(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Oktober 2012 (26.10.2012)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/143495 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
*A61K 47/48* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
*C07K 16/30* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/057243

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. April 2012 (20.04.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

| | | |
|---|---|---|
| 11163474.7 | 21. April 2011 (21.04.2011) | EP |
| 11163467.1 | 21. April 2011 (21.04.2011) | EP |
| 11163472.1 | 21. April 2011 (21.04.2011) | EP |
| 11163470.5 | 21. April 2011 (21.04.2011) | EP |
| 11168556.6 | 1. Juni 2011 (01.06.2011) | EP |
| 11168559.0 | 1. Juni 2011 (01.06.2011) | EP |
| 11168557.4 | 1. Juni 2011 (01.06.2011) | EP |
| 11168558.2 | 1. Juni 2011 (01.06.2011) | EP |
| 11193609.2 | 14. Dezember 2011 (14.12.2011) | EP |
| 11193623.3 | 14. Dezember 2011 (14.12.2011) | EP |
| 11193621.7 | 14. Dezember 2011 (14.12.2011) | EP |
| 11193618.3 | 14. Dezember 2011 (14.12.2011) | EP |

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH** [DE/DE]; Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim (DE). **BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Müller Straße 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **LERCHEN, Hans-Georg** [DE/DE]; Sürderstr. 3, 51375 Leverkusen (DE). **EL SHEIKH, Sherif** [DE/DE]; Kirchfeldstr. 8, 45219 Essen (DE). **BEIER, Rudolf** [DE/DE]; Kiautschoustr. 1, 13353 Berlin (DE). **BRUDER, Sandra** [DE/DE]; Beethovenstr. 33, 51375 Leverkusen (DE). **STELTE-LUDWIG, Beatrix** [DE/DE]; Görtzheide 10F, 42489 Wülfrath (DE). **JÖRIßEN, Hannah** [DE/DE]; Steinbeck 48, 45239 Essen (DE). **MAHLERT, Christoph** [DE/DE]; Kranichweg 11, 42111 Wuppertal (DE). **GREVEN, Simone** [DE/DE]; Am Schneckenacker 45, 41541 Dormagen (DE). **PETRUL, Heike** [DE/DE]; Richard-Sorge-Str. 72, 10249 Berlin (DE). **SCHUHMACHER, Joachim** [DE/DE]; Lipkenskothen 31, 42113 Wuppertal (DE). **LINDEN, Lars** [DE/DE]; Bruchstr. 72, 40235 Düsseldorf (DE). **WILLUDA, Jörg** [DE/DE]; Staerkstr. 47a, 16548 Glienicke/Nordbahn (DE). **KOPITZ, Charotte, Christine** [DE/DE]; Brahestr. 21, 10589 Berlin (DE). **GOLFIER, Sven** [DE/DE]; Reutlinger Str. 7a, 12247 Berlin (DE). **HEISLER, Iring** [DE/DE]; Friedenshort 45b, 42369 Wuppertal (DE). **HARRENGA, Axel** [DE/DE]; Sadowastr. 17, 42115 Wuppertal (DE). **THIERAUCH, Karl-Heinz** [DE/DE]; Hochwildpfad 45, 14169 Berlin (DE). **BORKOWSKI, Sandra** [DE/DE]; Käthestr. 9, 16540 Hohen Neuendorf (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**; Creative Campus Monheim, Alfred-Nobel-Str. 10, Geb. 4865, 40789 Monheim am Rhein (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

(54) Title: NOVEL BINDER-DRUG CONJUGATES (ADCS) AND THEIR USE

(54) Bezeichnung : NEUE BINDER-WIRKSTOFF KONJUGATE (ADCS) UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The present application relates to novel, anti-Target Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, GeneID1956) binder-drug conjugates (ADCs) of N,N-dialkyl auristatins, to effective metabolites of said ADCs, to methods for producing said ADCs, to the use of said ADCs for treating and/or preventing diseases, and to the use of said ADCs for producing pharmaceuticals for treating and/or preventing diseases, in particular hyperproliferative and/or angiogenic diseases, such as cancers. Such treatments can be carried out as monotherapy or in combination with other pharmaceuticals or additional therapeutic measures.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Anmeldung betrifft neue, gegen das Target Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, GeneID1956) gerichtete Binder- Wirkstoff-Konjuagte (ADCs) von N,N-Dialkylauristatinen, 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.

WO 2012/143495 A2

**Veröffentlicht**:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

**Neue Binder-Wirkstoff Konjugate (ADCs) und ihre Verwendung**

Die vorliegende Anmeldung betrifft neue Binder-Wirkstoff-Konjuagte (ADCs) von N,N-Dialkylauristatinen, insbesondere solche, die gegen das Target Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, GeneID1956) gerichtet sind, wirksame 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.

Die meisten der heutzutage parenteral applizierten Chemotherapeutika sind oft nicht zielgerichtet auf das Tumorgewebe oder die Tumorzellen, sondern durch die systemische Gabe unspezifisch im Körper verteilt, d.h. auch an Orten, an denen eine Wirkstoffexposition unerwünscht ist, wie beispielsweise in gesunden Zellen, Geweben und Organen. Dies kann zu unerwünschten Nebenwirkungen bis hin zu gravierenden allgemein-toxischen Effekten führen, die dann den therapeutisch nutzbaren Dosisbereich des Wirkstoffs oftmals stark limitieren oder ein völliges Absetzen der Medikation erfordern.

Die verbesserte und selektive Verfügbarkeit dieser Chemotherapeutika in der Tumorzelle oder dem direkt umgebenden Gewebe und die damit verbundene Wirksteigerung einerseits und Minimierung toxischer Nebeneffekte andererseits steht daher seit mehreren Jahren im Fokus bei der Entwicklung neuer Chemotherapeutika. Viele Versuche wurden bislang unternommen, effiziente Methoden für die Wirkstoffeinbringung in die Zielzelle zu entwickeln. Die Optimierung der Assoziation zwischen

Wirkstoff und intrazellulärem Ziel und die Minimierung der interzellulären Wirkstoffverteilung, beispielsweise zu Nachbarzellen, stellen jedoch nach wie vor eine schwierige Aufgabe dar.

Für die zielgerichtete Adressierung von Tumorgewebe und Tumorzellen sind beispielsweise monoklonale Antikörper geeignet. Die Bedeutung solcher Antikörper für die klinische Behandlung von Krebserkrankungen hat allgemein in den letzten Jahren erheblich zugenommen, basierend auf der Wirksamkeit solcher Agenzien wie Trastuzumab (Herceptin), Rituximab (Rituxan), Cetuximab (Erbitux) und Bevacizumab (Avastin), welche inzwischen für die Therapie einzelner, spezifischer Tumorerkrankungen zugelassen sind [siehe z.B. G. P. Adams und L. M. Weiner, *Nat. Biotechnol.* 23, 1147-1157 (2005)]. In Folge hiervon ist auch das Interesse an so genannten Immunokonjugaten wie bspw. den oben genannten ADCs deutlich gestiegen, 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)].

Statt Antikörpern können auch Binder aus dem Wirkstoffbereich kleiner Moleküle als Binder verwendet werden, die selektiv an einen speziellen Zielort ("target"), wie beispielsweise an einen Rezeptor, binden [siehe z.B. E. Ruoslahti *et al.*, *Science* 279, 377-380 (1998); D. Karkan *et al.*, PLoS ONE 3 (6), e2469 (June 25, 2008)]. Bekannt sind auch Konjugate aus cytotoxischem Wirkstoff und adressierendem Ligand, die zwischen Ligand und Wirkstoff eine definierte Spaltstelle zur Freisetzung des Wirkstoffs aufweisen. Eine solche "Soll-Bruchstelle" kann beispielsweise in einer Peptidkette bestehen, die an einer bestimmten Stelle selektiv durch ein spezielles Enzym am Wirkort gespalten werden kann [siehe z.B. R. A. Firestone und L. A. Telan, US Patent Application US 2002/0147138].

Für die zielgerichtete Adressierung von Tumorgewebe und Tumorzellen sind insbesondere monoklonale Antikörper geeignet, insbesondere solche, die gegen das Target EGFR gerichtet sind. Beim “Epidermal Growth Factor Receptor “(EGFR, GeneID1956) handelt es sich um ein trans-Membran Glykoprotein (170 kDa), das zur Subfamilie der Tyrosinkinasen gehört. Obwohl der EGF-Rezeptor in vielen normalen Zellen exprimiert wird, erfolgt eine Überexpression in vielen humanen

Krebsarten, u.a. bei Darm – und Dickdarmkrebs, Kopf- und Halskarzinomen, Pankreaskarzinomen oder Gliomen. Das Ausmaß der Überexpression korreliert mit einer schlechten Prognose (Galizia G, et al., Ann Surg Oncol. 2006 Jun;13(6) 823-35).

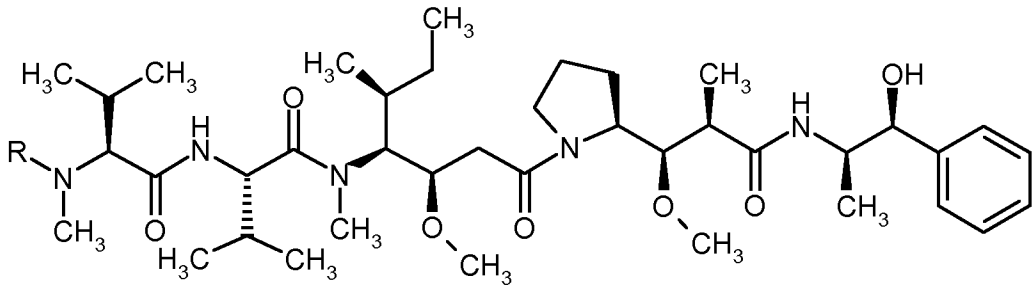
Die Bindung des Liganden EGF an den EGF-Rezeptor führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domänen. Die Kinase-Domänen autophosphorylieren sich und aktivieren damit pro-proliferative Signalkaskaden (einschließlich über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) und Akt). Diese Signalkaskaden regulieren die Transkription von Genen, die am Zellwachstum und Zellüberleben, an Motilität und Proliferation beteiligt sind.

Die Signaltransduktion durch den EGF-Rezeptor führt zur auch zur Aktivierung des Wild-Typ-KRAS Gens, die Anwesenheit einer aktivierenden somatischen Mutation im KRAS Gen innerhalb einer Krebszelle führt allerdings zu einer Dysregulation der Signalwege und zur Resistenz gegenüber EGFR –inhibitorischen Therapien (Allegra et al. J Clin Oncol. 2009 Apr 20;27(12):2091-6).

Bei einem ADC-Ansatz kann zusätzlich zur Hemmung der Interaktion zwischen Liganden und Rezeptor ein zusätzlicher anti-Tumor-Effekt durch das angehängte zytotoxische Agens erreicht werden.

Die folgenden Veröffentlichungen beschreiben im Allgemeinen den EGF Rezeptor und anti EGF-R Antikörper: WO-00069459-A1, WO-2010145796-A2, WO-02100348-A2, EP-00979246-B1, EP-00531472-B1, Mendelsohn J, Baselga J., Oncogene (2000) 19, 6550 – 6565, M.L. Janmaat and G. Giaccone, Drugs of Today, Vol. 39, Suppl. C, 2003, pp. 61-80, Normanno N, et al., Gene. 2006 Jan 17;366(1):2-16 Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer)

Auristatin E (AE) und Monomethylauristatin E (MMAE) sind synthetische Analoga der Dolastatine, einer speziellen Gruppe von linearen Pseudopeptiden, welche ursprünglich aus marinen Quellen isoliert wurden und die zum Teil sehr potente cytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen aufweisen [für eine Übersicht siehe z.B. G. R. Pettit, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70, 1-79 (1997); G. R. Pettit *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 10, 529-544 (1995); G. R. Pettit *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 13, 243-277 (1998)].



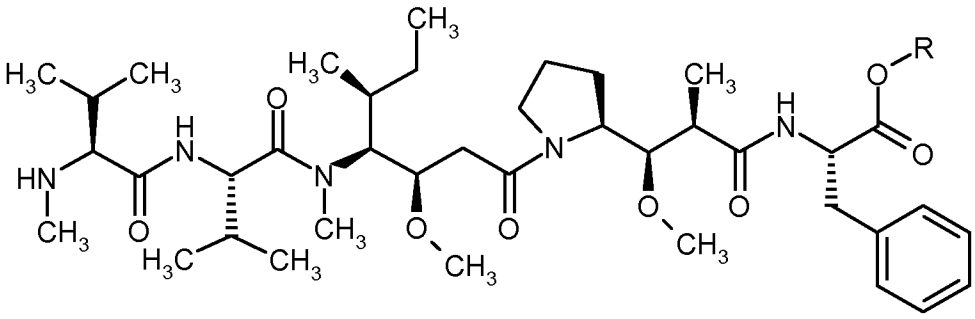
Auristatin E (AE): R = $CH_3$

Monomethylauristatin E (MMAE): R = H

Allerdings besitzt MMAE den Nachteil einer vergleichsweise hohen systemischen Toxizität. Zur Verbesserung der Tumorselektivität wird MMAE insbesondere in Verbindung mit enzymatisch spaltbaren Valin-Citrullin-Linkern im ADC-Setting zur gezielteren Tumortherapie eingesetzt [WO 2005/081711-A2; S. O. Doronina *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 17, 114-124 (2006)]. Nach proteolytischer Spaltung wird MMAE vorzugsweise intrazellulär aus entsprechenden ADCs freigesetzt.

MMAE ist jedoch bei einer Anwendung in Form von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs) nicht kompatibel mit Verknüpfungseinheiten (Linkern) zwischen Antikörper und Wirkstoff, welche keine enzymatisch spaltbare Soll-Bruchstelle aufweisen [S. O. Doronina *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 17, 114-124 (2006)].

Monomethylauristatin F (MMAF) ist ein Auristatin-Derivat mit einer C-terminalen Phenylalanin-Einheit, das nur moderate anti-proliferative Wirkung im Vergleich zu MMAE aufweist. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die freie Carboxylgruppe zurückzuführen, die aufgrund ihrer Polarität und Ladung die Zellgängigkeit dieser Verbindung negativ beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurde der Methylester von MMAF (MMAF-OMe) als ein neutral geladenes, zellgängiges Prodrug-Derivat beschrieben, das im Vergleich zu MMAF eine um mehrere Größenordnungen erhöhte *in vitro*-Cytotoxizität gegenüber verschiedenen Karzinoma-Zelllinien zeigt [S. O. Doronina *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 17, 114-124 (2006)]. Es ist anzunehmen, dass diese Wirkung durch MMAF selbst hervorgerufen wird, das nach Aufnahme des Prodrugs in die Zellen schnell durch intrazelluläre Ester-Hydrolyse freigesetzt wird.



Monomethylauristatin F (MMAF): R = H

Monomethylauristatin F-methylester (MMAF-OMe): R = $CH_3$

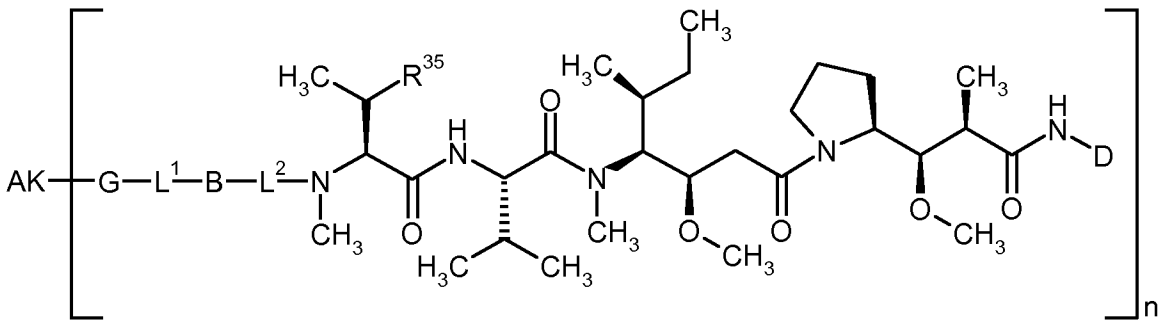
Wirkstoff-Verbindungen auf Basis von einfachen Ester-Derivaten unterliegen allgemein jedoch dem Risiko einer chemischen Instabilität infolge einer unspezifischen, vom vorgesehenen Wirkort unabhängigen Ester-Hydrolyse, beispielsweise durch im Blutplasma vorhandene Esterasen; dies kann die Anwendbarkeit solcher Verbindungen in der Therapie deutlich einschränken.

Monomethylauristatin F (MMAF) sowie verschiedene Ester- und Amid-Derivate hiervon wurden in WO 2005/081711-A2 offenbart. Weitere Auristatin-Analoga mit einer C-terminalen, amidisch substituierten Phenylalanin-Einheit sind in WO 01/18032-A2 beschrieben. In WO 02/088172-A2 und WO 2007/008603-A1 werden MMAF-Analoga beansprucht, welche Seitenketten-Modifikationen des Phenylalanins betreffen, und in WO 2007/008848-A2 solche, in denen die Carboxylgruppe des Phenylalanins modifiziert ist. Über den C-Terminus verknüpfte Auristatin-Konjugate wurden vor kurzem in WO 2009/117531-A1 beschrieben [siehe auch S. O. Doronina *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 19, 1960-1963 (2008)].

Darüber hinaus sind Auristatin-Derivate wie MMAE und MMAF auch Substrate für Transporterproteine, welche von vielen Tumorzellen exprimiert werden, was zu einer Resistenzentwicklung gegenüber diesen Wirkstoffen führen kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung neuer Binder-Wirkstoff-Konjugate (ADCs), die durch Kombination von neuen N,N-Dialkylauristatin-Derivaten mit neuartigen, geeigneten Linkern und Binder ein sehr attraktives Wirkprofil, wie beispielsweise hinsichtlich ihrer spezifischen Tumorwirkung und/oder des geringeren Potentials der intrazellulär gebildeten Metabolite als Substrat gegenüber Transporterproteinen, aufweisen, und sich daher zur Behandlung und/oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen, wie beispielsweise Krebserkrankungen, eignen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia)



(Ia),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für einen Binder steht, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

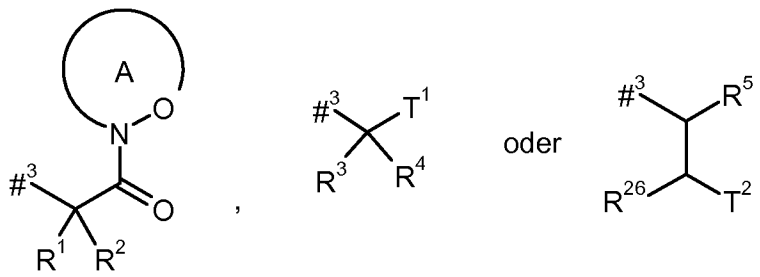
die Gruppe §-G-$L^1$-B-$L^2$-§§ für einen Linker steht,

wobei

§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

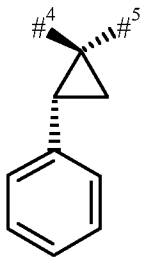
$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-

aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

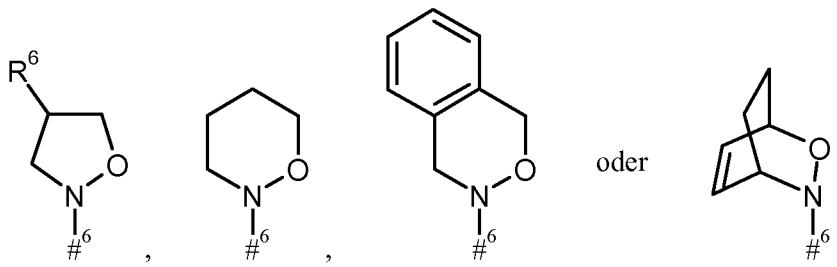



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

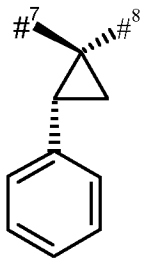
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

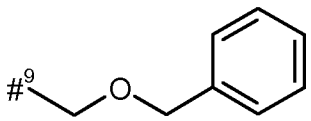
oder

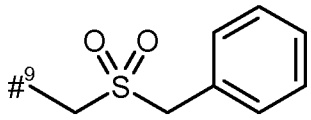
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

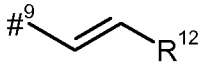
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

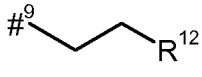
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

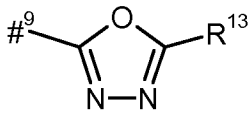


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Erfindungsgemäße Verbindungen sind die Verbindungen der Formel (I) und deren Salze, Solvate und Solvate der Salze, die von Formel (I) umfassten Verbindungen der nachfolgend genannten Formeln und deren Salze, Solvate und Solvate der Salze sowie die von Formel (I) umfassten, nachfolgend als Ausführungsbeispiele genannten Verbindungen und deren Salze, Solvate und Solvate der Salze, soweit es sich bei den von Formel (I) umfassten, nachfolgend genannten Verbindungen nicht bereits um Salze, Solvate und Solvate der Salze handelt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in Abhängigkeit von ihrer Struktur in unterschiedlichen stereoisomeren Formen existieren, d.h. in Gestalt von Konfigurationsisomeren oder gegebenenfalls auch als Konformationsisomere (Enantiomere und/oder Diastereomere, einschließlich sol-

cher bei Atropisomeren). Die vorliegende Erfindung umfasst deshalb die Enantiomeren und Diastereomeren und ihre jeweiligen Mischungen. Aus solchen Mischungen von Enantiomeren und/ oder Diastereomeren lassen sich die stereoisomer einheitlichen Bestandteile in bekannter Weise isolieren; vorzugsweise werden hierfür chromatographische Verfahren verwendet, insbesondere die HPLC-Chromatographie an achiraler bzw. chiraler Phase.

Sofern die erfindungsgemäßen Verbindungen in tautomeren Formen vorkommen können, umfasst die vorliegende Erfindung sämtliche tautomere Formen.

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 Ausführungsform 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).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung haben die Substituenten, soweit nicht anders spezifiziert, die folgende Bedeutung:

$(C_1$-$C_4)$-Alkyl stehen im Rahmen der Erfindung für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien genannt: Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Isopropyl, *n*-Butyl, Isobutyl, 1-Methylpropyl und *tert.*-Butyl.

Alkandiyl steht im Rahmen der Erfindung für einen linearen, 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).

($C_3$-$C_7$)-Cycloalkyl bzw. 3- bis 7-gliedriger Carbocyclus steht im Rahmen der Erfindung für eine monocyclische, gesättigte Cycloalkylgruppe mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien genannt: Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl und Cycloheptyl.

Die Seitengruppe einer α-Aminosäure in der Bedeutung von $R^{19}$ umfasst sowohl die Seitengruppen der natürlich vorkommenden α-Aminosäuren als auch die Seitengruppen von Homologen und Isomeren dieser α-Aminosäuren. Die α-Aminosäure kann hierbei sowohl in der L- als auch in der D-Konfiguration oder auch als Gemisch der L- und D-Form vorliegen. Als Seitengruppen seien beispielhaft genannt: Methyl (Alanin), Propan-2-yl (Valin), Propan-1-yl (Norvalin), 2-Methylpropan-1-yl (Leucin), 1-Methylpropan-1-yl (Isoleucin), Butan-1-yl (Norleucin), *tert.*-Butyl (2-*tert.*-Butylglycin), Phenyl (2-Phenylglycin), Benzyl (Phenylalanin), p-Hydroxybenzyl (Tyrosin), Indol-3-ylmethyl (Tryptophan), Imidazol-4-ylmethyl (Histidin), Hydroxymethyl (Serin), 2-Hydroxyethyl (Homoserin), 1-Hydroxyethyl (Threonin), Mercaptomethyl (Cystein), Methylthiomethyl (*S*-Methylcystein), 2-Mercaptoethyl (Homocystein), 2-Methylthioethyl (Methionin), Carbamoylmethyl (Asparagin), 2-Carbamoylethyl (Glutamin), Carboxymethyl (Asparaginsäure), 2-Carboxyethyl (Glutaminsäure), 4-Aminobutan-1-yl (Lysin), 4-Amino-3-hydroxybutan-1-yl (Hydroxylysin), 3-Aminopropan-1-yl (Ornithin), 2-Aminoethyl (2,4-Diaminobuttersäure), Aminomethyl (2,3-Diaminopropionsäure), 3-Guanidinopropan-1-yl (Arginin), 3-Ureidopropan-1-yl (Citrullin). Bevorzugte α-Aminosäure-Seitengruppen in der Bedeutung von $R^{19}$ sind Methyl (Alanin), Propan-2-yl (Valin), 2-Methylpropan-1-yl (Leucin), Benzyl (Phenylalanin), Imidazol-4-ylmethyl (Histidin), Hydroxymethyl (Serin), 1-Hydroxyethyl (Threonin), 4-Aminobutan-1-yl (Lysin), 3-Aminopropan-1-yl (Ornithin), 2-Aminoethyl (2,4-Diaminobuttersäure), Aminomethyl (2,3-Diaminopropionsäure), 3-Guanidinopropan-1-yl (Arginin). Bevorzugt ist jeweils die L-Konfiguration.

Ein 4- bis 7-gliedriger Heterocyclus steht im Rahmen der Erfindung für einen monocyclischen, gesättigten Heterocyclus mit insgesamt 4 bis 7 Ringatomen, der 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. Bevorzugt ist ein 5- bis 7-gliedriger Heterocyclus mit ein oder zwei Ring-Heteroatomen aus der Reihe N, O und/oder S, besonders bevorzugt ein 5- oder 6-gliedriger Heterocyclus mit ein oder zwei Ring-Heteroatomen aus der Reihe N und/oder O. Beispielhaft seien genannt: Azetidinyl, Oxetanyl, Pyrrolidinyl, Pyrazolidinyl, Tetrahydrofuranyl, Thiolanyl, Piperidinyl, Piperazinyl, Tetrahydropyranyl, Tetrahydrothiopyranyl, Morpholinyl, Thiomorpholinyl, Hexahydroazepinyl und Hexahydro-1,4-diazepinyl. Bevorzugt sind Pyrrolidinyl, Tetrahydrofuranyl, Piperidinyl, Piperazinyl, Tetrahydropyranyl und Morpholinyl.

In der Formel der Gruppe, für die A, B, D, G, $L^1$, $L^2$, $L^4$, $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ bzw. $R^5$ stehen kann, steht der Endpunkt der Linie, an dem das Zeichen $\#^6$, *, **, $\#^3$, $\#^1$, $\#^2$, $\#\#^1$, $\#\#^2$, $\#\#^3$, $\#\#^4$, ***, ****, $\#^4$, $\#^5$, $\#^6$, $\#^7$, $\#^8$

bzw. #[9] steht, nicht für ein Kohlenstoffatom beziehungsweise eine $CH_2$-Gruppe, sondern ist Bestandteil der Bindung zu dem jeweils bezeichneten Atom, an das A, B, D, G, $L^1$, $L^2$, $L^4$, $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ bzw. $R^5$ gebunden ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung gilt, dass für alle Reste, die mehrfach auftreten, deren Bedeutung unabhängig voneinander ist. Wenn Reste in den erfindungsgemäßen Verbindungen substituiert sind, können die Reste, soweit nicht anders spezifiziert, ein- oder mehrfach substituiert sein. Eine Substitution mit einem oder mit zwei gleichen oder verschiedenen Substituenten ist bevorzugt. Besonders bevorzugt ist die Substitution mit einem Substituenten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung haben die verwendeten Begriffe, soweit nicht anders spezifiziert, die folgende Bedeutung:

Der Begriff „Linker“ wird im breitesten Sinne als eine chemische Einheit verstanden, die eine kovalente Bindung oder eine Anreihung von Atomen umfasst, die einen Binder an einen Wirkstoff kovalent knüpft. Vorzugsweise wird der Begriff „Linker“ als eine Anreihung von Atomen im Sinne der vorliegenden Erfindung verstanden, die einen Binder an einen Wirkstoff kovalent knüpft. Darüber hinaus können Linker beispielsweise divalente chemische Einheiten, wie Alkyldiyle, Aryldiyle, Heteroaryldiyle, Heterocyclyldiyle, Dicarbonylsäureester, Dicarbonylsäureamide darstellen.

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.

Als Binder sind erfindungsgemäß bevorzugt (insbesondere humane oder humanisierte, monoklonale) Antikörper oder Antigen-bindende Antikörperfragmente, die an EGFR binden. Im Falle von Antikörpern wie z.B. anti-EGFR-Antikörpern ist n, also die Anzahl an Toxophormolekülen pro Antikörpermolekül, vorzugsweise in dem Bereich von 1 bis 10, besonders bevorzugt 2 bis 8.

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 Zelllmembran 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. Aus der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der kovalenten Kopplung (Konjugation) von organischen Molekülen an Antikörper bekannt. 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). 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. 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. Kanninchen, 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 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 Immulological 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. WO93/17715; 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 Disulfid-Interaktionen, die zwischen den Ch1 und den CL Domänen stattfindet, reduziert oder oder komplett verhindert werden kann.

„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 der 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 erfolgen). Jedoch wird ein Antikörper normalerweise durch mindestens einen Reinigungsschritt 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.

Antikörper, welche spezifisch gegen ein Krebszell-Antigen 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.

Die Verbindungen der Formel (I) stellen eine Untergruppe der Verbindungen der Formel (Ia) dar.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

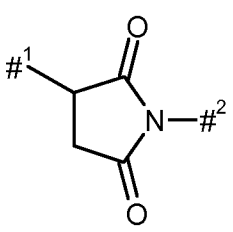
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

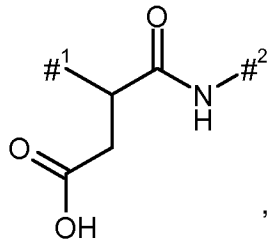
wobei

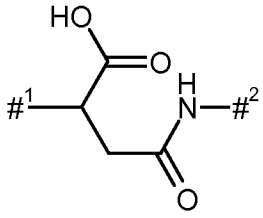
$AK_1$ für einen Binder (vorzugsweise für einen chimärer, humanisierter oder humaner Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper), der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

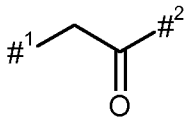
$AK_2$ für einen Binder (vorzugsweise für einen chimärer, humanisierter oder humaner Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper), der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



,


,



oder 


steht, wobei

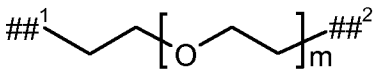
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

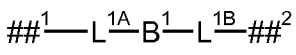
$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^1$ kennzeichnet,

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



oder 


steht, wobei

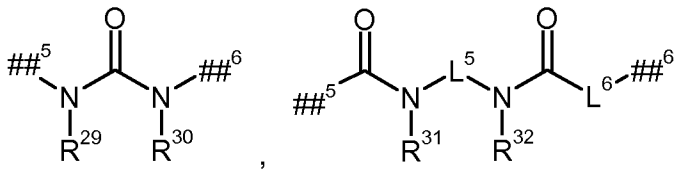
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

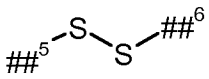
$\#\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



oder 

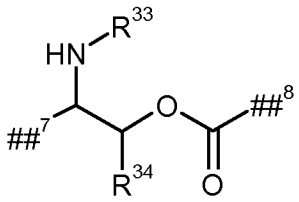
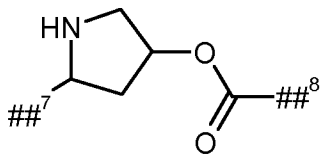
steht, worin

## $^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## $^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder $(C_2$-$C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, worin

## $^7$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## $^8$ die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, $(C_1$-$C_4)$-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

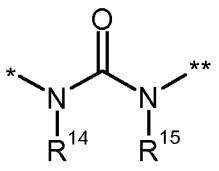
und

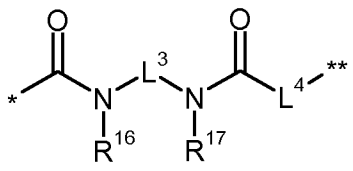
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

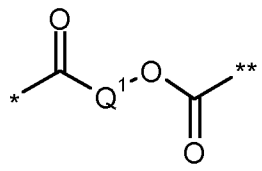
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

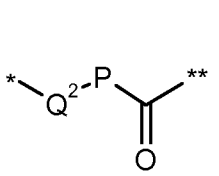
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

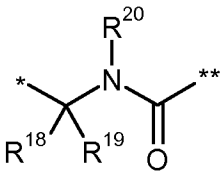


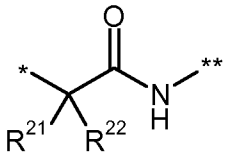
,


,


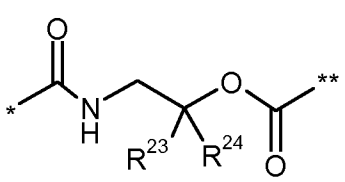
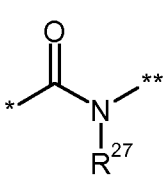
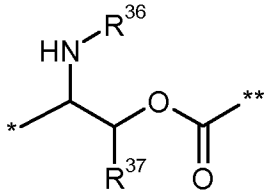
,

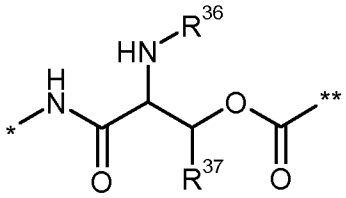


,


,


,

oder 

steht, wobei

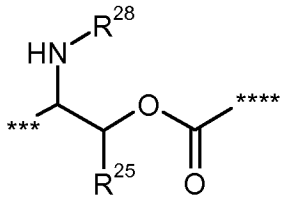
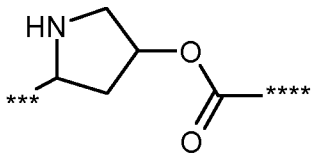
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder $(C_2$-$C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder 

steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, $(C_1$-$C_4)$-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

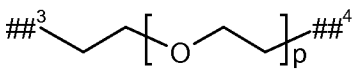
$R^{36}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxy carbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

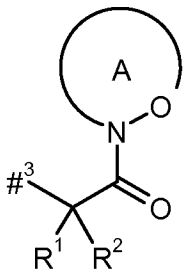
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

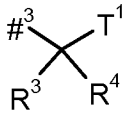
wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

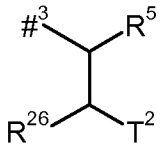
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

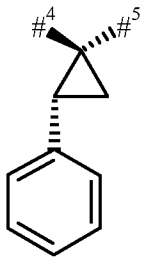
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

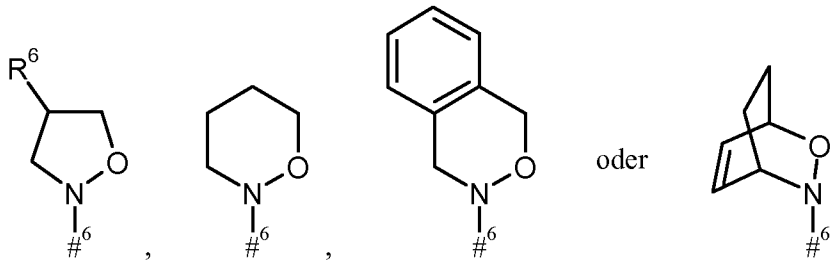



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

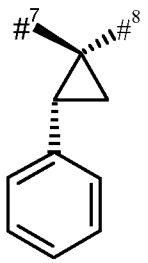
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

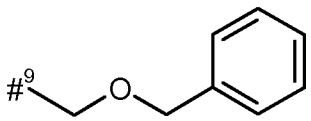
oder

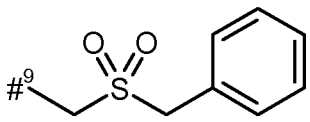
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

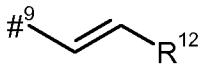
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

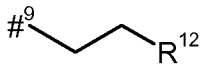
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

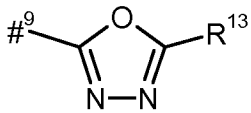


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für einen Binder steht, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

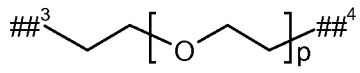
die Gruppe §-G-$L^1$-B-§§ für einen Linker steht,

wobei

§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

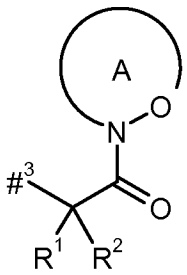
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

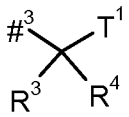
wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

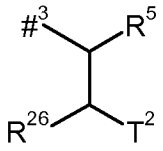
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

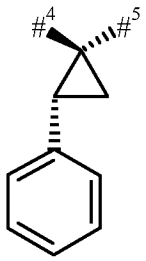
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

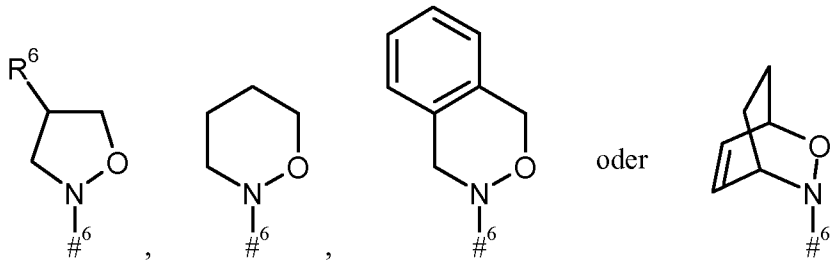



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

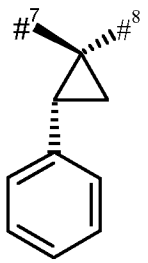
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

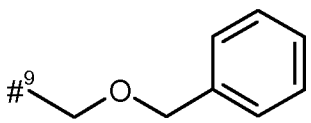
oder

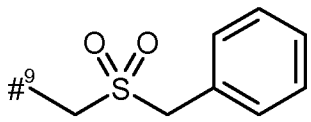
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

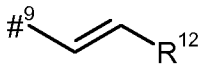
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

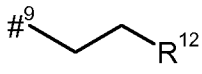
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

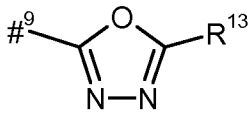


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

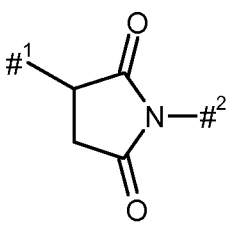
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

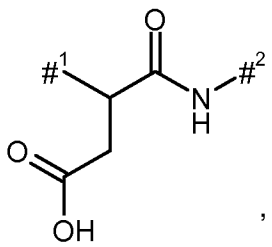
wobei

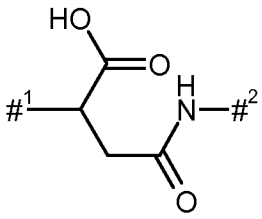
$AK_1$ für einen Binder (vorzugsweise für einen chimärer, humanisierter oder humaner Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper), der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

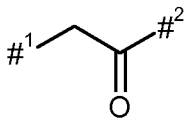
$AK_2$ für einen Binder (vorzugsweise für einen chimärer, humanisierter oder humaner Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper), der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, wobei

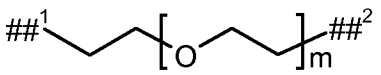
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

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

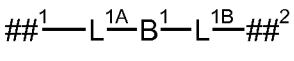
oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

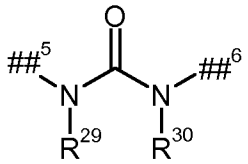
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

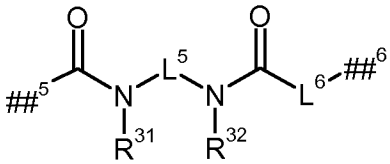
##2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

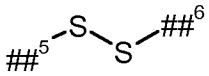
$B^1$ für eine Gruppe der Formel




,




oder



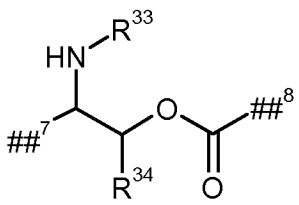

steht, worin

## 5 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

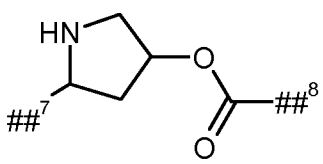
## 6 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

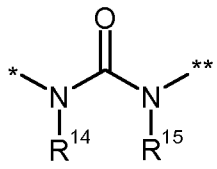
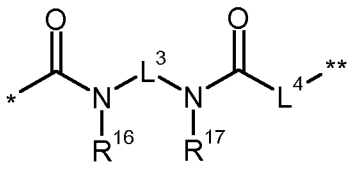
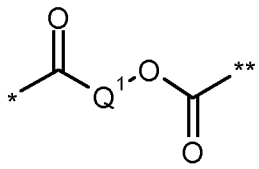
und

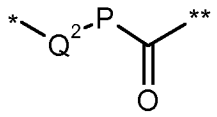
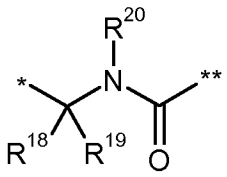
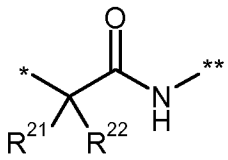
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

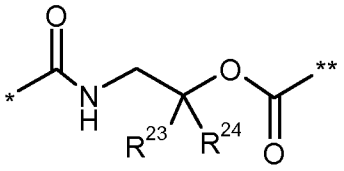
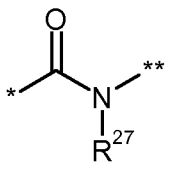
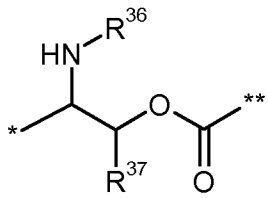
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,

,


,

,

,


,

oder


steht, wobei

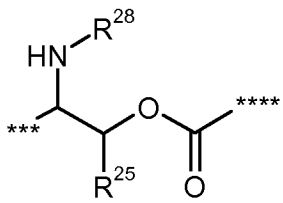
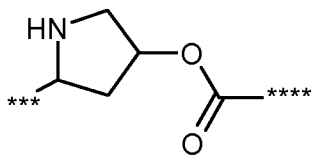
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder $(C_2\text{-}C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

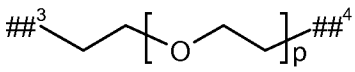
$R^{36}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

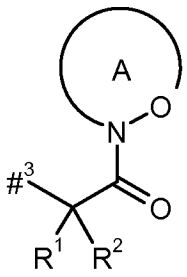
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

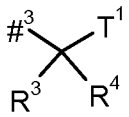
wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

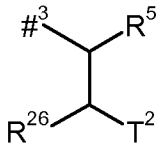
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

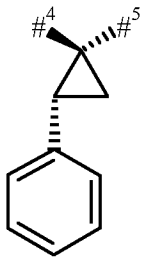
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

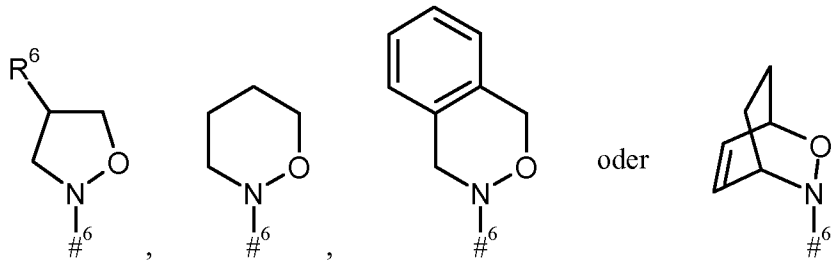



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

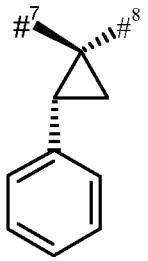
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

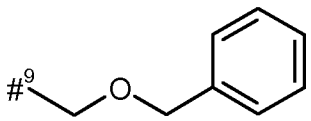
oder

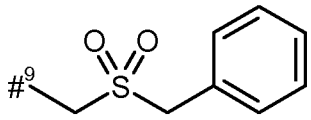
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

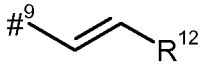
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

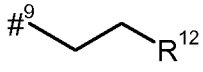
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

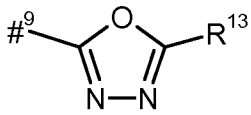


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

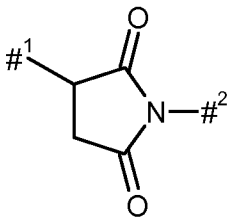
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

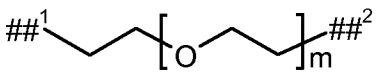
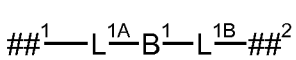
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

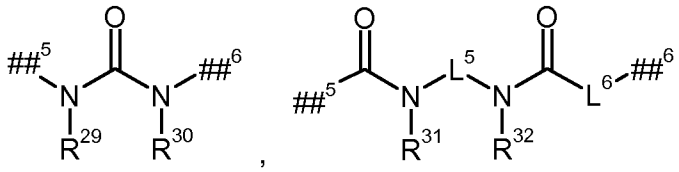
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

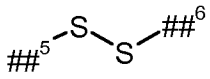
##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



oder



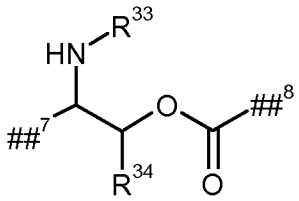
steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

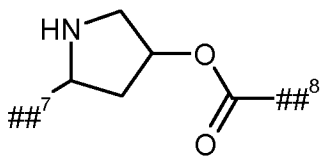
## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder



steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

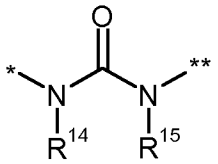
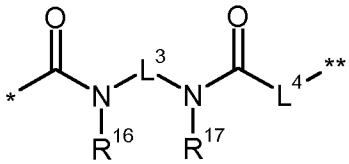
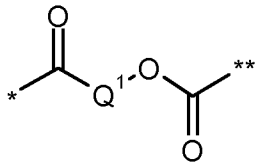
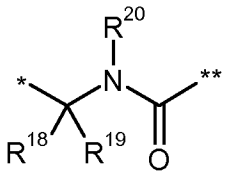
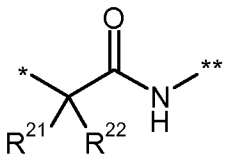
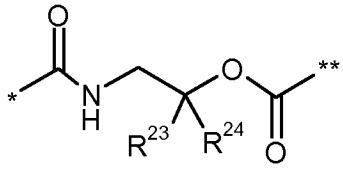
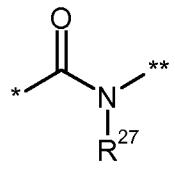
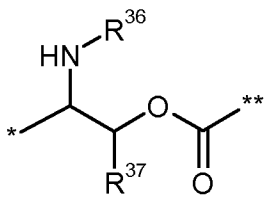
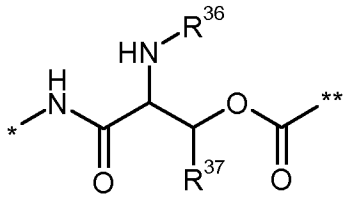
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel









oder


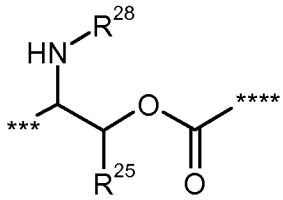
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

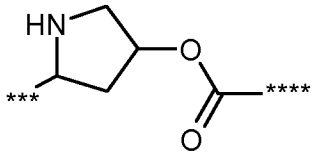
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff steht,

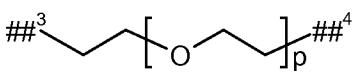
$R^{36}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

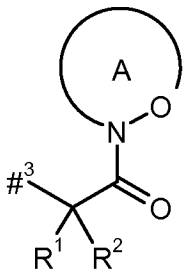
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

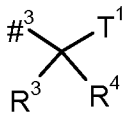
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

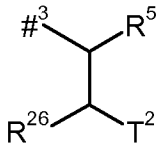
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

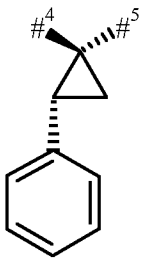
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

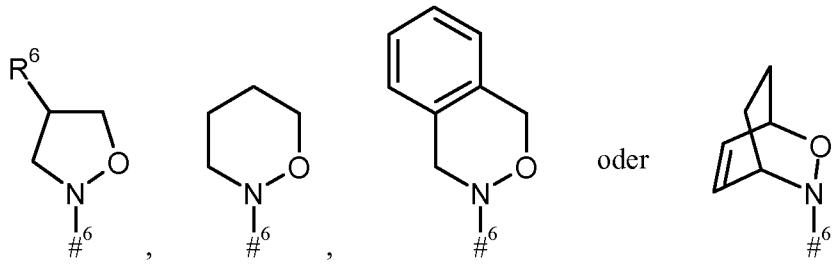



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

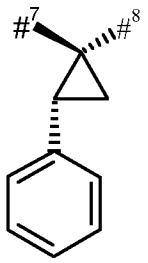
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-yl-methyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

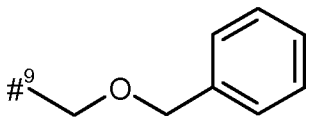
oder

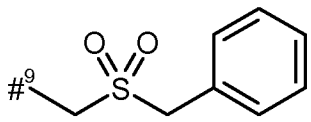
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

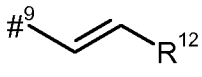
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

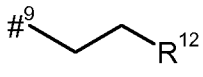
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

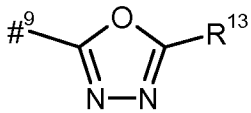


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

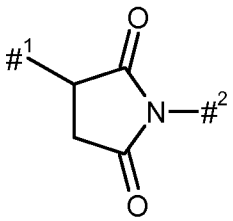
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

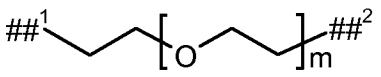
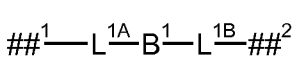
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

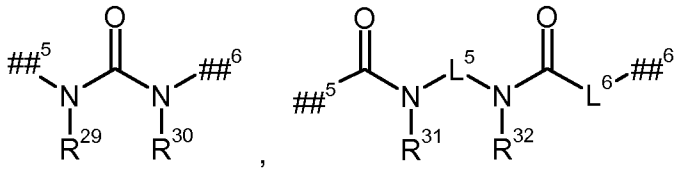
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

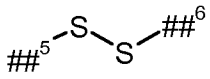
##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



oder



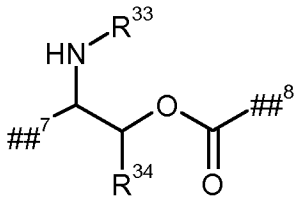
steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

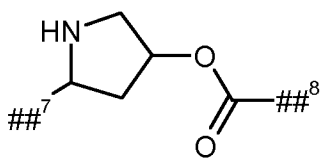
## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder



steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

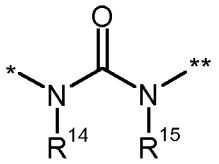
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

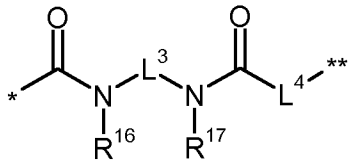
$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

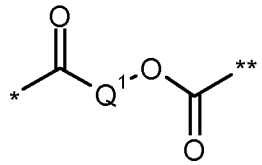
und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

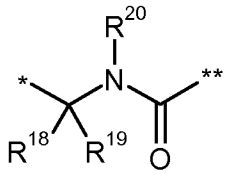
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

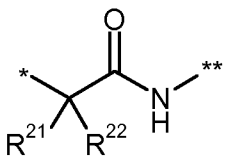


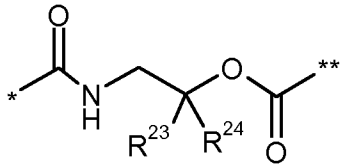
,


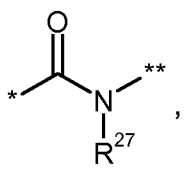
,


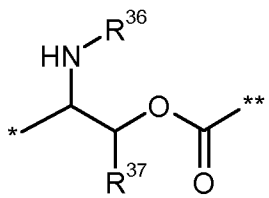
,



,


,


,
oder


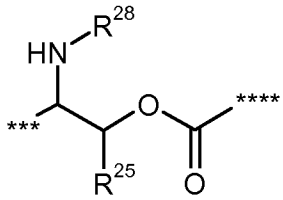

steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

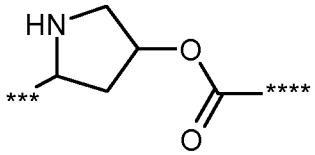
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

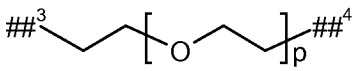
$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff steht,

$R^{36}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

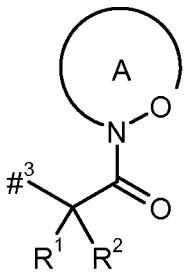
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

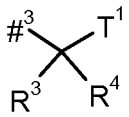
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

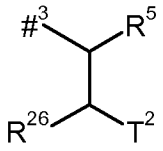
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

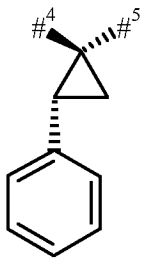
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

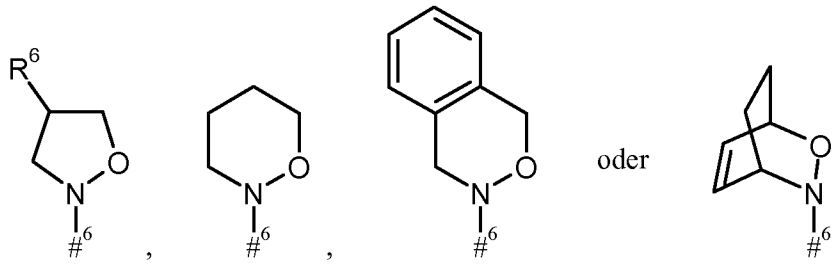



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

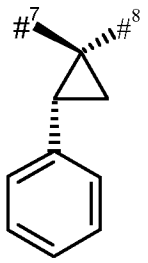
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-yl-methyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

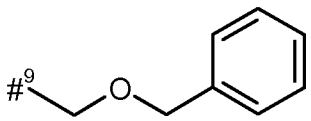
oder

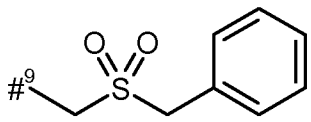
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

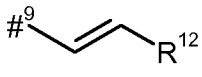
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

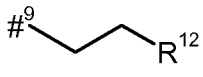
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

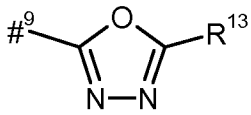


,


,



,


oder



steht, worin

#9 die Verknüpfungsstelle mit –CHC($R^{26}$)-$T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $–S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

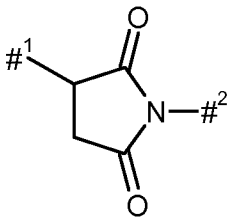
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

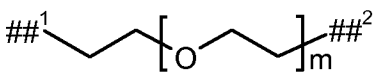
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel




steht, wobei

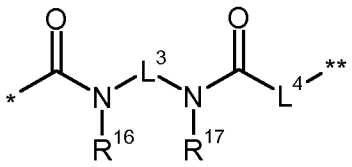
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

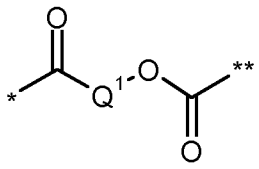
## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

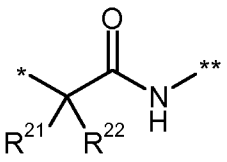
wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

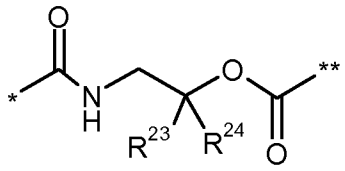
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



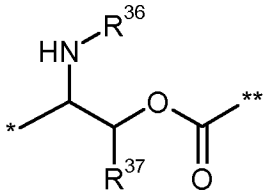
,


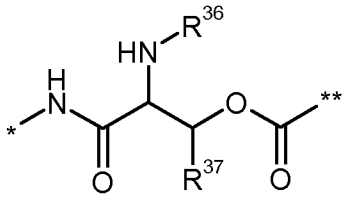
,



,


,



oder


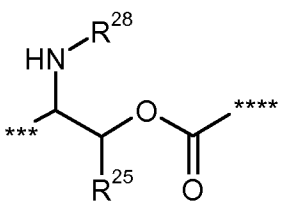

steht, wobei

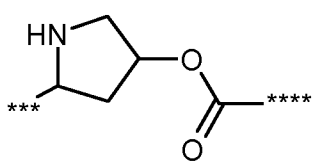
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

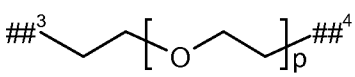
$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$R^{36}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



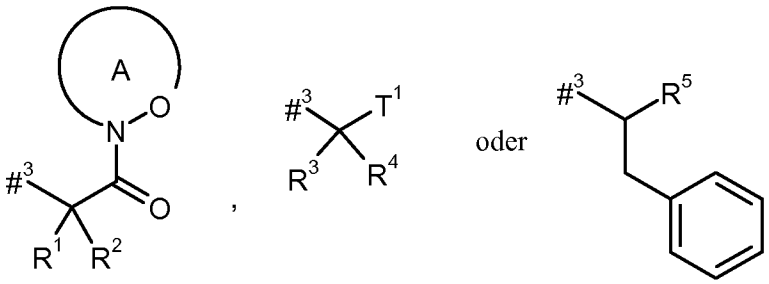
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##[4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

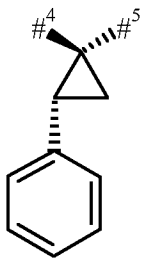
#[3] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

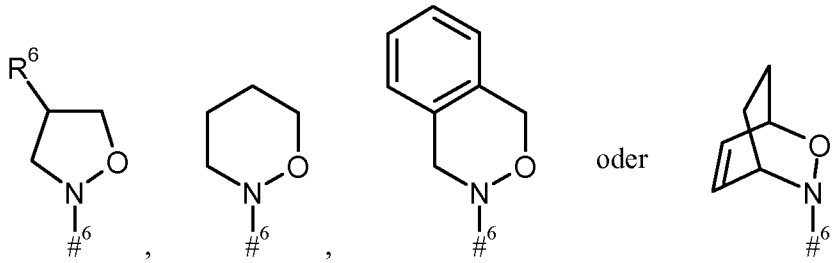


bilden, worin

#[4] die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

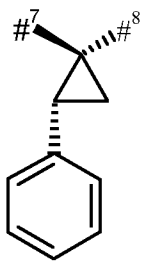
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

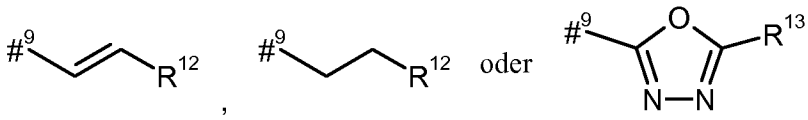
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

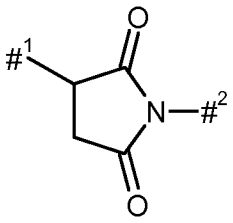
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

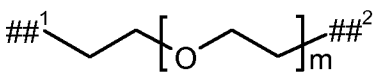
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel




steht, wobei

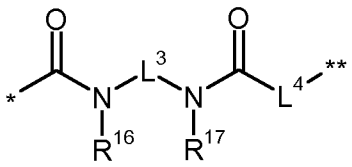
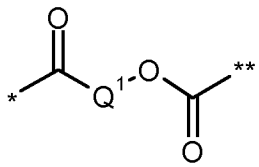
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

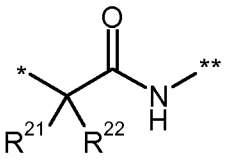
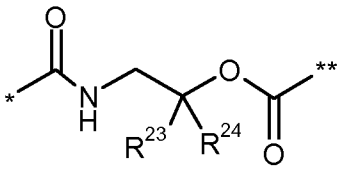
## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,


oder


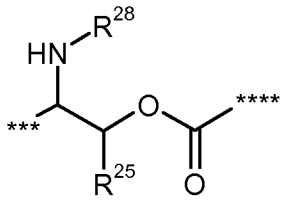
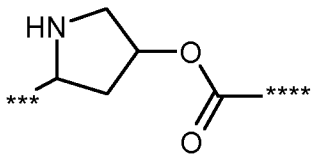
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

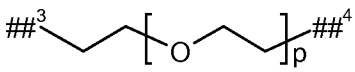
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



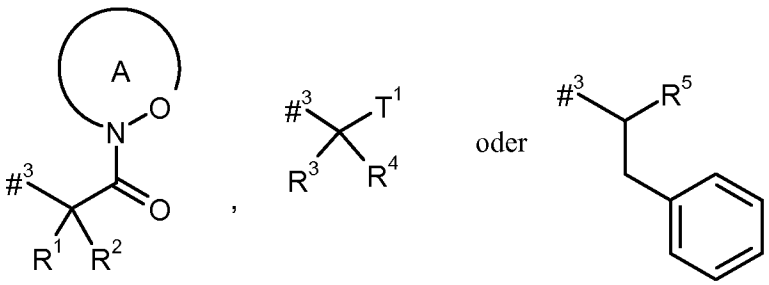

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

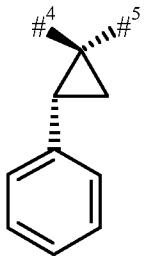
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

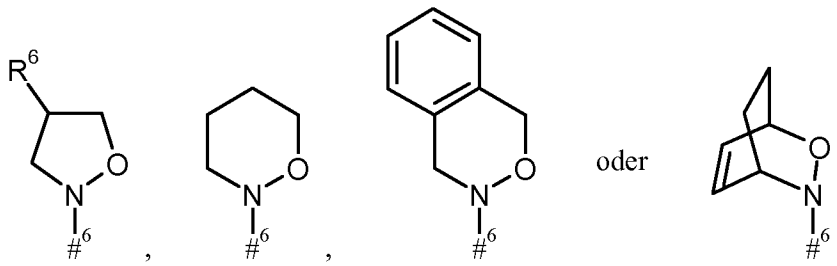



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

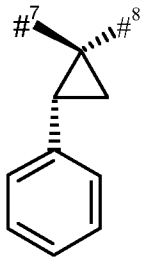
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

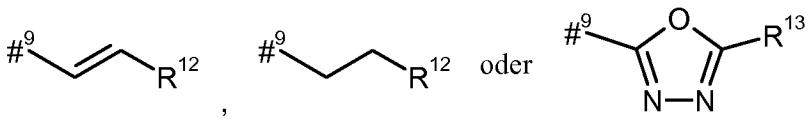
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel




steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

AK für $AK_2$ steht

wobei

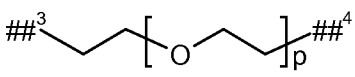
$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



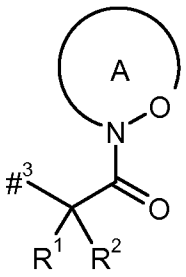

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

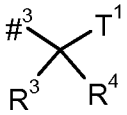
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$\#\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

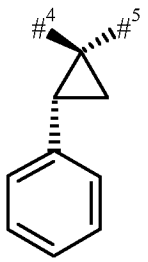
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

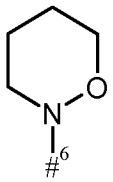



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

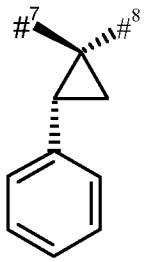
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff oder Benzyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

AK für $AK_2$ steht,

wobei

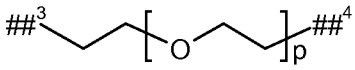
$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



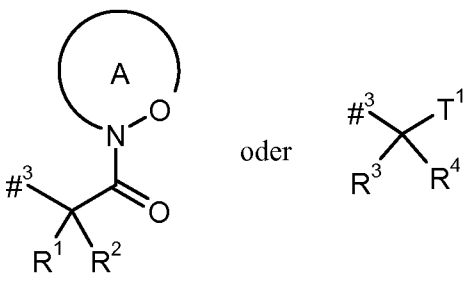

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder

steht, wobei

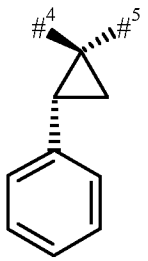
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

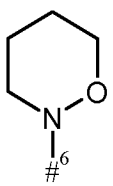



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

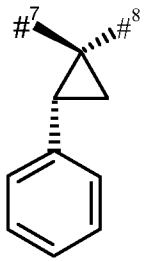
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff oder Benzyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

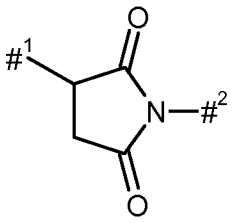
n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

AK für $AK_1$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel

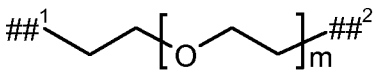


steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

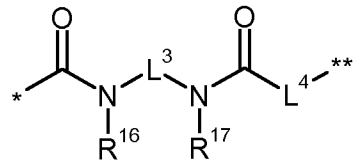
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



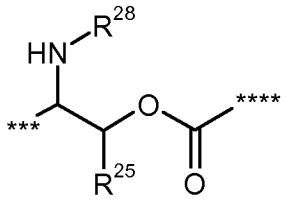
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

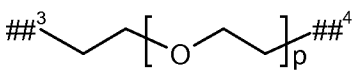
$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



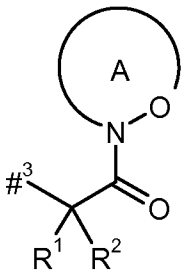

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

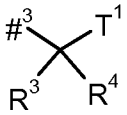
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

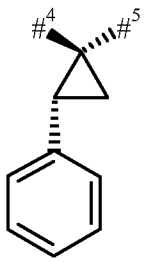
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

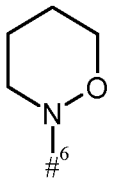



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

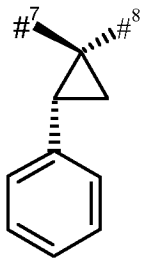
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff oder Benzyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

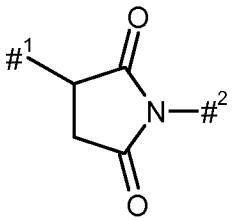
n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

AK für $AK_1$ steht,

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel

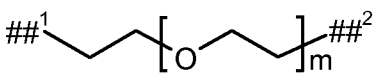



steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel




steht, wobei

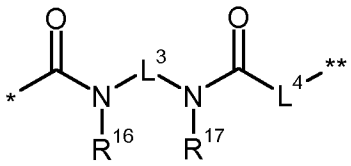
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



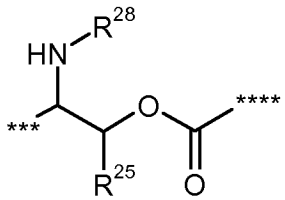
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

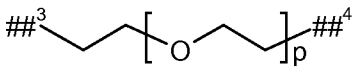
$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



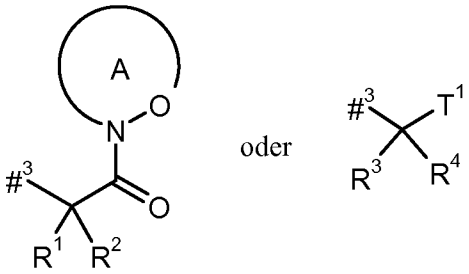

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

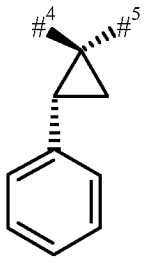
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

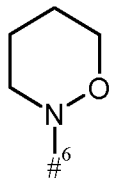



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

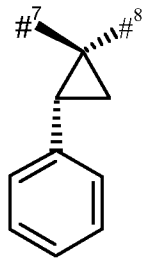
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

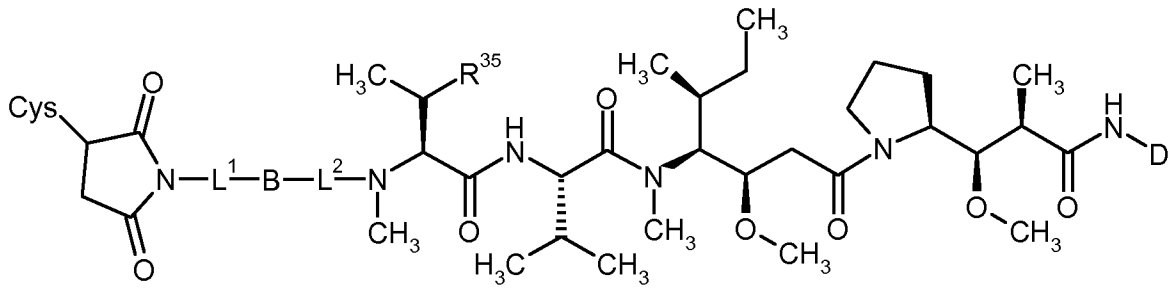
$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff oder Benzyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXa)

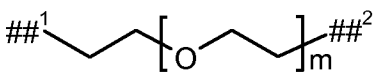
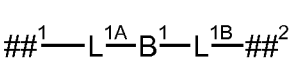


(XXXa),

in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette an ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

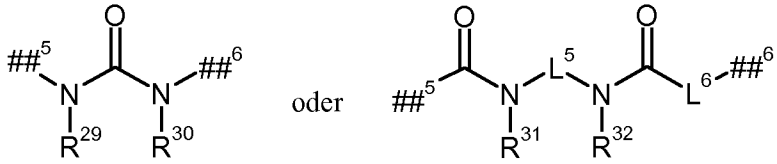
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## $^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## $^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel




steht, worin

## 5 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## 6 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

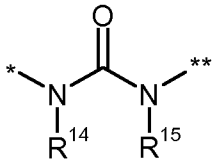
und

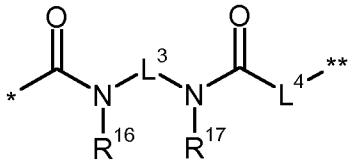
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

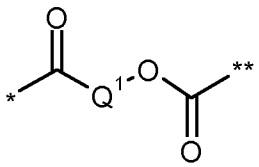
wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

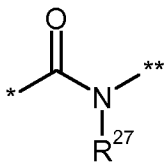
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

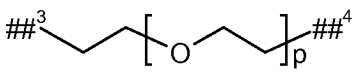
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

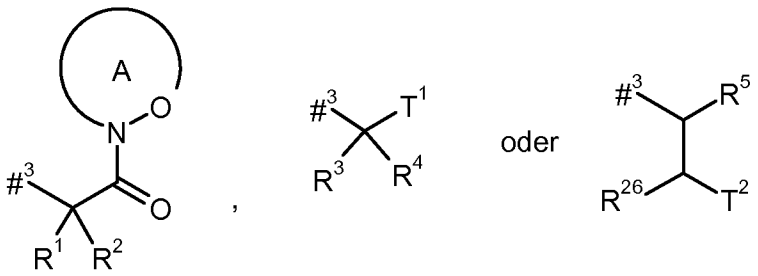
##[4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

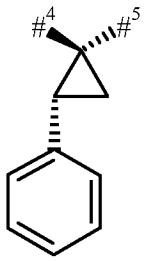
#[3] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

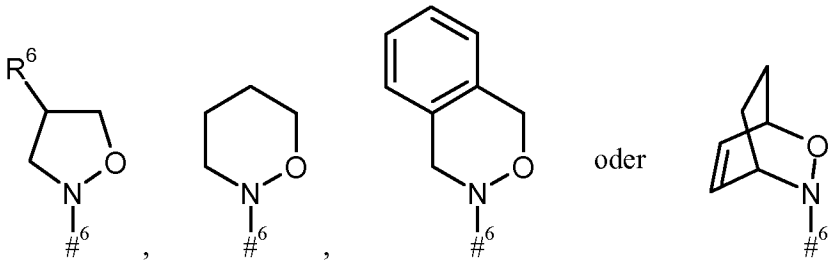


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

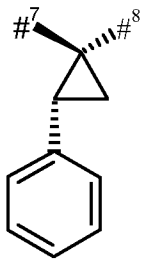
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

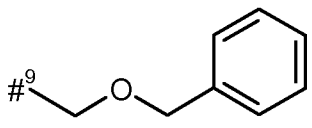
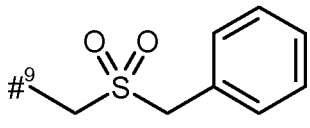
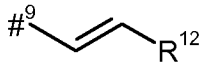
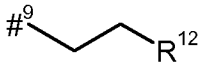
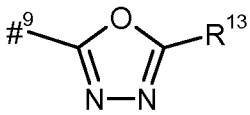
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel





oder


steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

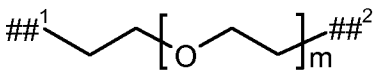
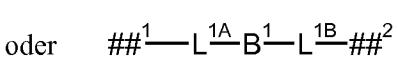
$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXa) wie oben angegeben, in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel


oder


steht, wobei

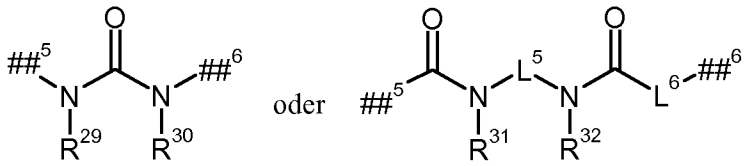
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

$##^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



steht, worin

$## ^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

$## ^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

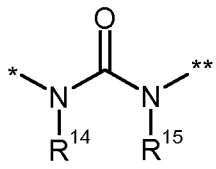
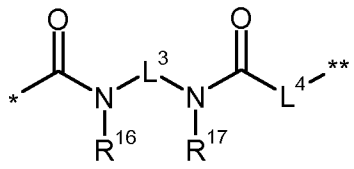
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

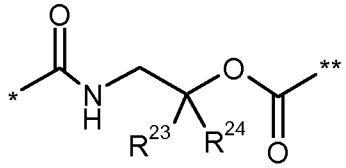
und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

,

oder 

steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

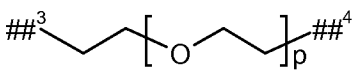
oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, Piperazinylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



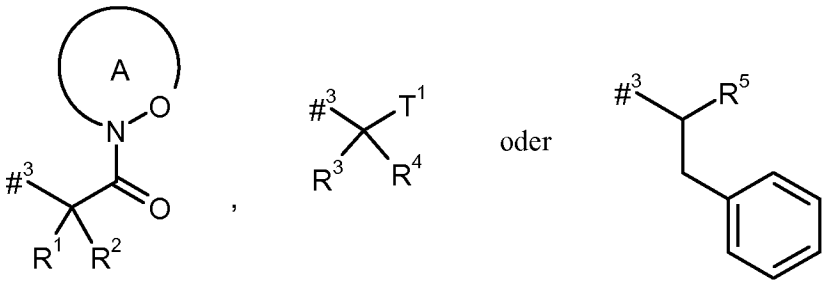
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##[4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

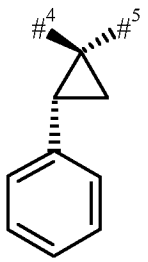
#[3] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

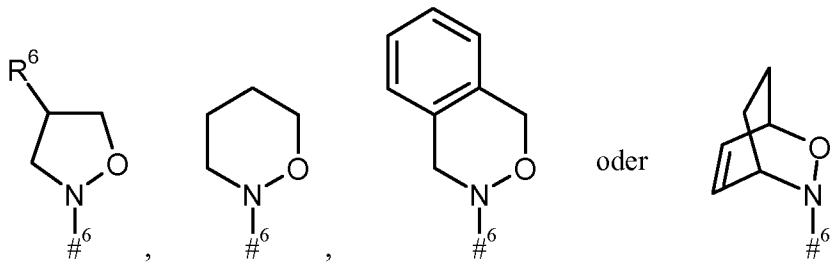



bilden, worin

#[4] die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

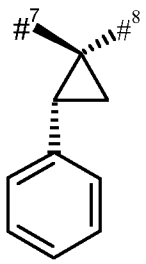
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

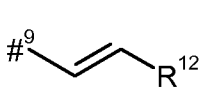
oder

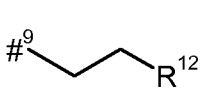
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

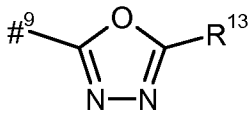
$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit –$CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel –$S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

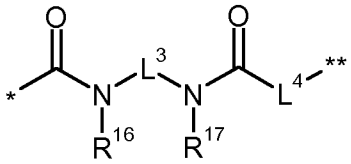
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXa) wie oben angegeben, in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^1$ für eine Bindung oder lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

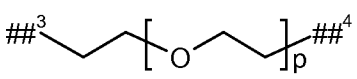
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



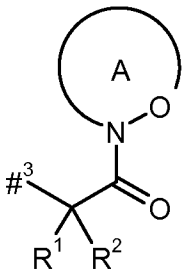
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

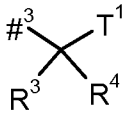
## $^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## $^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

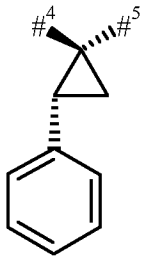
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

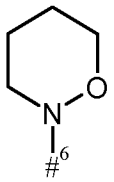



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

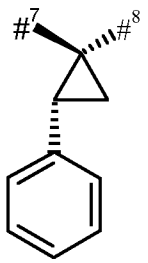
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

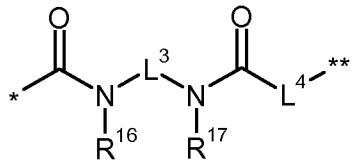
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXa) wie oben angegeben, in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^1$ für eine Bindung oder lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

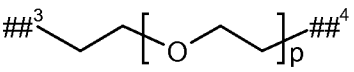
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



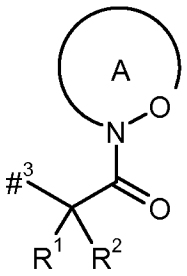
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

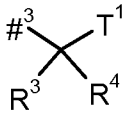
## $^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## $^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

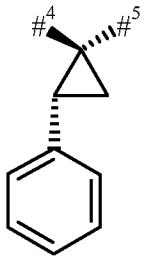
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

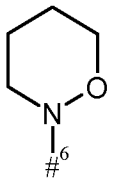



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

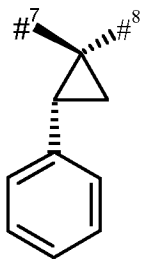
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

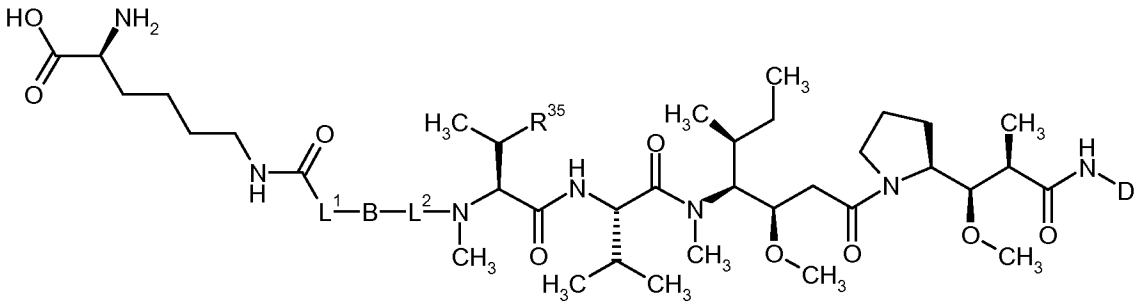
$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

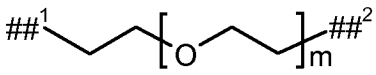
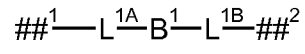
Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXI)



(XXXI),

in welcher

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

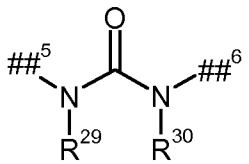
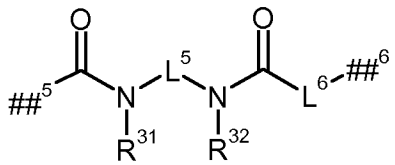
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## $^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## $^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, worin

## $^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## $^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

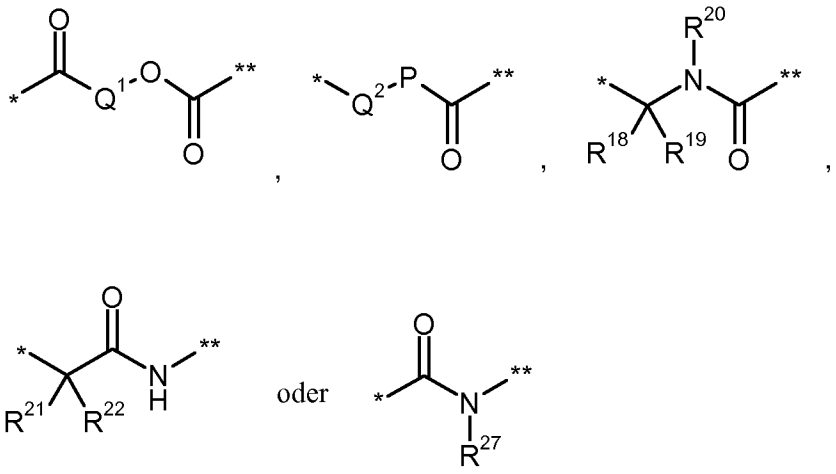
und

wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

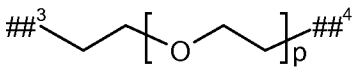
$R^{22}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

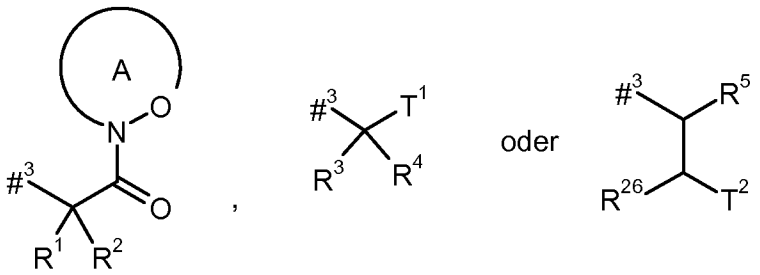
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

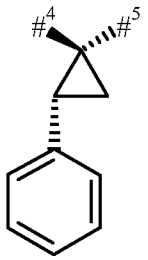
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

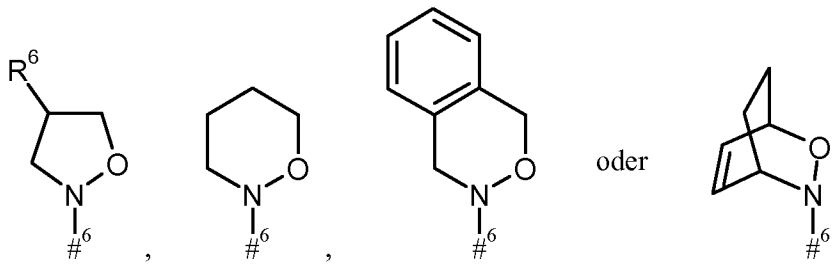



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

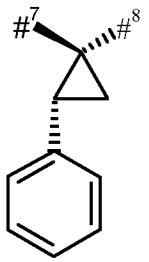
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

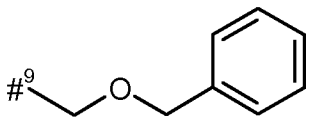
oder

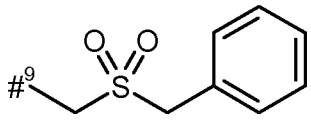
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

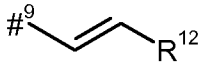
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

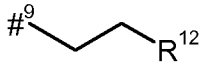
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

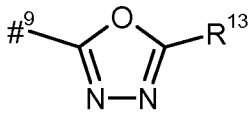


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

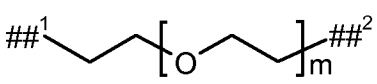
$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXI) wie oben angegeben, in welcher

$L^1$ für eine Bindung, lineares $(C_2-C_6)$-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel




steht, wobei

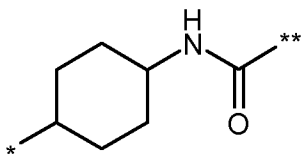
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

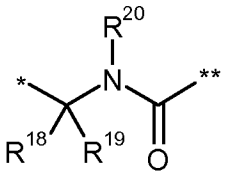
## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

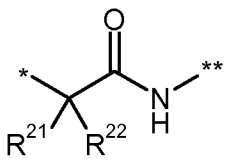
wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

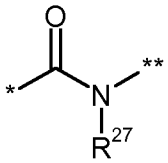
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Methyl, Propan-2-yl, 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

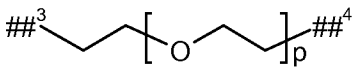
$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropyl-Ring bilden,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

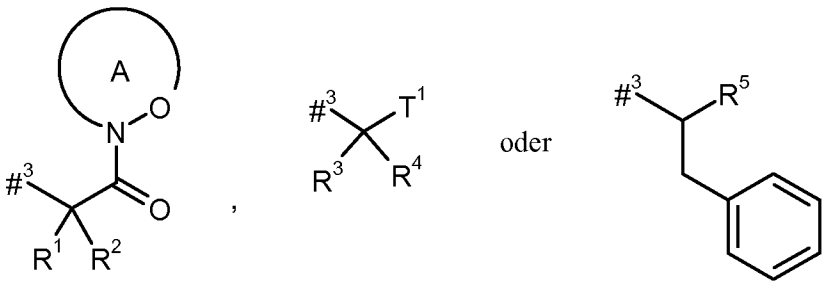
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

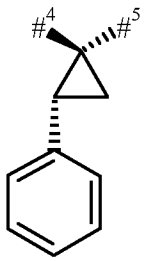
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

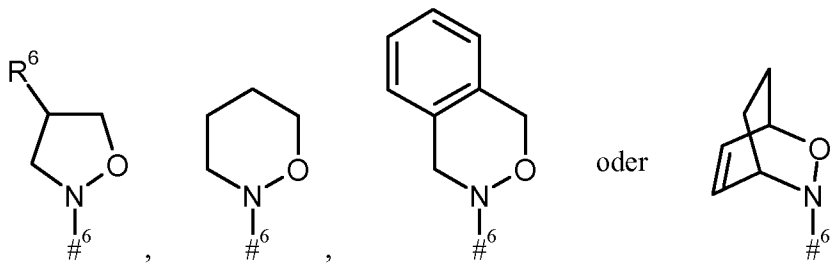



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

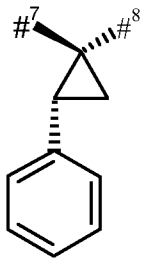
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

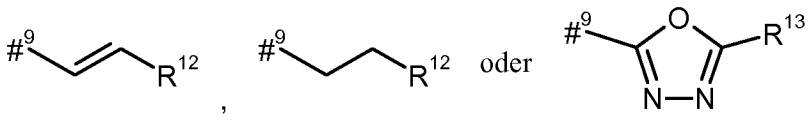
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit –$CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel –$S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

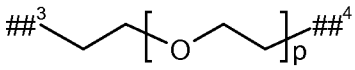
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXI) wie oben angegeben, in welcher

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



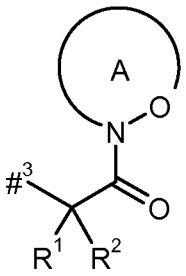
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

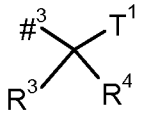
$\#\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$\#\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

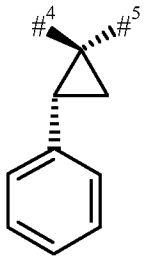
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

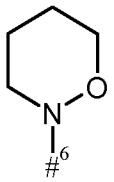



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

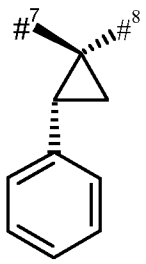
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

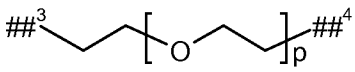
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXXI) wie oben angegeben, in welcher

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



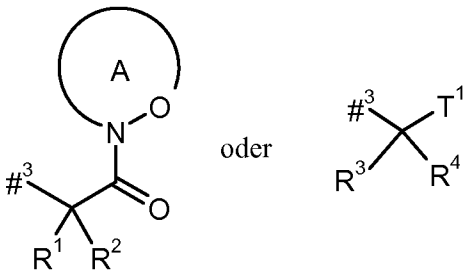

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

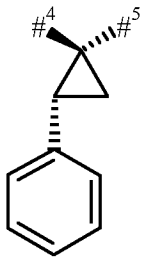
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

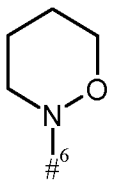


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

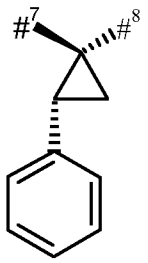
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formeln (XXXa) und (XXXI) ausgewählt aus der Gruppe:

*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid,

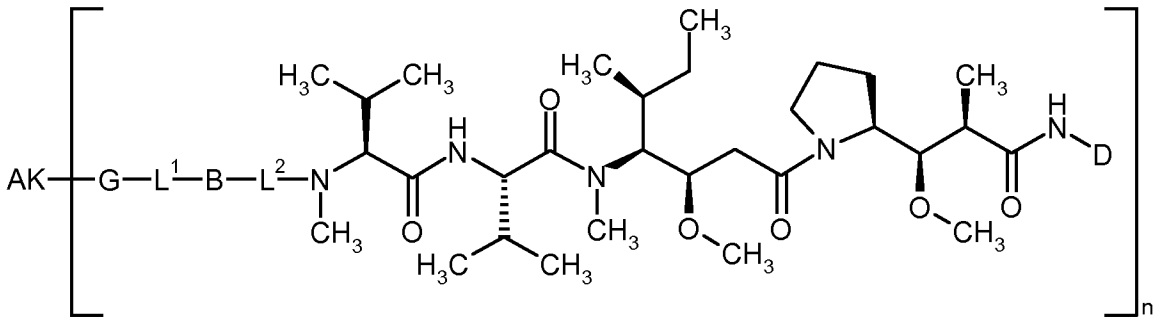
*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid,

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat,

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I)



(I),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für einen Binder steht, vorzugsweise für einen chimären humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

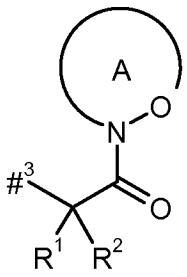
die Gruppe §-G-$L^1$-B-$L^2$-§§ für einen Linker steht,

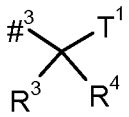
wobei

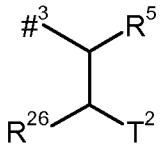
§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

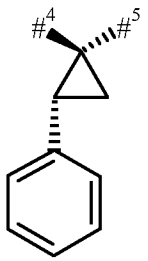
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

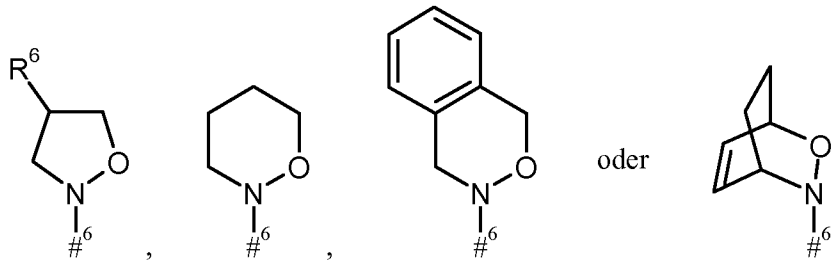



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

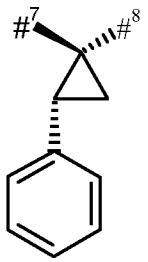
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl, 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

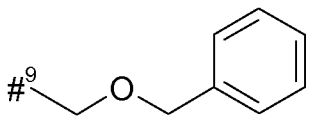
oder

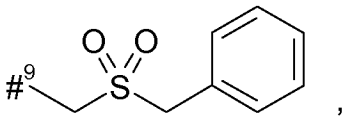
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

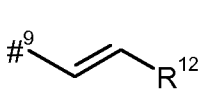
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

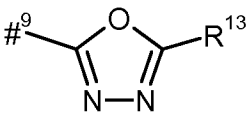
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

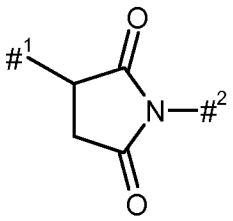
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

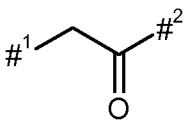
$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

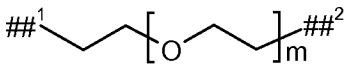
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

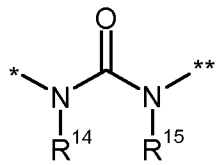
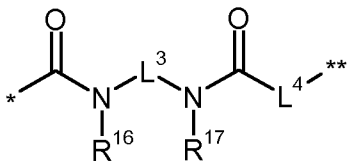
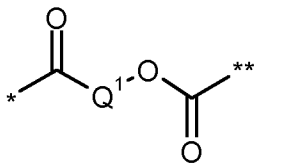
## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

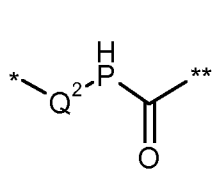
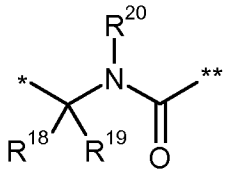
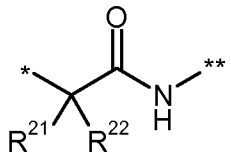
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

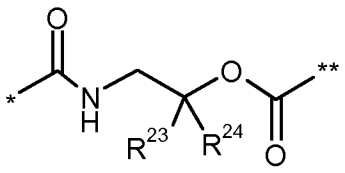
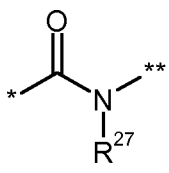
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,

,


,

,

,


oder


steht, wobei

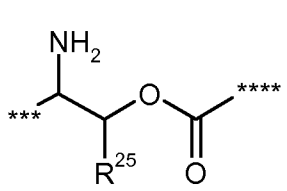
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

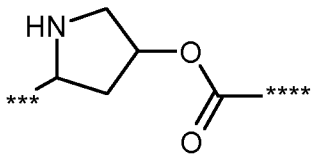
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder $(C_2$-$C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder



steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

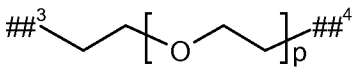
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D die oben angegebenen Bedeutungen aufweist,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht und über ein Schwefelatom an die Gruppe G gebunden sind, vorzugsweise für einen chimären humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht und über ein Stickstoffatom an die Gruppe G gebunden sind, vorzugsweise für einen chimären humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G, $L^1$, B, $L^2$ und D die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

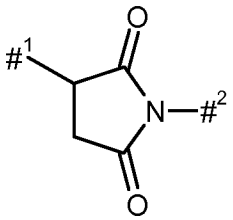
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

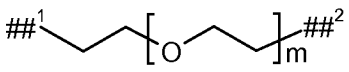
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

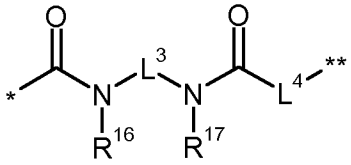
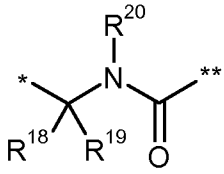
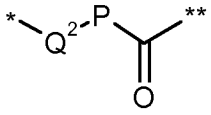
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

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

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder


steht, wobei

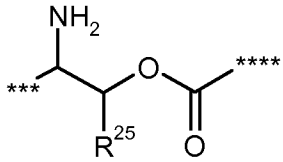
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$Q^2$ für Cyclopentyl oder Cyclohexyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

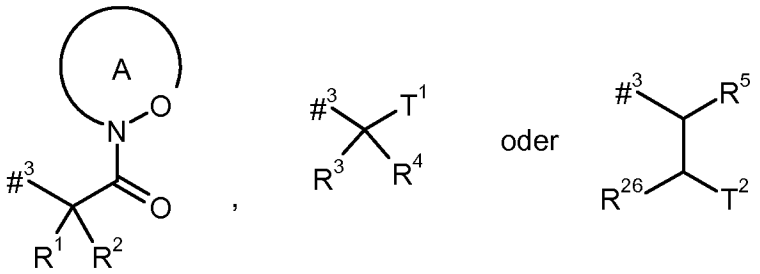
oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

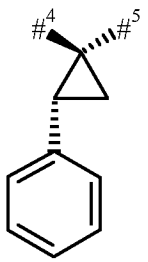
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

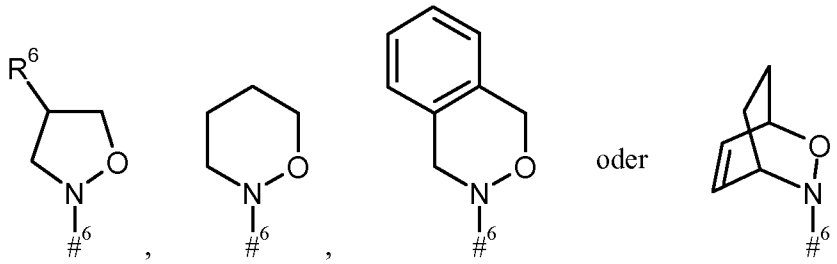


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

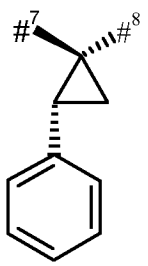
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

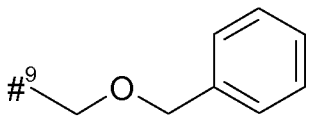
oder

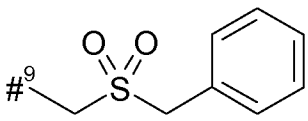
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

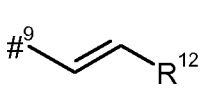
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

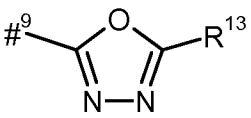
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I)

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

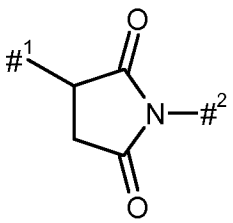
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

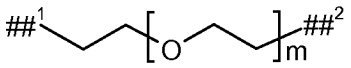
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

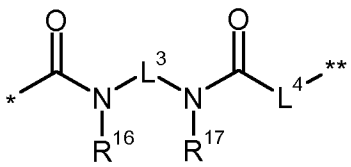
m für eine Zahl 2 oder 3 steht,

## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



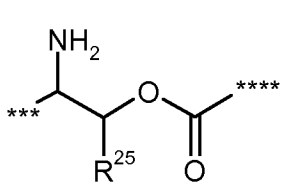

steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

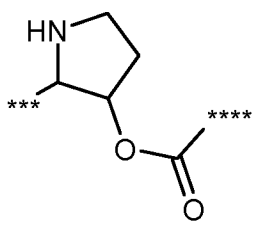
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

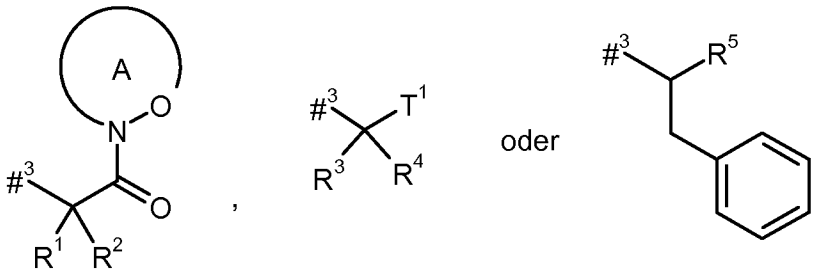
$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

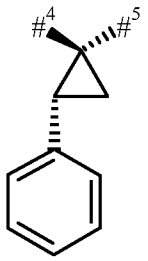
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

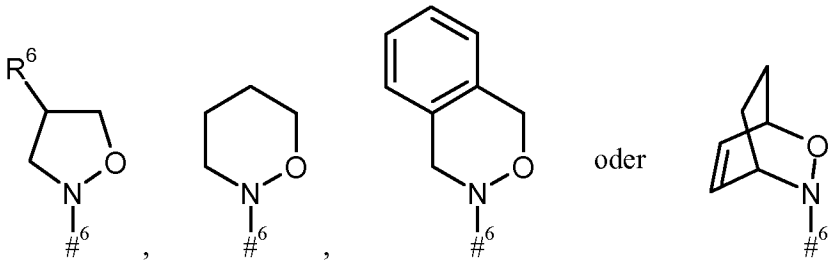


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

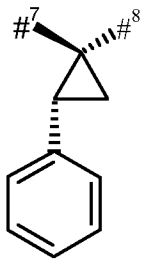
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe T kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

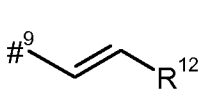
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

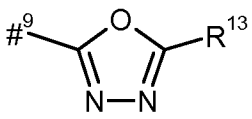
$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

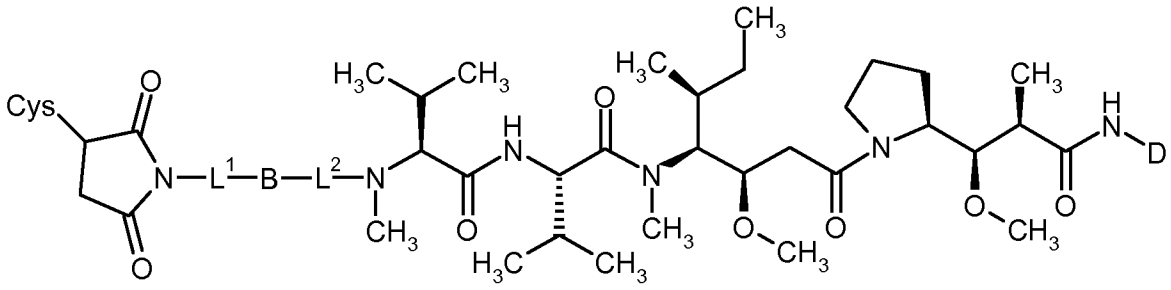
$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (XXX)

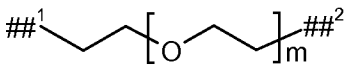


(XXX),

in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette an ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## $^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

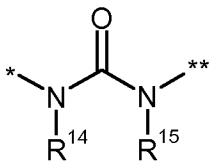
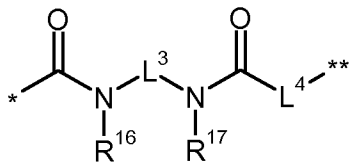
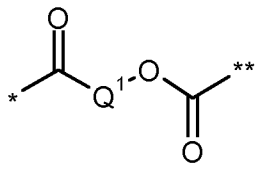
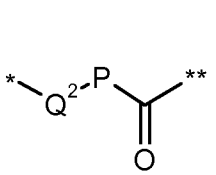
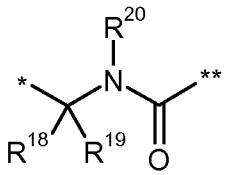
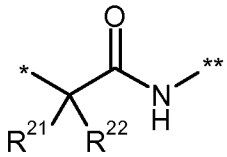
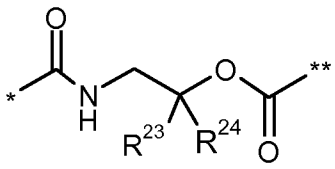
## $^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel






oder



steht, wobei

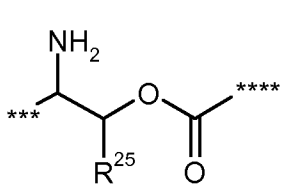
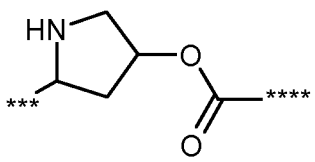
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung, oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$Q^1$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Aza-Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Aza-Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

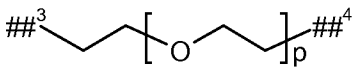
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares $(C_2\text{-}C_{10})$-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

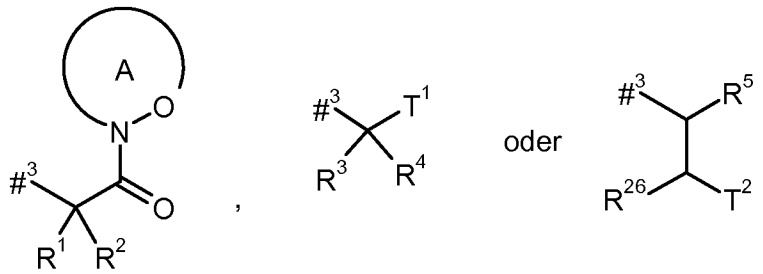
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei $(C_2\text{-}C_{10})$-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem $(C_3\text{-}C_6)$-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

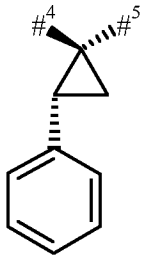
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

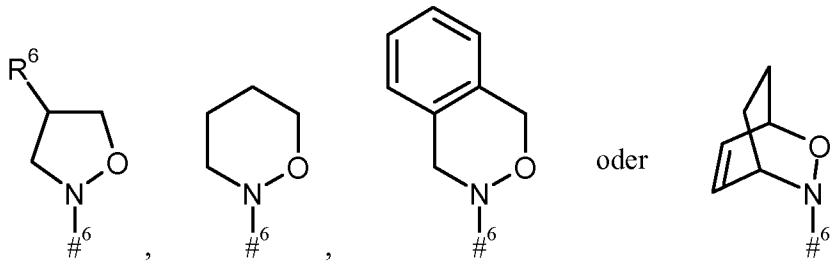


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

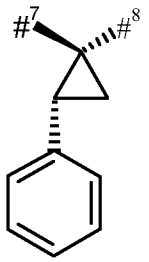
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

#7 die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

#8 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

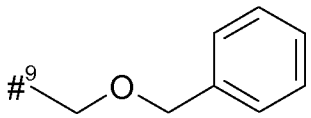
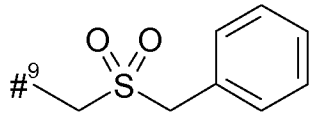
oder

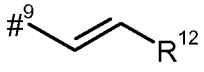
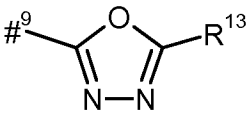
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel


,

,


oder


steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

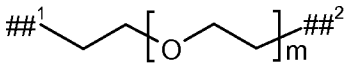
$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind weiterhin auch Verbindungen der Formel (XXX), in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

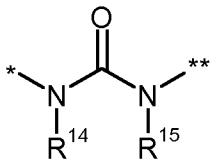
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

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

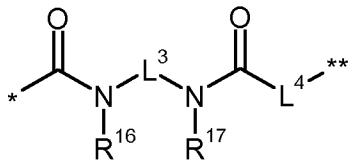
$\#\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

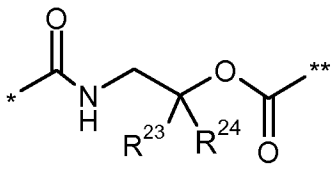
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



,



oder



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

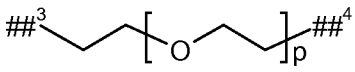
oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



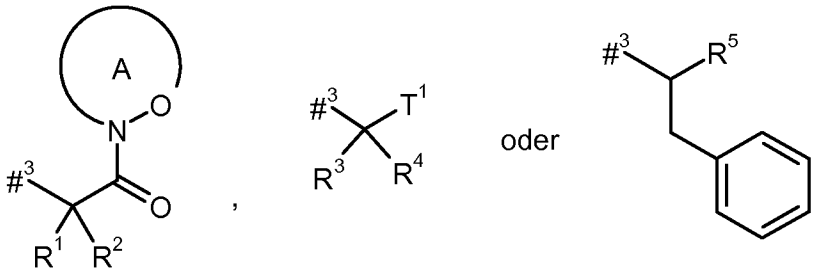
steht, wobei

p für eine Zahl 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## 4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

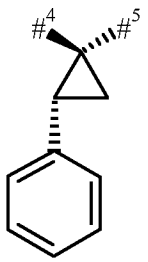
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

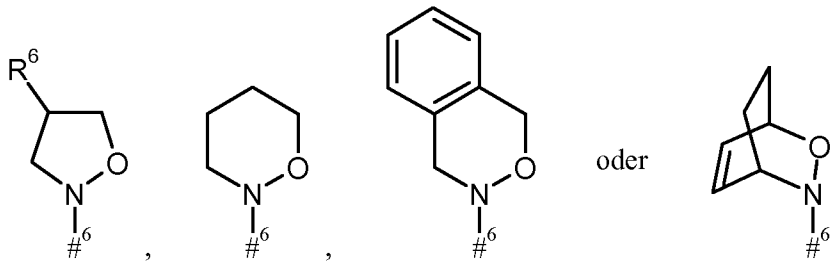


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

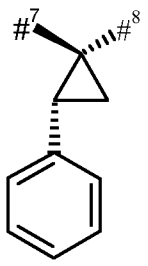
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe T kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

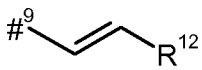
$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

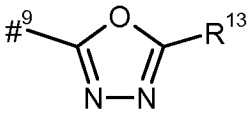
$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit –CHC($R^{26}$)Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel –$S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

n = 1-20, besonders bevorzugt n = 1-10 und ganz besonders bevorzugt n = 2-8 bedeutet.

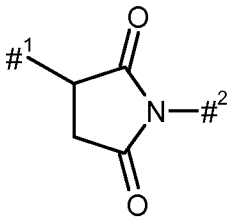
Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

AK für $AK_1$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

und

n, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

AK für $AK_2$ steht

wobei

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

und

n, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

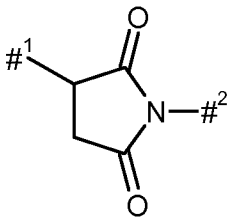
Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

AK für $AK_1$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

und

n, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

AK für $AK_2$ steht

wobei

$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

und

n, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia), in welcher

AK für $AK_2$ steht

wobei

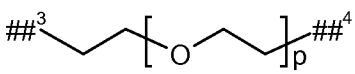
$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

n, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

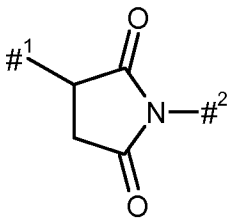
Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia), in welcher

AK für $AK_1$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel

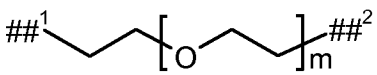


steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

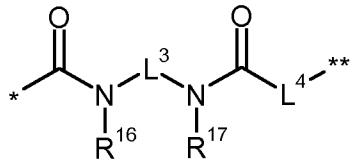
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



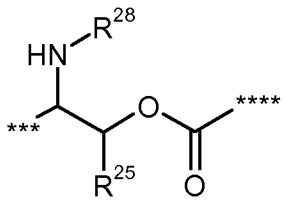
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

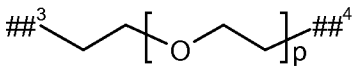
$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

und

n, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

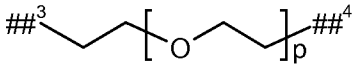
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

$L^1$ für eine Bindung, steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

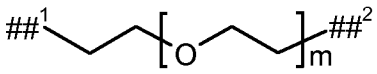
und

n, AK, Cys, G, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

$L^1$ für lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

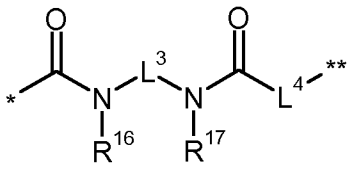
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

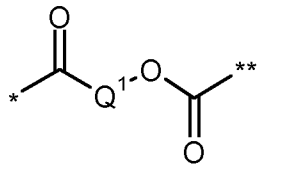
##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

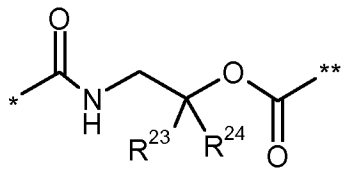
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



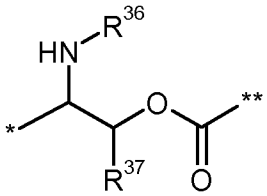
,



,



oder



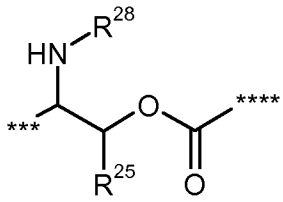
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

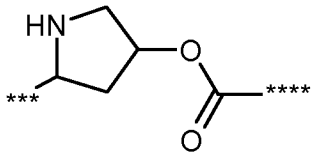
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

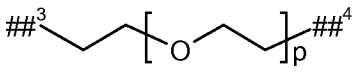
$R^{36}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxy carbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

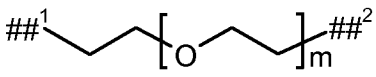
und

n, AK, G, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

$L^1$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



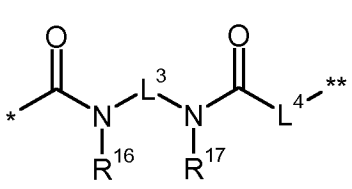
steht, wobei

m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

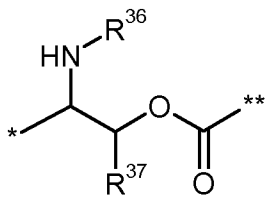
## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder



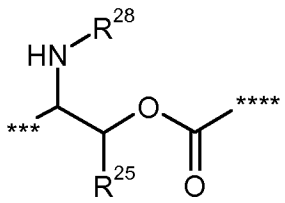
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

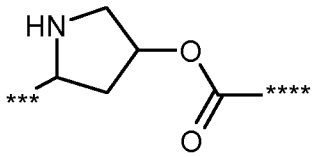
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

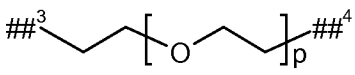
$R^{36}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

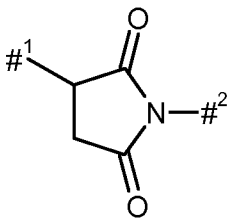
und

n, AK, G, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia) und (XXXa), in welcher

G für eine Gruppe der Formel

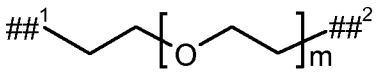



steht, wobei

#1 die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel




steht, wobei

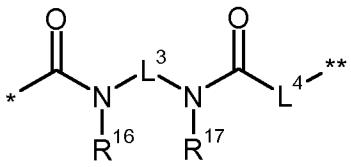
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

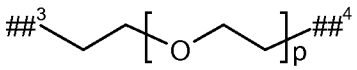
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##[4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

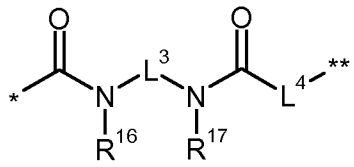
und

n, $AK_1$, Cys, D, $R^{16}$ und $R^{17}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia) und (XXXa), in welcher

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

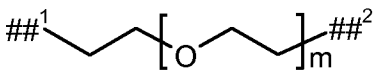
$L^4$ für eine Bindung steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, $L^2$, D, $R^{16}$, $R^{17}$ und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

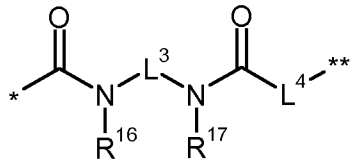
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

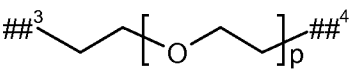
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung

$R^{16}$ für Wasserstoff steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## $^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## $^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

n, AK, Cys, G, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

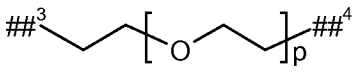
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

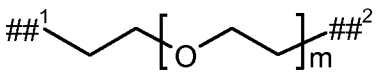
## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

n, AK, Cys, G, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

$L^1$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

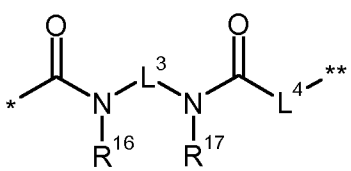
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

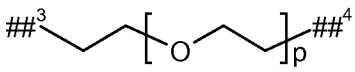
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung

$R^{16}$ für Wasserstoff steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

n, AK, Cys, G, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5, steht,

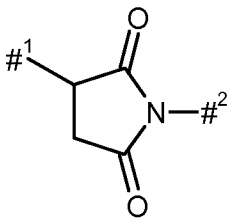
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an C4.4a bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an C4.4a bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

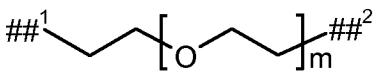
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

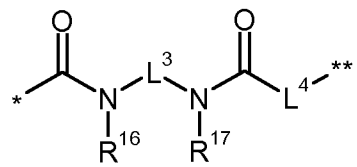
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

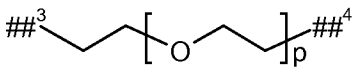
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung

$R^{16}$ für Wasserstoff steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

und

D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5, steht,

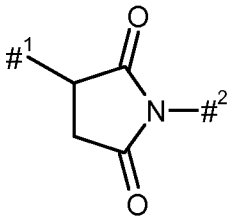
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an C4.4a bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an C4.4a bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

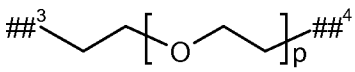
oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

$\#\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$\#\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

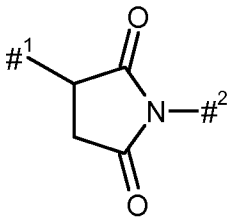
n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5, steht,

AK für $AK_1$ steht,

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an C4.4a bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel

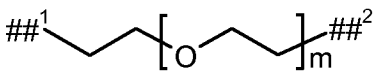


steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

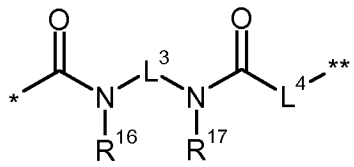
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

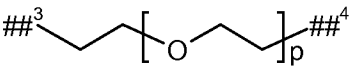
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung

$R^{16}$ für Wasserstoff steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## $^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

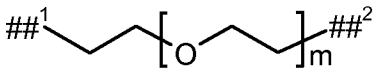
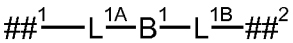
##$^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

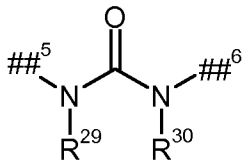
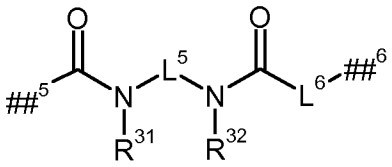
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

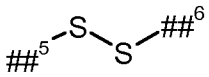
## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel

 , 

oder 

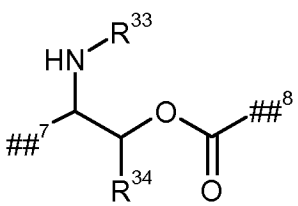
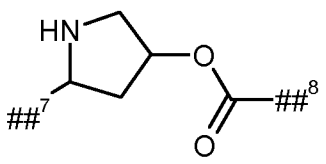
steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

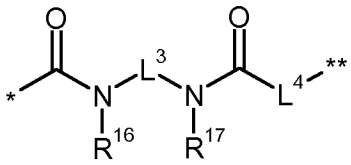
$R^{30}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

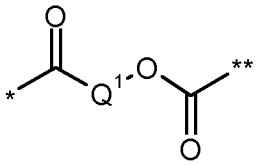
$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

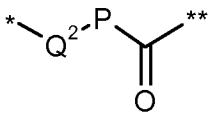
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

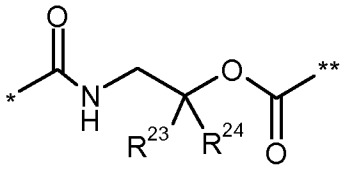
$L^{1B}$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

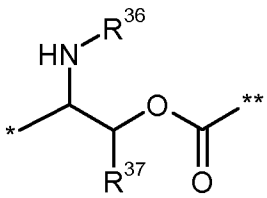
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



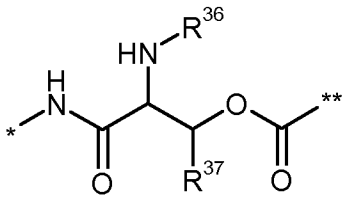
,


,


,


,



oder




steht, wobei

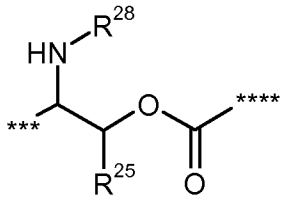
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

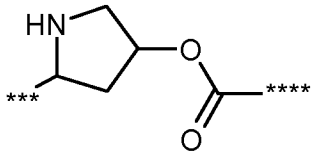
P für O steht,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, $(C_1$-$C_4)$-Alkylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{23}$ für $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

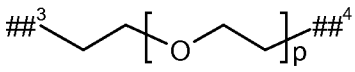
$R^{36}$ für Wasserstoff, $(C_1$-$C_4)$-Alkylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares $(C_2$-$C_6)$-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder3 steht,

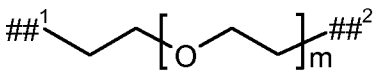
## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (Ia), in welcher

$L^1$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



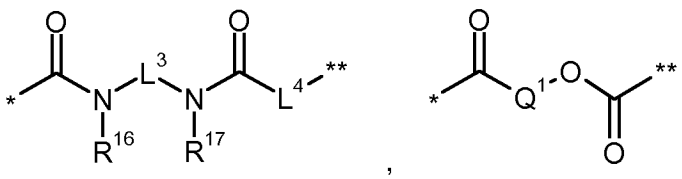
steht, wobei

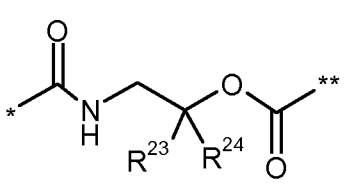
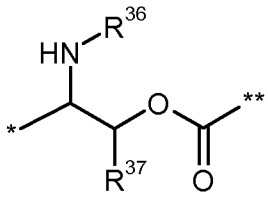
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

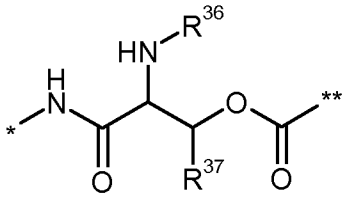
## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

B für eine Gruppe der Formel



oder 

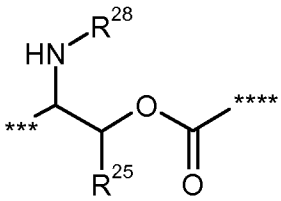
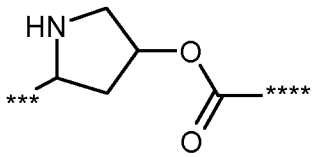
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Gruppe der Formel


oder 

steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

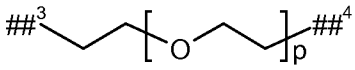
$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$R^{36}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

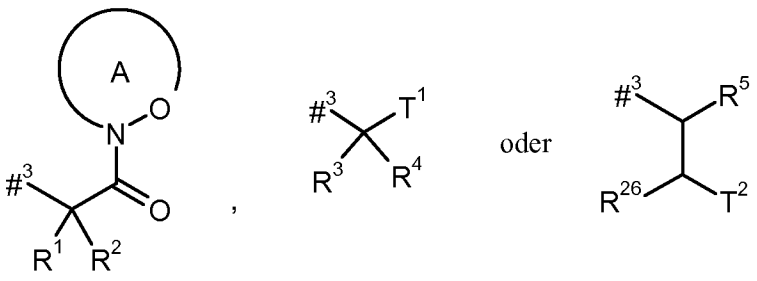
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

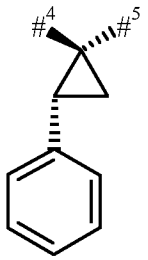
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

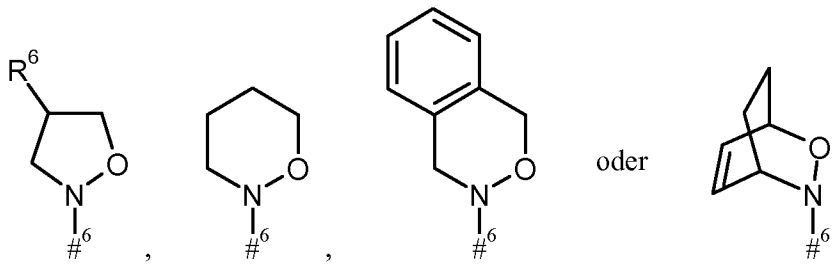



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

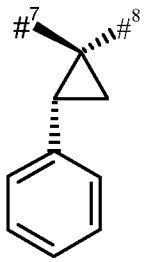
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

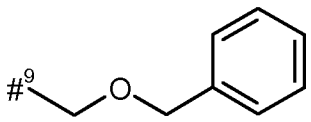
oder

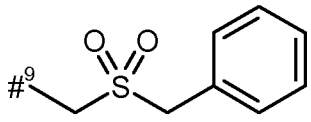
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

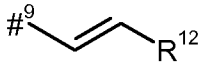
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

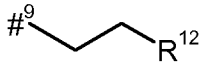
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

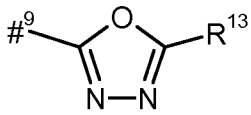


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

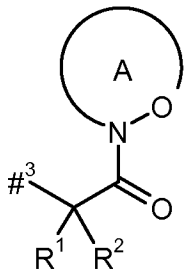
und

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

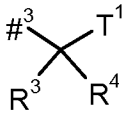
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




oder



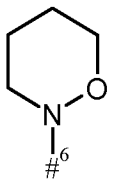

steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

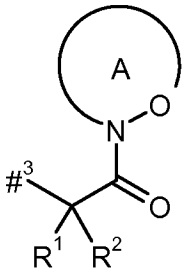
$R^9$ für Wasserstoff steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

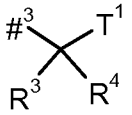
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




oder



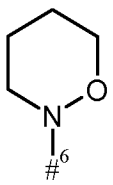

steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^8$ für Wasserstoff steht,

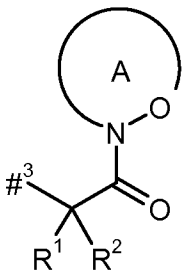
$R^9$ für Wasserstoff steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

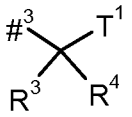
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




oder



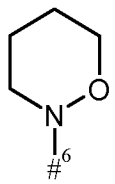

steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^8$ für Wasserstoff steht,

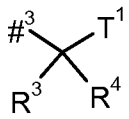
$R^9$ für Wasserstoff steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

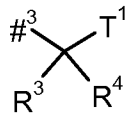
$R^9$ für Wasserstoff steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^8$ für Wasserstoff steht,

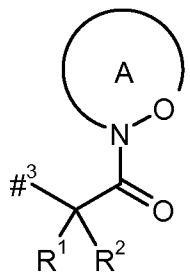
$R^9$ für Wasserstoff steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

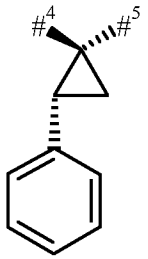
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

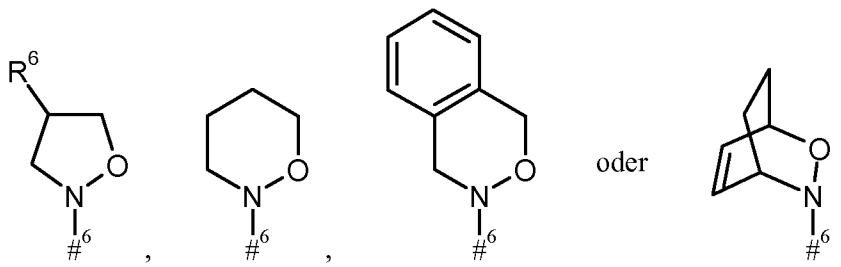



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

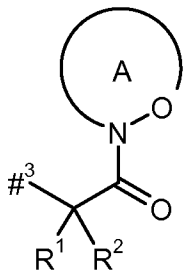
und

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

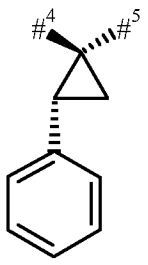
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

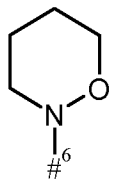



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

und

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

$R^{35}$ für Hydroxy steht,

und

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (Ia), (XXXa) und (XXXI), in welcher

$R^{35}$ für Methyl steht,

und

n, AK, Cys, G, $L^1$, B, $L^2$, D und $R^{35}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

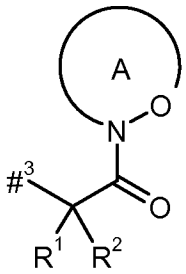
Besonders bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind weiterhin auch Verbindungen der Formel (XXXa), in welcher

Cys für einen L-Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (I) und (XXX), in welcher

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

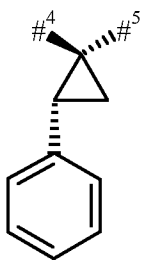
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

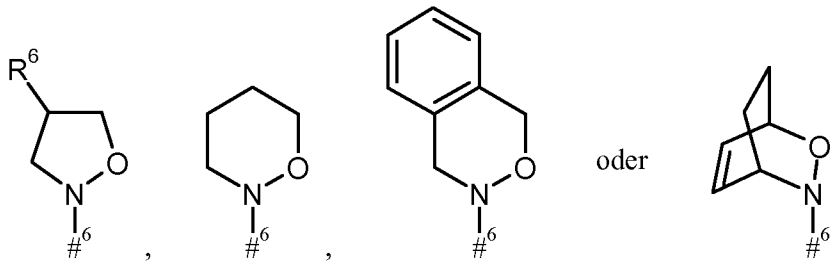



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

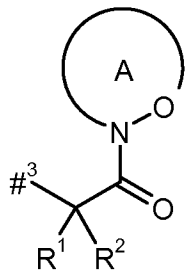
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, $L^2$ und B die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verbindungen der Formel (I) und (XXX), in welcher

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

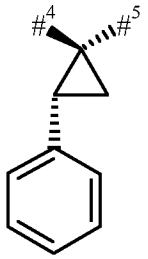
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

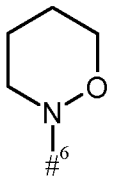



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen Heterocyclus der Formel




steht, worin

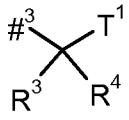
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

n, AK, Cys, G, $L^1$, $L^2$ und B die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Ein weiterer besonders bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (I), in welcher

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

$T^1$ für -C(=O)-OH oder -C(=O)-$NH_2$ steht und

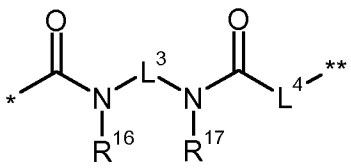
n, AK, G, $L^1$, B, $L^2$, #3, $R^3$ und $R^4$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen.

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (I), in welcher

n = 1-20, besonders bevorzugt n = 1-10 und ganz besonders bevorzugt n = 2-8 bedeutet.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (I) und (XXX), in welcher

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

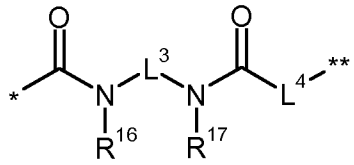
$L^4$ für eine Bindung steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, $L^2$, D, $R^{16}$ und $R^{17}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch Verbindungen der Formel (I) und (XXX), in welcher

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ und $L^4$ für eine Bindung steht,

n, AK, Cys, G, $L^1$, $L^2$, D, $R^{16}$ und $R^{17}$ die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

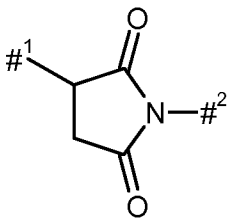
Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I), in welcher

AK für $AK_1$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für eine Gruppe der Formel

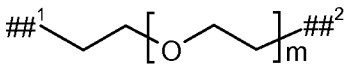


steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

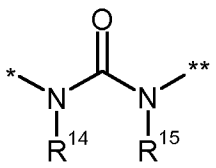
##2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

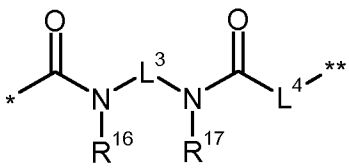
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

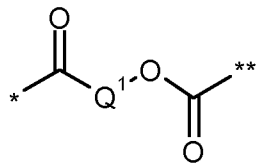
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




,




oder



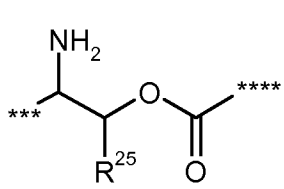

steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

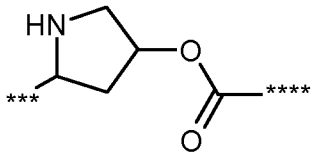
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

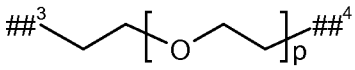
$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I), in welcher

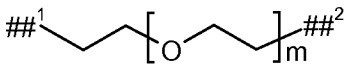
AK für $AK_2$ steht

wobei

$AK_2$ für einen Binder, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

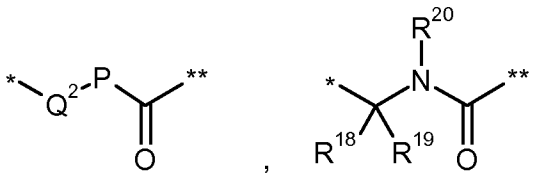
## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

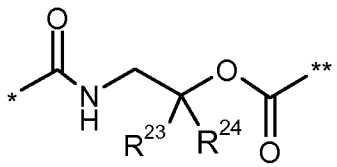
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder 


steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

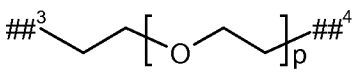
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

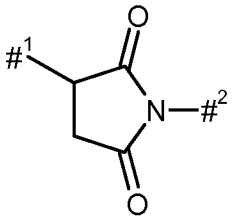
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

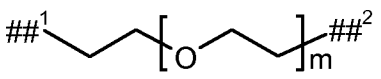
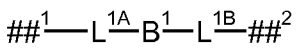
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

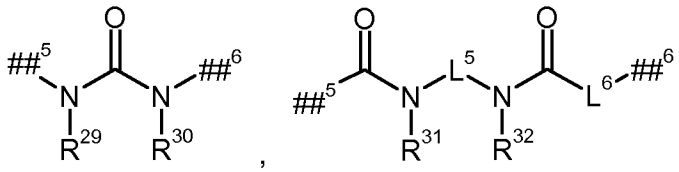
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

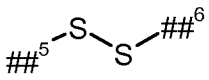
$\#\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



oder 

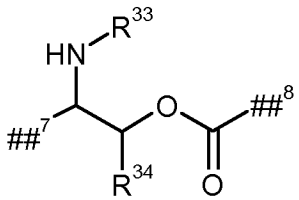
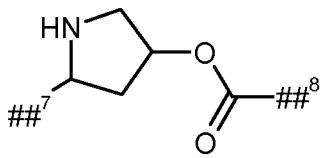
steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

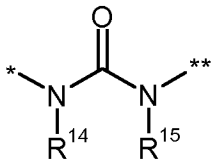
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

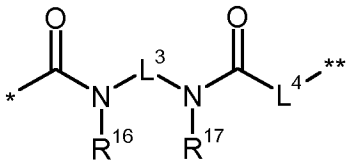
$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

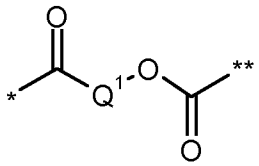
und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

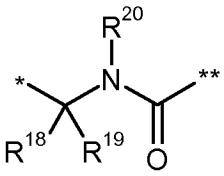
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

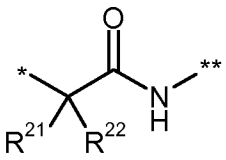


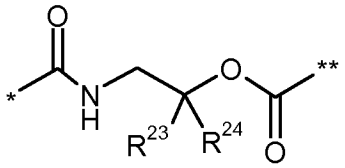
,


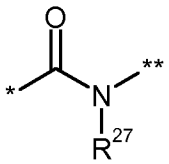
,


,



,


,



oder 

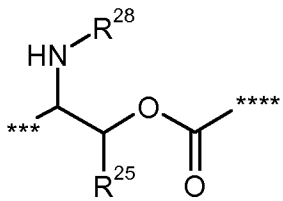

steht, wobei

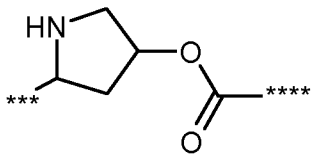
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

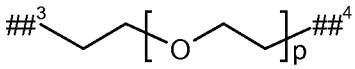
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

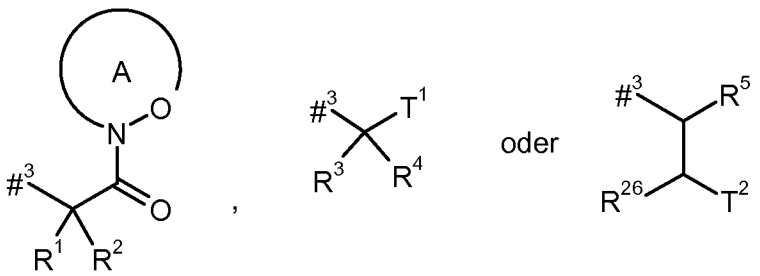
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

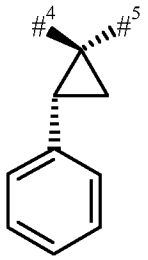
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

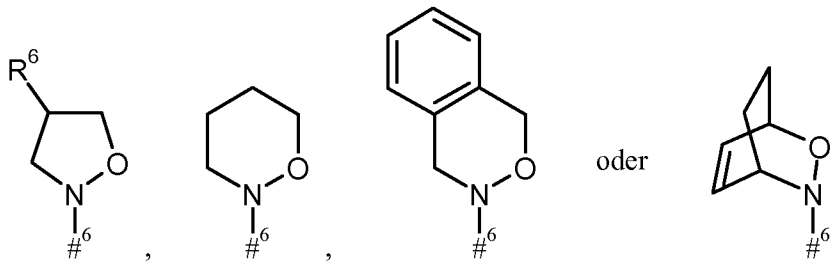



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

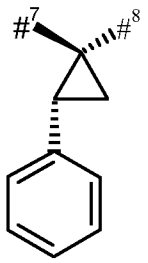
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

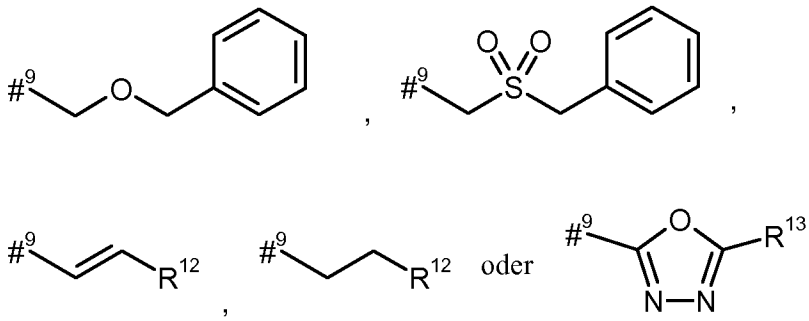
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) wie oben angegeben, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

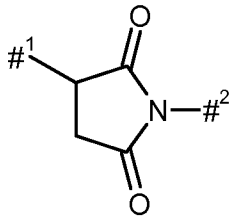
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

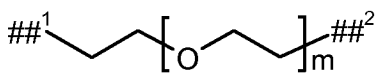
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



steht, wobei

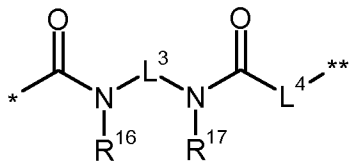
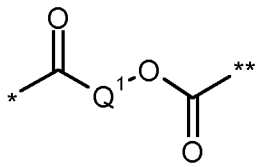
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

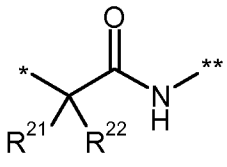
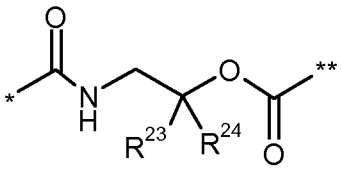
$\#\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,


oder


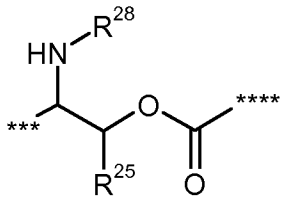
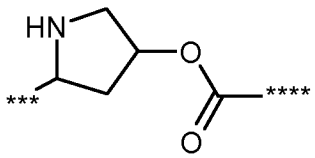
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

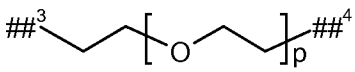
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



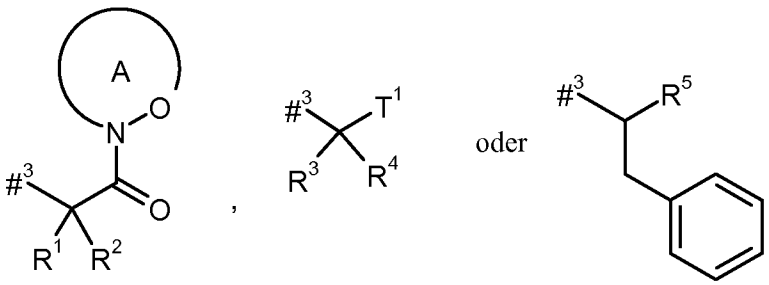

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

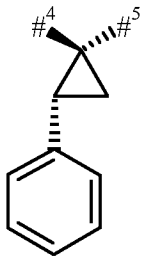
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl, oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

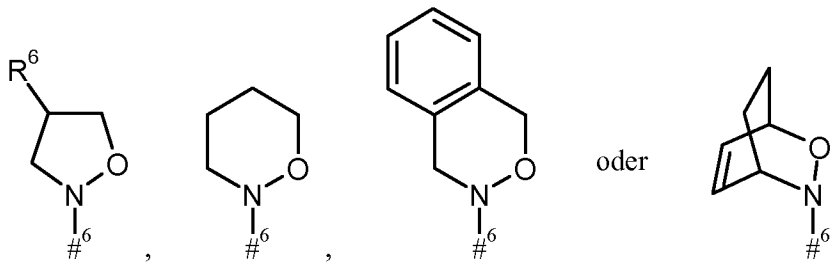



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

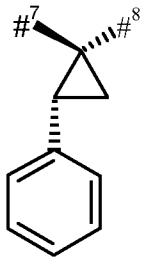
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

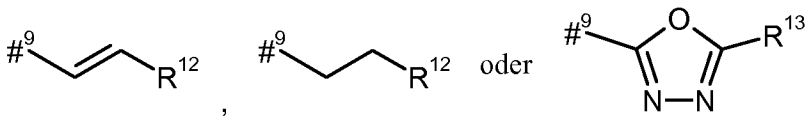
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel




steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Binder-Wirkstoff-Konjugate der Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 2 bis 8 steht,

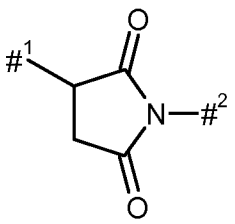
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht,

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

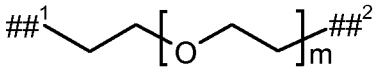
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



steht, wobei

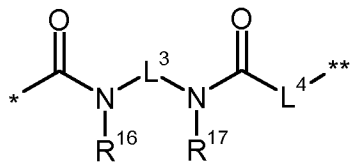
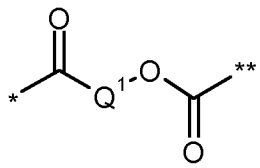
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

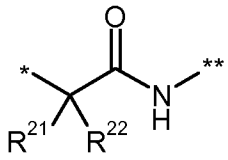
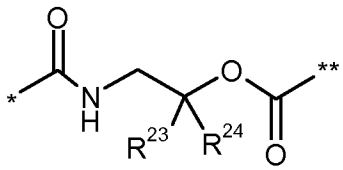
$\#\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,


oder


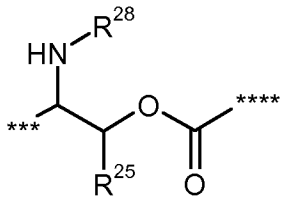
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

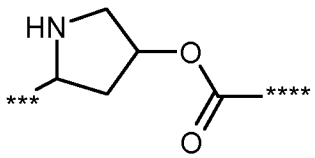
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

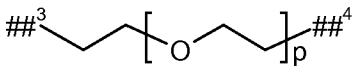
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



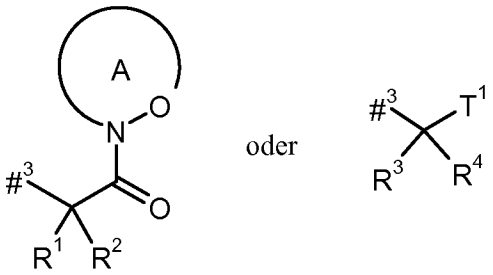
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [3] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## [4] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



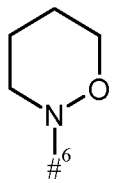
steht, wobei

#[3] die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für



steht, worin

#[6] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, oder Ethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Binder-Wirkstoff-Konjugate der Formel (Ia), in welcher

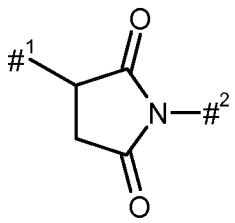
n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5 steht,

AK für $AK_1$ steht,

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für eine Gruppe der Formel



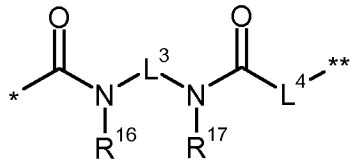

steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für Pentan-1,5-diyl steht,

B für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung steht,

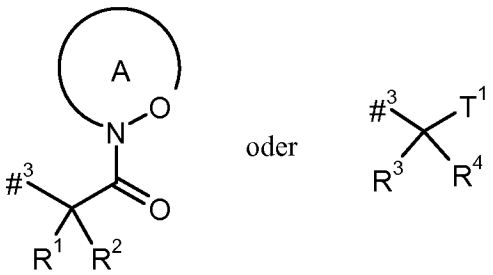
$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für Propan-1,3-diyl steht,

D für eine Gruppe der Formel



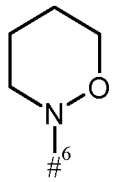
steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Binder-Wirkstoff-Konjugate der Formel (Ia), in welcher

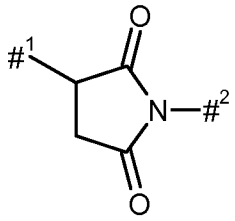
n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5 steht,

AK für $AK_1$ steht,

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für Hexan-1,6-diyl steht,

und D die zuvor angegebene Bedeutung hat,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Binder-Wirkstoff-Konjugate der Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise von 2 bis 5, steht,

AK für $AK_2$ steht,

wobei

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

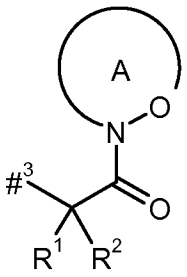
G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung steht,

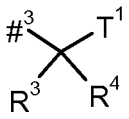
B für eine Bindung steht,

$L^2$ für Pentan-1,5-diyl steht,

D für eine Gruppe der Formel




oder



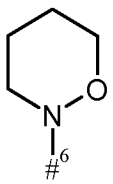

steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Binder-Wirkstoff-Konjugate der Formel (Ia), in welcher

n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5 steht,

AK für $AK_2$ steht,

wobei

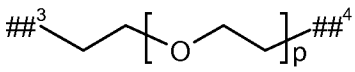
$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist, vorzugsweise für einen chimären, humanisierten oder humanen Antikörper, besonders bevorzugt einen anti-EGFR-Antiköper,

G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für die Zahl 3 steht,

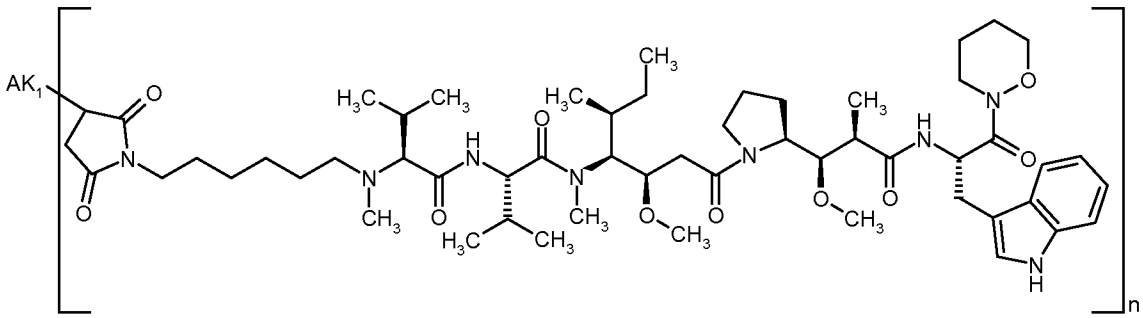
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

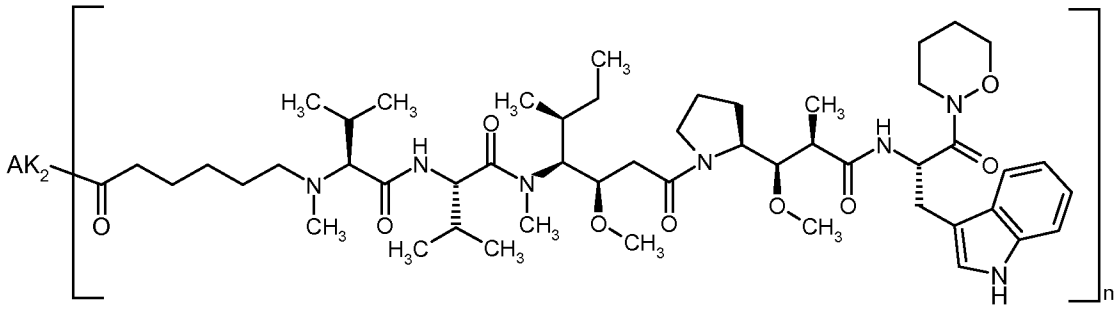
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

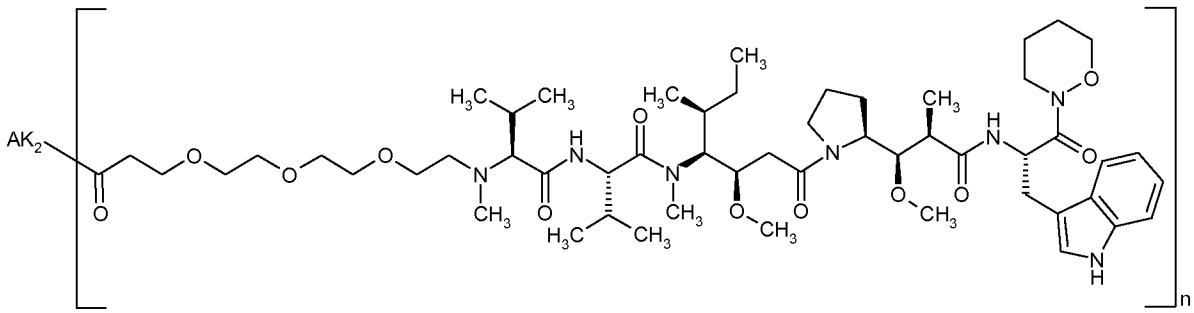
und D die zuvor angegebene Bedeutung hat,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

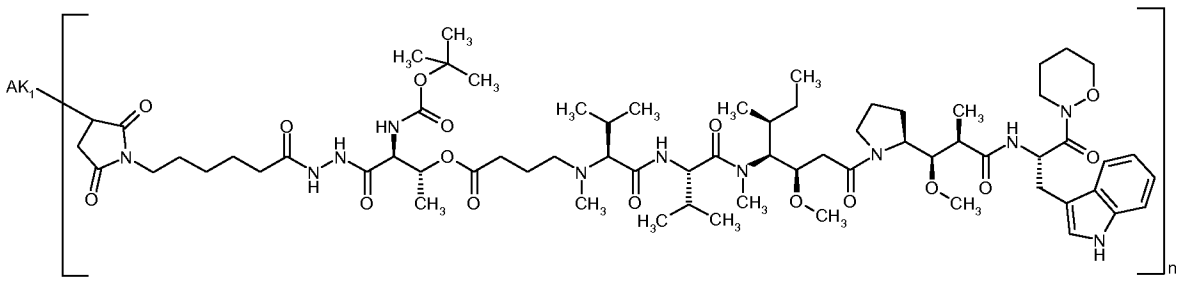
Besonders bevorzugt wird erfindungsgemäß das Wirkstoff-Binder-Konjugat aus den folgenden Verbindungen, wobei n jeweils für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5 steht, und AK für einen chimären, humanen oder humanisierten Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an Mesothelin, C4.4a oder EGFR bindet:

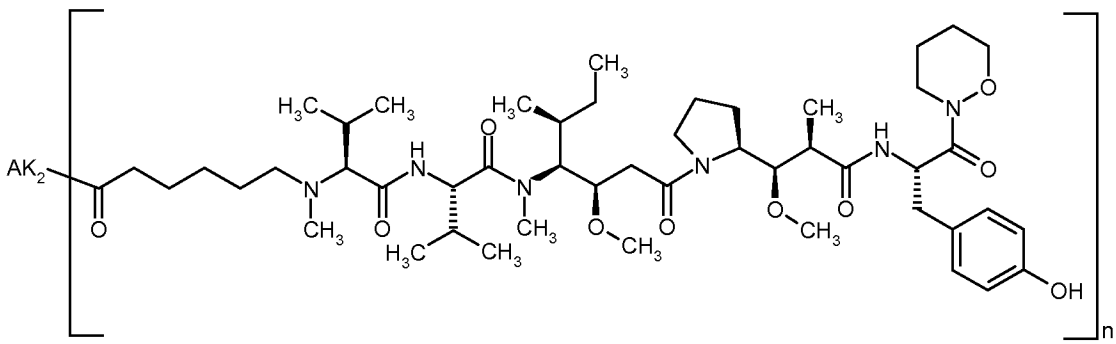


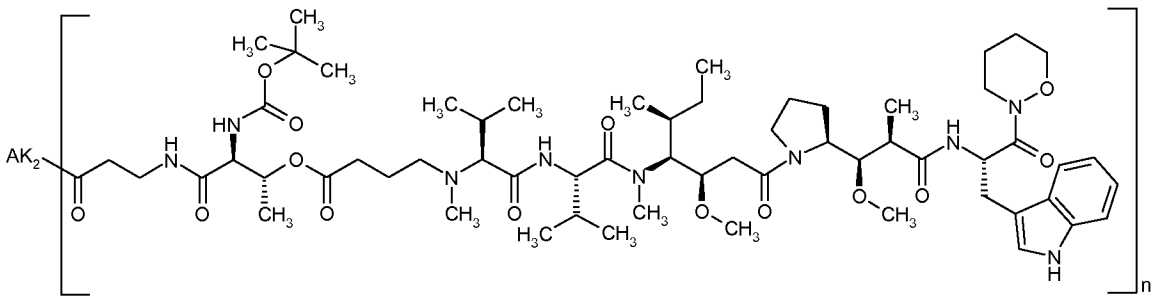




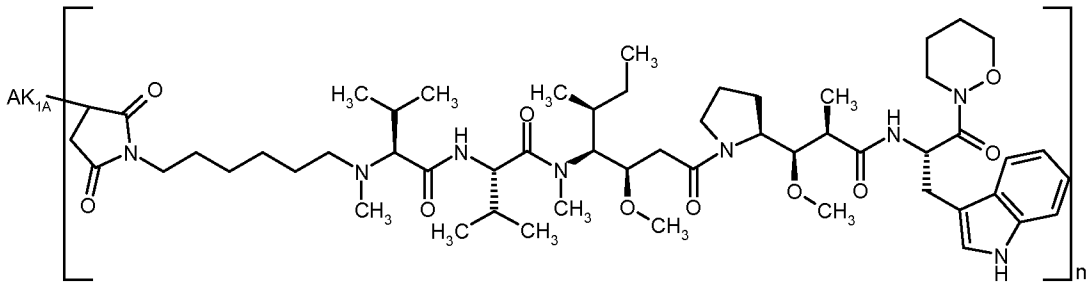
5

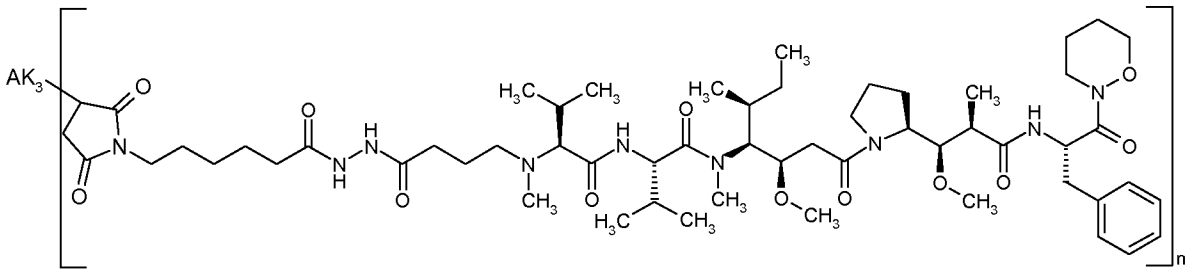


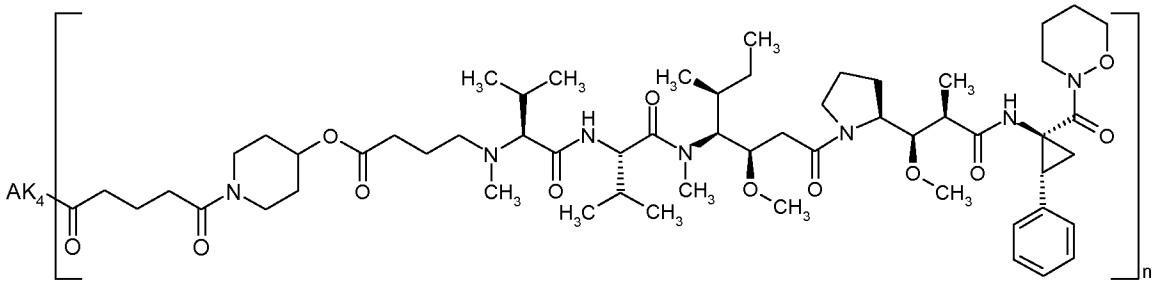


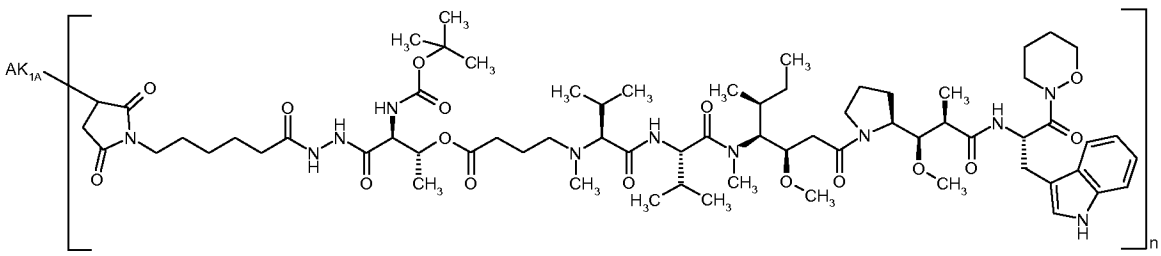


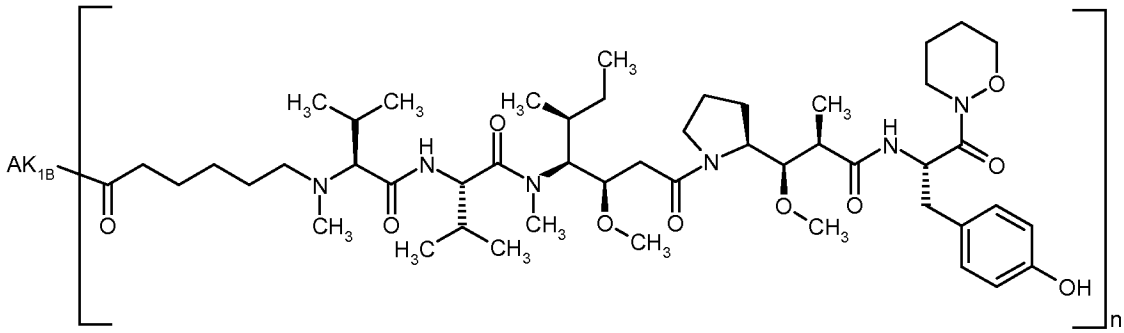
Weiterhin besonders bevorzugt wird erfindungsgemäß das Wirkstoff-Binder-Konjugat aus den folgenden Verbindungen ausgewählt:

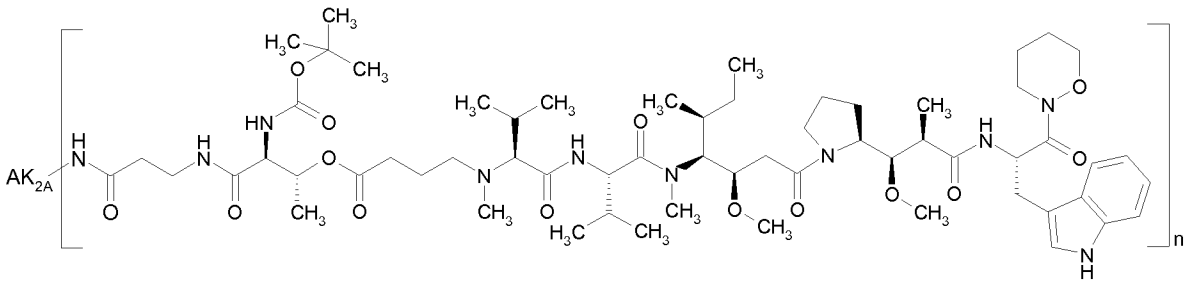












in welcher

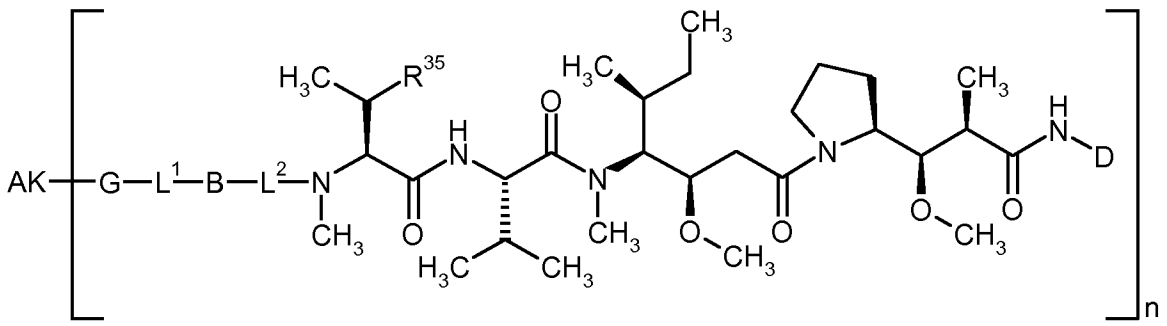
n für eine Zahl von 2 bis 8, bevorzugt von 2 bis 5,

und

$AK_{1A}$, $AK_{1B}$, $AK_{2A}$, $A_{K3}$ und $AK_4$ für die angegebenen Antikörper steht.

AK

Binder-Wirkstoff-Konjugat der folgenden Formel Ia



wobei

n für eine Zahl von 2 bis 8 steht;

AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

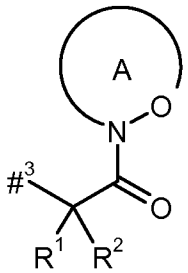
wobei

$AK_1$ für einen chimären, humanen oder humanisierten Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an Mesothelin, EGFR oderC4.4a bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

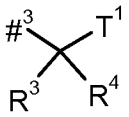
$AK_2$ für einen chimären, humanen oder humanisierten Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an Mesothelin, EGFR oderC4.4a bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$R^{35}$ für Methyl steht;

D für eine Gruppe der Formel




oder



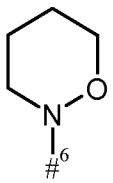

steht, wobei

$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, oder Ethyl steht,

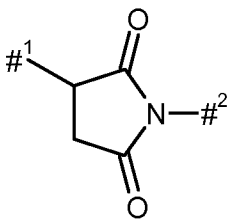
die Gruppe §-G-$L^1$-B-$L^2$-§§ für einen Linker steht,

wobei

§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

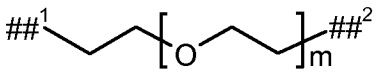
$#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel




steht, wobei

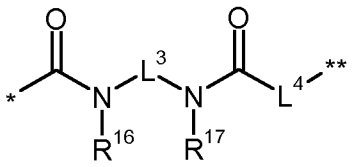
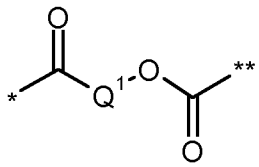
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

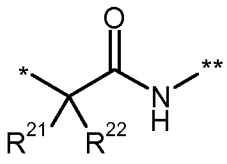
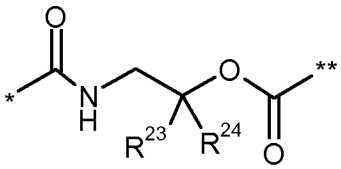
## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,


oder


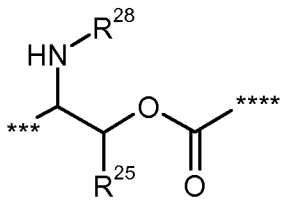
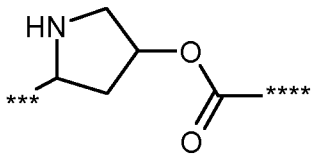
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

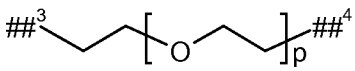
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

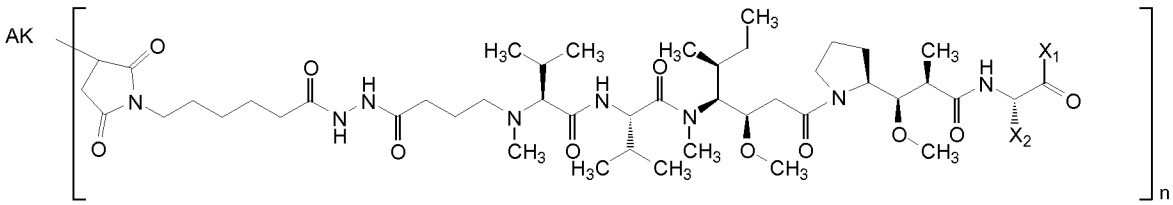
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

Besonders bevorzugt sind Konjugate der folgenden Formel,

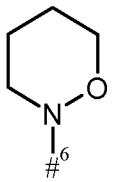


wobei

n für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5 steht;

AK für einen humanen oder humanisierten Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an Mesothelin, EGFR oderC4.4a bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

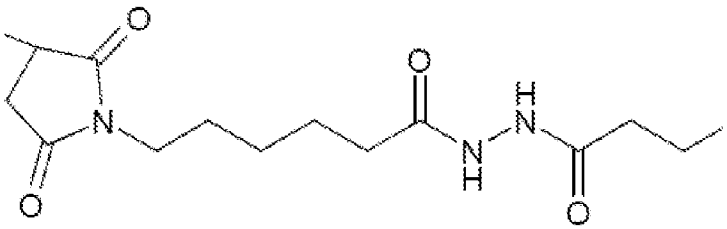
$X_1$ für $NH_2$ oder



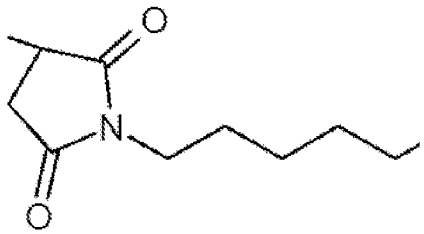
steht; und

$X_2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht.

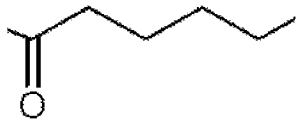
Bei Bindung des Toxophors an einen Cystein-Rest des Antikörpers kann der Linker

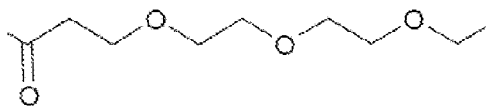


durch z.B. den folgenden Linker ersetzt werden:

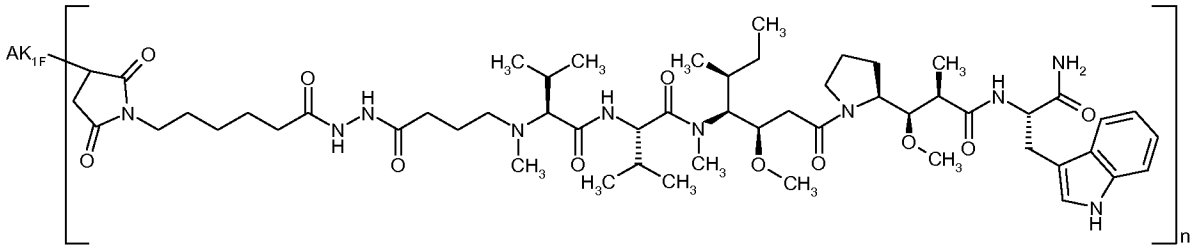


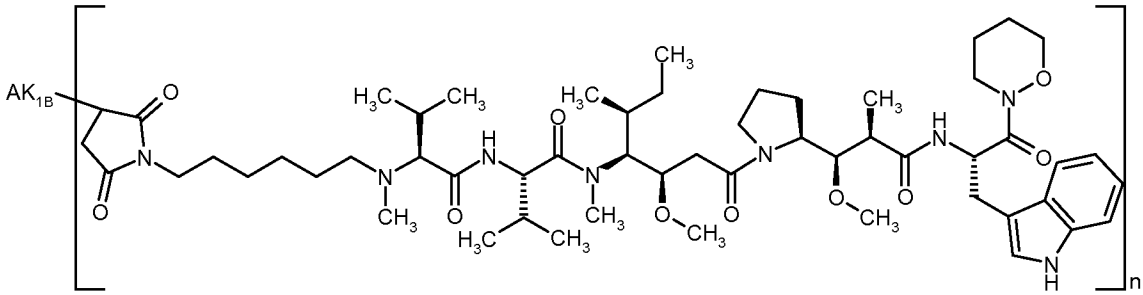
Bei Bindung des Toxophors an eine NH-Gruppe eines Lysin-Restes des Antikörpers kann der Linker durch folgende ausgetauscht werden:

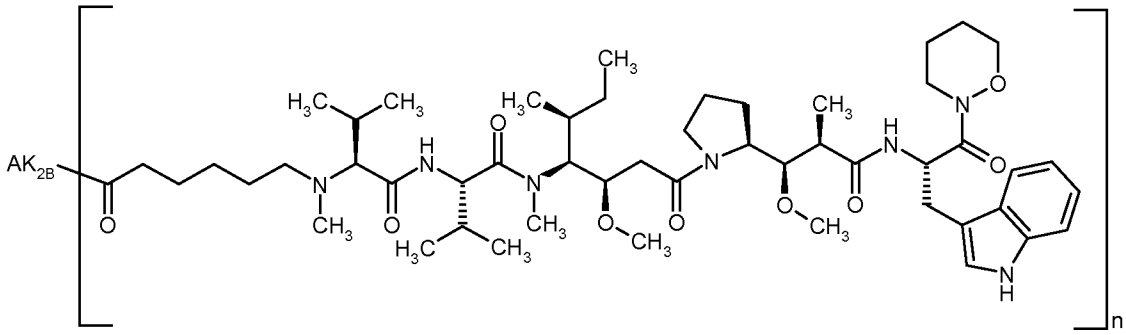


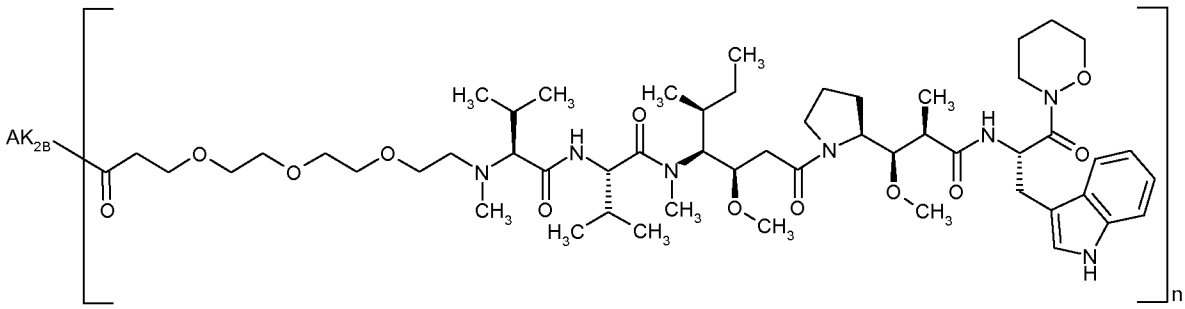


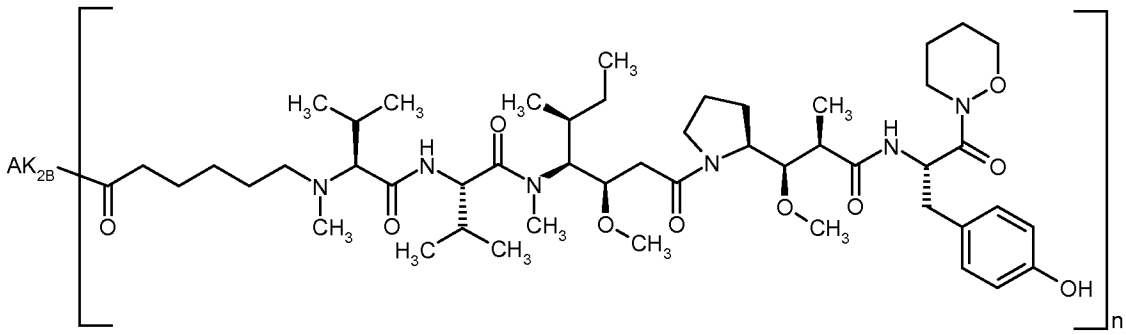
Besonders bevorzugt wird erfindungsgemäß das Wirkstoff-Binder-Konjugat aus den folgenden Verbindungen, wobei n jeweils für eine Zahl von 2 bis 8, vorzugsweise 2 bis 5 steht, und AK für einen chimären, humanen oder humanisierten Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an Mesothelin, EGFR oderC4.4a bindet:

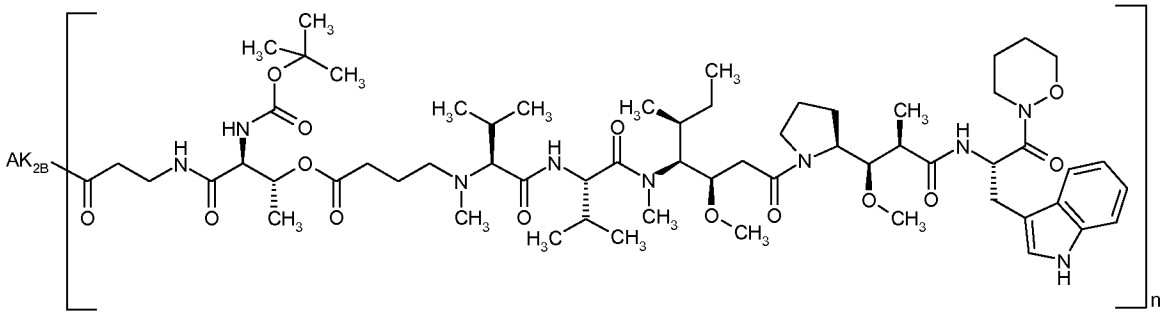












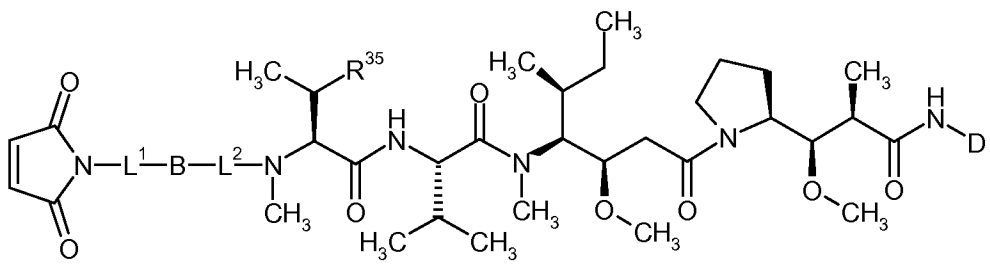
In diesen Formeln können $AK_{1F}$, $AK_{1B}$ und $AK_{2B}$ durch andere chimäre, humane oder humanisierte anti-C4.4a-Antikörper, anti-EGFR-Antikörper oder anti-Mesothelin-Antikörper ersetzt werden.

Die in den jeweiligen Kombinationen bzw. bevorzugten Kombinationen von Resten im einzelnen angegebenen Reste-Definitionen werden unabhängig von den jeweiligen angegebenen Kombinationen der Reste beliebig auch durch Reste-Definitionen anderer Kombinationen ersetzt.

Ganz besonders bevorzugt sind Kombinationen von zwei oder mehreren der oben genannten Vorzugsbereiche.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (Ia), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung des Binders in PBS-Puffer

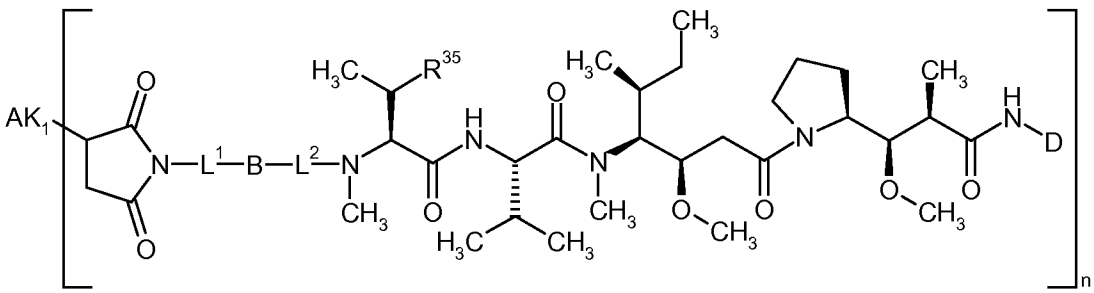
[A] mit einem geeigneten Reduktionsmittel, wie beispielsweise Dithiothreitol oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid, versetzt, und anschließend mit einer Verbindung der Formel (IIa)



(IIa),

in welcher D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (I-A)



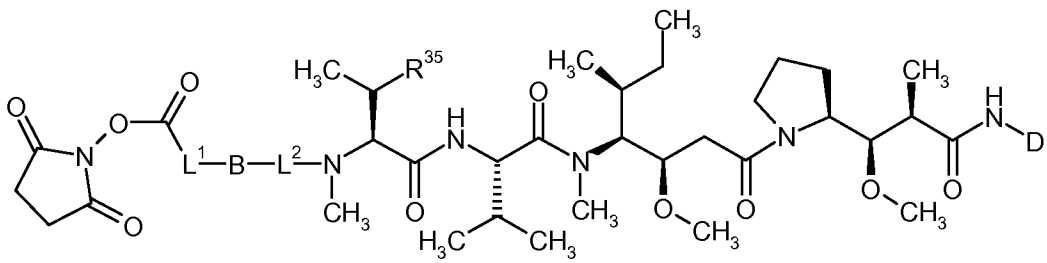
(Ia-A),

in welcher n, $AK_1$, D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt,

oder

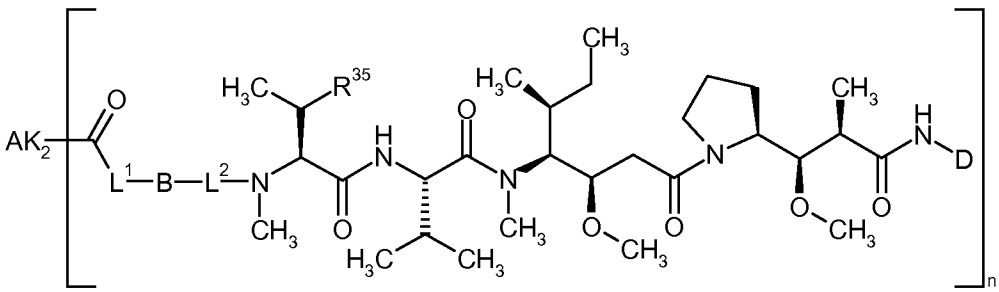
[B] mit einer Verbindung der Formel (IIIa)



(IIIa),

in welcher D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (Ia-B)



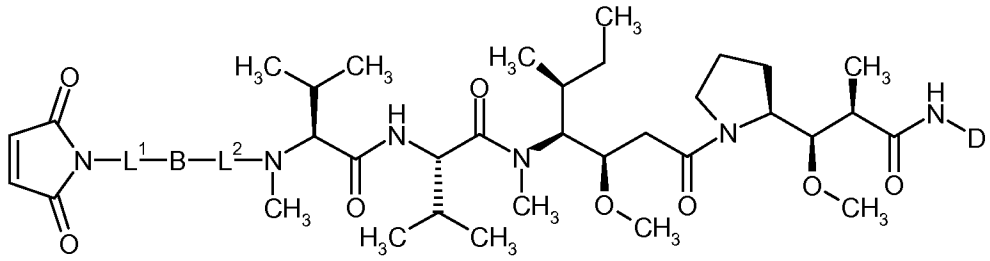
(Ia-B),

in welcher n, $AK_2$, D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung des Binders in PBS-Puffer

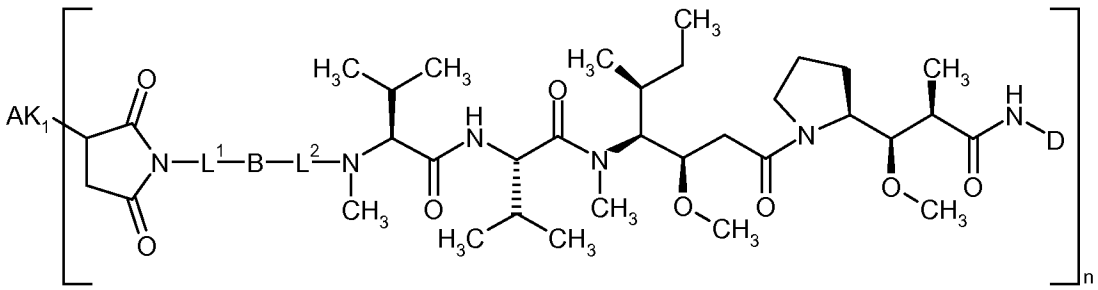
[A] mit einem geeigneten Reduktionsmittel, wie beispielsweise Dithiothreitol oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid, versetzt, und anschließend mit einer Verbindung der Formel (II)



(II),

in welcher D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (I-A)



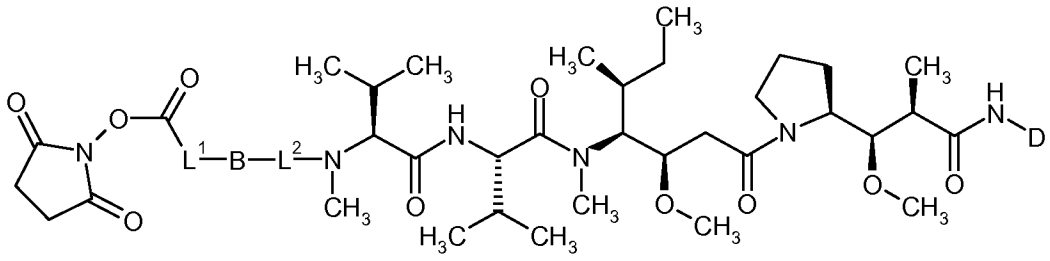
(I-A),

in welcher n, $AK_1$, D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt,

oder

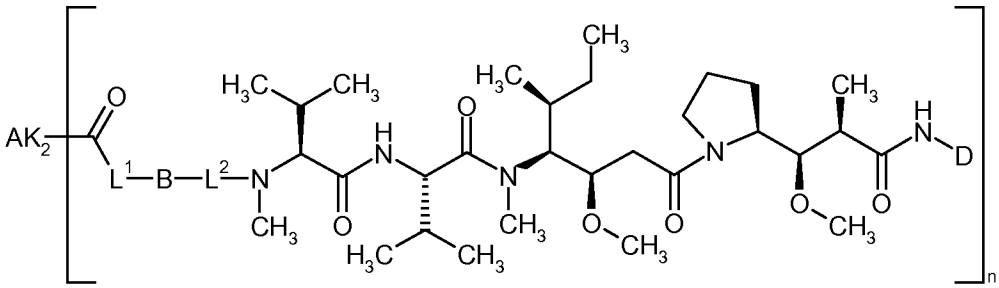
[B] mit einer Verbindung der Formel (III)



(III),

in welcher D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (I-B)



(I-B),

in welcher n, $AK_2$, D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

Cystein-Kupplung:

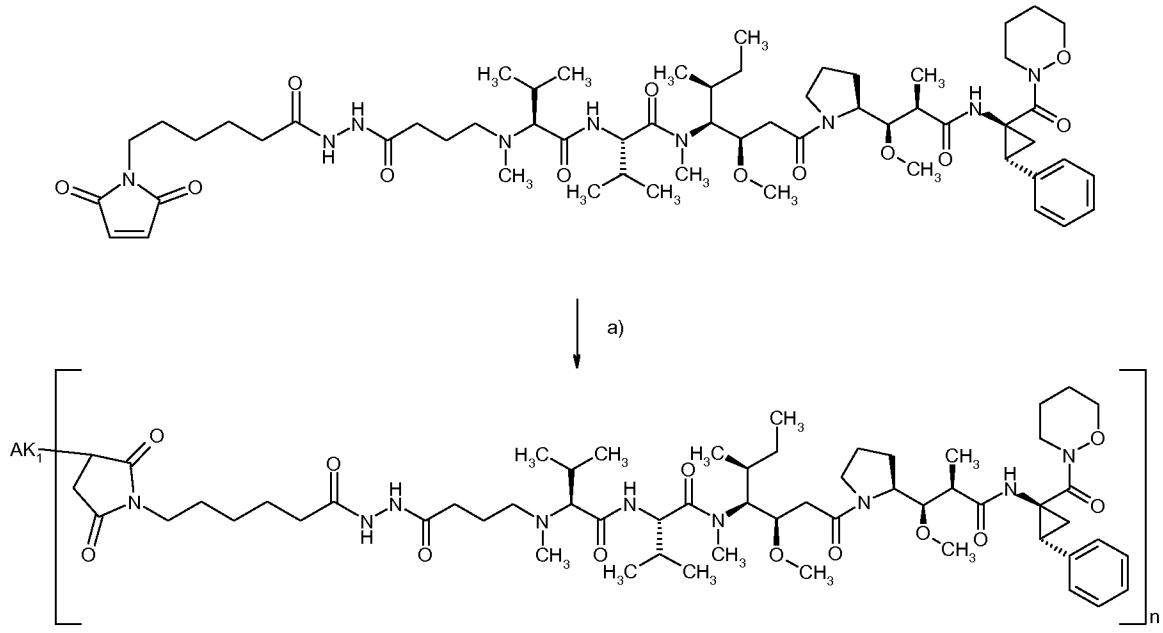
Die partielle Reduktion des Antikörpers sowie die anschließende Konjugation des (partiell) reduzierten Antikörpers mit einer Verbindung der Formel (II) bzw. (IIa) erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Methoden, siehe z.B. Ducry et. al., Bioconj. Chem. 2010, 21, 5 und Referenzen hierin, Klussman et.al., Bioconj. Chem. 2004, 15(4), 765-773. Bevorzugt erfolgt die milde Reduktion des Antikörpers durch Zugabe von 2-6 Equivalenten TCEP zu dem in geeigneter Pufferlösung, bevorzugt Phospatpuffer, vorliegenden Antikörpers und 30-180-minütigem Rühren bei Temperaturen zwischen 15 und 40°C, bevorzugt bei RT. Anschließend erfolgt die Konjugation durch Zugabe einer Lösung einer Verbindung der Formel (II) bzw. (IIa) in DMSO, Acetonitril oder DMF zur Lösung des (partiell) reduzierten Antikörpers in PBS-Puffer, und anschliessender Umsetzung bei einer Temperatur von 0°C bis +40°C, insbesondere von +10°C bis +30°C, für einen Zeitraum von 30 min bis 6 Stunden, insbesondere 1 bis 2 Stunden.

Lysin-Kupplung:

Zunächst werden die Verbindungen der Formel (III) bzw. (IIa) oder vergleichbare aktivierte Carboxylkomponenten nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt. Diese werden dann in inerten Lösungsmitteln wie z.B. DMSO oder DMF aufgenommen und zu dem bevorzugt in Phosphatpuffer bei neutralem pH-Wert vorliegenden Antikörper zugegeben. Die Lösung wird 1-16h bei einer Temperatur zwischen 15 und 40°C, bevorzugt RT gerührt.

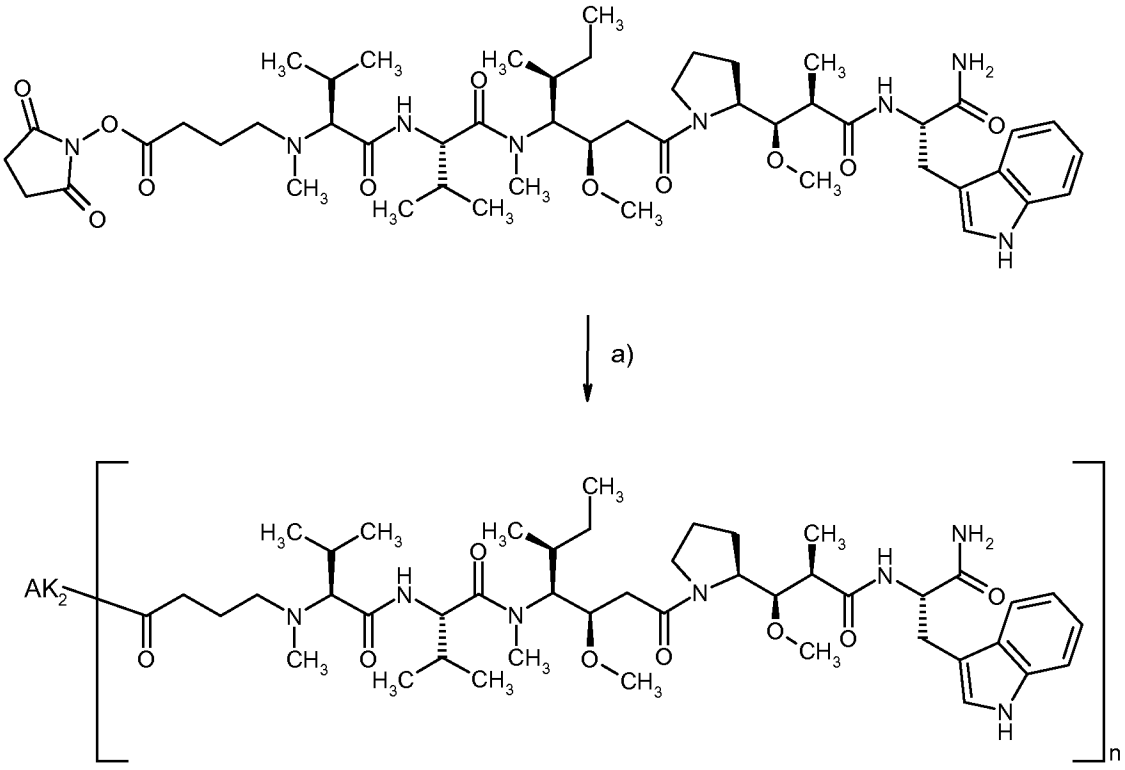
Die zuvor beschriebenen Herstellungsverfahren werden anhand der nachfolgenden Schemata (Schema 1 und 2) beispielhaft erläutert:

Schema 1



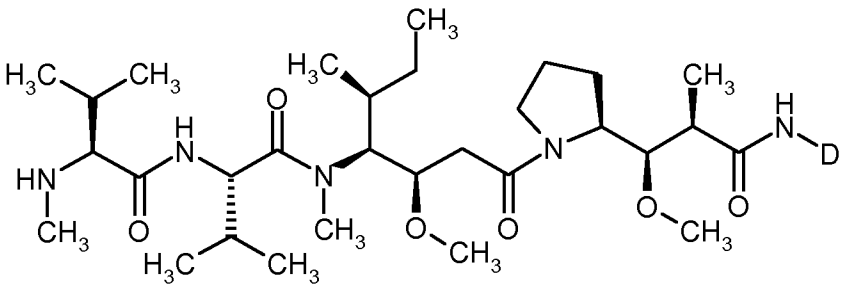

[a): 1. AK, TCEP, PBS-Puffer, RT; 2. Zugabe vom Maleinimid-Derivat in DMSO, RT].

Schema 2




[a): AK, PBS-Puffer, RT mit aktiviertem Carboxylderivat der Linker-Wirkstoff-Komponenten versetzen].

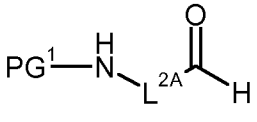
Die Verbindungen der Formel (II), in welcher $L^1$ und B für eine Bindung stehen, können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IV)



(IV),

in welcher D die oben angegebene Bedeutung hat,

in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel (V)



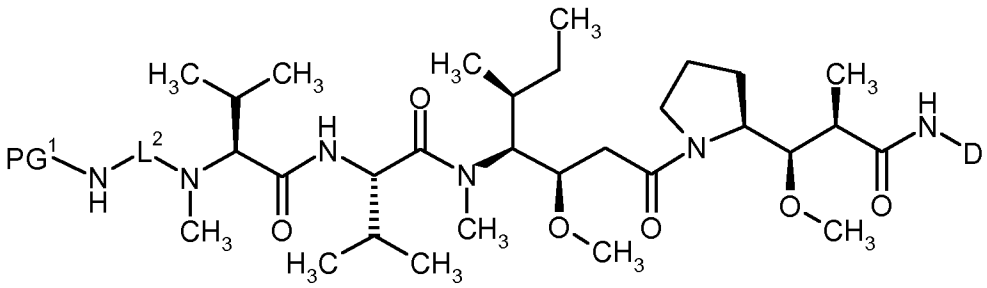
(V),

in welcher

$L^{2A}$ die oben definierte Bedeutung von $L^2$ hat, jedoch in der Alkyl-Kettenlänge um ein Kohlenstoffatom verkürzt ist,

$PG^1$ für eine Amino-Schutzgruppe wie beispielsweise (9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl, *tert.*-Butoxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

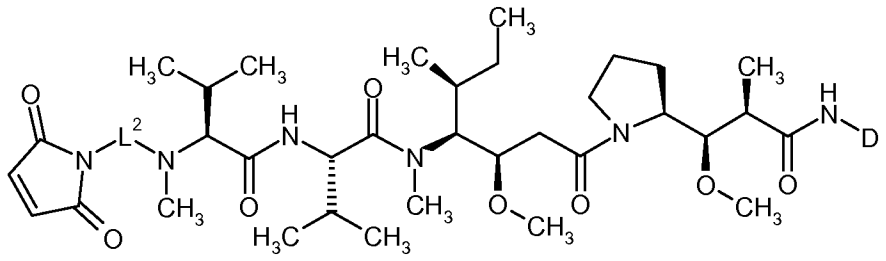
zu einer Verbindung der Formel (VI)



(VI),

in welcher D, $L^2$ und $PG^1$ die oben angegebene Bedeutung hat,

reduktiv aminiert, von dieser Verbindung nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^1$ abspaltet, und die entschützte Verbindung in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base mit Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat zu einer Verbindung der Formel (II-A)

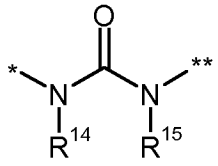


(II-A),

in welcher D und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

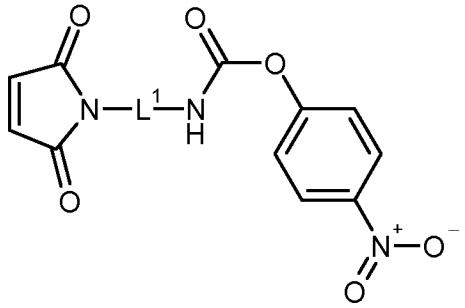
Die Verbindungen der Formel (II), in welcher B für eine Gruppe der Formel ($B^1$)



($B^1$),

in welcher *, **, $R^{14}$ und $R^{15}$ jeweils die oben angegebenen Bedingungen haben,

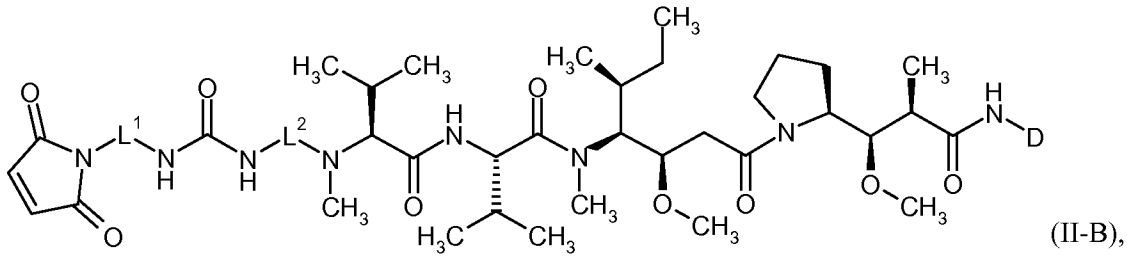
steht, können hergestellt werden, indem man von einer Verbindung der Formel (VI) nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^1$ abspaltet, und die entschützte Verbindung in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (VII)



(VII),

in welcher $L^1$ die oben angegebene Bedeutung hat,

zu einer Verbindung der Formel (II-B)

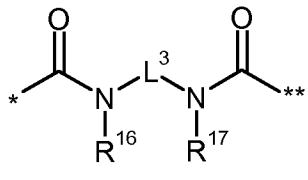


(II-B),

in welcher D, $L^1$ und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

Die Verbindungen der Formel (II), in welcher B für eine Gruppe der Formel ($B^2$)

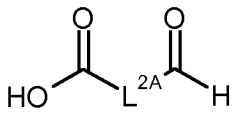


($B^2$),

in welcher *, **, $L^3$, $R^{16}$ und $R^{17}$ jeweils die oben angegebenen Bedingungen haben,

steht, können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IV)

in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel (VIII)

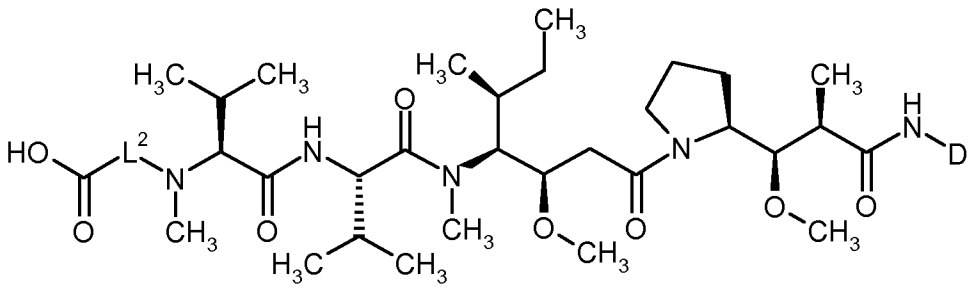


(VIII),

in welcher

$L^{2A}$ die oben definierte Bedeutung von $L^2$ hat, jedoch in der Alkyl-Kettenlänge um ein Kohlenstoffatom verkürzt ist,

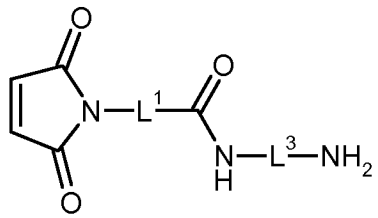
zu einer Verbindung der Formel (IX)



(IX),

in welcher D und $L^2$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

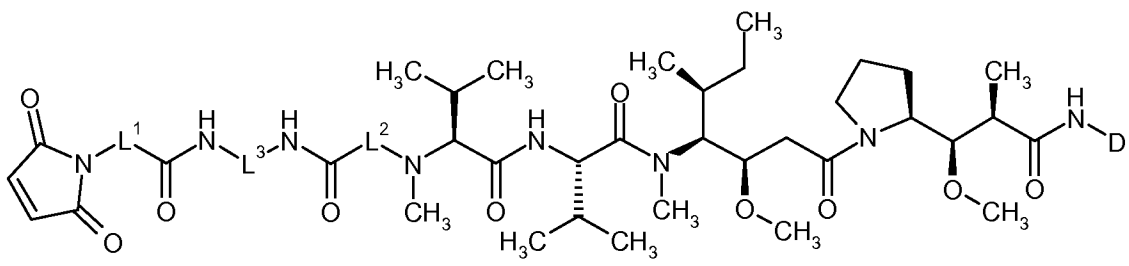
reduktiv aminiert, und diese Verbindung in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (X)



(X),

in welcher $L^1$ und $L^3$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (II-C)

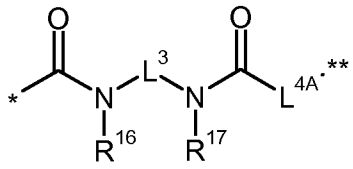


(II-C),

in welcher D, $L^1$, $L^2$ und $L^3$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

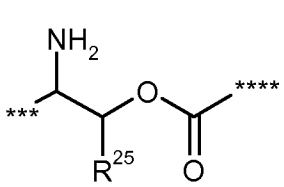
Verbindung der Formel (II), in welcher B für eine Gruppe der Formel ($B^3$)



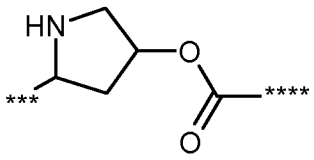
($B^3$),

in welcher *, **, $L^3$, $R^{16}$ und $R^{17}$ jeweils die oben angegebenen Bedingungen haben und

$L^{4A}$ für eine Gruppe der Formel



oder



steht, worin

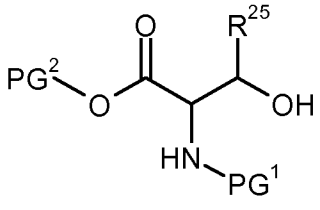
*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

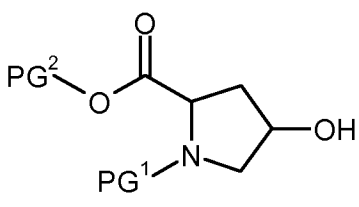
$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

steht,

können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base und eines geeigneten Kupplungsreagenzes mit einer Verbindung der Formel (XI-A) oder (XI-B)



(XI-A) oder

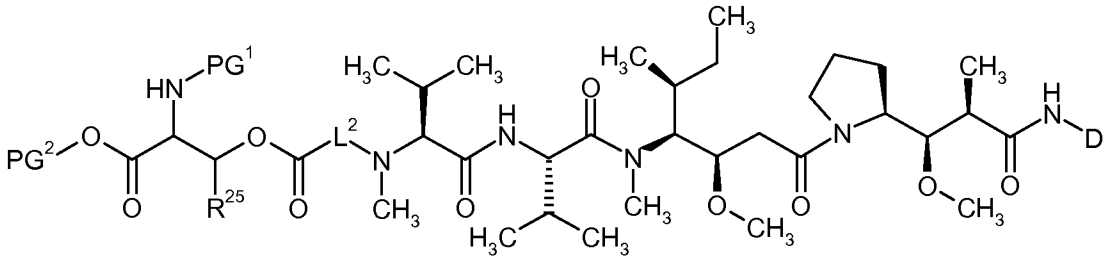


(XI-B),

in welchen $R^{25}$ und $PG^1$ jeweils die zuvor angegebenen Bedeutungen haben und

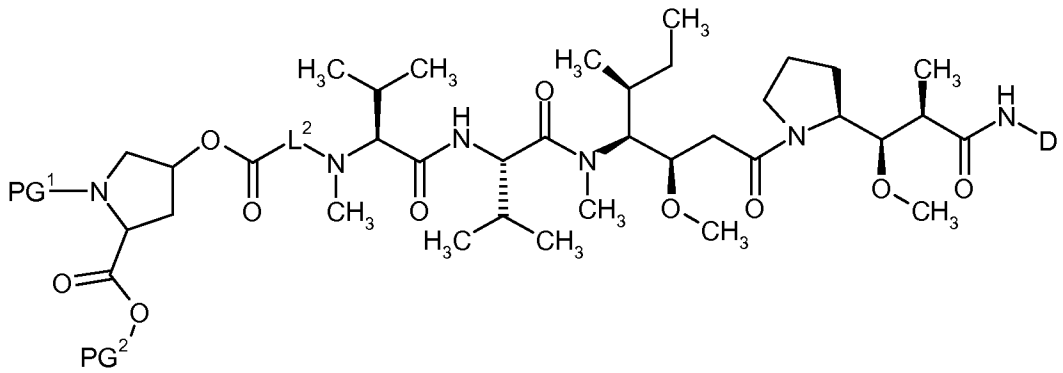
$PG^2$ für eine geeignete Carboxyl-Schutzgruppe, insbesondere Benzyl, steht,

zu einer Verbindung (XII-A) bzw. (XII-B)



(XII-A)

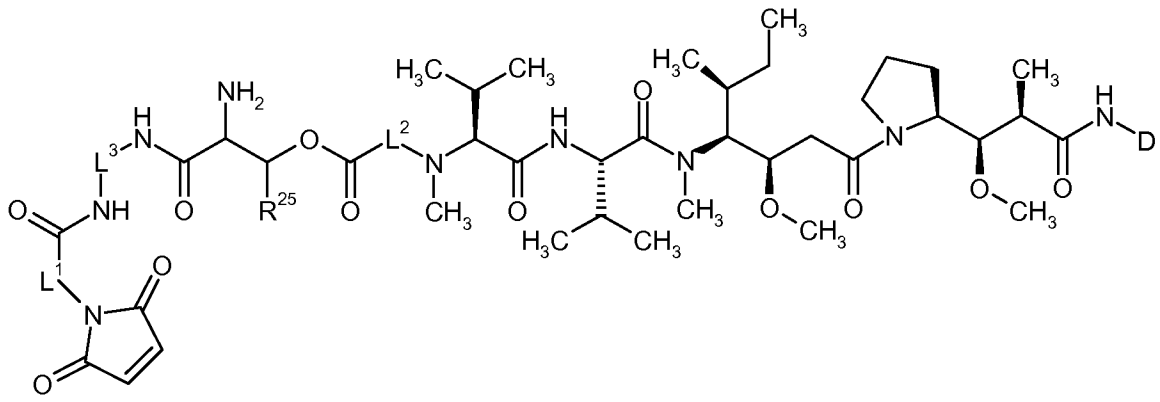
bzw.



(XII-B),

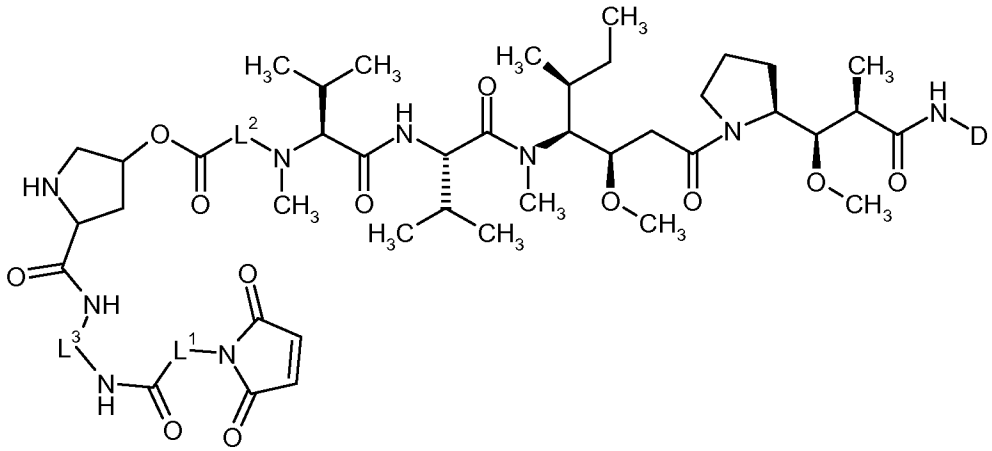
in welchen D, $PG^1$, $PG^2$ und $L^2$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt, von dieser anschliessend nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^2$ abspaltet und die entschützte Verbindung in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (X) umsetzt, und von dieser schließlich nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe PG1 zu einer Verbindung der Formel (II-D-A) bzw. (II-D-B)



(II-D-A),

bzw.

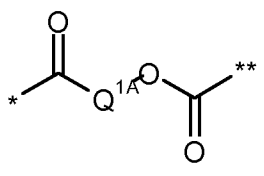


(II-D-B),

in welchen D, $L^1$, $L^2$ und $L^3$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

abspaltet.

Verbindung der Formel (II), in welcher B für eine Gruppe der Formel ($B^4$)

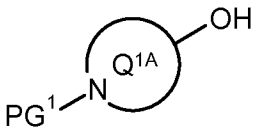


($B^4$),

in welcher *, ** jeweils die oben angegebenen Bedingungen haben und

$Q^{1A}$ für einen N-verknüpften 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

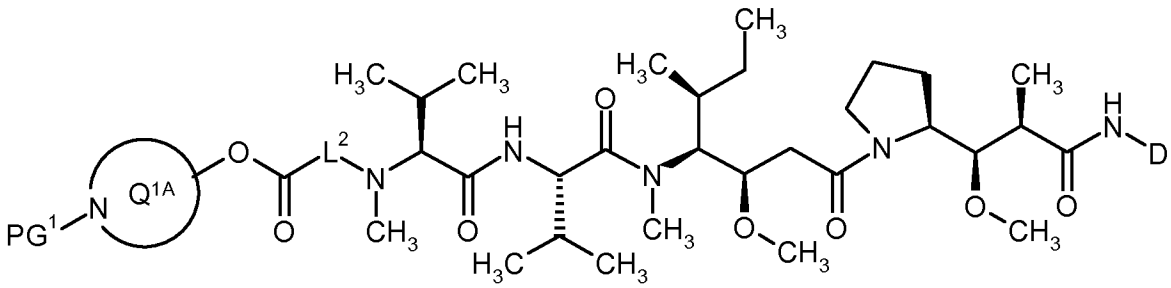
können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base und eines geeigneten Kupplungsreagenzes mit einer Verbindung der Formel (XXI)



(XXI),

in welcher $PG^1$ und $Q^{1A}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

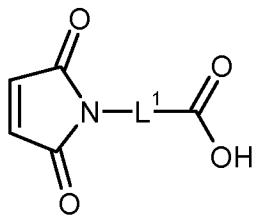
zu einer Verbindung der Formel (XXII)



(XXII),

in welcher $PG^1$, $Q^{1A}$, D und $L^2$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

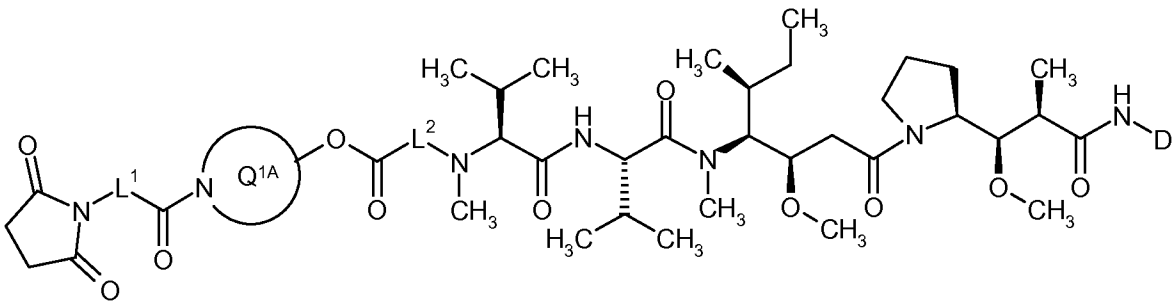
umsetzt, von dieser nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^1$ abspaltet und die entschützte Verbindung anschliessend in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XXIII)



(XXIII),

in welcher $L^1$ die oben angegebene Bedeutung hat,

zu einer Verbindung der Formel (II-D)

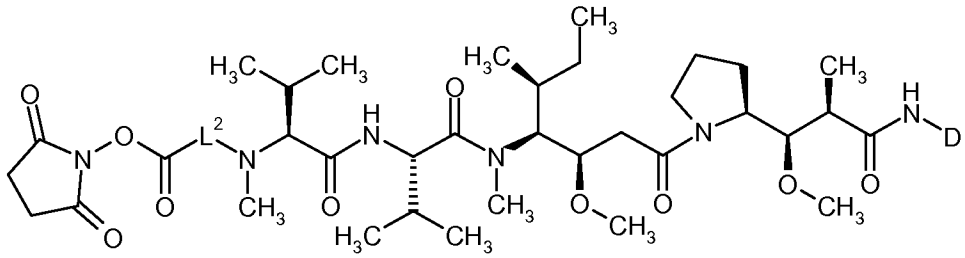


(II-D),

in welcher $Q^{1A}$, D, $L^1$ und $L^2$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

Die Verbindungen der Formel (III), in welcher $L^1$ und B für eine Bindung stehen, können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit N-Hydroxysuccinimid zu einer Verbindung der Formel (III-A)

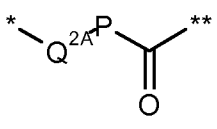


(III-A),

in welcher D und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

Die Verbindungen der Formel (III), in welcher $L^1$ für eine Bindung und B für eine Gruppe der Formel ($B^{5A}$)

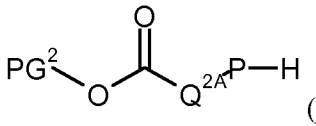


($B^{5A}$),

in welcher *, ** und P jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben und

$Q^{2A}$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus steht,

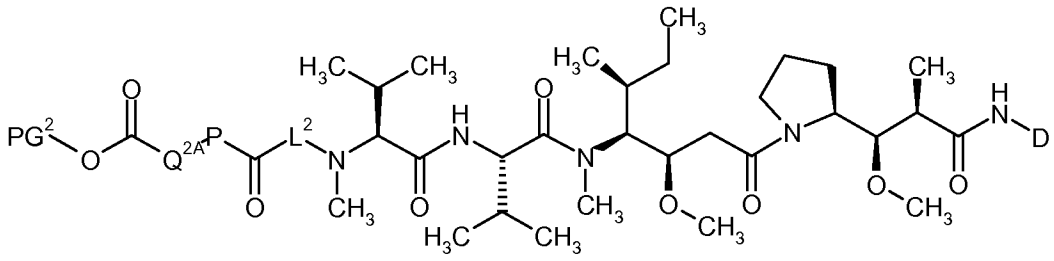
stehen, können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XIII)



(XIII),

in welcher P, $Q^{2A}$ und $PG^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

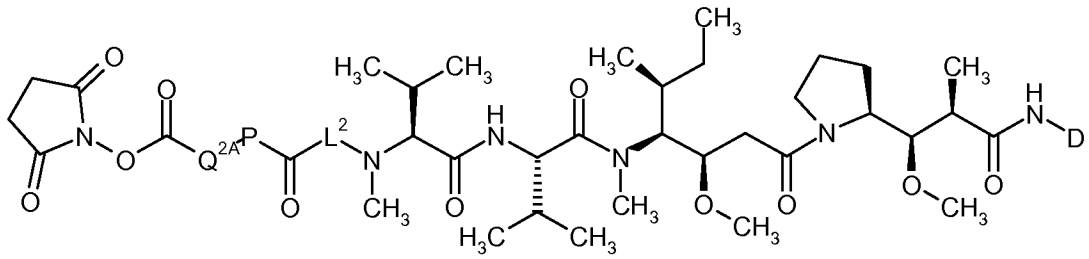
zu einer Verbindung der Formel (XIV)



(XIV),

in welcher D, P, $Q^{2A}$, $L^2$ und $PG^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt, von dieser nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^2$ abspaltet und die entschützte Verbindung anschliessend in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base mit N-Hydroxysuccinimid zu einer Verbindung der Formel (III-B)

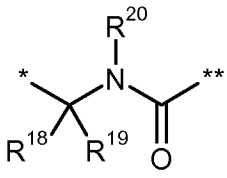


(III-B),

in welcher D, P, $Q^{2A}$ und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

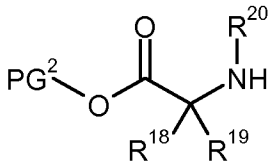
Die Verbindungen der Formel (III), in welcher $L^1$ für eine Bindung und B für eine Gruppe der Formel ($B^6$)



(B$^6$),

in welcher *, **, $R^{18}$, $R^{19}$ und $R^{20}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

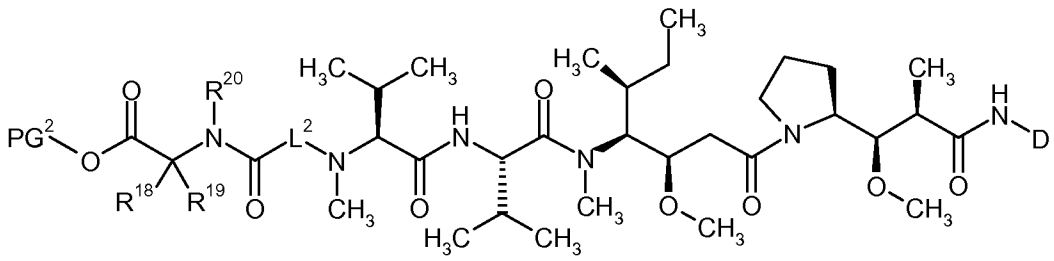
stehen, können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XV)



(XV),

in welcher $R^{18}$, $R^{19}$, $R^{20}$ und $PG^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

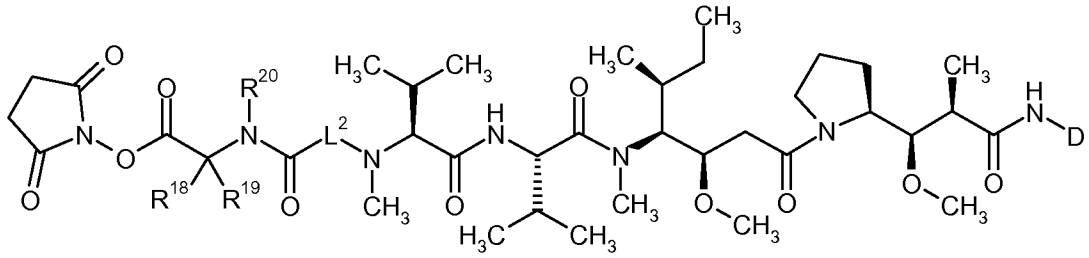
zu einer Verbindung der Formel (XVI)



(XVI),

in welcher D, $R^{18}$, $R^{19}$, $R^{20}$, $L^2$ und $PG^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt, von dieser nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^2$ abspaltet und die entschützte Verbindung anschliessend in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit N-Hydroxysuccinimid zu einer Verbindung der Formel (III-C)

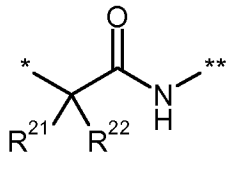


(III-C),

in welcher D, $R^{18}$, $R^{19}$, $R^{20}$ und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

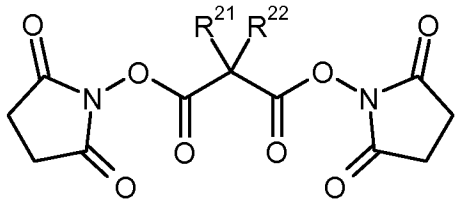
Die Verbindungen der Formel (III), in welcher $L^1$ für eine Bindung und B für eine Gruppe der Formel ($B^7$)



($B^7$),

in welcher *, **, $R^{21}$ und $R^{22}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

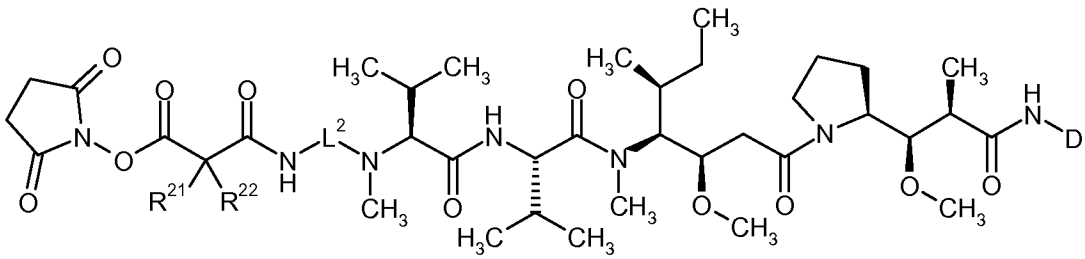
stehen, können hergestellt werden, indem man von einer Verbindung der Formel (VI) nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^1$ abspaltet, und die resultierende entschützte Verbindung in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XVII)



(XVII),

in welcher $R^{21}$ und $R^{22}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (III-D)

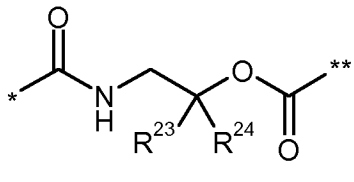


(III-D),

in welcher D, $R^{21}$, $R^{22}$ und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

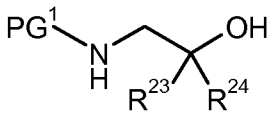
Die Verbindungen der Formel (III), in welcher B für eine Gruppe der Formel ($B^8$)



($B^8$),

in welcher *, **, $R^{23}$ und $R^{24}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

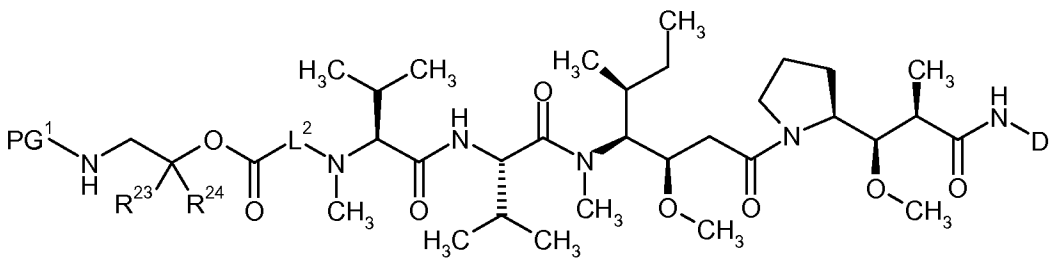
steht, können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XVIII)



(XVIII),

in welcher $R^{23}$, $R^{24}$ und $PG^1$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

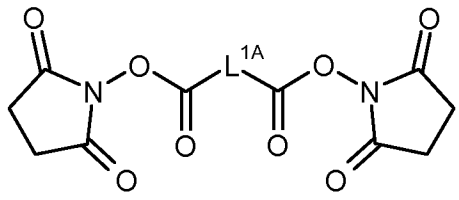
zu einer Verbindung der Formel (XIX)



(XIX),

in welcher D, $R^{23}$, $R^{24}$, $L^2$ und $PG^1$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

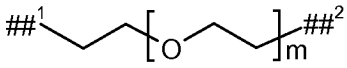
umsetzt, von dieser nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^1$ abspaltet und die entschützte Verbindung anschliessend in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Kupplungsreagenzes und einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XX)



(XX),

in welcher

$L^{1A}$ für lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

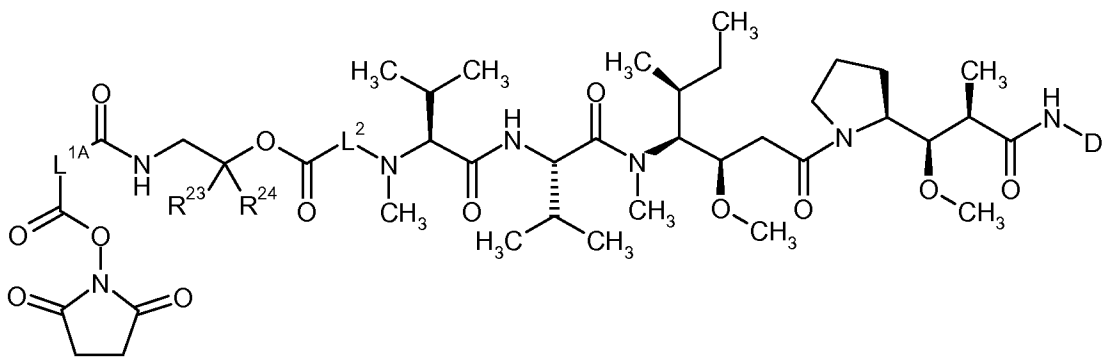
##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

zu einer Verbindung der Formel (III-E)

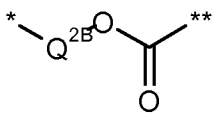


(III-E),

in welcher D, $R^{23}$, $R^{24}$, $L^{1A}$ und $L^2$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

Die Verbindungen der Formel (III), in welcher B für eine Gruppe der Formel ($B^{5B}$)

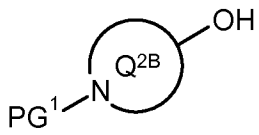


($B^{5B}$),

in welcher * und ** jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben und

$Q^{2B}$ für einen N-verknüpften 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

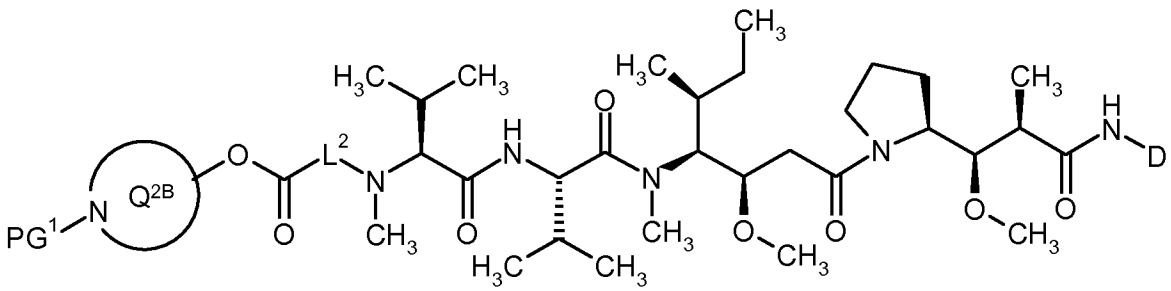
können hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel (IX) in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base und eines geeigneten Kupplungsreagenzes mit einer Verbindung der Formel (XXIV)



(XXIV),

in welcher $PG^1$ und $Q^{2B}$ jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (XXV)

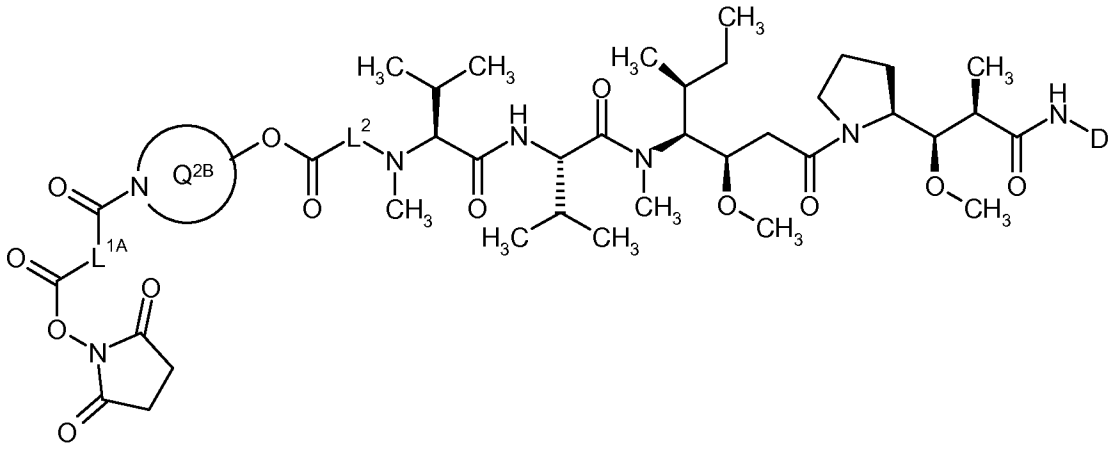


(XXV),

in welcher $PG^1$, $Q^{2B}$, D und $L^2$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt, von dieser nach dem Fachmann bekannten Methoden die Schutzgruppe $PG^1$ abspaltet,

und die entschützte Verbindung anschliessend in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart einer geeigneten Base mit einer Verbindung der Formel (XX) in eine Verbindung der Formel (III-F)



(III-F),

in welcher $Q^{2B}$, D, $L^{1A}$ und $L^2$ die oben angegebenen Bedeutungen haben,

überführt.

Die Umsetzungen (IV) + (V) → (VI) und (IV) + (VIII) → (IX) erfolgen in den für eine reduktive Aminierung üblichen, unter den Reaktionsbedingungen inerten Lösungsmitteln, gegebenenfalls in Gegenwart einer Säure und/ oder eines wasserentziehenden Mittels als Katalysator. Zu solchen Lösungsmitteln gehören beispielsweise Alkohole wie Methanol, Ethanol, *n*-Propanol, Isopropanol, *n*-Butanol oder *tert.*-Butanol, Ether wie Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan oder Bis-(2-methoxyethyl)-ether, oder andere Solventien wie Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan, *N,N*-Dimethylformamid oder auch Wasser. Ebenso ist es möglich, Gemische dieser Lösungsmittel einzusetzen. Bevorzugt wird als Lösungsmittel ein 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisch verwendet unter Zusatz von Essigsäure oder verdünnter Salzsäure als Katalysator.

Als Reduktionsmittel eignen sich für diese Reaktion insbesondere komplexe Borhydride, wie beispielsweise Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid, Natriumtriacetoxyborhydrid, Tetra-*n*-butylammoniumborhydrid oder Boran-Pyridin-Komplex. Bevorzugt wird Natriumcyanoborhydrid oder Boran-Pyridin-Komplex eingesetzt.

Die Umsetzungen (IV) + (V) → (VI) und (IV) + (VIII) → (IX) erfolgen im Allgemeinen in einem Temperaturbereich von 0°C bis +120°C, bevorzugt bei +50°C bis +100°C. Die Reaktionen können bei normalem, bei erhöhtem oder bei erniedrigtem Druck durchgeführt werden (z.B. von 0.5 bis 5 bar); in der Regel arbeitet man bei Normaldruck.

Die oben beschriebenen Kupplungsreaktionen (IX) + (X) → (II-C), (XII-A) bzw. (XII-B) + (X) → (II-D-A) bzw. (II-D-B), (IX) + (XIII) → (XIV), (IX) + (XV) → (XVI) und (XXII) + (XXIII) →

(II-D) (Amid-Bildung aus jeweiliger Amin- und Carbonsäure-Komponente) werden nach allgemein üblichen Methoden der Peptidchemie durchgeführt [siehe z.B. M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, 1993; M. Bodanszky und A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, 1984; H.-D. Jakubke und H. Jeschkeit, *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, 1982].

Inerte Lösungsmittel für diese Kupplungsreaktionen sind beispielsweise Ether wie Diethylether, Diisopropylether, *tert.*-Butylmethylether, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan oder Bis-(2-methoxyethyl)-ether, Kohlenwasserstoffe wie Benzol, Toluol, Xylol, Pentan, Hexan, Heptan, Cyclohexan oder Erdölfraktionen, Halogenkohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, Trichlormethan, Tetrachlormethan, 1,2-Dichlorethan, Trichlorethylen oder Chlorbenzol, oder dipolar-aprotische Lösungsmittel wie Aceton, Methylethylketon, Acetonitril, Ethylacetat, Pyridin, Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA), *N,N'*-Dimethylpropylenharnstoff (DMPU) oder *N*-Methylpyrrolidinon (NMP). Ebenso ist es möglich, Gemische solcher Lösungsmittel zu verwenden. Bevorzugt wird *N,N*-Dimethylformamid eingesetzt.

Als Aktivierungs-/Kondensationsmittel für diese Kupplungen eignen sich beispielsweise Carbodiimide wie *N,N'*-Diethyl-, *N,N'*-Dipropyl-, *N,N'*-Diisopropyl-, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder *N*-(3-Dimethylaminoisopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC), Phosgen-Derivate wie *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) oder Isobutylchlorformiat, 1,2-Oxazolium-Verbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-*tert.*-Butyl-5-methylisoxazolium-perchlorat, Acylamino-Verbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, Phosphor-Verbindungen wie Propanphosphonsäureanhydrid, Cyanophosphonsäurediethylester, Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)-phosphorylchlorid, Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat oder Benzotriazol-1-yloxy-tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP), oder Uronium-Verbindungen wie *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU), *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), 2-(2-Oxo-1-(2*H*)-pyridyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TPTU), *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) oder *O*-(1*H*-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TCTU), gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Hilfsstoffen wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) oder *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu), sowie als Basen Alkalicarbonate, z.B. Natrium- oder Kaliumcarbonat, oder tertiäre Aminbasen wie Triethylamin, *N*-Methylmorpholin, *N*-Methylpiperidin, *N,N*-Diisopropylethylamin, Pyridin oder 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird als Aktivierungs-/Kondensationsmittel für solche Kupplungsreaktionen bevorzugt *N*-(3-Dimethylaminoisopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid

(EDC) in Kombination mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und *N,N*-Diisopropylethylamin, oder *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) gleichfalls in Verbindung mit *N,N*-Diisopropylethylamin verwendet.

Die Kupplungsreaktionen (IX) + (X) → (II-C), (XII-A) bzw. (XII-B) + (X) → (II-D-A) bzw. (II-D-B), (IX) + (XIII) → (XIV) , (IX) + (XV) → (XVI) und (XXII) + (XXIII) → (II-D) werden in der Regel in einem Temperaturbereich von -20°C bis +60°C, bevorzugt bei 0°C bis +40°C durchgeführt. Die Umsetzungen können bei normalem, bei erhöhtem oder bei erniedrigtem Druck erfolgen (z.B. von 0.5 bis 5 bar); im Allgemeinen arbeitet man bei Normaldruck.

Die Esterbildungen (IX) + (XVIII) → (XII) und (IX) + (XI-A) bzw. (XI-B) → (XII-A) bzw. (XII-B), (IX) + (XXIV) → (XXV) sowie (IX) + (XXI) → (XXII) erfolgen in Analogie zu den oben beschriebenen Amid-Kupplungsreaktionen. Bevorzugt erfolgen diese Reaktionen in Dichlormethan unter Verwendung von *N*-(3-Dimethylaminoisopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC) und 4-Dimethylaminopyridin bei einer Temperatur von +50°C bis 100°C bei Normaldruck.

Die in den Verbindungen gegebenenfalls vorhandenen funktionellen Gruppen – wie insbesondere Amino-, Hydroxy- und Carboxylgruppen – können bei den zuvor beschriebenen Verfahrensschritten, falls zweckmäßig oder erforderlich, auch in temporär geschützter Form vorliegen. Die Einführung und Entfernung solcher Schutzgruppen erfolgt hierbei nach üblichen, aus der Peptidchemie bekannten Methoden [siehe z.B. T.W. Greene und P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1999; M. Bodanszky und A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, 1984]. Bei Vorhandensein mehrerer geschützter Gruppen kann deren Wiederfreisetzung gegebenenfalls simultan in einer Eintopf-Reaktion oder auch in separaten Reaktionsschritten vorgenommen werden.

Als Amino-Schutzgruppe $PG^1$ wird bevorzugt *tert.*-Butoxycarbonyl (Boc), Benzyloxycarbonyl (Z) oder (9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl (Fmoc) verwendet; für eine Hydroxy- oder Carboxyl-Funktion wird vorzugsweise *tert.*-Butyl oder Benzyl als Schutzgruppe $PG^2$ eingesetzt. Die Abspaltung einer *tert.*-Butyl- oder *tert.*-Butoxycarbonyl-Gruppe geschieht üblicherweise durch Behandlung mit einer starken Säure, wie Chlorwasserstoff, Bromwasserstoff oder Trifluoressigsäure, in einem inerten Lösungsmittel wie Diethylether, 1,4-Dioxan, Dichlormethan oder Essigsäure; gegebenenfalls kann diese Reaktion auch ohne Zusatz eines inerten Lösungsmittels durchgeführt werden. Im Falle von Benzyl oder Benzyloxycarbonyl als Schutzgruppe werden diese bevorzugt durch Hydrogenolyse in Gegenwart eines geeigneten Palladium-Katalysators, wie beispielsweise Palladium auf Aktivkohle, entfernt. Die (9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl-Gruppe wird im Allgemeinen mit Hilfe einer sekundären Aminbase wie Diethylamin oder Piperidin abgespalten.

Die Umsetzung (VI) → (II-A) erfolgt in einem unter den Reaktionsbedingungen inerten Lösungsmittel wie beispielsweise Ether wie Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan oder Bis-(2-methoxyethyl)-ether, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Butanol oder *tert.*-Butanol, oder dipolar-aprotische Lösungsmittel wie Aceton, Methylethylketon, Acetonitril, Ethylacetat, Pyridin, Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA), *N,N'*-Dimethylpropylenharnstoff (DMPU) oder *N*-Methylpyrrolidinon (NMP) oder Wasser. Ebenso ist es möglich, Gemische solcher Lösungsmittel zu verwenden. Bevorzugt wird ein Gemisch von 1,4-Dioxan und Wasser eingesetzt.

Geeignete Basen für die Umsetzung (VI) → (II-A) sind beispielsweise Alkalicarbonate wie Kaliumcarbonat, Natriumcarbonat oder Lithiumcarbonat, Alkalihydrogencarbonate wie Natrium- oder Kaliumhydrogencarbonat oder Alkalialkoholate wie Natriummethanolat, Natriumethanolat oder Kalium-tert.-butylat. Bevorzugt wird Natriumhydrogencarbonat verwendet.

Die Reaktion (VI) → (II-A) erfolgt in einem Temperaturbereich von 0°C bis +50°C, bevorzugt bei +10°C bis +30°C. Die Umsetzung kann bei normalem, bei erhöhtem oder bei erniedrigtem Druck erfolgen (z.B. von 0.5 bis 5 bar); im Allgemeinen arbeitet man bei Normaldruck.

Die Umsetzung (VI) + (VII) → (II-B) erfolgt in einem unter den Reaktionsbedingungen inerten Lösungsmittel wie beispielsweise Ether wie Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan oder Bis-(2-methoxyethyl)-ether, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Butanol oder *tert.*-Butanol, oder dipolar-aprotische Lösungsmittel wie Aceton, Methylethylketon, Acetonitril, Ethylacetat, Pyridin, Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA), *N,N'*-Dimethylpropylenharnstoff (DMPU) oder *N*-Methylpyrrolidinon (NMP) oder Wasser. Ebenso ist es möglich, Gemische solcher Lösungsmittel zu verwenden. Bevorzugt wird DMF eingesetzt.

Geeignete Basen für die Umsetzung (VI) + (VII) → (II-B) sind beispielsweise tertiäre Aminbasen wie Triethylamin, *N*-Methylmorpholin, *N*-Methylpiperidin, *N,N*-Diisopropylethylamin, Pyridin oder 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin. Bevorzugt wird *N,N*-Diisopropylethylamin verwendet.

Die Reaktion (VI) + (VII) → (II-B) erfolgt in einem Temperaturbereich von 0°C bis +50°C, bevorzugt bei +10°C bis +30°C. Die Umsetzung kann bei normalem, bei erhöhtem oder bei erniedrigtem Druck erfolgen (z.B. von 0.5 bis 5 bar); im Allgemeinen arbeitet man bei Normaldruck.

Die Umsetzungen (IX) → (III-A), (XIV) → (III-B) und (XVI) → (III-C) sowie (VI) + (XVII) → (III-D), (XIX) + (XX) → (III-E) und (XXV) + (XX) → (III-F) erfolgen in einem Lösungsmittel, welches unter den Reaktionsbedingungen inert ist. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise Ether

wie Diethylether, Diisopropylether, *tert.*-Butylmethylether, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan oder Bis-(2-methoxyethyl)-ether, Kohlenwasserstoffe wie Benzol, Toluol, Xylol, Pentan, Hexan, Heptan, Cyclohexan oder Erdölfraktionen, Halogenkohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, Trichlormethan, Tetrachlormethan, 1,2-Dichlorethan, Trichlorethylen oder Chlorbenzol, oder dipolar-aprotische Lösungsmittel wie Aceton, Methylethylketon, Acetonitril, Ethylacetat, Pyridin, Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA), *N,N'*-Dimethylpropylenharnstoff (DMPU) oder *N*-Methylpyrrolidinon (NMP). Ebenso ist es möglich, Gemische solcher Lösungsmittel zu verwenden. Bevorzugt wird *N,N*-Dimethylformamid eingesetzt.

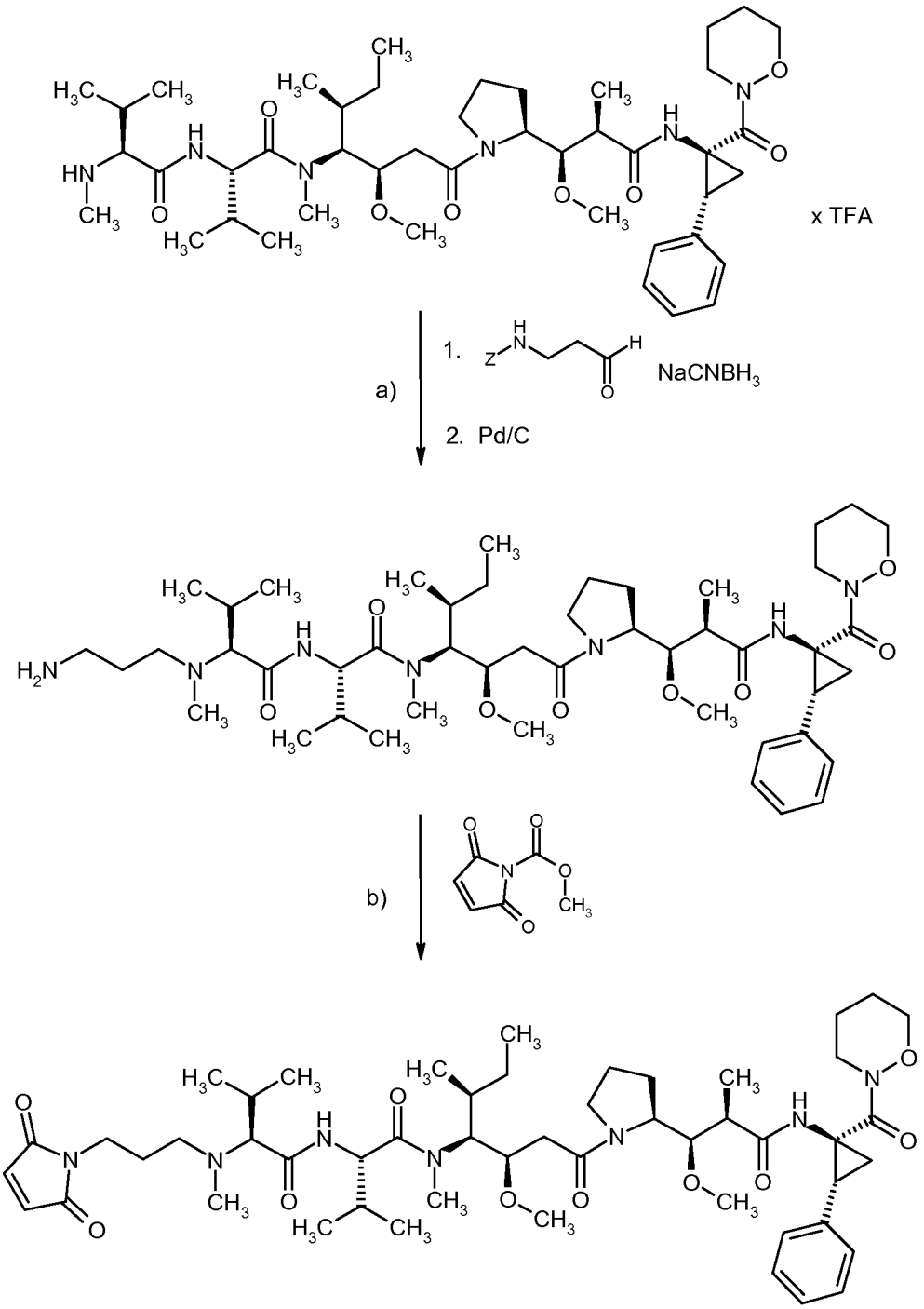
Geeignete Basen für diese Umsetzungen sind beispielsweise tertiäre Amine wie Triethylamin, *N*-Methylmorpholin, *N*-Methylpiperidin, *N,N*-Diisopropylethylamin, Pyridin oder 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin. Bevorzugt wird *N,N*-Diisopropylethylamin, verwendet, gegebenenfalls unter Zusatz von 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin.

Die Umsetzungen (IX) → (III-A), (XIV) → (III-B) und (XVI) → (III-C) sowie (VI) + (XVII) → (III-D) und (XIX) + (XX) → (III-E) erfolgen in einem Temperaturbereich von 0°C bis +50°C, bevorzugt bei +10°C bis +30°C. Die Umsetzung kann bei normalem, bei erhöhtem oder bei erniedrigtem Druck erfolgen (z.B. von 0.5 bis 5 bar); im Allgemeinen arbeitet man bei Normaldruck.

Die Verbindungen der Formeln (II), (III), (I-A) bzw. (I-B) sind Untermengen der Verbindungen der Formeln (IIa), (IIIa), (Ia-A) bzw. (Ia-B), wobei $R^{35}$ für Methyl steht. Die Herstellung der Verbindungen (IIa) und (IIIa) erfolgt in Analogie zur Herstellung der Verbindung der Formeln (II) und (III) wie zuvor beschrieben.

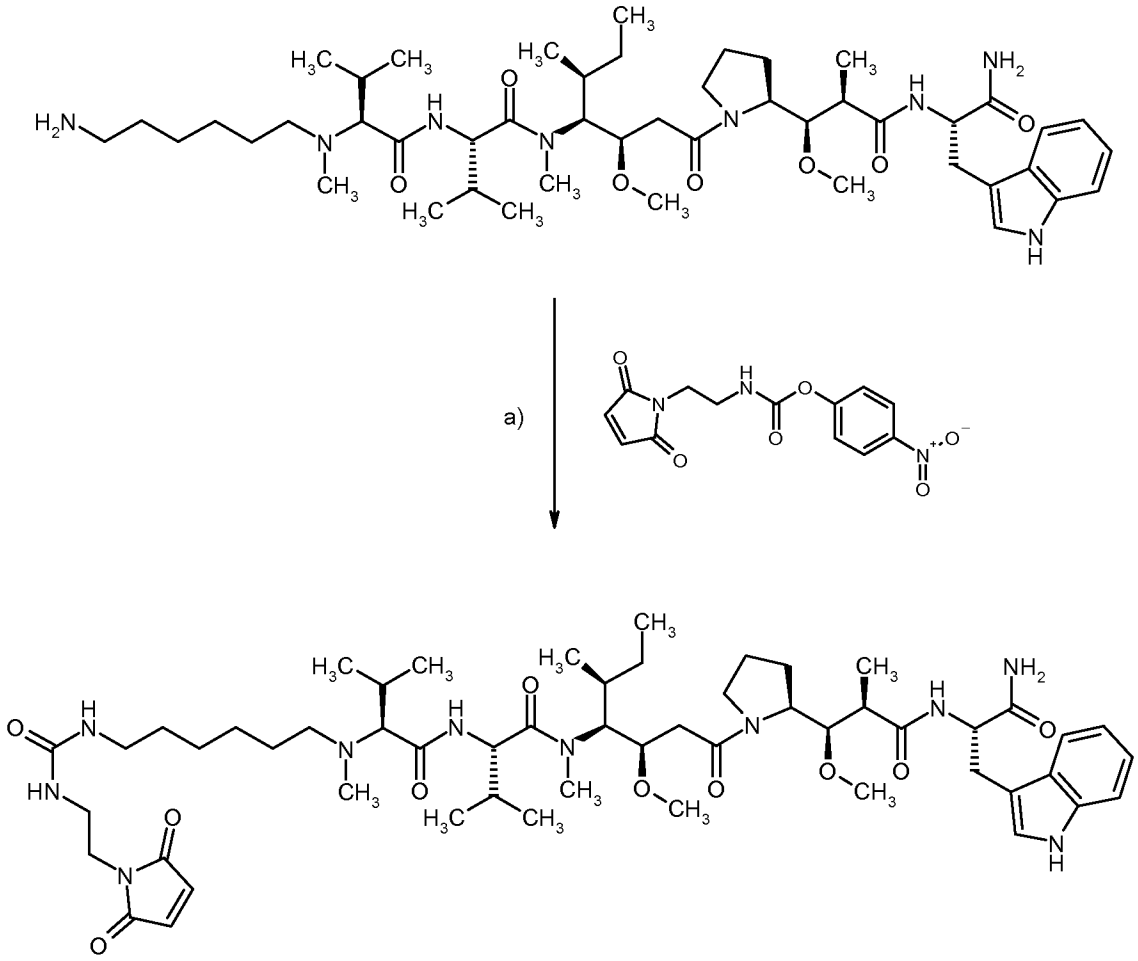
Die zuvor beschriebenen Verfahren werden durch die nachfolgenden Syntheseschemata (Schema 3 bis 13, 18) beispielhaft verdeutlicht:

Schema 3



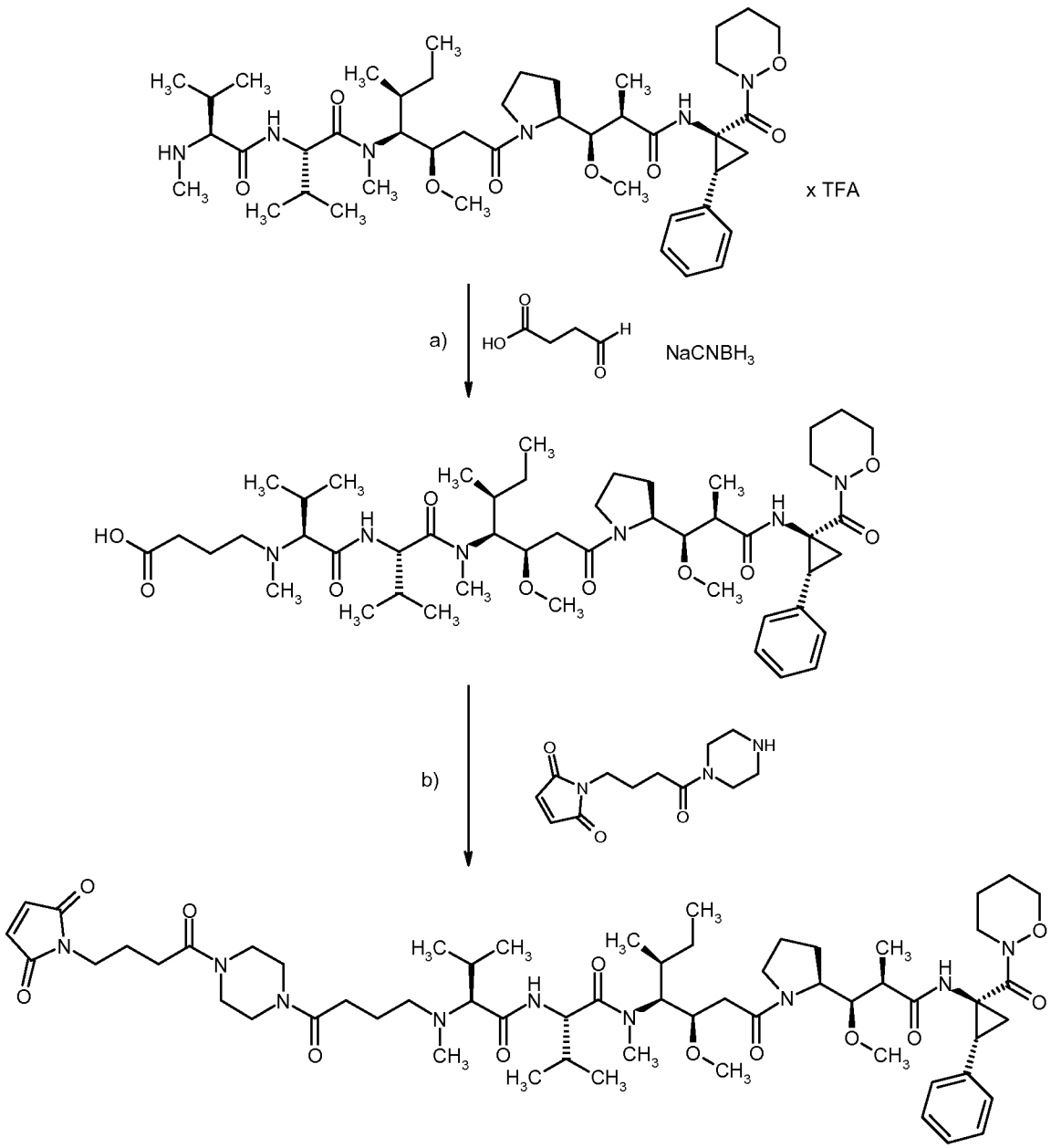

[a): 1. Wasser/Dioxan, 1N HCl, 100°C; 2. $H_2$, Pd/C, Methanol, RT; b): $NaHCO_3$, $H_2O$, Dioxan, RT].

Schema 4



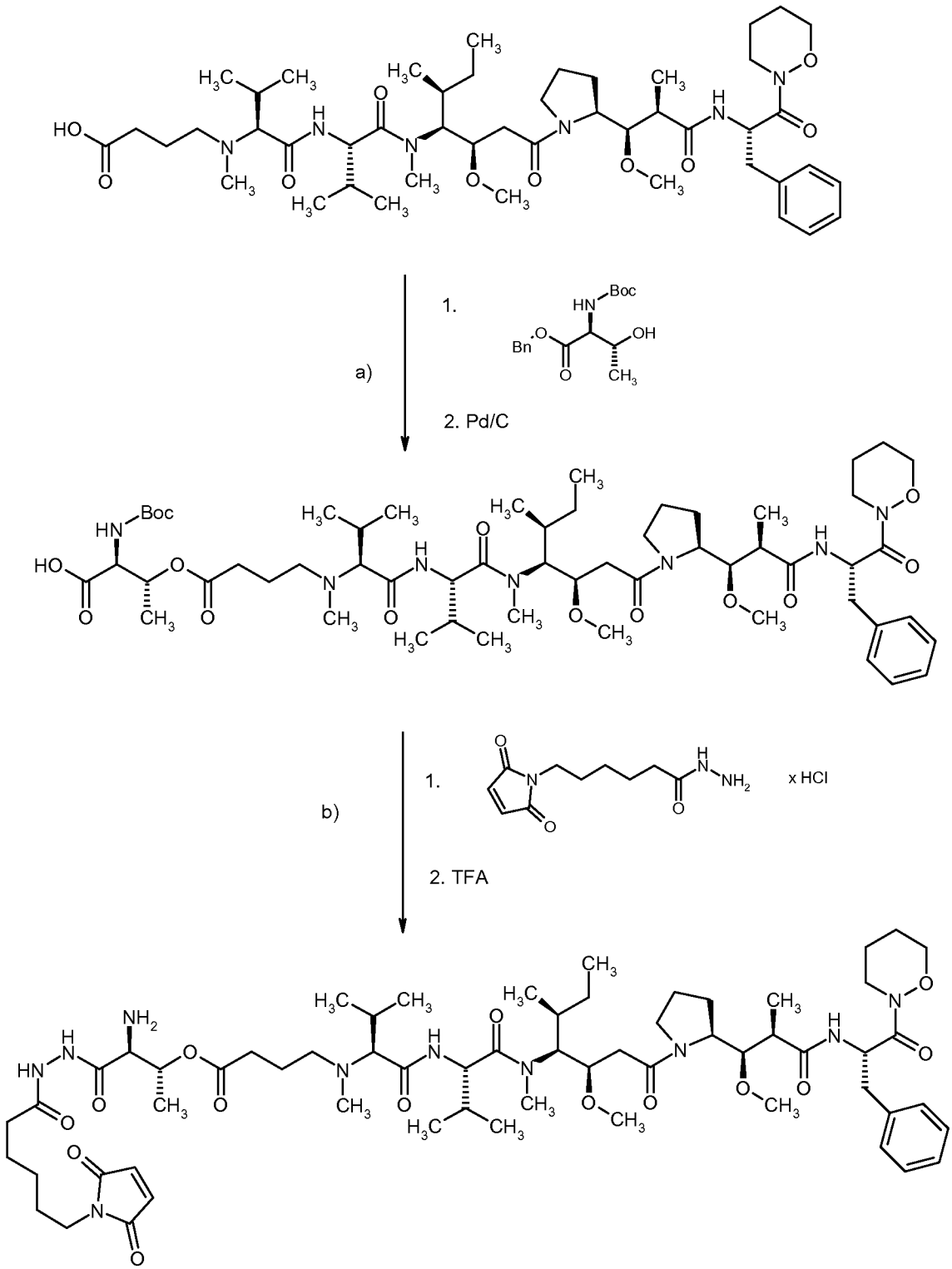

[a): Diisopropylethylamin, DMF, RT].

Schema 5



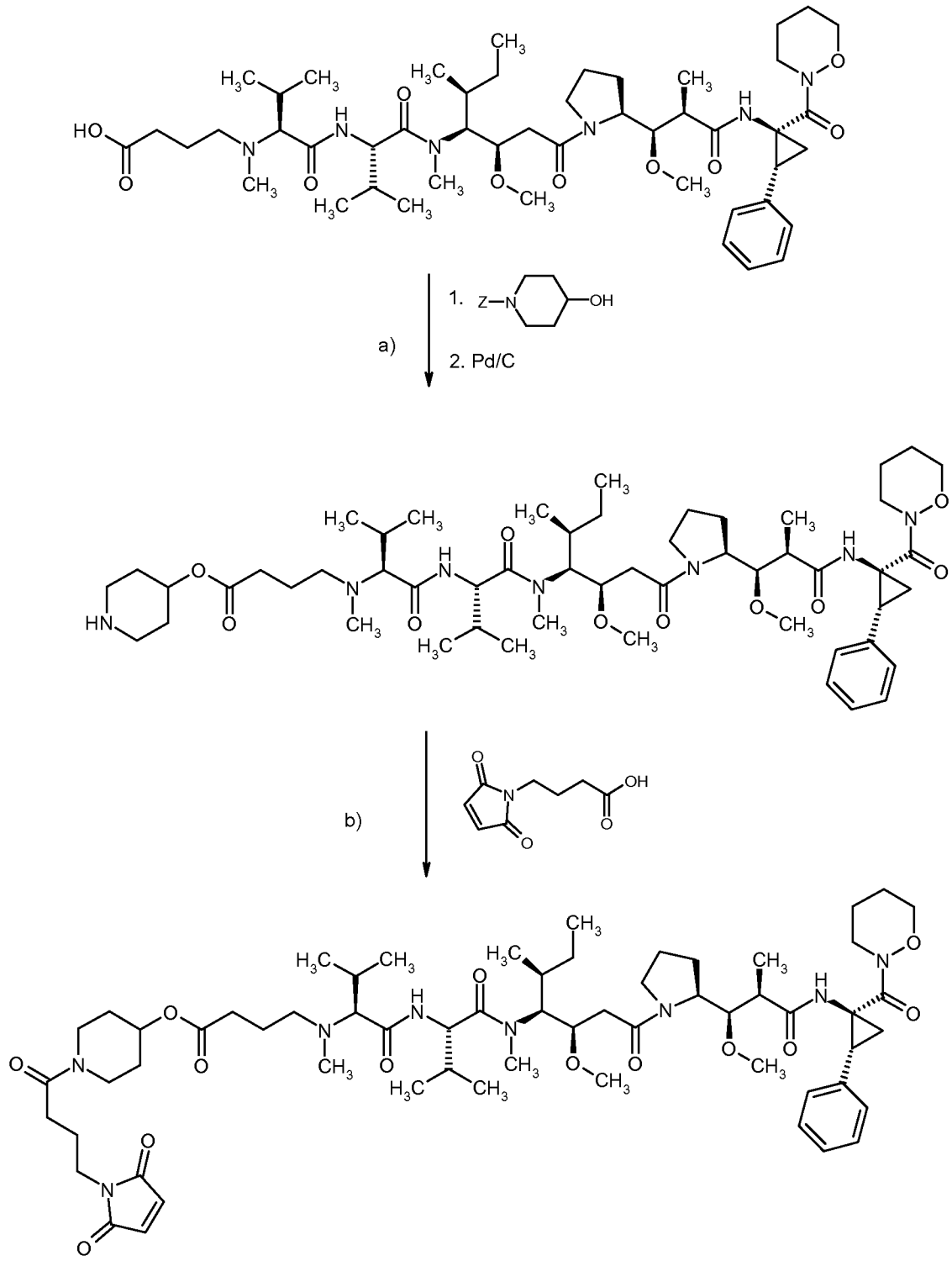

[a): Wasser/Dioxan, 1N HCl, 100°C; b): HATU, Diisopropylamin, DMF, RT].

Schema 6



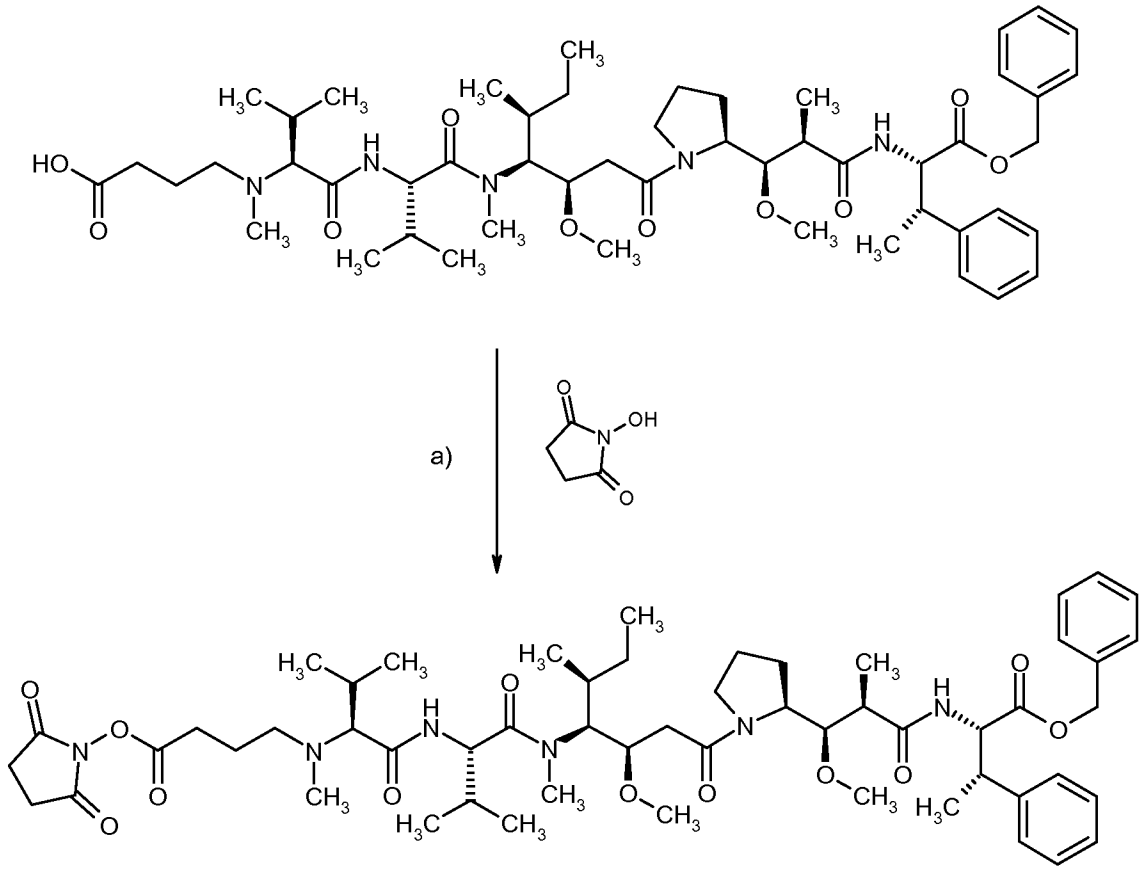

[a): 1. EDCI, DMAP, Dichlormethan, RT; 2. $H_2$, Methanol, RT ; b): 1. EDCI, HOBt, Diisopropyl-amin, DMF, RT; 2. Dichlormethan, RT].

Schema 7



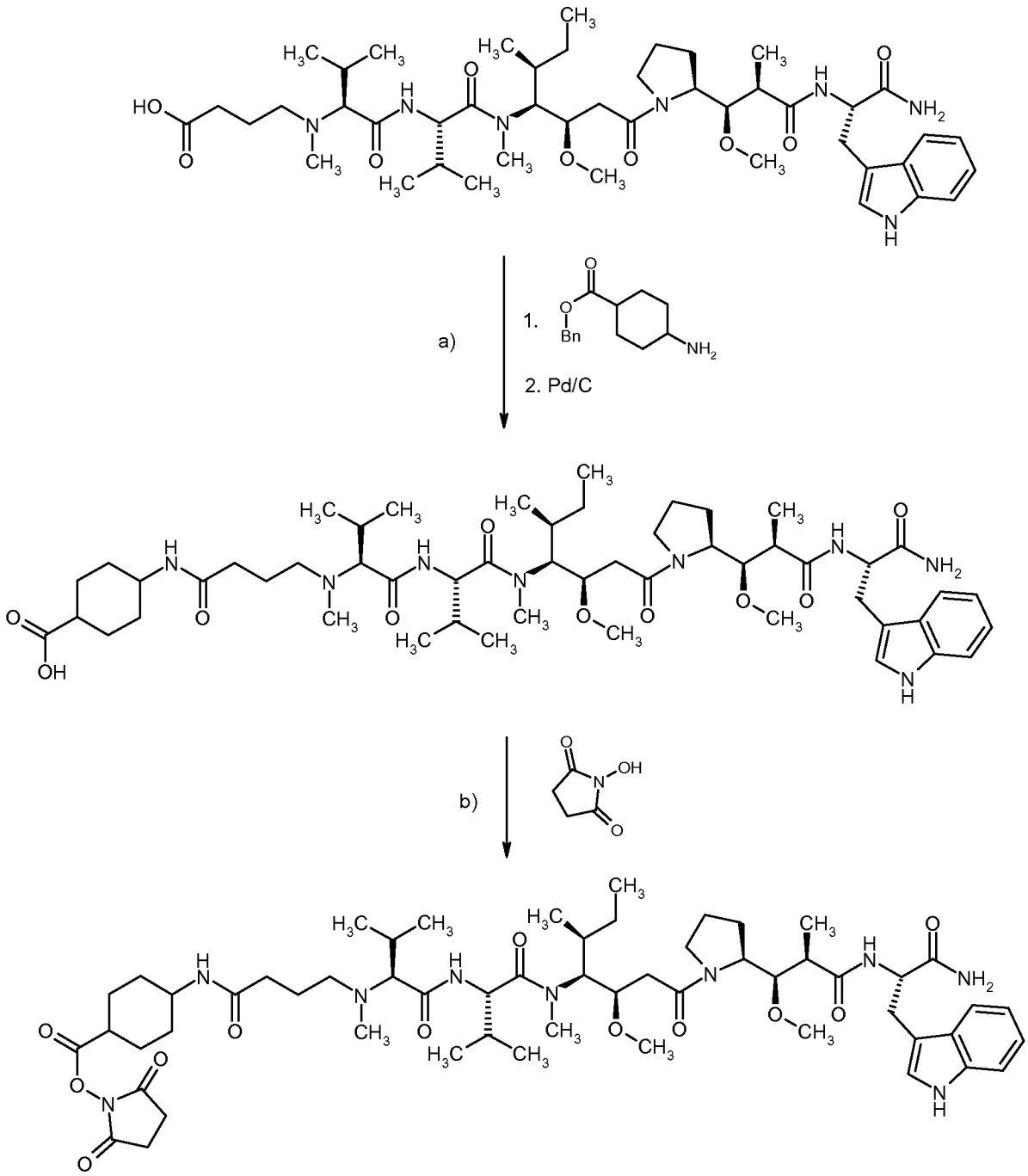

[a): 1. EDCI, DMAP, Dichlormethan, RT; 2. $H_2$, Methanol, RT ; b): HATU, Diisopropylamin, DMF, RT].

Schema 8



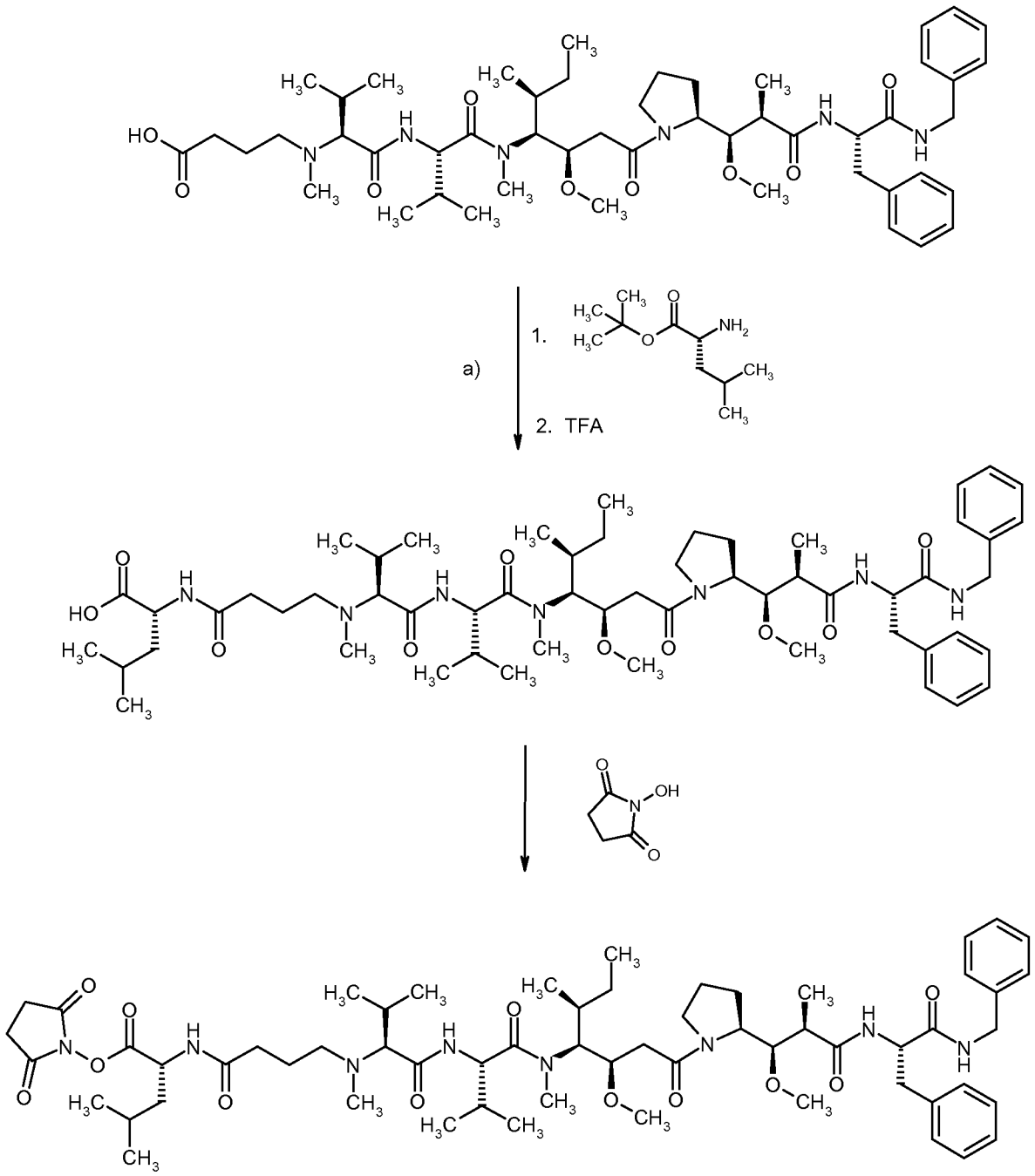

[a): EDCI, Dichlormethan, RT].

Schema 9



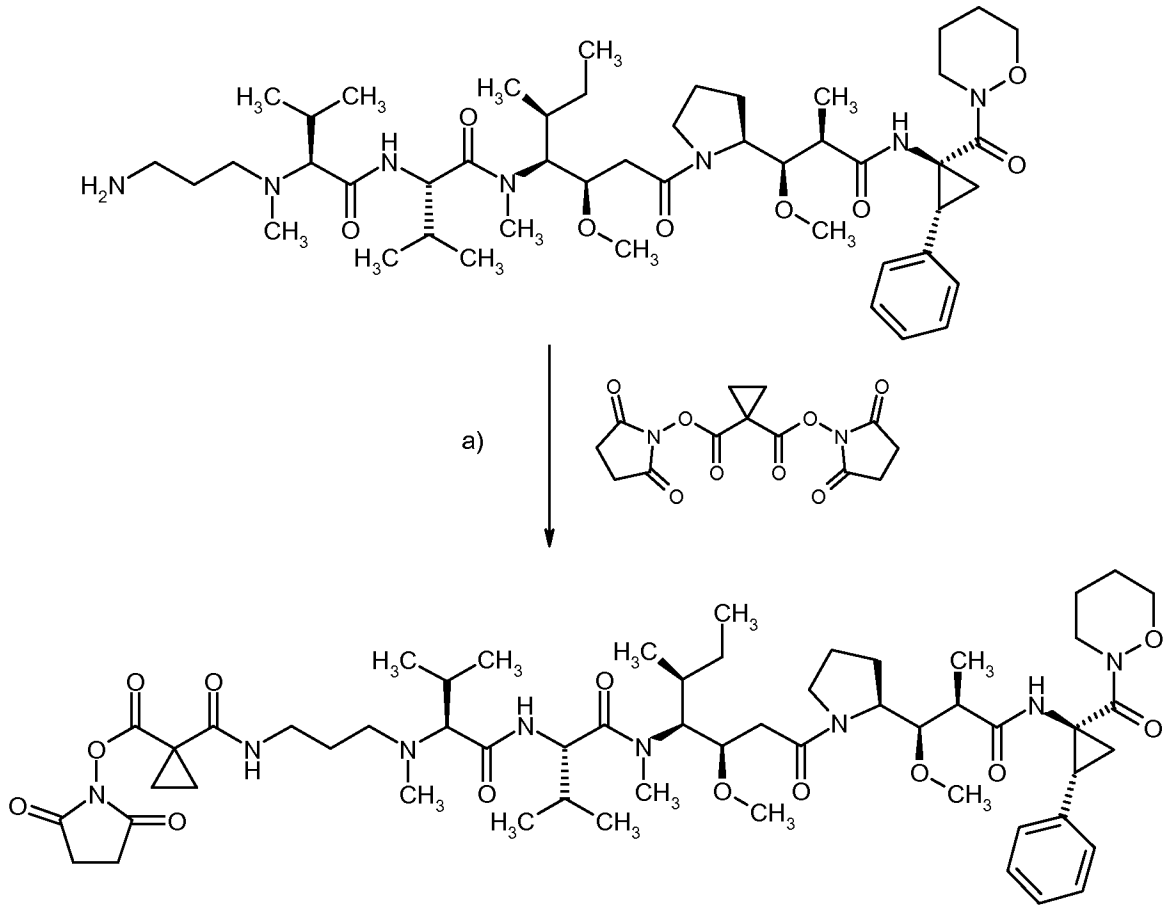

[a): HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. $H_2$, Methanol, RT; b): EDCI, DMAP, Dichlormethan, RT].

Schema 10




[a): 1. HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. Dichlormethan, RT; b): EDCI, DMAP, Dichlormethan, RT].

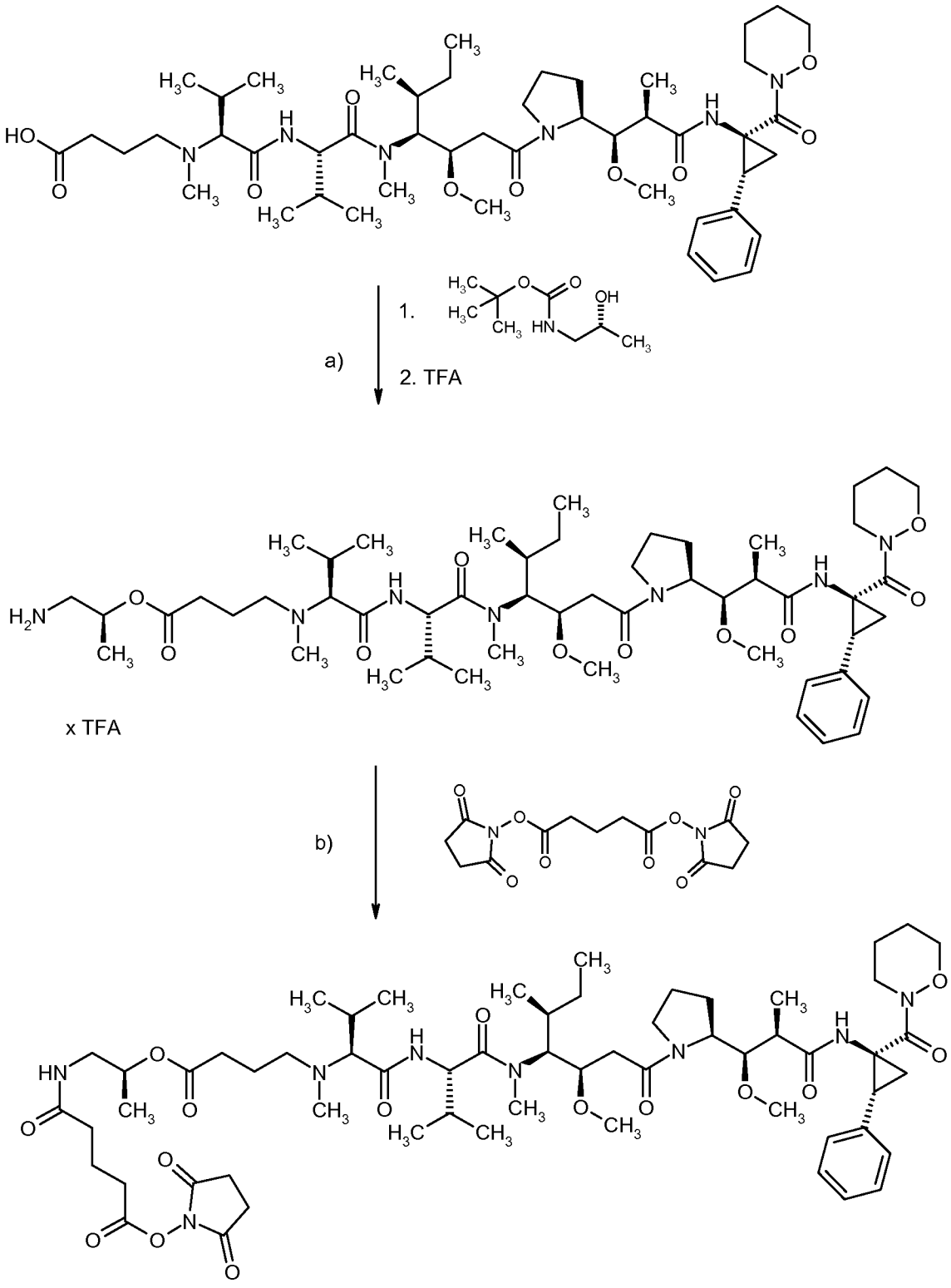
Schema 11




-

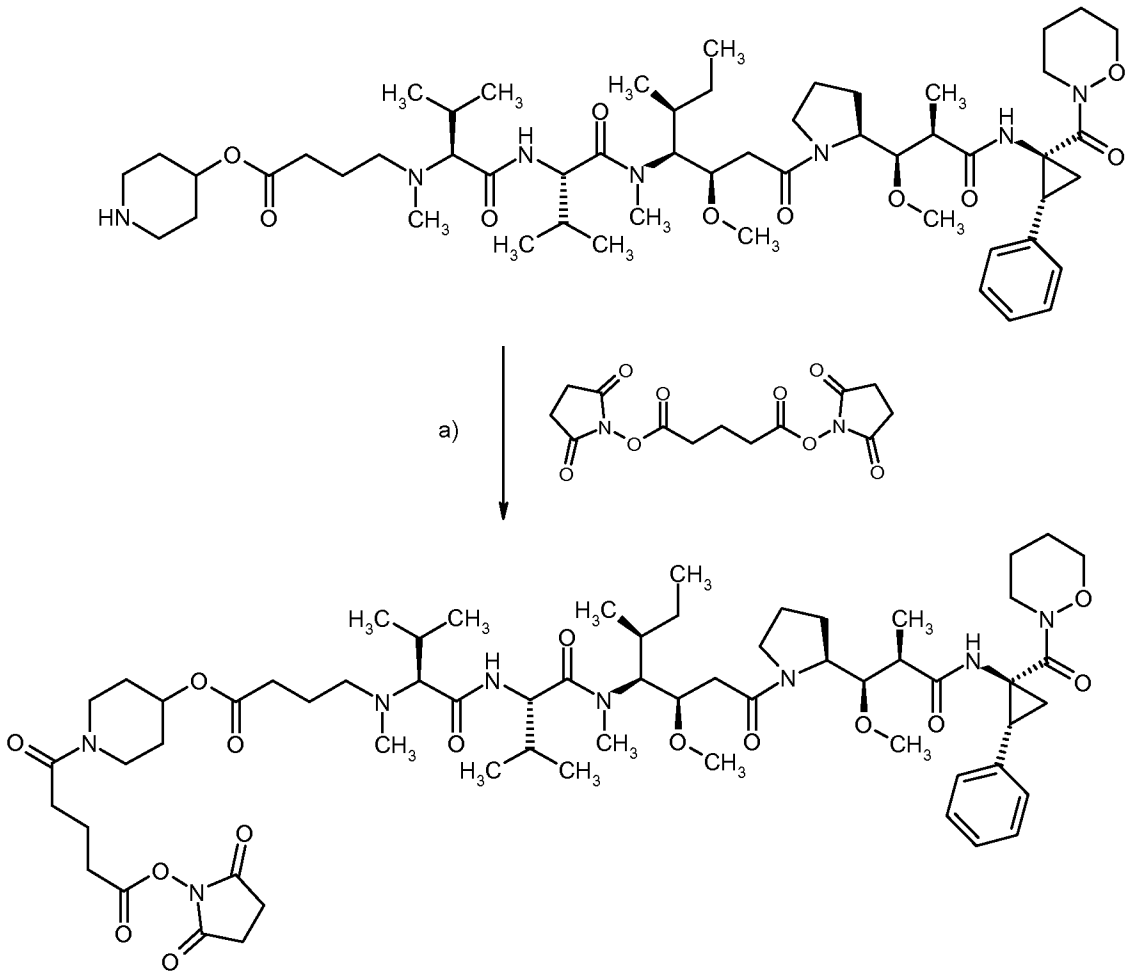
[a): Diisopropylethylamin, DMF, RT].

Schema 12



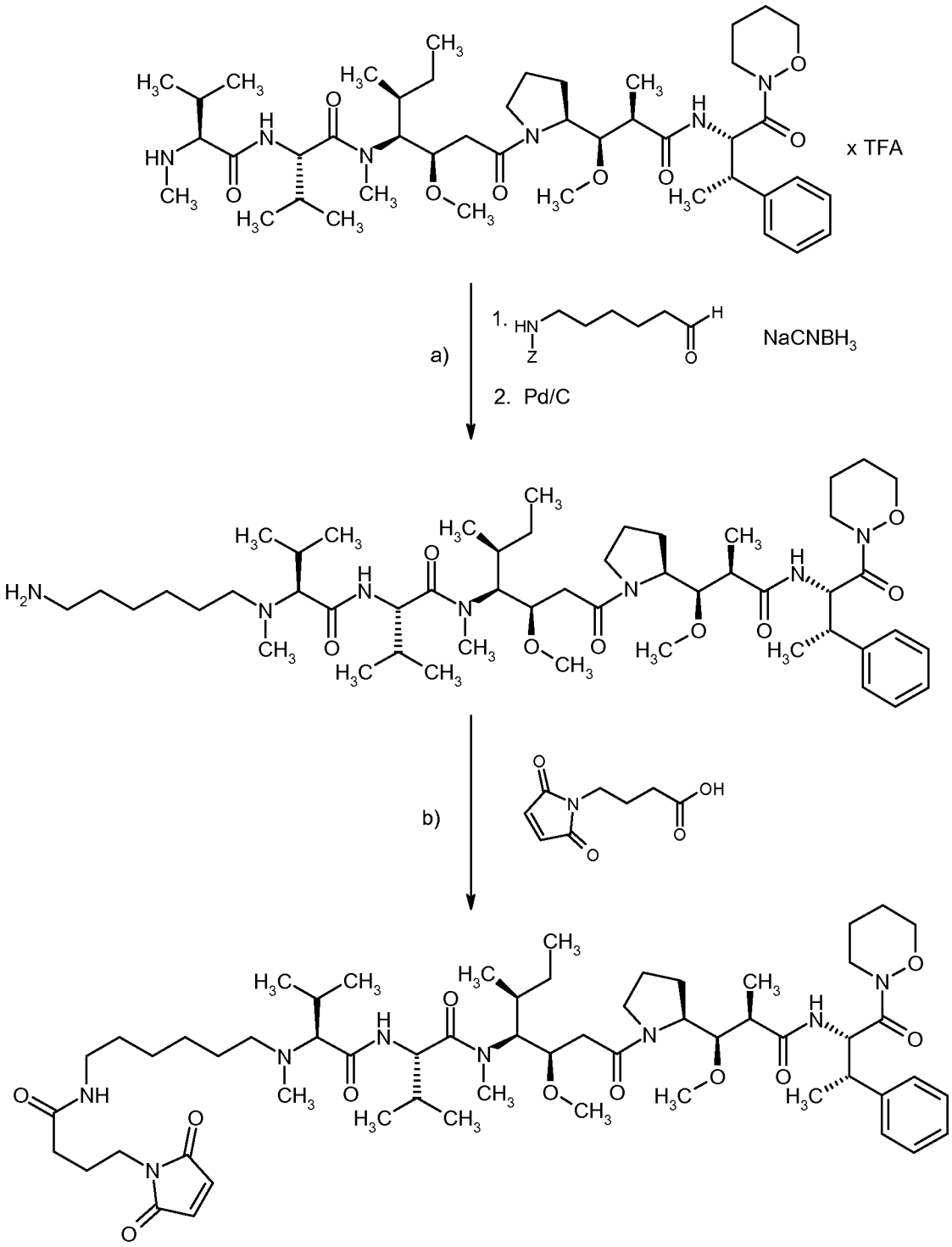

[a): 1. EDCI, DMAP, Dichlormethan, RT; 2. Dichlormethan, RT ; b): Diisopropylamin, DMAP, Dichlormethan, RT].

Schema 13




[a): DMAP, Diisopropylamin, Dichlormethan, RT].

Schema 18

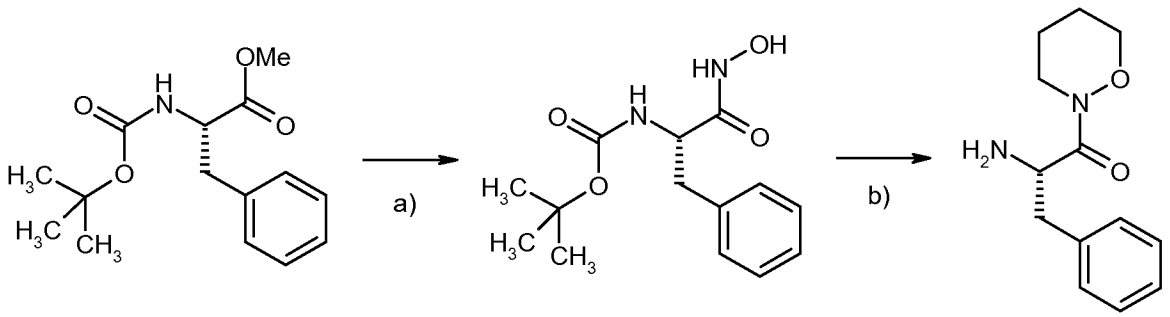



[a): 1. Wasser/Dioxan, 1N HCl, 100°C; 2. $H_2$, Pd/C, Methanol, RT; b): HATU, Diisopropylethylamin, RT].

Die Verbindungen der Formel (IV) können aus kommerziell erhältlichen oder literaturbekannten Aminosäure-Bausteinen (siehe z. B. Pettit *et al.*, *Synthesis* 1996, 719; Shioiri *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 931; Shioiri *et al.*, *Tetrahedron* 1993, *49*, 1913; Koga *et al.*, *Tetrahedron Lett.*

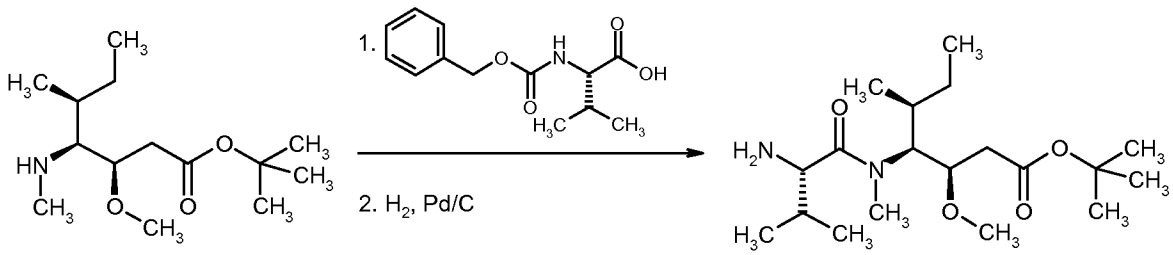
1991, *32*, 2395; Vidal *et al.*, *Tetrahedron* 2004, *60*, 9715; Poncet *et al.*, *Tetrahedron* 1994, *50*, 5345. Pettit *et al.*, *J. Org. Chem.* 1994, *59*, 1796) in Analogie zu literaturbekannten Verfahren nach üblichen Methoden der Peptidchemie, und wie im vorliegenden experimentellen Teil beschrieben, hergestellt werden. Die nachfolgenden Syntheseschemata (Schema 14 bis 16) verdeutlichen die Herstellung beispielhaft.

Schema 14



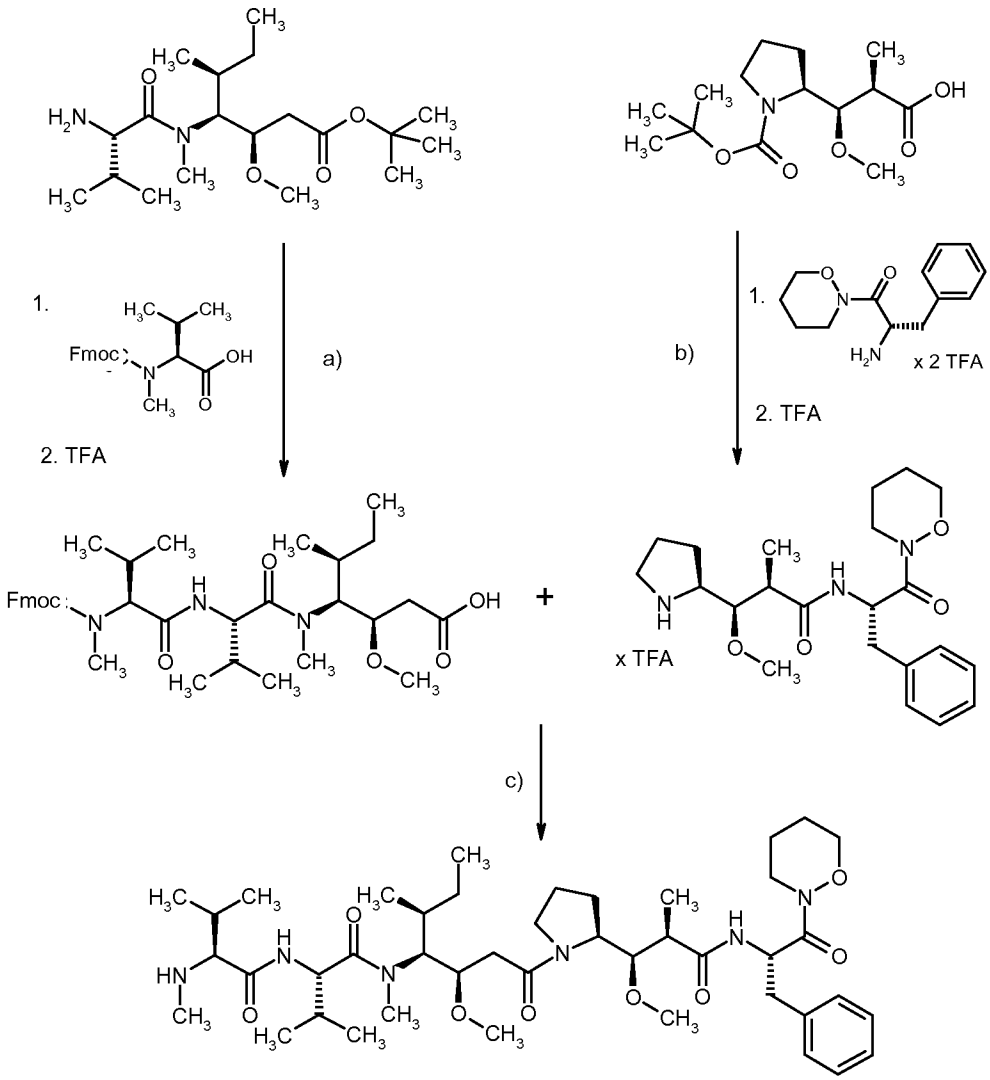

[ a): Hydroxylamin-Hydrochlorid, KOH, MeOH, 0°C → RT; b): $BrCH_2(CH_2)_2CH_2Br$, $K_2CO_3$, Aceton, Rückfluß].

Schema 15




[a): 1. Diisopropylethylamin, BEP, Dichlormethan, -10°C → RT; 2. MeOH].

Schema 16




[ a): 1. Diisopropylethylamin, BEP, DMF, RT; 2. Dichlormethan; b): 1. HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. Dichlormethan, RT; c): 1. HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. Piperidin, DMF, RT ].

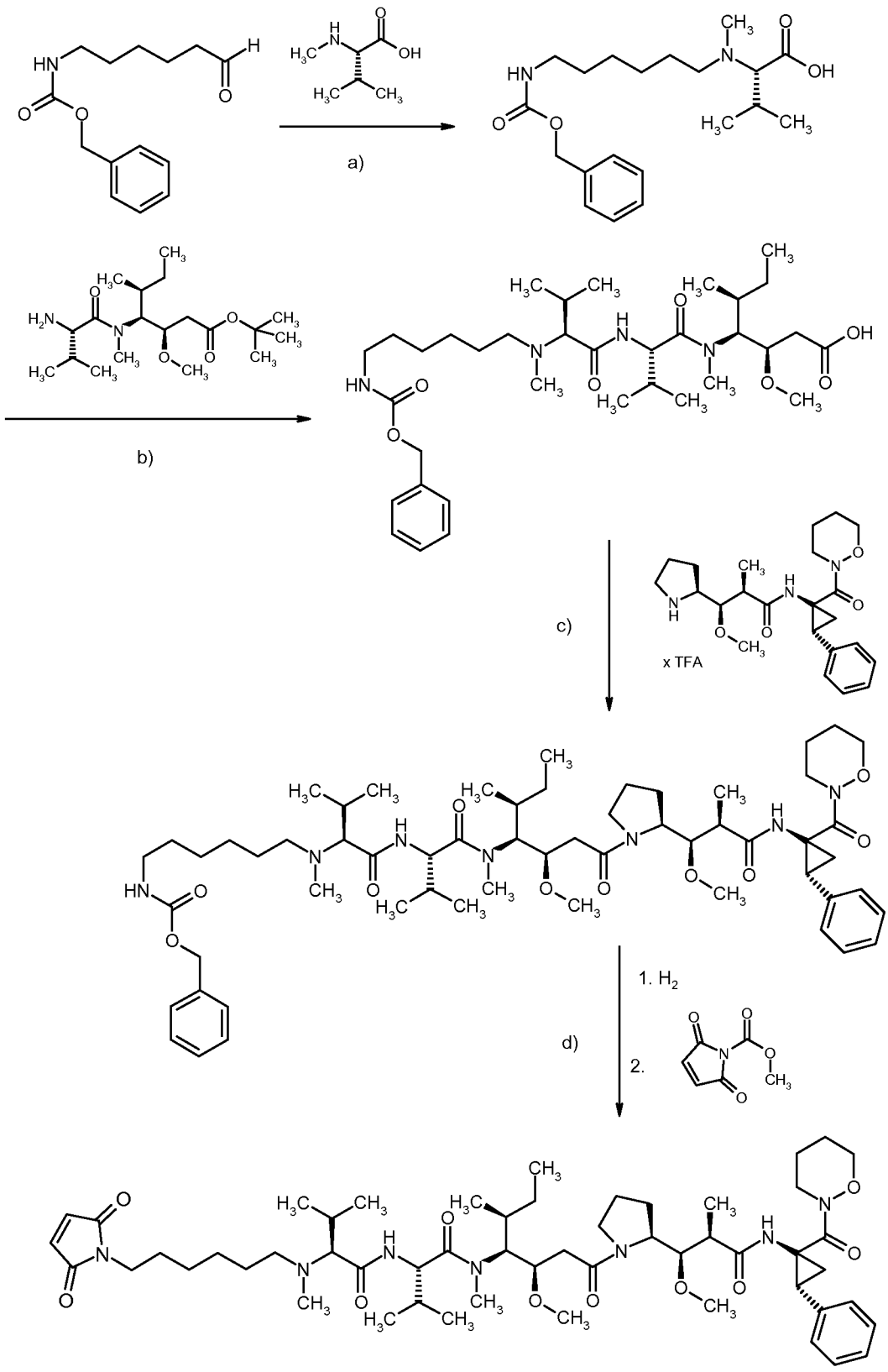
Die Verbindungen der Formeln (XI), (XIII), (XV), (XVII) und (XXI) einschließlich, wo zutreffend, chiraler oder diastereomerer Formen hiervon sind kommerziell erhältlich oder als solche in der Literatur beschrieben, oder sie können auf für den Fachmann offenkundigem Wege in Analogie zu in der Literatur publizierten Methoden hergestellt werden. Zahlreiche ausführliche Vorschriften sowie Literaturangaben zur Herstellung der Ausgangsmaterialien befinden sich auch im Experimentellen Teil im Abschnitt zur Herstellung der Ausgangsverbindungen und Intermediate.

Die Verbindungen der Formeln (V), (VII), (VIII), (X), (XVIII), (XX) und (XXIII) einschließlich, wo zutreffend, chiraler oder diastereomerer Formen hiervon sind literaturbekannt, oder sie können auf für den Fachmann offenkundigem Wege in Analogie zu in der Literatur publizierten Methoden

hergestellt werden. Zahlreiche ausführliche Vorschriften sowie Literaturangaben zur Herstellung der Ausgangsmaterialien befinden sich auch im Experimentellen Teil im Abschnitt zur Herstellung der Ausgangsverbindungen und Intermediate.

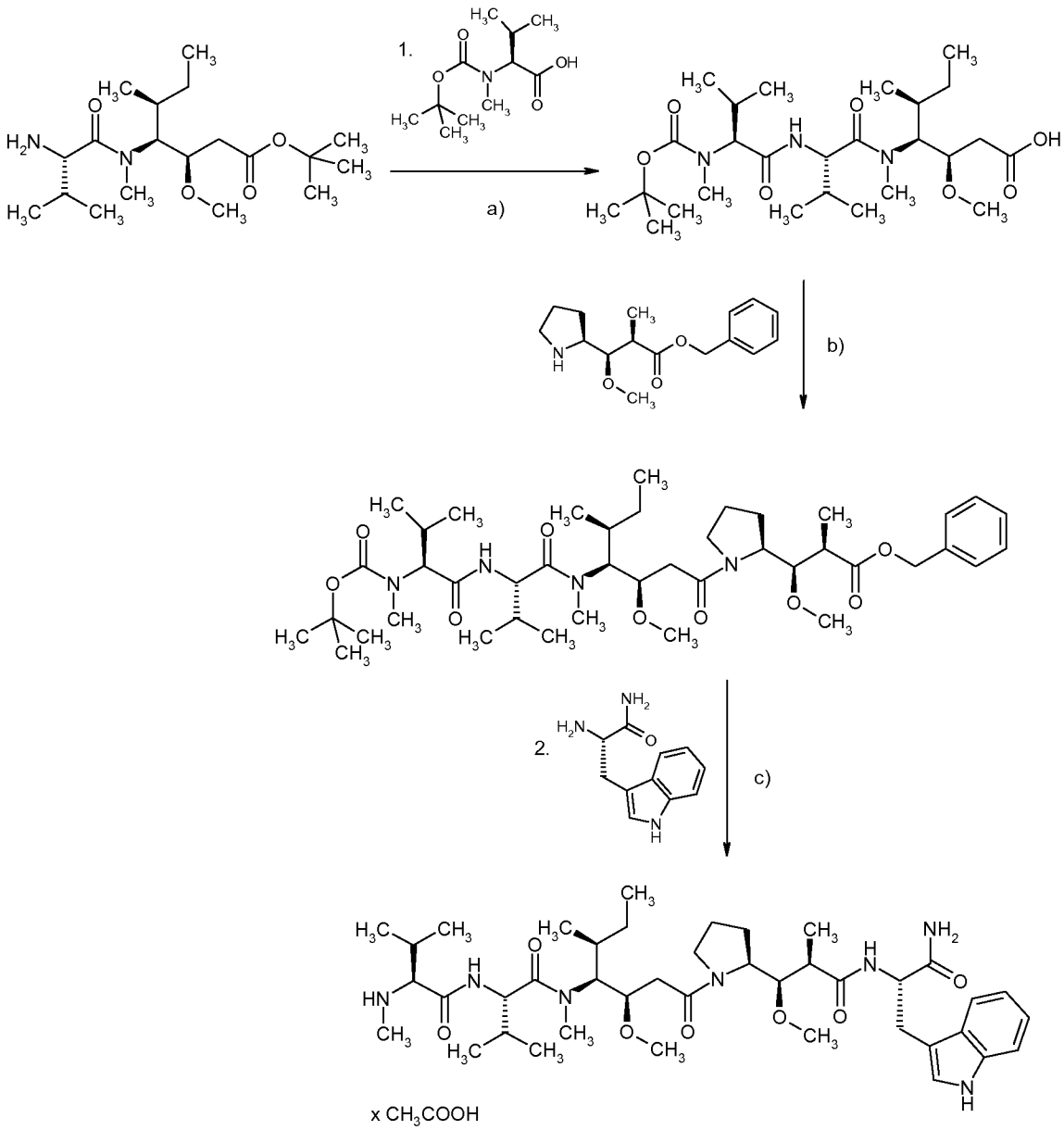
Alternativ können einzelne Schritte der Herstellungssequenz in anderer Reihenfolge durchgeführt werden. Dieses Vorgehen wird in den nachfolgenden Syntheseschemata (Schema 17, 19 und 20) beispielhaft verdeutlicht.

Schema 17



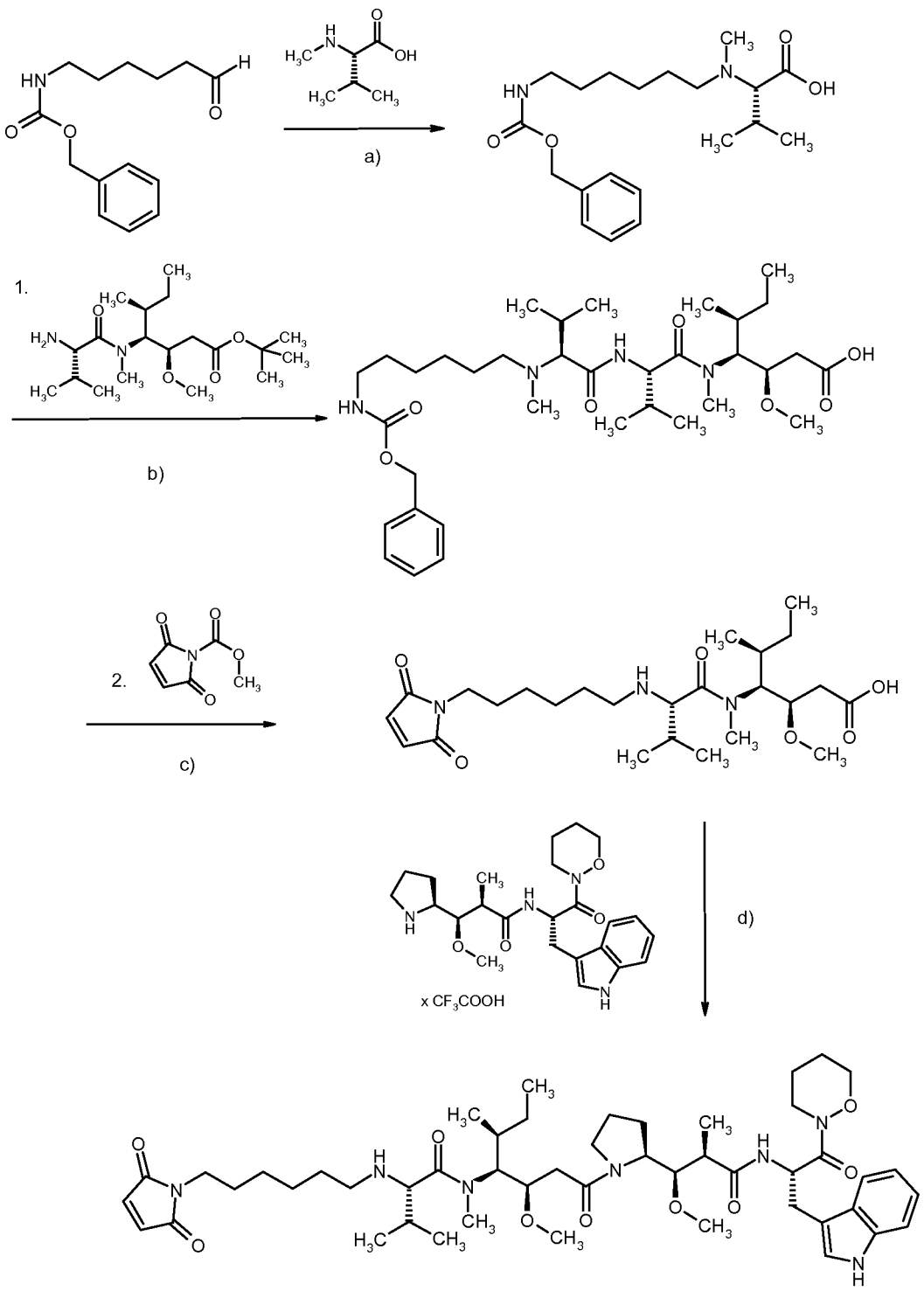

[ a): Boran-Pyridin-Komplex, Essigsäure, MeOH; b): 1. HOBt, EDCI, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. TFA, Dichlormethan, RT; c): HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; d): 1. Pd/C, MeOH, RT; 2. $NaHCO_3$, Dioxan, Wasser].

Schema 19




[ a): 1. HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. TFA, Dichlormethan, RT ; 3. $((H_3C)_3C(C=O))_2O$, DMF, Diisopropylethylamin; b): Diisopropylethylamin, BEP, DMF, RT; c): 1. $H_2$, Pd/C (10%). Methanol, RT ; 2. HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 3. TFA, Dichlormethan, RT ].

Schema 20




[ a): Boran-Pyridin-Komplex, Essigsäure, MeOH; b): 1. HOBt, EDCI, Diisopropylethylamin, DMF, RT; 2. TFA, Dichlormethan, RT; c): 1. $H_2$, Pd/C, MeOH, RT; 2. $NaHCO_3$, Dioxan, Wasser; d): HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT;].

In einer Ausführungsform bindet der Binder an ein Zielmolekül, welches auf einer Krebszelle vorhanden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform bindet der Binder an ein Krebs-Zielmolekül. In einer weiteren 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 reference sequence NP_005219.2)

Sequenz (1210 Aminosäuren):

>gi|29725609|ref|NP_005219.2| epidermal growth factor receptor isoform a precursor [Homo sapiens]
MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNL
EITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKT
GLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCP
NGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATC
KDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRK
CKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ
ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKE
ISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEP
RDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHY
IDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGM
VGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKI
KVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGI
CLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLV
KTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTF
GSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDP
QRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSA
TSNNSTVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSV
QNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNP
DYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA

Die extrazelluläre Domäne ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

(2) Mesothelin (SwissProt reference Q13421-3)

Sequenz (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 reference Q16790)

Sequenz (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 reference sequence NP_055215.2; Synonym LYPD3)

Sequenz (346 Aminosäuren):

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

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDVCTEAV
GAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRALDPAGNE
SAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQ
DEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGSRCNSDLRNKTYFSPRIPPLVRLPPPEPTTVASTTSVTTSTS
APVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGVEHEASRDEEPRLTGGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKG
CVAPTAGLAALLLAVAAGVLL

Die maturierte, extrazelluläre Domäne ist durch Unterstreichung gekennzeichnet (SEQ ID NO:1).

(5) CD52 (NCBI reference sequence NP_001794.2 )

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

(6) Her2 (NCBI reference sequence NP_004439.2)

>gi|54792096|ref|NP_004439.2| receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 isoform a [Homo sapiens]
MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYL
PTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVT
GASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPC
SPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNH
SGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAE
DGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTA
PLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGL
RSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHC
WGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCV
ACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASP
LTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRIL
KETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSP
YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRD
LAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGV
TVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSE
FSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAG
GMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHD
PSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERP
KTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPS
TFKGTPTAENPEYLGLDVPV

(7) CD20 (NCBI reference sequence NP_068769.2)

>gi|23110987|ref|NP_068769.2| B-lymphocyte antigen CD20 [Homo sapiens]
MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIA
LGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISG
MILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILS
VMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEE
DIEIIPIQEEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

(8) das Lymphozyten aktivierungs Antigen CD30 (SwissProt ID P28908)

>gi|68348711|ref|NP_001234.2| tumor necrosis factor receptor superfamily member 8 isoform 1 precursor [Homo sapiens]
MRVLLAALGLLFLGALRAFPQDRPFEDTCHGNPSHYYDKAVRRCCYRCPMGLFPTQQCPQRPTDC
RKQCEPDYYLDEADRCTACVTCSRDDLVEKTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVNSCARCFFHSV
CPAGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPATSSASTMPVR
GGTRLAQEAASKLTRAPDSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDYYLDEAGRCTACV
SCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPGMICATSATNSRARCVPYPICAAETVTKPQDMAEKDTTFE
APPLGTQPDCNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTLPIPTSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFW
VILVLVVVVGSSAFLLCHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTE
PVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIM
KADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKE
DPLPTAASGK

(9) das Lymphozyten Adhesionsmolekül CD22 (SwissProt ID **P20273**)

>gi|157168355|ref|NP_001762.2| B-cell receptor CD22 isoform 1 precursor [Homo sapiens]
MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYN
KNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLRMESKTEKWME
RIHLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTI
KSVFTRSELKFSPQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAIVREGDS
VTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVTKDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFL

QVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWH
AGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYE
WKPHGAWEEPSLGVLKIQNVGWDNTTIACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDVRVRKIKPLSEIH
SGNSVSLQCDFSSSHPKEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDSISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAW
TLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRLEPVK
VQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAILILAICGLKLQRRWKRT
QSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPRTGDAES
SEMQRPPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVDYVIL
KH

(10) das Myloidzellen Oberflächenantigen CD33 (SwissProt ID **P20138**)

>gi|130979981|ref|NP_001763.3| myeloid cell surface antigen CD33 isoform 1 precursor [Homo sapiens]

MPLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGA
IISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYK
SPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSS
VLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHG
AIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKKSKLHGPTETSSC
SGAAPTVEMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ

(11) das Transmembran Glykoprotein NMB (SwissProt ID Q14956)

>gi|52694752|ref|NP_001005340.1| transmembrane glycoprotein NMB isoform a precursor [Homo sapiens]

MECLYYFLGFLLLAARLPLDAAKRFHDVLGNERPSAYMREHNQLNGWSSDENDWNEKLYPVWKRG
DMRWKNSWKGGRVQAVLTSDSPALVGSNITFAVNLIFPRCQKEDANGNIVYEKNCRNEAGLSADP
YVYNWTAWSEDSDGENGTGQSHHNVFPDGKPFPHHPGWRRWNFIYVFHTLGQYFQKLGRCSVRVS
VNTANVTLGPQLMEVTVYRRHGRAYVPIAQVKDVYVVTDQIPVFVTMFQKNDRNSSDETFLKDLP
IMFDVLIHDPSHFLNYSTINYKWSFGDNTGLFVSTNHTVNHTYVLNGTFSLNLTVKAAAPGPCPP
PPPPPRPSKPTPSLATTLKSYDSNTPGPAGDNPLELSRIPDENCQINRYGHFQATITIVEGILEV
NIIQMTDVLMPVPWPESSLIDFVVTCQGSIPTEVCTIISDPTCEITQNTVCSPVDVDEMCLLTVR
RTFNGSGTYCVNLTLGDDTSLALTSTLISVPDRDPASPLRMANSALISVGCLAIFVTVISLLVYK
KHKEYNPIENSPGNVVRSKGLSVFLNRAKAVFFPGNQEKDPLLKNQEFKGVS

(12) das Adhesionsmolekül CD56 (SwissProt ID P13591)

>gi|94420689|ref|NP_000606.3| neural cell adhesion molecule 1 isoform 1 [Homo sapiens]

MLQTKDLIWTLFFLGTAVSLQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGDAKDKDISWFSPNGEKLTPN
QQRISVVWNDDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVTGEDGSESEATVNVKIFQKLMFKNAPTPQEFR
EGEDAVIVCDVVSSLPPTIIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNYLQIRGIKKTDEGTYRCEGRILA
RGEINFKDIQVIVNVPPTIQARQNIVNATANLGQSVTLVCDAEGFPEPTMSWTKDGEQIEQEEDD
EKYIFSDDSSQLTIKKVDKNDEAEYICIAENKAGEQDATIHLKVFAKPKITYVENQTAMELEEQV
TLTCEASGDPIPSITWRTSTRNISSEEKTLDGHMVVRSHARVSSLTLKSIQYTDAGEYICTASNT
IGQDSQSMYLEVQYAPKLQGPVAVYTWEGN
QVNITCEVFAYPSATISWFRDGQLLPSSNYSNIKIYNTPSASYLEVTPDSENDFGNYNCTAVNRI
GQESLEFILVQADTPSSPSIDQVEPYSSTAQVQFDEPEATGGVPILKYKAEWRAVGEEVWHSKWY
DAKEASMEGIVTIVGLKPETTYAVRLAALNGKGLGEISAASEFKTQPVQGEPSAPKLEGQMGEDG
NSIKVNLIKQDDGGSPIRHYLVRYRALSSEWKPEIRLPSGSDHVMLKSLDWNAEYEVYVVAENQQ
GKSKAAHFVFRTSAQPTAIPANGSPTSGLSTGAIVGILIVIFVLLLVVVDITCYFLNKCGLFMCI
AVNLCGKAGPGAKGKDMEEGKAAFSKDESKEPIVEVRTEEERTPNHDGGKHTEPNETTPLTEPEK
GPVEAKPECQETETKPAPAEVKTVPNDATQTKENESKA

(13) das Oberflächenmolekül CD70 (SwissProt ID P32970)

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

MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHT
GPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAV
GICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

(14) das Oberflächenmolekül CD74 (SwissProt ID P04233)

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

MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILVTLLLAGQA
TTAYFLYQQQGRLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPQGPMQN
ATKYGNMTEDHVMHLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSR
HSLEQKPTDAPPKESLELEDPSSGLGVTKQDLGPVPM

(15) das B-Lymphozyten Antigen CD19 (SwissProt ID P15391)

>gi|296010921|ref|NP_001171569.1| B-lymphocyte antigen CD19 isoform 1 precursor [Homo sapiens]

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLS
LGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLG
GLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGST
LWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYY
CHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRRKRKR
MTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGA
LGSRSPPGVGPEEEEGEGYEEPDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSGYENPEDEPLGPEDEDSF
SNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQ
PGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR

(16) das Oberflächenprotein Mucin-1 (SwissProt ID P15941)

>gi|65301117|ref|NP_002447.4| mucin-1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNALSTGVSFFFLSF
HISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTI
NVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLVCVLVALAIVY
LIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLS
YTNPAVAATSANL

(17) das Oberflächenprotein CD138 (SwissProt ID P18827)

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

MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPPEDQDGSGDDSDNFSGSGAGALQDITLSQQTPSTW
KDTQLLTAIPTSPEPTGLEATAASTSTLPAGEGPKEGEAVVLPEVEPGLTAREQEATPRPRETTQ
LPTTHQASTTTATTAQEPATSHPHRDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHTEDGGPSATERAAEDG
ASSQLPAAEGSGEQDFTFETSGENTAVVAVEPDRRNQSPVDQGATGASQGLLDRKEVLGGVIAGG
LVGLIFAVCLVGFMLYRMKKKDEGSYSLEEPKQANGGAYQKPTKQEEFYA

(18) das Integrin alphaV (Genbank Accession No.: NP_002201.1)

>gi|4504763|ref|NP_002201.1| integrin alpha-V isoform 1 precursor [Homo sapiens]

MAFPPRRRLRLGPRGLPLLLSGLLLPLCRAFNLDVDSPAEYSGPEGSYFGFAVDFFVPSASSRMF
LLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEFDATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASVRS

KQDKILACAPLYHWRTEMKQEREPVGTCFLQDGTKTVEYAPCRSQDIDADGQGFCQGGFSIDFTK
ADRVLLGGPGSFYWQGQLISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRTAQAIFDDSYLGYSVAVGD
FNGDGIDDFVSGVPRAARTLGMVYIYDGKNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVAATDINGDDYADVFI
GAPLFMDRGSDGKLQEVGQVSVSLQRASGDFQTTKLNGFEVFARFGSAIAPLGDLDQDGFNDIAI
AAPYGGEDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDIDKNGYPDLIVG
AFGVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFNVRFCLKADGKGVLPRK
LNFQVELLLDKLKQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGLMQCEELIAYLRDESEFRDKLTPI
TIFMEYRLDYRTAADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLEVSVDSDQKKIYIG
DDNPLTLIVKAQNQGEGAYEAELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFKTENQTRQVVCDLGN
PMKAGTQLLAGLRFSVHQQSEMDTSVKFDLQIQSSNLFDKVSPVVSHKVDLAVLAAVEIRGVSSP
DHIFLPIPNWEHKENPETEEDVGPVVQHIYELRNNGPSSFSKAMLHLQWPYKYNNNTLLYILHYD
IDGPMNCTSDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGERDHLITKRDLALSEGDIHTLGCGVAQCL
KIVCQVGRLDRGKSAILYVKSLLWTETFMNKENQNHSYSLKSSASFNVIEFPYKNLPIEDITNST
LVTTNVTWGIQPAPMPVPVWVIILAVLAGLLLLAVLVFVMYRMGFFKRVRPPQEEQEREQLQPHE
NGEGNSET

(19) das teratocarcinoma-derived growth factor 1 Protein TDGF1 (Genbank Accession No.: NP_003203.1)

>gi|4507425|ref|NP_003203.1| teratocarcinoma-derived growth factor 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEPAIRPRSSQ
RVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSL
CKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGICLSIQSYY

(20) das Prostata spezifiche Membranantigen PSMA (Swiss Prot ID: Q04609)

>gi|4758398|ref|NP_004467.1| glutamate carboxypeptidase 2 isoform 1 [Homo sapiens]

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDEL
KAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISI
INEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKIN
CSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILN
LNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWRGSLKV
PYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQS
GAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSS
IEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGND
FEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVF
ELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERL
QDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDI
ESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

(21) die Tyrosin-Proteinkinase EPHA2 (Swiss Prot ID: P29317)

>gi|32967311|ref|NP_004422.2| ephrin type-A receptor 2 precursor [Homo sapiens]

MELQAARACFALLWGCALAAAAAAQGKEVVLLDFAAAGGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMNDMPIY
MYSVCNVMSGDQDNWLRTNWVYRGEAERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYYAESDLDY
GTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKLNVEERSVGPLTRKGFYLAFQDIGACVALLSVR
VYYKKCPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLATVAGTCVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDGEWLVPIGQC
LCQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSCECEEGFFRAPQDPASMPC
TRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVYSVTCEQCWPESGECGPCEASVRYSEPPH
GLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVS
WSIPPPQQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDDLAPDTTYLVQVQALTQEGQGAGSK
VHEFQTLSPEGSGNLAVIGGVAVGVVLLLVLAGVGFFIHRRRKNQRARQSPEDVYFSKSEQLKPL
KTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKGMLKTSSGKKEVPVAIKTLKA

GYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMMIITEYMENGALDKFLREKDGEFSVLQ
LVGMLRGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPEATYTTSGGKIP
IRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEVMTYGERPYWELSNHEVMKAINDGFRLPTPMDCPSA
IYQLMMQCWQQERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKTLADFDPRVSIRLPSTSGSEGVPFRTVS
EWLESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTNDDIKRIGVRLPGHQKRIAYSLLGLKDQVNTVGIP
I

(22) das Oberflächenprotein SLC44A4 (Genbank Accession No: NP_001171515)

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

MGGKQRDEDDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICCVLFLLFILGYIVVGIVAWLYGDPRQVL
YPRNSTGAYCGMGENKDKPYLLYFNIFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQTVITSLQQELCPSFLL
PSAPALGRCFPWTNVTPPALPGITNDTTIQQGISGLIDSLNARDISVKIFEDFAQSWYWILVALG
VALVLSLLFILLLRLVAGPLVLVLILGVLGVLAYGIYYCWEEYRVLRDKGASISQLGFTTNLSAY
QSVQETWLAALIVLAVLEAILLLMLIFLRQRIRIAIALLKEASKAVGQMMSTMFYPLVTFVLLLI
CIAYWAMTALYLATSGQPQYVLWASNISSPGCEKVPINTSCNPTAHLVNSSCPGLMCVFQGYSSK
GLIQRSVFNLQIYGVLGLFWTLNWVLALGQCVLAGAFASFYWAFHKPQDIPTFPLISAFIRTLRY
HTGSLAFGALILTLVQIARVILEYIDHKLRGVQNPVARCIMCCFKCCLWCLEKFIKFLNRNAYIM
IAIYGKNFCVSAKNAFMLLMRNIVRVVVLDKVTDLLLFFGKLLVVGGVGVLSFFFFSGRIPGLGK
DFKSPHLNYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCVDTLFLCFLEDLERNNGSLDRPYYMSKSLL
KILGKKNEAPPDNKKRKK

(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 Prostatastammzellenl-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) Single-pass type I membrane protein “Programmed cell death 1 ligand 1”

(Synonyms: CD274, B7H1, PDCD1L1, PDCD1LG1, PDL1) (SwissProt: Q9NZQ7) – beide Isoformen

>sp|Q9NZQ7|PD1L1_HUMAN Programmed cell death 1 ligand 1 OS=Homo sapiens GN=CD274 PE=1 SV=1

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME
DKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG
ADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTT

TNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVIL
GAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

(53) Single-pass type I membrane protein „ICOSLG" (Synonyms:B7H2, B7RP1, ICOSL, KIAA0653, CD275) – (SwissProt: O75144), beide Isoformen

>sp|O75144|ICOSL_HUMAN ICOS ligand OS=Homo sapiens GN=ICOSLG PE=1 SV=2

MRLGSPGLLFLLFSSLRADTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESK
TVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL
GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLD
QALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKI
TENPVSTGEKNAATWSILAVLCLLVVVAVAIGWVCRDRCLQHSYAGAWAVSPETELTGH
V

(54) Tyrosinkinase „Fibroblast growth factor receptor 3" (FGFR-3, EC=2.7.10.1, CD333, JTK4), (SwissProt: P22607) – 4 Isoformen (alternat. Splicing)

>sp|P22607|FGFR3_HUMAN Fibroblast growth factor receptor 3 OS=Homo sapiens GN=FGFR3 PE=1 SV=1

MGAPACALALCVAVAIVAGASSESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFGSGDAVELS
CPPPGGGPMGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYSCRQRLTQRVLC
HFSVRVTDAPSSGDDEDGEDEAEDTGVDTGAPYWTRPERMDKKLLAVPAANTVRFRCPA
AGNPTPSISWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQQWSLVMESVVPSDRGNYTCVVENKFGSIRQ
TYTLDVLERSPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVYSDAQPHIQWLKHVEVNGSKVG
PDGTPYVTVLKTAGANTTDKELEVLSLHNVTFEDAGEYTCLAGNSIGFSHHSAWLVVLPA
EEELVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVAAVTLCRLRSPPKKGLGSPTVHKISRFPLKR
QVSLESNASMSSNTPLVRIARLSSGEGPTLANVSELELPADPKWELSRARLTLGKPLGEGCF
GQVVMAEAIGIDKDRAAKPVTVAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLL
GACTQGGPLYVLVEYAAKGNLREFLRARRPPGLDYSFDTCKPPEEQLTFKDLVSCAYQVA
RGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDVHNLDYYKKTTNGRLPVKW
MAPEALFDRVYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCT
HDLYMIMRECWHAAPSQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDTPSS
SSSGDDSVFAHDLLPPAPPSSGGSRT

(55) Single-pass type I membrane protein „TYRP1“(CAS2, TYRP, TYRRP, DHICA oxidase, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase, Catalase B, Glycoprotein 75, Melanoma antigen gp75, Tyrosinase-related protein 1), (SwissProt: P17643)

>sp|P17643|TYRP1_HUMAN 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase OS=Homo sapiens GN=TYRP1 PE=1 SV=2

MSAPKLLSLGCIFFPLLLFQQARAQFPRQCATVEALRSGMCCPDLSPVSGPGTDRCGSSSG
RGRCEAVTADSRPHSPQYPHDGRDDREVWPLRFFNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWRGA
ACDQRVLIVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAKRTTHPLFVIATRRSEEILGPDGNTPQFENI
SIYNYFVWTHYYSVKKTFLGVGQESFGEVDFSHEGPAFLTWHRYHLLRLEKDMQEMLQE
PSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDLMGSRSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCDSLEDYDTLGTL
CNSTEDGPIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEVGLFDTPPFYSNSTNSFRNTVEGYS
DPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADIST
FPLENAPIGHNRQYNMVPFWPPVTNTEMFVTAPDNLGYTYEIQWPSREFSVPEIIAIAVVGA
LLLVALIFGTASYLIRARRSMDEANQPLLTDQYQCYAEEYEKLQNPNQSVV

(56) Zellmembranprotein, gespalten in sekretiertes „Glypican-3“ (GPC3, OCI5, GTR2-2, Intestinal protein OCI-5, MXR7), (SwissProt: P51654)

>sp|P51654|GPC3_HUMAN Glypican-3 OS=Homo sapiens GN=GPC3 PE=1 SV=1

MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPGLKWVPETPVPGS
DLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSASMELKFLIIQNAAVFQEAFEIVVRH
AKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDINVDDMVNELFDSLFPVIYTQL
MNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFPKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVINTTD
HLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMMVKPCGGYCNVVMQGCMAGVVEIDKYWREYIL
SLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLTTTIGKLCAHSQQRQYRSAYY
PEDLFIDKKVLKVAHVEHEETLSSRRRELIQKLKSFISFYSALPGYICSHSPVAENDTLCWN
GQELVERYSQKAARNGMKNQFNLHELKMKGPEPVVSQIIDKLKHINQLLRTMSMPKGRV
LDKNLDEEGFESGDCGDDEDECIGGSGDGMIKVKNQLRFLAELAYDLDVDDAPGNSQQA
TPKDNEISTFHNLGNVHSPLKLLTSMAISVVCFFFLVH

In einem bevorzugten Gegenstand der Erfindung ist das Krebs-Zielmolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Krebs-Zielmolekülen (1) – (56).

In einem weiteren 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) – (56).

In einem weiteren 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) – (56).

In einem besonders bevorzugten Gegenstand der Erfindung ist das Krebs-Zielmolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus EGF-Rezeptor (NP_005219.2), Mesothelin (Q13421-3), C4.4a (NP_055215.2), Carboanhydrase IX (CA IX; Q16790, NP_001207.2), Her2, Glypican-3, TYRP1, Fibroblast growth factor receptor 3, Single-pass type I membrane protein ICOSLG, und Programmed cell death 1 ligand 1.

In einem weiteren besonders bevorzugten Gegenstand der Erfindung bindet der Binder an ein extrazelluläres Krebs-Zielmolekül, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus EGF-Rezeptor (NP_005219.2), Mesothelin (Q13421-3), C4.4a (NP_055215.2), Carboanhydrase IX (CA IX; Q16790, NP_001207.2), Her2, Glypican-3, TYRP1, Fibroblast growth factor receptor 3, Single-pass type I membrane protein ICOSLG, und Programmed cell death 1 ligand 1.

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 EGF-Rezeptor (NP_005219.2), Mesothelin (Q13421-3), C4.4a (NP_055215.2), Carboanhydrase IX (CA IX; Q16790, NP_001207.2), Her2, Glypican-3, TYRP1, Fibroblast growth factor receptor 3, Single-pass type I membrane protein ICOSLG, und Programmed cell death 1 ligand 1.

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.

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 WO2007070538 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 WO2007070538, Seite 24 ff und Beispiel 1 auf Seite 70, Beispiel 2 auf Seite 72). Weitere Verfahren zur Herstellung von Antikörper, die DNA Bibliotheken aus B-Zellen verwenden, sind zum Beispiel auf Seite 26 (WO2007070538) 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 WO90/0786 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 Kimrnel (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vo1. 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 Biolony, (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 WO2007070538 auf

den Seiten 41 – 45 beschrieben. Verfahren zur Herstellung eines IgG1-Antikörpers sind z.B. in WO2007070538 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 WO2007070538 auf Seite 80 beschrieben. Der Fachmann kann die in WO2007070538 beschriebenen Verfahren, die zur Herstellung von Carboanhydrase IX (Mn)-Antikörpern verwendet wurden, anlog zur Herstellung für Antikörper mit anderer Zielmolekülspezifität verwenden.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Binder sind Antikörper, insbesondere humane oder humanisierte Antikörper. 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. bestimmt werden durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.

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, Faktor 5, Faktor 10 oder insbesondere bevorzugt Faktor 100 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.

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 wird 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):

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS
GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cetuximab Schwere Kette:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAA

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSR
FSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Panitumumab Schwere Kette:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTN
YNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

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.

Weitere Ausführungsformen für EGFR-Antikörper sind:

- Zalutumumab / 2F8 / HuMax-EGFr, Firma Genmab A/S (WO-02100348, WO-2004056847, INN-Nummer 8605)
- Necitumumab / 11F8, ImClone / IMC-11F8, Firma ImClone Systems Inc [Eli Lilly & Co] (WO-2005090407 (EP-01735348-A1, US-20070264253-A1, US-07598350, WO-2005090407-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-09215683, 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-2010112413-A1, WO-2010115554)
- GT-MAB 5.2-GEX / CetuGEX, Firma Glycotope GmbH (WO-2008028686-A2 (EP-01900750-A1, EP-01911766-A1, EP-02073842-A2, US-20100028947-A1)
- ISU-101, Firma Isu Abxis Inc (ISU Chemical Co Ltd) / Scancell (Patent: WO-2008004834-A1)
- ABT-806 / mAb-806 / ch-806 / anti-EGFR monoc. antibody 806, Firma Ludwig Institute for Cancer Research / Abbott / Life Science Pharmaceuticals (WO02092771, WO2005081854 und WO-2009023265)
- SYM-004 (consists of two chimeric IgG1 antibodies (992 and 1024)), Firma Symphogen A/S (WO-2010022736-A2)
- MR1-1 /MR1-1KDEL, Firma IVAX Corp (Teva Pharmaceutical Industries Ltd) (Duke University), (Patent: WO-2001062931-A2)

- Antikörper gegen die Deletionsmutante, EGFRvIII, Firma Amgen/Abgenix (WO-2005010151, US-07628986)

- SC-100, Firma Scancell Ltd (WO-2001088138-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-09105871, WO-09215683)

- anti-EGFR-Mab, Firma Xencor (WO 2005056606)

- 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 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 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.

Carboanhydrase IX Antikörper

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Binder sind anti-CAIX-Antikörper, insbesondere humane oder humanisierte anti-CAIX-Antikörper. 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 z.B. durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie 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, Faktor 5, Faktor 10 oder insbesondere bevorzugt Faktor 100 bessere Affinität am Zielprotein aufweist 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. Anti-CAIX -Antikörper sind z.B. in WO 2007/070538-A2 beschrieben. Diese Antikörper können erfindungsgemäß verwendet werden.

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 WO2007070538-A2), 3ef2 (Anspruch 4 (b) in WO2007070538-A2), 1e4 (Anspruch 4 (c) in WO2007070538-A2), 3a4 (Anspruch 4 (d) in WO2007070538-A2), 3ab4 (Anspruch 4 (e) in WO2007070538-A2), 3ah10 (Anspruch 4 (f) in WO2007070538-A2), 3bb2 (Anspruch 4 (g) in WO2007070538-A2), 1aa1 (Anspruch 4 (h) in WO2007070538-A2), 5a6 (Anspruch 4 (i) in WO2007070538-A2) und 5aa3 (Anspruch 4 (j) in WO2007070538-A2).

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 Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 3ee9 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 3ef2 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 1e4 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 3a4 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 3ab4 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 3ah10 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 3bb2 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 1aa1 (aus WO2007070538-A2) umfassen,

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 5a6 (aus WO2007070538-A2) umfassen und

anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers 5aa3 (aus WO2007070538-A2) umfassen.

Die her angegebenen Sequenzen der CDR Regionen sind in Abbildungen 2a – 2c, Seite 128-130 in WO2007070538-A2 offenbart.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 3ee9, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4b auf Seite 137 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 3ef2, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4c auf Seite 138, bzw. in Abbildung 4b auf Seite 137 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 1e4, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4a auf Seite 136 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 3a4, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4a auf Seite 136 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 3ab4, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4a auf Seite 136 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 3ah10, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4a auf Seite 136 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 3bb2, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4b auf Seite 137 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 1aa1, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4a auf Seite 136 angegeben, umfasst,

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 5a6, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4b auf Seite 137 angegeben, umfasst, und

einem Antikörper oder antigen-bindendem Fragment, der die Aminosäuresequenz der variablen leichten und variablen schweren Ketten des Antikörpers 5aa3, wie in WO2007070538-A2 in Abbildung 4b auf Seite 137 angegeben, umfasst.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der anti-Carboanhydrase IX Antikörper Antikörper 3ee9 aus WO2007070538-A2.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder das antigen-bindenden Antikörperfragment die Aminosäuresequenzen der CDR Regionen der variablen schweren Kette des Antikörpers 3ee9 (VH3-CDR1: GFTFSSYGMS; VH3-CDR2: GISSLGSTTYYADSVKG; VH3-CDR3: TGSPGTFMHGDH, siehe Abbildung 2a, Seite 128 in

WO2007070538-A2) und die Aminosäuresequenzen der CDR Regionen der variablen leichten Kette des Antikörpers 3ee9 (VLk1-CDR1: RASQDINNYLS; VLk1-CDR2: YGASNLQS; VLk1-CDR3: QQYYGRPT, siehe Abbildung 2b, Seite 129 in WO2007070538-A2).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder das antigen-bindenden Antikörperfragment die Aminosäuresequenzen der variablen schweren Kette des Antikörpers 3ee9 (VH3:ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISSLGSTTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGSPGTFMHGDHWGQGTLVT VSS, siehe Abbildung 4b, Seite 137 in WO2007070538-A2) und die Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette des Antikörpers 3ee9 (VLk1:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRaSQDINNYLSWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYYGRPTTFGQGTKVEIKRT, siehe Abbildung 4b, Seite 137 in WO2007070538-A2).

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der anti-Carboanhydrase IX Antikörper 3ee9 ein IgG Antikörper.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der anti-Carboanhydrase IX Antikörper 3ee9 ein IgG1 Antikörper (3ee9-IgG1),

wobei die Aminosäuresequenz der schweren Kette die folgende Sequenz umfasst:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISSLGSTTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGSPGTFMHGDHWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

und die Aminosäuresequenzen der leichten Kette die folgende Sequenz umfasst:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLSWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYYGRPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

anti-Carboanhydrase IX Antikörper 3ee9-IgG1:

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung des anti-Carboanhydrase IX Antikörpers 3ee9-IgG1.

C4.4a Antikörper:

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Binder sind anti-C4.4a-Antikörper, insbesondere humane oder humanisierte anti-C4.4a-Antikörper. 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 z.B. durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie 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 aufweist 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.
Anti-C4.4a-Antikörper sind z.B. in WO01/23553 oder WO2011070088 beschrieben. Diese Antikörper können erfindungsgemäß verwendet werden.

Beispiele für C4.4a Antikörper und antigen-bindende Fragmente sind nachfolgend beschrieben. Die Sequenzen der Antikörper sind in Tabelle 1 angegeben, wobei jede Zeile die jeweiligen CDR Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette bzw. der variablen Schweren Kette des in Spalte 1 aufgeführten Antikörpers wiedergibt. Die Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette und der variablen schweren Kette und die Nukleinsäuresequenz des jeweils in Spalte 1 angegeben Antikörpers ist ebenso angegeben.

In einer Ausführungsform binden die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente an die S1 Domäne S1 (Aminosäureposition 1-85 von SEQ ID NO: 1) von C4.4a.

In einer Ausführungsform sind die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente kreuzreaktiv mit humanem C4.4a (SEQ ID NO:1) und mit murinem C4.4a (SEQ ID NO:2).

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 kompetieren die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente mit dem Antikörper M31-B01 und/oder mit dem Antikörper M20-D02-S-A um Bindung an C4.4a. Antikörper M31-B01 und M20-D02-S-A kompetieren um die Bindung an C4.4a. Die Antikörper B01-1 bis B01-12 wurden mittels Affinitätsmaturierung aus M31-B01 hergestellt und kompetieren mit M31-B01 um Bindung an C4.4a. Die Antikörper D02-1 bis D02-13 wurden mittels Affinitätsmaturierung aus M20-D02-S-A hergestellt und kompetieren mit M20-D02-S-A um Bindung an C4.4a.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente mindestens eine, zwei oder drei der in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten CDR Aminosäuresequenzen.

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 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente mindestens eine, zwei oder drei CDR Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette und mindestens eine, zwei oder drei CDR Aminosäuresequenzen der variablen schweren Kette eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente, die zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder 95% identisch sind mit den CDR Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette und mit den CDR Aminosäuresequenzen der variablen schweren Kette, eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die CDR Sequenzen der anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente

CDR Sequenzen der schweren Kette, die zu den CDR Sequenzen SEQ ID NO: 297 (CDR H1), SEQ ID NO: 298 (CDR H2) und SEQ ID NO: 299 (CDR H3) konform sind, und CDR Sequenzen der leichten Kette , die zu den CDR Sequenzen SEQ ID NO: 300 (CDR L1), SEQ ID NO: 22 (CDR L2) and SEQ ID NO: 301 (CDR L3) konform sind, oder

CDR Sequenzen der schweren Kette, die zu den CDR Sequenzen SEQ ID NO: 302 (CDR H1), SEQ ID NO: 303 (CDR H2) and SEQ ID NO: 304 (CDR H3) konform sind, und CDR Sequenzen der leichten Kette , die zu den CDR Sequenzen SEQ ID NO: 305 (CDR L1), SEQ ID NO: 306 (CDR L2) and SEQ ID NO: 307 (CDR L3) konform sind.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente, die zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder 95% identisch sind mit der variablen leichten Kette und mit der variablen schweren Kette, eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente die drei CDR Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette und die drei

CDR Aminosäuresequenzen der variablen schweren Kette eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente eine variable leichte Kette und/oder eine variable schwere Kette eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente die variable leichte Kette und die variable schwere Kette eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die C4.4a Antikörper und die antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 75-77 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 78-80 umfasst (B01-10),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 5, 9 und 13 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 17, 21 und 25 umfasst (M31-B01),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 6, 10 und 14 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 18, 22 und 26 umfasst (M20-D02-S-A),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 7, 11 und 15 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 19, 23 und 27 umfasst (M60-G03),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 8, 12 und 16 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 20, 24 und 28 umfasst (36-H02),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 45-47 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 48-50 umfasst (B01-3),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 55-57 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 58-60 umfasst (B01-5),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 65-67 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 68-70 umfasst (B01-7),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 85-87 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 88-90 umfasst (B01-12),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 95-97 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 98-100 umfasst (D02-4),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 105-107 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 108-110 umfasst (D02-6),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 115-117 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 118-120 umfasst (D02-7),

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 125-127 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 128-130 umfasst (D02-11), und

Antikörper, der die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 135-137 und der die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO: 138-140 umfasst (D02-13).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die C4.4a Antikörper und die antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 81 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 82 umfassen (B01-7),

Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 33 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 29 umfassen (M31-B01),

Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 34 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 30 umfassen (M20-D02 S-A),

Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 35 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 31 umfassen (M60-G03),

Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 36 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 32 umfassen (M36-H02),

Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die

Sequenz SEQ ID NO: 51 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 52 umfassen (B01-3), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 61 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 62 umfassen (B01-5), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 71 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 72 umfassen (B01-7), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 91 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 92 umfassen (B01-12), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 101 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 102 umfassen (D02-4), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 111 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 112 umfassen (D02-6), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 121 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 122 umfassen (D02-7), Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 131 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 132 umfassen (D02-11), und Antikörper, die die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 141 und die die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO: 142 umfassen (D02-13).

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper die leichte Kette und die schwere Kette eines in Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper die leichte Kette und die schwere Kette eines in Tabelle 2 angeführten Antikörpers.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der C4.4a Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

Antikörper, der die Aminosäuresequenz der leichten Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 346 und der die Aminosäuresequenz der schweren Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 347 umfasst (M31-B01) umfasst,

Antikörper, der die Aminosäuresequenz der leichten Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 352 und der die Aminosäuresequenz der schweren Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 353 umfasst (B01-3) umfasst,

Antikörper, der die Aminosäuresequenz der leichten Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 364 und der die Aminosäuresequenz der schweren Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 365 umfasst (B01-10) umfasst, und

Antikörper, der die Aminosäuresequenz der leichten Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 382 und der die Aminosäuresequenz der schweren Kette repräsentiert durch SEQ ID NO: 383 umfasst (D02-6) umfasst.

Tabelle 1: Sequenzen der C4.4a Antikörper

| Anti-körper | SEQ ID NO: HCDR1 | SEQ ID NO: HCDR2 | SEQ ID NO: HCDR3 | SEQ ID NO : LCDR1 | SEQ ID NO: LCDR2 | SEQ ID NO: LCDR3 | SEQ ID NO: VH Protein | SEQ ID NO: VL Protein | SEQ ID NO: VH Nucleotide | SEQ ID NO: VL Nucleotide |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M31-B01 | 5 | 9 | 13 | 17 | 21 | 25 | 33 | 29 | 41 | 37 |
| M20-D02 S-A | 6 | 10 | 14 | 18 | 22 | 26 | 34 | 30 | 42 | 38 |
| M60-G03 | 7 | 11 | 15 | 19 | 23 | 27 | 35 | 31 | 43 | 39 |
| M36-H02 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 36 | 32 | 44 | 40 |
| B01-3 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 |
| B01-5 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 |
| B01-7 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 |
| B01-10 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 |
| B01-12 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 |

| Anti-körper | SEQ ID NO: HCDR1 | SEQ ID NO: HCDR2 | SEQ ID NO: HCDR3 | SEQ ID NO : LCDR1 | SEQ ID NO: LCDR2 | SEQ ID NO: LCDR3 | SEQ ID NO: VH Protein | SEQ ID NO: VL Protein | SEQ ID NO: VH Nucleotide | SEQ ID NO: VL Nucleotide |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D02-4 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 |
| D02-6 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 |
| D02-7 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 |
| D02-11 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 |
| D02-13 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 |
| B01-nn1 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 308 | 309 |
| B01-nn2 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 310 | 311 |
| B01-nn3 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 312 | 313 |
| B01-nn4 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 314 | 315 |
| B01-nn5 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 316 | 317 |
| B01-2 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 318 | 319 |
| B01-4 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 320 | 321 |
| B01-6 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 322 | 323 |
| B01-8 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 324 | 325 |
| B01-9 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 326 | 327 |
| B01-11 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 328 | 329 |
| B01-12 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 330 | 331 |
| D02-ogl | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 332 | 333 |
| D02-5 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 334 | 335 |
| D02-8 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 336 | 337 |
| D02-9 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 338 | 339 |
| D02-10 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 340 | 341 |
| D02-11 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 342 | 343 |
| D02-12 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 344 | 345 |

Tabelle 2: Sequenzen der leichten und schweren Kette der C4.4a Antikörper

| Antikörper | Leichte Kette SEQ ID NO: | Schwere Kette SEQ ID NO: |
|---|---|---|

| Antikörper | Leichte Kette SEQ ID NO: | Schwere Kette SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| M31-B01 | 346 | 347 |
| B01-1 | 348 | 349 |
| B01-2 | 350 | 351 |
| B01-3 | 352 | 353 |
| B01-4 | 354 | 355 |
| B01-5 | 356 | 357 |
| B01-6 | 358 | 359 |
| B01-7 | 360 | 361 |
| B01-8 | 362 | 363 |
| B01-10 | 364 | 365 |
| B01-11 | 366 | 367 |
| B01-12 | 368 | 369 |
| M20-D02 S-A | 370 | 371 |
| D02-1 | 372 | 373 |
| D02-2 | 374 | 375 |
| D02-3 | 376 | 377 |
| D02-4 | 378 | 379 |
| D02-5 | 380 | 381 |
| D02-6 | 382 | 383 |
| D02-7 | 384 | 385 |
| D02-8 | 386 | 387 |
| D02-9 | 388 | 389 |
| D02-10 | 390 | 391 |
| D02-11 | 392 | 393 |
| D02-12 | 394 | 395 |
| D02-13 | 396 | 397 |

anti-C4.4a Antikörper IgG:

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines anti-C4.4a IgG1 Antikörpers, der die Aminosäuresequenz der leichten Kette und der schweren Kette eines in Tabelle 2 angeführten Antikörpers umfaßt.

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. 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. 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.

Mesothelin Antikörper

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Binder sind anti-Mesothelin-Antikörper, insbesondere humane oder humanisierte anti-Mesothelin-Antikörper. 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 z.B. durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie 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 aufweist 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.

Die erfindungsgemäßen verwendeten 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-Mesothelin -Antikörper sind z.B. WO 2009/068204 beschrieben. Diese Antikörper können erfindungsgemäß verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen anti-Mesothelin Antikörpers (MF-Ta), dessen Aminosäuresequenz die CDR Sequenzen der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO:398 (HCDR1), SEQ ID NO:399 (HCDR2) und SEQ ID NO:400 (HCDR3) und die CDR Sequenzen der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO:401 (LCDR1), SEQ ID NO:402 (LCDR2) und SEQ ID NO:403 (LCDR3) umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz des anti-Mesothelin Antikörpers MF-Ta oder antigen-bindender Antikörperfragmente die Sequenz der variablen schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO:404 und die Sequenz der variablen leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO:405. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz des anti-Mesothelin Antikörpers MF-Ta oder antigen-bindender Antikörperfragmente die Sequenz der variablen schweren Kette, welche durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:406 kodiert wird, und die Sequenz der variablen leichten Kette, welche durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:407 kodiert wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz des anti-Mesothelin Antikörpers MF-Ta die Sequenz der schweren Kette wiedergegeben durch die Sequenzen SEQ ID NO:408 und die Sequenz der leichten Kette wiedergegeben durch die Sequenz SEQ ID NO:409.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Aminosäuresequenz des anti-Mesothelin Antikörpers MF-Ta die Sequenz schweren Kette, welche durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:410 kodiert wird, und die Sequenz der leichten Kette, welche durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO: 411 kodiert wird.

Weitere Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmoleküle Mesothelin binden, sind dem Fachmann bekannt und sind z.B. in WO 2009/068204 beschrieben und können für die erfindungsgemässen Binder-Wirkstoff-Konjugate verwendet werden.

In einer Ausführungsform der Binder-Wirkstoff-Konjugate ist der Binder ein anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindendes Antikörperfragment, wobei der Antikörper an Mesothelin bindet und invariante Bindung zeigt.

In einer Ausführungsform der Binder-Wirkstoff-Konjugate umfasst ein anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindendes Antikörperfragment die Aminosäuresequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Aminosäuresequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette eines in WOv2009/068204-A1 (Tabelle 7; Seite 61 – 63) beschriebenen Antikörpers.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

anti- Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers MF-Ta umfassen,

anti- Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers MF-J (WO2009068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen,

anti- Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers MOR06640 (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen,

anti- Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers MF-226 (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen, und

anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenzen der drei CDR Regionen der leichten Kette und die Sequenzen der drei CDR Regionen der schweren Kette des Antikörpers MOR06626 (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenz der variablen leichten Kette und die Sequenz der variablen schweren Kette des Antikörpers MF-Ta umfassen,

anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenz der variablen leichten Kette und die Sequenz der variablen schweren Kette des Antikörpers MF-J (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen,

anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenz der variablen leichten Kette und die Sequenz der variablen schweren Kette des Antikörpers MOR06640 (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen,

anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenz der variablen leichten Kette und die Sequenz der variablen schweren Kette des Antikörpers MF-226 (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen, und

anti-Mesothelin Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten davon, die die Sequenz der variablen leichten Kette und die Sequenz der variablen schweren Kette des Antikörpers MOR06626 (WO 2009/068204-A1; Tabelle 7; Seite 61) umfassen.

Weitere 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. 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. 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.

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 WO2009123894-A2, WO2008140603-A2, oder in WO2011044368-A2. Beispiel für ein anti-HER2 Konjugat ist Trastuzumab-Emtansine (INN-Nr. 9295).

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 WO2008092117, WO2008036688 oder WO2006089232 offenbart. Beispiele für ein anti- CD30 Konjugat ist Brentuximab Vedotin (INN-Nr. 9144).

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).

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.

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).

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).

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 WO2007038637-A2 oder WO2008070593-A2 offenbart. Ein Beispiel für ein anti-CD70 Konjugat ist SGN-75 (CD70 MMAF)

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).

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 WO2008031056-A2 offenbart. Weitere Antikörper und Beispiele für ein anti-CD19 Konjugat (SAR3419) sind in WO2008047242-A2 offenbart.

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 WO2003106495-A2, WO2008028686-A2 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-Mucin Konjugate sind in WO2005009369-A2 offenbart.

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 WO2009080829-A1, WO2009080830-A1 offenbart.

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 7465449-B2, EP719859-A1, WO2002012501-A1, oder WO2006062779-A2 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-Integrin AlphaV Konjugate sind Intetumumab-DM4 und weitere in WO2007024536-A2 offenbarte ADCs.

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül TDGF1 binden und zur Behandlung von Krebs verwendet werden können, sind die in WO2002077033-A1, US7318924, WO2003083041-A2 und WO2002088170-A2 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-TDGF1 Konjugate sind in WO2002088170-A2 offenbart.

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül PSMA binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Prostatakarzinom verwendet werden können, sind die in WO199735616-A1, WO199947554-A1, und WO2001009192-A1 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-PSMA Konjugate sind in WO2009026274-A1 offenbart.

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül EPHA2 binden, zur Herstellung eines Konjugats und zur Behandlung von Krebs verwendet werden können, sind in WO2004091375-A2 offenbart.

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 WO2009033094-A2 und US20090175796-A1 offenbart.

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 WO2005081711-A2 offenbart.

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 WO2006074418-A2 offenbart.

Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül PDL1 bindet, ist der Antikörper 3G10 aus Patent WO-2007005874-A2. Der Antikörper 3G10 kann z.B. im humanen IgG1 Format verwendet werden und als in den Ausführungsbeispielen verwendeter anti-PDL1 umfasst der Antikörper folgende Sequenzen:

Leichte Kette:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLVWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYGFSWVRQAPGQGLEWMGWITAYNGNT
NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARDYFYGMDVWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül ICOSLG bindet, ist der Antikörper 16H (Seq. ID ID No 70 und 45) aus WO-2007011941-A2. Anti- ICOSLG antikörper 16H kann z.B. im humanen IgG1 Format verwendet werden und als in den Ausführungsbeispielen verwendeter anti-ICOSLG umfasst der Antikörper folgende Sequenzen:

Leichte Kette:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVAYIKQDGNEKY
YVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGILWFGDLPTFWGQGILVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül FGFR3 bindet, ist der Antikörper 15D8 (SEQ ID NO: 74 für die schwere Kette und SEQ ID NO:76 für die leichte Kette) aus WO 2010002862-A2. Anti- FGFR3 antikörper 15D8 kann z.B. im humanen IgG1 Format verwendet werden und als in den Ausführungsbeispielen verwendeter anti-FGFR3 umfasst der Antikörper folgende Sequenzen:

Leichte Kette:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMYWFQQKPGKAPKPLIYLTSYLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNMYWVRQMPGKGLEWMGYIDPYNGGTS
YNQKFKGKATLTVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAREGGNYEAWFAYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase (TYRP1) bindet, ist der Antikörper 20D7S Antikörper (SEQ ID NO: 30 und 32) aus Patent WO-2009114585-A1. Anti- TYRP1 antikörper 20D7S kann z.B. im humanen IgG1 Format verwendet werden und als in den Ausführungsbeispielen verwendeter anti-TYRP1 umfasst der Antikörper folgende Sequenzen:

Leichte Kette:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLESMGWINTNTGNPT
YAQGFTGRFVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül Glypican-3 bindet, ist der die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 84 und 92 umfassende (human-Maus Chimäre) aus Patent US-07776329-B2. Der vorgehend beschrieben anti-Glypican-3 Antikörper kann z.B. im humanen IgG1 Format verwendet werden und als in den Ausführungsbeispielen verwendeter anti-Glypican-3 umfasst der Antikörper folgende Sequenzen:

Leichte Kette:

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDT
AYSQKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSYTYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Die erfindungsgemäßen Verbindungen besitzen wertvolle pharmakologische Eigenschaften und können zur Vorbeugung und Behandlung von Erkrankungen bei Menschen und Tieren verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Binder-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) der Formel (Ia) weisen eine hohe und spezifische cytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen auf, welche anhand der im vorliegenden experimentellen Teil (C-1. bis C-7e.) aufgeführten Assays gezeigt werden kann. Diese hohe und spezifische cytotoxische Aktivität der erfindungsgemäßen Binder-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) der Formel (Ia) wird durch die geeignete Kombination vom neuen N,N-Dialkylauristatin-Derivaten und Binder mit Linkern, welche sowohl eine enzymatisch, hydrolytisch oder reduktiv spaltbare Soll-Bruchstelle zur Freisetzung der Toxophore als auch keine solche Soll-Bruchstelle aufweisen, erreicht. Insbesondere durch Verwendung von stabilen Linkern, welche keine enzymatisch, hydrolytisch oder reduktiv spaltbare Soll-Bruchstelle zur Freisetzung der Toxophore aufweisen, und die nach Aufnahme des ADCs in die Tumorzelle und nach komplettem intrazellulären, enzymatischen Abbau des Antikörpers noch ganz oder teilweise intakt bleiben, wird die Wirkung sehr spezifisch auf die Tumorzelle eingegrenzt. Die Kompatibilität von ADCs mit stabilen Linkern setzt unter anderem voraus, dass die intrazellulär gebildeten Metabolite ausreichend effizient entstehen, ihr Target erreichen und dort ihre anti-proliferative Wirkung am Target in ausreichender Potenz entfalten können, ohne dass sie zuvor von Transporterproteinen wieder aus der Tumorzelle ausgeschleust werden. Die nach Aufnahme der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (Ia) intrazellulär gebildeten Metabolite weisen ein vemindertes Potential als Substrat gegenüber

Transporterproteinen auf, wodurch eine Rückverteilung in die systemische Zirkulation und damit die Auslösung von potentiellen Nebenwirkungen durch das Toxophor selbst unterdrückt wird. Weiterhin wird durch die neuartige N-Alkyl-Anbindung der basiche Charakter am Aminoende des Monomethyl-Auristatin-Peptids erhalten. Insbesondere bei den über Lysin-Seitenketten verknüpften erfindungsgemäßen Binder-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) der Formel (Ia) bleibt die Gesamtladung des Antikörpers unabhängig von der Anzahl der Toxophor-Linker-Beladungen konstant.

Die Kompatibilität der ADCs mit einer stabilen Linkerchemie und dem betreffenden Target in Verbindung mit Metaboliten, die in geringerem Maße ein Substrat für Transporterproteine darstellen, bietet ein vergrößertes therapeutisches Fenster.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind aufgrund dieses Eigenschaftsprofils daher in besonderem Maße zur Behandlung von hyperproliferativen Erkrankungen beim Menschen und bei Säugetieren allgemein geeignet. Die Verbindungen können einerseits die Zellproliferation und Zellteilung hemmen, blockieren, verringern oder senken und andererseits die Apoptose verstärken.

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 (ductale und lobuläre Formen, auch *in situ*), Atemwegstumore (kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinom), Hirntumore (z.B. des Hirnstamms und des Hypothalamus, Astrocytoma, Medulloblastoma, Ependymoma sowie neuro-ectodermale und pineale Tumore), Tumore der Verdauungsorgane (Speiseröhre, Magen, Gallenblase, Dünndarm, Dickdarm, Rektum), Lebertumore (u.a. hepatozelluläres Karzinom, Cholangiokarzinom und gemischt-hepatozelluläres Cholangiokarzinom), Tumore des Kopf- und Halsbereiches (Larynx, Hypopharynx, Nasopharynx, Oropharynx, Lippen und Mundhöhle), Hauttumore (Plattenepithelkarzinom, Kaposi-Sarkom, malignes Melanom, Merkelzell-Hautkrebs und nicht-melanomartiger Hautkrebs), Tumore der Weichteile (u.a. Weichteilsarkome, Osteosarkome, maligne fibröse Histiozytome, Lymphosarkome und Rhabdomyosarkome), Tumore der Augen (u.a. intraokuläres Melanom und Retinoblastom), Tumore der endokrinen und exokrinen Drüsen (z.B. thyroide und parathyroide Drüsen, Bauchspeicheldrüse und Speicheldrüse), 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 Bluterkrankungen in solider Form und als zirkulierende Blutzellen, wie Lymphome, Leukämien und myeloproliferative Erkrankungen, 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.

Bevorzugte hyperproliferative Erkrankungen für anti-CA9 Binder-Wirkstoff-Konjugate

Hyperproliferative Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt eingesetzt werden können, sind CA9 überexprimierende Tumore, Brustkarzinome und Brusttumore (z.B. ductale und lobuläre Formen, auch *in situ*); Atemwegstumore (z.B. kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinom), davon bevorzugt nichtkleinzelliges Lungenkarzinom; Hirntumore (z.B. des Hirnstamms und des Hypothalamus, Astrocytoma, Medulloblastoma, Ependymoma und/oder neuro-ectodermale und pineale Tumore); Tumore der Verdauungsorgane (z.B. Speiseröhre, Magen, Gallenblase, Dünndarm, Dickdarm, Rektum), davon besonders bevorzugt sind Magen- und Darmtumore; Lebertumore (u.a. hepatozelluläres Karzinom, Cholangiokarzinom und gemischt-hepatozelluläres Cholangiokarzinom); Tumore des Kopf- und Halsbereiches (z.B. Larynx, Hypopharynx, Nasopharynx, Oropharynx, Lippen, Mundhöhle, Zunge und Speiseröhre); Tumore des Harntrakts (Blasen-, Penis-, Nieren-, Nierenbecken- und Harnleitertumore), davon besonders bevorzugt Tumore der Nieren und der Blase; und/oder Tumore der reproduktiven Organe (Endometrium-, Zervix-, Ovarial-, Vaginal-, Vulva- und Uteruskarzinome der Frau und/oder Prostata- und Hodenkarzinome des Mannes), davon besonders bevorzugt Zervix- und Uteruskarzinome.

Bevorzugte hyperproliferative Erkrankungen für anti-EGFR Binder-Wirkstoff-Konjugate

Hyperproliferative Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt eingesetzt werden können, sind EGFR überexprimierende Tumore, Atemwegstumore (z.B. kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinom), davon bevorzugt nichtkleinzelliges Lungenkarzinom; Tumore der Verdauungsorgane (z.B. Speiseröhre, Magen, Gallenblase, Dünndarm, Dickdarm, Rektum), davon besonders sind Darmtumore; Tumore der endokrinen und exokrinen Drüsen (z.B. thyroide und parathyroide Drüsen, Bauchspeicheldrüse und Speicheldrüse), davon bevorzugt Pankreas; Tumore des Kopf- und Halsbereiches (z.B. Larynx, Hypopharynx, Nasopharynx, Oropharynx, Lippen, Mundhöhle, Zunge und Speiseröhre); und/oder Gliome.

Bevorzugte hyperproliferative Erkrankungen für anti-Mesothelin Binder-Wirkstoff-Konjugate

Hyperproliferative Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt eingesetzt werden können, sind Mesothelin überexprimierende Tumore, Tumore der reproduktiven Organe (Endometrium-, Zervix-, Ovarial-, Vaginal-, Vulva- und Uteruskarzinome der Frau und/oder Prostata- und Hodenkarzinome des Mannes), davon bevorzugt Ovarialkarzinome; Tumore

der endokrinen und exokrinen Drüsen (z.B. thyroide und parathyroide Drüsen, Bauchspeicheldrüse und Speicheldrüse), davon bevorzugt Pankreas; Atemwegstumore (z.B. kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinom), davon bevorzugt nichtkleinzelliges Lungenkarzinom; und/oder Mesotheliome.

Bevorzugte hyperproliferative Erkrankungen für anti-C4.4a Binder-Wirkstoff-Konjugate

Hyperproliferative Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt eingesetzt werden können, sind C4.4a überexprimierende Tumore, Plattenepithelkarzinome (z.B. der Cervix, Vulva, Vagina, des Analkanals, Endometriums, Fallopian Rohrs, Penis, Scrotum, der Spesieröhre, Brust, der Blase, des Gallenganges, Endometriums, Uterus, und Ovars); Brustkarzinome und Brusttumore (z.B. ductale und lobuläre Formen, auch *in situ*); Atemwegstumore (z.B. kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinom), davon bevorzugt nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, Plattenepithel- und Adenokarzinom der Lunge; Tumore des Kopf- und Halsbereiches (z.B. Larynx, Hypopharynx, Nasopharynx, Oropharynx, Lippen, Mundhöhle, Zunge und Speiseröhre, Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches); Tumore des Harntrakts (Blasen-, Penis-, Nieren-, Nierenbecken- und Harnleitertumore, Plattenepithelkarzinome der Blase), davon besonders bevorzugt Tumore der Nieren und der Blase; Hauttumore (Plattenepithelkarzinom, Kaposi-Sarkom, malignes Melanom, Merkelzell-Hautkrebs und nicht-melanomartiger Hautkrebs), davon besonders bevorzugt Melanome; Tumore der endokrinen und exokrinen Drüsen (z.B. thyroide und parathyroide Drüsen, Bauchspeicheldrüse und Speicheldrüse), davon bevorzugt Pankreas; Tumore der Verdauungsorgane (z.B. Speiseröhre, Magen, Gallenblase, Dünndarm, Dickdarm, Rektum), davon besonders kolorectale Karzinome; und/oder Tumore der reproduktiven Organe (Endometrium-, Zervix-, Ovarial-, Vaginal-, Vulva- und Uteruskarzinome der Frau und/oder Prostata- und Hodenkarzinome des Mannes), davon besonders bevorzugt Uteruskarzinome.

Diese gut beschriebenen Krankheiten des Menschen können mit vergleichbarer Ätiologie auch in anderen Säugetieren vorkommen und dort mit den Verbindungen der vorliegenden Erfindung behandelt werden.

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.

Das erfindungsgemäße Binder-Wirkstoff-Konjugat wird vorzugsweise zur Behandlung von Krebs in einem Patienten eingesetzt, wobei die zu behandelnden Krebszellen des Patienten Expression des Targets (vorzugsweise EGFR, CA9, Mesothelin, oder C4.4a) haben, vorzugsweise eine höhere Expression als in Nicht-Tumor-Gewebe.

Ein Verfahren zur Identifizierung von Patienten, die vorteilhaft auf ein anti-Target-Binder-Wirkstoff-Konjugat zur Behandlung von Krebs ansprechen, umfasst die Bestimmung der Target-Expression in Krebszellen des Patienten. In einer Ausführungsform wird die Target-Expression durch Target-Genexpressionsanalyse ermittelt. Der Fachmann kennt Verfahren zur Genexpressionsanalyse wie z.B. RNA Detektion, quantitative oder qualitative Polymerasekettenreaktion oder Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Target-Expression mittels Immunohistochemie mit einem anti- Target-Antikörper ermittelt. Bevorzugt wird die Immunohistochemie an Fomaldehyd-fixiertem Gewebe durchgeführt. Der Antikörper zur Verwendung in der Immunohistochemie ist der gleiche Antikörper sein, der auch im Konjugat Verwendung findet. Der Antikörper zur Verwendung in der Immunohistochemie ist ein zweiter Antikörper, der, bevorzugt spezifisch, das Zielprotein / Target erkennt.

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 erfindungs-

gemäßen 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:

Aldesleukin, Alendronsäure, Alfaferon, Alitretinoin, Allopurinol, Aloprim, Aloxi, Altretamin, Aminoglutethimid, Amifostin, Amrubicin, Amsacrin, Anastrozol, Anzmet, Aranesp, Arglabin, Arsentrioxid, Aromasin, 5-Azacytidin, Azathioprin, BCG oder tice-BCG, Bestatin, Betamethason-Acetat, Betamethason-Natriumphosphat, Bexaroten, Bleomycin-Sulfat, Broxuridin, Bortezomib, Busulfan, Calcitonin, Campath, Capecitabin, Carboplatin, Casodex, Cefeson, Celmoleukin, Cerubidin, Chlorambucil, Cisplatin, Cladribin, Clodronsäure, Cyclophosphamid, Cytarabin, Dacarbazin, Dactinomycin, DaunoXome, Decadron, Decadron-Phosphat, Delestrogen, Denileukin Diftitox, Depomedrol, Deslorelin, Dexrazoxan, Diethylstilbestrol, Diflucan, Docetaxel, Doxifluridin, Doxorubicin, Dronabinol, DW-166HC, Eligard, Elitek, Ellence, Emend, Epirubicin, Epoetin-alfa, Epogen, Eptaplatin, Ergamisol, Estrace, Estradiol, Estramustin-Natriumphosphat, Ethinylestradiol, Ethyol, Etidronsäure, Etopophos, Etoposid, Fadrozol, Farston, Filgrastim, Finasterid, Fligrastim, Floxuridin, Fluconazol, Fludarabin, 5-Fluordeoxyuridin-Monophosphat, 5-Fluoruracil (5-FU), Fluoxymesteron, Flutamid, Formestan, Fosteabin, Fotemustin, Fulvestrant, Gammagard, Gemcitabin, Gemtuzumab, Gleevec, Gliadel, Goserelin, Granisetron-Hydrochlorid, Histrelin, Hycamtin, Hydrocorton, erythro-Hydroxynonyladenin, Hydroxyharnstoff, Ibritumomab Tiuxetan, Idarubicin, Ifosfamid, Interferon-alpha, Interferon-alpha-2, Interferon-alpha-2α, Interferon-alpha-2β, Interferon-alpha-n1, Interferon-alpha-n3, Interferon-beta, Interferon-gamma-1α, Interleukin-2, Intron A, Iressa, Irinotecan, Kytril, Lentinan-Sulfat, Letrozol, Leucovorin, Leuprolid, Leuprolid-Acetat, Levamisol, Levofolinsäure-Calciumsalz, Levothroid, Levoxyl, Lomustin, Lonidamin, Marinol, Mechlorethamin, Mecobalamin, Medroxyprogesteron-Acetat, Megestrol-Acetat, Melphalan, Menest, 6-Mercaptopurin, Mesna, Methotrexat, Metvix, Miltefosin, Minocyclin, Mitomycin C, Mitotan, Mitoxantron, Modrenal, Myocet, Nedaplatin, Neulasta, Neumega, Neupogen, Nilutamid, Nolvadex, NSC-631570, OCT-43, Octreotid, Ondansetron-Hydrochlorid, Orapred, Oxaliplatin, Paclitaxel, Pediapred, Pegaspargase, Pegasys, Pentostatin, Picibanil, Pilocarpin-Hydrochlorid, Pirarubicin, Plicamycin, Porfimer-Natrium, Prednimustin, Prednisolon, Prednison, Premarin, Procarbazin, Procrit, Raltitrexed, Rebif, Rhenium-186-Etidronat, Rituximab, Roferon-A, Romurtid, Salagen, Sandostatin, Sargramostim, Semustin, Sizofiran, Sobuzoxan, Solu-Medrol, Streptozocin, Strontium-89-chlorid, Synthroid, Tamoxifen, Tamsulosin, Tasonermin, Tastolacton, Taxoter, Teceleukin, Temozolomid, Teniposid, Testosteron-Propionat, Testred, Thioguanin, Thiotepa, Thyrotropin, Tiludronsäure, Topotecan,

Toremifen, Tositumomab, Tastuzumab, Teosulfan, Tretinoin, Trexall, Trimethylmelamin, Trimetrexat, Triptorelin-Acetat, Triptorelin-Pamoat, UFT, Uridin, Valrubicin, Vesnarinon, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinorelbin, Virulizin, Zinecard, Zinostatin-Stimalamer, Zofran; ABI-007, Acolbifen, Actimmun, Affinitak, Aminopterin, Arzoxifen, Asoprisnil, Atamestan, Atrasentan, Avastin, BAY 43-9006 (Sorafenib), CCI-779, CDC-501, Celebrex, Cetuximab, Crisnatol, Cyproteron-Acetat, Decitabin, DN-101, Doxorubicin-MTC, dSLIM, Dutasterid, Edotecarin, Eflornithin, Exatecan, Fenretinid, Histamin-Dihydrochlorid, Histrelin-Hydrogel-Implant, Holmium-166-DOTMP, Ibandronsäure, Interferon-gamma, Intron-PEG, Ixabepilon, Keyhole Limpet-Hemocyanin, L-651582, Lanreotid, Lasofoxifen, Libra, Lonafarnib, Miproxifen, Minodronat, MS-209, liposomales MTP-PE, MX-6, Nafarelin, Nemorubicin, Neovastat, Nolatrexed, Oblimersen, Onko-TCS, Osidem, Paclitaxel-Polyglutamat, Pamidronat-Dinatrium, PN-401, QS-21, Quazepam, R-1549, Raloxifen, Ranpirnas, 13-*cis*-Retinsäure, Satraplatin, Seocalcitol, T-138067, Tarceva, Taxoprexin, Thymosin-alpha-1, Tiazofurin, Tipifarnib, Tirapazamin, TLK-286, Toremifen, TransMID-107R, Valspodar, Vapreotid, Vatalanib, Verteporfin, Vinflunin, Z-100, Zoledronsäure, sowie Kombinationen hiervon.

In einer bevorzugten Ausführungsform können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung mit anti-hyperproliferativen Agenzien kombiniert werden, welche beispielhaft – ohne dass diese Aufzählung abschließend wäre – sein können:

Aminoglutethimid, L-Asparaginase, Azathioprin, 5-Azacytidin, Bleomycin, Busulfan, Carboplatin, Carmustin, Chlorambucil, Cisplatin, Colaspase, Cyclophosphamid, Cytarabin, Dacarbazin, Dactinomycin, Daunorubicin, Diethylstilbestrol, 2',2'-Difluordeoxycytidin, Docetaxel, Doxorubicin (Adriamycin), Epirubicin, Epothilon und seine Derivate, erythro-Hydroxynonyladenin, Ethinylestradiol, Etoposid, Fludarabin-Phosphat, 5-Fluordeoxyuridin, 5-Fluordeoxyuridin-Monophosphat, 5-Fluoruracil, Fluoxymesteron, Flutamid, Hexamethylmelamin, Hydroxyharnstoff, Hydroxyprogesteron-Caproat, Idarubicin, Ifosfamid, Interferon, Irinotecan, Leucovorin, Lomustin, Mechlorethamin, Medroxyprogesteron-Acetat, Megestrol-Acetat, Melphalan, 6-Mercaptopurin, Mesna, Methotrexat, Mitomycin C, Mitotan, Mitoxantron, Paclitaxel, Pentostatin, *N*-Phosphonoacetyl-L-aspartat (PALA), Plicamycin, Prednisolon, Prednison, Procarbazin, Raloxifen, Semustin, Streptozocin, Tamoxifen, Teniposid, Testosteron-Propionat, Thioguanin, Thiotepa, Topotecan, Trimethylmelamin, Uridin, Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin.

In viel versprechender Weise lassen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen auch mit biologischen Therapeutika wie Antikörpern (z.B. Avastin, Rituxan, Erbitux, Herceptin) kombinieren. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit gegen die Angiogenese gerichteten Therapien positive Effekte erzielen, wie zum Beispiel mit Avastin, Axitinib, Recentin, Regora-

fenib, Sorafenib oder Sunitinib. Kombinationen mit Inhibitoren des Proteasoms und von mTOR sowie Kombinationen mit Antihormonen und steroidalen metabolischen Enzyminhibitoren sind wegen ihres günstigen Nebenwirkungsprofils ebenfalls besonders geeignet.

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 oral, parenteral, 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, subcutan, intracutan, percutan 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.

**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. NaCl, KCl oder $Na_2HPO_4$ 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.

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.

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.

## 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 |
| ADC | Antibody-drug-conjugate = Antikörper-Wirkstoff-Konjugat |
| Ac | Acetyl |
| aq. | wässrig, wässrige Lösung |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCRP | Brustkrebs-Resistenz-Protein, ein Efflux-Transporter |
| Boc | *tert.*-Butoxycarbonyl |
| br. | breit (bei NMR) |
| Bsp. | Beispiel |
| *ca.* | *circa*, ungefähr |
| CAIX | Carboanhydrase IX |
| 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<br>PBS = DPBS = D-PBS, pH7,4, Fa. Sigma, No D8537<br><br>Zusammensetzung:<br><br>0,2 g KCl<br>0,2 g $KH_2PO_4$ (anhyd)<br>8,0 g NaCl<br>1,15 g $Na_2HPO_4$ (anhyd)<br>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 |
| 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 |
| 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) |
| *tert.* | tertiär |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| UV | Ultraviolett-Spektrometrie |
| v/v | Volumen zu Volumen-Verhältnis (einer Lösung) |
| Z | Benzyloxycarbonyl |

**HPLC- und LC-MS-Methoden:**

Methode 1 (LC-MS):

Instrument: Waters Acquity SQD UPLC System; Säule: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8µ 50 mm 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; Fluss: 0.40 ml/min; Ofen: 50°C; UV-Detektion: 210-400 nm.

Methode 2 (LC-MS):

Instrument: Micromass QuattroPremier mit Waters UPLC Acquity; Säule: Thermo Hypersil GOLD 1.9µ 50 mm 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 90% A → 0.1 min 90% A → 1.5 min 10% A → 2.2 min 10% A; Fluss: 0.33 ml/min; Ofen: 50°C; UV-Detektion: 210 nm.

Methode 3 (LC-MS):

Instrument: Micromass Quattro Micro MS mit HPLC Agilent Serie 1100; Säule: Thermo Hypersil GOLD 3µ 20 mm x 4 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 100% A → 3.0 min 10% A → 4.0 min 10% A → 4.01 min 100% A (Fluss 2.5 ml/min) → 5.00 min 100% A; Ofen: 50°C; Fluss: 2 ml/min; UV-Detektion: 210 nm.

Methode 4 (LC-MS):

Gerätetyp MS: Micromass ZQ; Gerätetyp HPLC: HP 1100 Series; UV DAD; Säule: Phenomenex Gemini 3µ 30 mm x 3.00 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 90% A → 2.5 min 30% A → 3.0 min 5% A → 4.5 min 5% A; Fluss: 0.0 min 1 ml/min → 2.5 min/3.0 min/4.5 min 2 ml/min; Ofen: 50°C; UV-Detektion: 210 nm.

Methode 5 (HPLC):

Gerät: HP 1090 Serie II; Säule: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50 mm x 4.6 mm; Vorsäule: Merck Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e, 5 mm x 4.6 mm; Injektionsvolumen: 5 µl; Eluent A: 70% $HClO_4$ in Wasser (4 ml/Liter), Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0.00 min 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; Fluss: 5 ml/min; Säulentemperatur: 40°C.

Methode 6 (HPLC):

Gerät: Waters 2695 mit DAD 996; Säule: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50 mm x 4.6 mm; BestNr: 1.51450.0001. Vorsäule: Merck Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e, 5 mm x 4.6 mm; BestNr: 1.51470.0001. Eluent A: 70% $HClO_4$ in Wasser (4 ml/Liter), Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0.00 min 5% B → 0.50 min 5% B → 3.00 min 95% B → 4.00 min 95% B; Fluss: 5 ml/min.

Methode 7 (LC-MS):

Gerätetyp MS: Waters ZQ; Gerätetyp HPLC: Agilent 1100 Series; UV DAD; Säule: Thermo Hypersil GOLD 3µ 20 mm x 4 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 100% A → 3.0 min 10% A → 4.0 min 10% A → 4.1 min 100% A (Fluss 2.5 ml/min); Ofen: 55°C; Fluss: 2 ml/min; UV-Detektion: 210 nm.

Methode 8 (LC-MS):

Gerätetyp MS: Waters ZQ; Gerätetyp HPLC: Agilent 1100 Series; UV DAD; Säule: Thermo Hypersil GOLD 3µ 20 mm x 4 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 100% A → 2.0 min 60% A → 2.3 min 40% A → 3.0 min 20% A → 4.0 min 10% A → 4.2 min 100% A (Fluss 2.5 ml/min); Ofen: 55°C; Fluss: 2 ml/min; UV-Detektion: 210 nm.

Methode 9 (LC-MS):

Instrument: Waters Acquity SQD UPLC System; Säule: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8µ 50 mm 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 10 (HPLC):

Gerät: Agilent 1200 Series; Säule: Agilent Eclipse XDB-C18 5µ 4.6 mm x 150 mm; Vorsäule: Phenomenex KrudKatcher Disposable Pre-Column; Injektionsvolumen: 5 µl; Eluent A: 1 l Wasser + 0.01% Trifluoressigsäure; Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.01% Trifluoressigsäure; Gradient: 0.00 min 10% B → 1.00 min 10% B → 1.50 min 90% B → 5.5 min 10% B; Fluss: 2 ml/min; Säulentemperatur: 30°C.

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.

Methode 11 (LC-MS):

Instrument: Waters ACQUITY SQD UPLC System; Säule: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 µ 30 x 2 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: 0.60 ml/min; UV-Detektion: 208 – 400 nm.

Methode 12 (HPLC):

Gerät: Agilent 1200 Series mit Säulenofen und DAD; Säule: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50 mm x 4.6 mm; BestNr: 1.51450.0001. Vorsäule: Merck Chromolith Guard Cartridge Kit RP-18e, 5 mm x 4.6 mm; BestNr: 1.51470.0001. Eluent A: 70% $HClO_4$ in Wasser (4 ml/Liter), Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0.00 min 5% B → 0.50 min 5% B → 3.00 min 95% B → 4.00 min 95% B; Fluss: 5 ml/min; Säulentemperatur: 30°C.

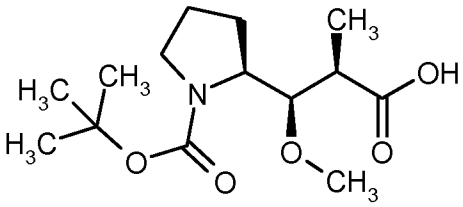
Methode 13 (LC-MS):

Instrument MS: Waters (Micromass) Quattro Micro; Instrument HPLC: Agilent 1100 Serie; Säule : YMC-Triart C18 3 µ 50 x 3 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.01 mol Ammoniumcarbonat, Eluent B: 1 l Acetonitril; Gradient: 0.0 min 100% A → 2.75 min 5% A → 4.5 min 5% A; Ofen: 40°C; Fluss: 1.25 ml/min; UV-Detektion: 210 nm.

**Ausgangsverbindungen und Intermediate:**

**Ausgangsverbindung 1**

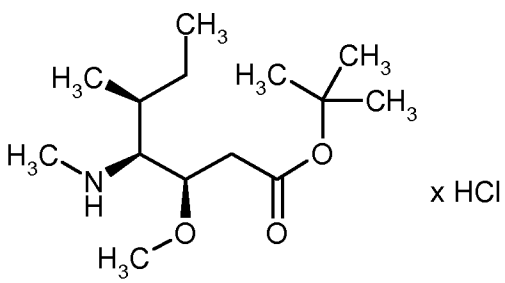
(2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure (Boc-Dolaproin)



Die Titelverbindung kann auf verschiedenen Wegen nach Literaturvorschriften hergestellt werden, siehe z.B. Pettit *et al.*, *Synthesis* 1996, 719; Shioiri *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 931; Shioiri *et al.*, *Tetrahedron* 1993, *49*, 1913; Koga *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 2395; Vidal *et al.*, *Tetrahedron* 2004, *60*, 9715; Poncet *et al.*, *Tetrahedron* 1994, *50*, 5345. Sie wurde entweder als freie Säure oder als 1:1 Salz mit Dicycclohexylamin hergestellt.

**Ausgangsverbindung 2a**

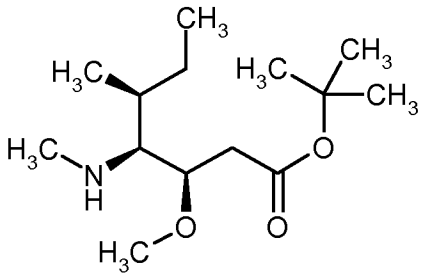
*tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-5-methyl-4-(methylamino)heptanoat-Hydrochlorid (Dolaisoleucin-OtBu x HCl)



Die Titelverbindung kann auf verschiedenen Wegen nach Literaturvorschriften hergestellt werden, siehe z.B. Pettit *et al.*, *J. Org. Chem.* 1994, *59*, 1796; Koga *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 2395; Shioiri *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 931; Shioiri *et al.*, *Tetrahedron* 1993, *49*, 1913.

**Ausgangsverbindung 2b**

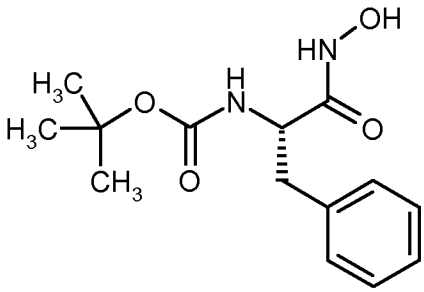
*tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-5-methyl-4-(methylamino)heptanoat
(Dolaisoleucin-O$^t$Bu)



Die Verbindung wurde in Analogie zur Ausgangsverbindung 2a hergestellt, jedoch wurde die Hydrierung ohne Zusatz von 1N Salzsäure durchgeführt.

**Ausgangsverbindung 3**

$N^{\alpha}$-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-hydroxy-L-phenylalaninamid



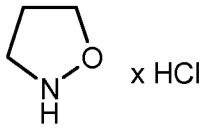
Die Titelverbindung wurde nach Literaturvorschrift hergestellt (A. Ritter *et al.*, *J. Org. Chem.* 1994, *59*, 4602).

Ausbeute: 750 mg (75% d. Th.)

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.67 min; MS (ESIpos): m/z = 281 $(M+H)^+$.

**Ausgangsverbindung 4**

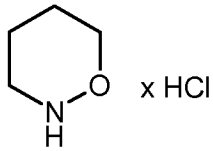
1,2-Oxazolidin-Hydrochlorid




Die Titelverbindung kann nach Literaturvorschriften hergestellt werden, siehe z.B. H. King, *J. Chem. Soc.* 1942, 432; sie ist auch kommerziell erhältlich.

**Ausgangsverbindung 5**

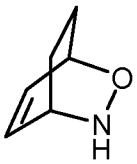
1,2-Oxazinan-Hydrochlorid




Die Titelverbindung kann nach Literaturvorschriften hergestellt werden, siehe z.B. H. King, *J. Chem. Soc.* 1942, 432.

**Ausgangsverbindung 6**

2-Oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en

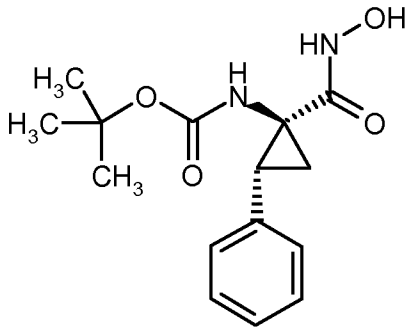



Die Titelverbindung kann in Boc-geschützter Form nach Literaturvorschrift hergestellt werden (siehe z.B. C. Johnson *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1998, *39*, 2059); die Entschützung erfolgte auf übliche Weise durch Behandlung mit Trifluoressigsäure und anschließende Neutralisation.

Ausbeute: 149 mg (89% d. Th.).

**Ausgangsverbindung 7**

*tert.*-Butyl-[(1*S*,2*R*)-1-(hydroxycarbamoyl)-2-phenylcyclopropyl]carbamat



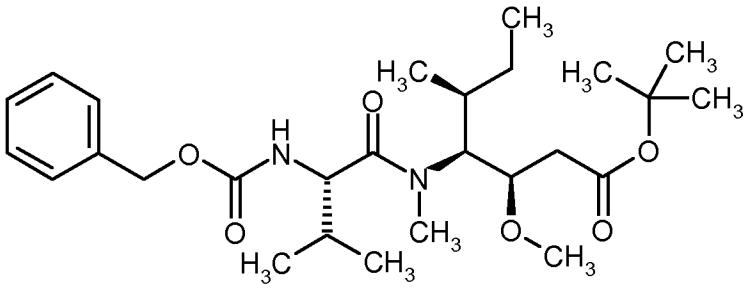
Die Titelverbindung wurde gemäß einer Literaturvorschrift (A. Ritter *et al.*, *J. Org. Chem.* 1994, *59*, 4602) hergestellt ausgehend von kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure (C. Cativiela *et al.*, *Chirality* 1999, 11, 583).

Ausbeute: 339 mg (59% d. Th.)

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 293 $(M+H)^+$.

**Intermediat 1**

*tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-4-[{*N*-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valyl}(methyl)amino]-3-methoxy-5-methyl-heptanoat



10.65 g (41.058 mmol) *tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-5-methyl-4-(methylamino)-heptanoat (Ausgangsverbindung 2b) wurden in 250 ml Dichlormethan aufgenommen und die Lösung auf -10°C abgekühlt. Dann wurden unter Rühren 10.317 g (41.058 mmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valin, 16.866 g (61.586 mmol) 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP) sowie 28.6 ml *N,N*-Diisopropylethylamin zugegeben und die Mischung anschließend 20 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach mit Dichlormethan verdünnt und zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 4:1 als Eluent gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand über Nacht im

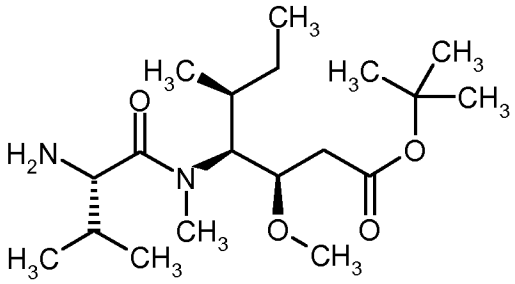
Hochvakum getrocknet. Es wurden 10.22 g (51% d. Th.) der Titelverbindung als gelbliches Öl erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.3 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.59 min; MS (ESIpos): m/z = 493 $(M+H)^+$.

**Intermediat 2**

*tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-5-methyl-4-[methyl(L-valyl)amino]heptanoat



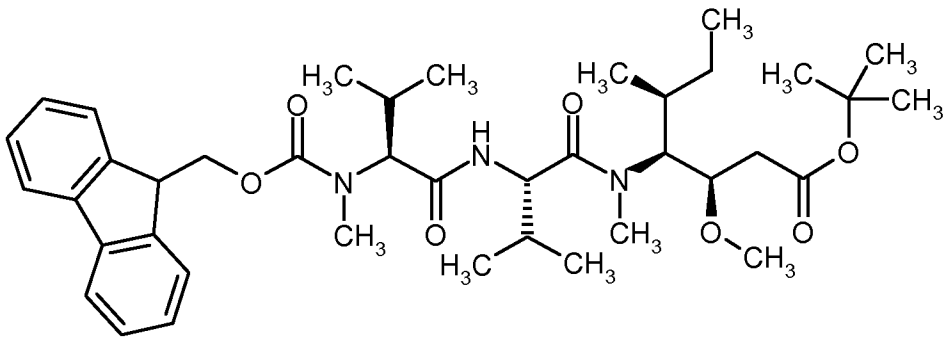
500 mg (1 mmol) *tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-4-[{*N*-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valyl}(methyl)amino]-3-methoxy-5-methylheptanoat (Intermediat 1) wurden in 50 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 100 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 1 h lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 370 mg (quant.) der Titelverbindung als nahezu farbloses Öl.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.59 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 359 $(M+H)^+$.

**Intermediat 3**

*N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-*tert.*-butoxy-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



4.64 g (13.13 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valin wurden in 20 ml DMF gelöst und nacheinander mit 4.28 g (11.94 mmol) *tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-5-methyl-4-[methyl(L-valyl)amino]heptanoat (Intermediat 2), 2.75 g (14.33 mmol) 1-(3-Dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid sowie 2.2 g (14.33 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach in eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde direkt, ohne weitere Reinigung, in der nächsten Stufe eingesetzt.

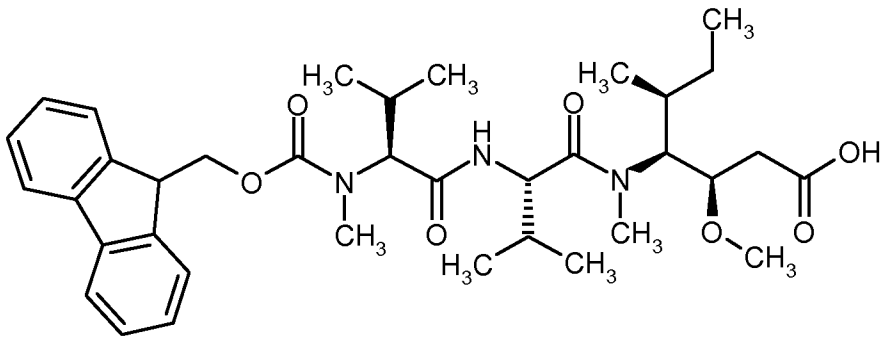
Ausbeute: 9.1 g (quant., 60%-ige Reinheit)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.99 min; MS (ESIpos): m/z = 694 $(M+H)^+$.

**Intermediat 4**

*N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



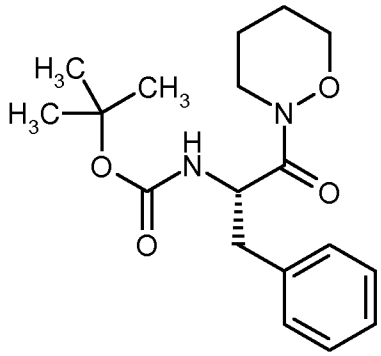
9.1 g des Rohproduktes *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-*tert.*-butoxy-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 3) wurden in 56.6 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 56.6 ml Trifluoressigsäure versetzt und 2h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand durch Flash-Chromatographie gereinigt, wobei als Eluent Dichlormethan, Dichlormethan/Ethylacetat 3:1 und Dichlormethan/Ethylacetat/Methanol 15:5:0.5 verwendet wurden. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Einengen wurden 5.8 g (86% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.3 min; MS (ESIpos): m/z = 638 $(M+H)^+$.

**Intermediat 5**

*tert.*-Butyl-[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]carbamat



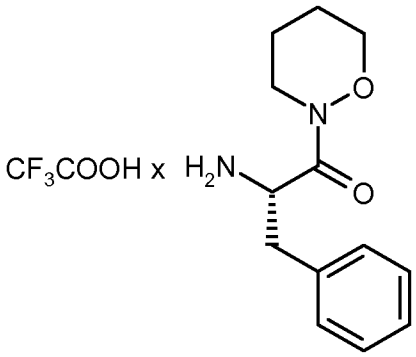
500 mg (1.9 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanin wurden in 10 ml DMF gelöst und nacheinander mit 466 mg (3.8 mmol) 1,2-Oxazinan-Hydrochlorid (Ausgangsverbindung 5), 433 mg (2.3 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 382 mg (2.8 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat sowie 731 mg (5.7 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach in eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Man erhielt 620 mg (98% d. Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.62 min; MS (ESIpos): m/z = 235 $(M-C_4H_8-CO_2+H)^+$.

**Intermediat 6**

(2*S*)-2-Amino-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-3-phenylpropan-1-on-Trifluoracetat



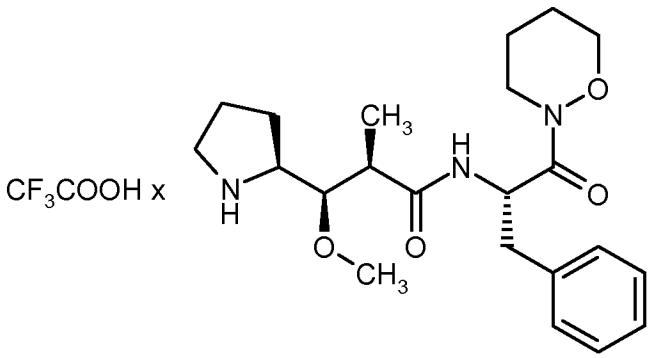

620 mg (1.85 mmol) *tert.*-Butyl-[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]carbamat (Intermediat 5) wurden in 5 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand aus Wasser/Acetonitril lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 779 mg (91% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 0.45 min;

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 235 $(M+H)^+$.

**Intermediat 7**

(2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat




360 mg (1.25 mmol) (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methyl-propansäure (Ausgangsverbindung 1) wurden in 10 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 579.2 mg (1.25 mmol) (2*S*)-2-Amino-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-3-phenylpropan-1-on-Trifluoracetat (Intermediat 6), 714.5 mg (1.88 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 655 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 16 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach eingeengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und zuerst mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung, dann mit 5%-iger wässriger

Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 16:4 als Eluent gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen des Rückstands im Hochvakuum wurden 503.5 mg (74% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *tert.*-Butyl-(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-carboxylat erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.12 min; MS (ESIpos): m/z = 504 $(M+H)^+$.

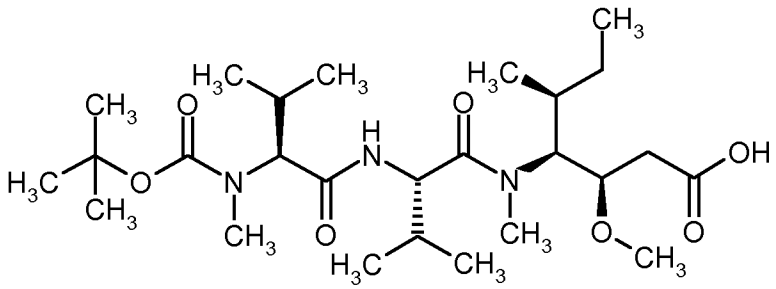
503 mg (1 mmol) dieses Intermediats wurden in 20 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und mit Dichlormethan rückdestilliert. Der verbliebene Rückstand wurde aus Ethylacetat mit n-Pentan gefällt, das Lösungsmittel abdekantiert. Der so erhaltene Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die wässrige Phase anschließend lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 462 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.53 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.57 min; MS (ESIpos): m/z = 404 $(M+H)^+$.

**Intermediat 8**

*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



51 mg (0.08 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 0.5 ml Piperidin versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch

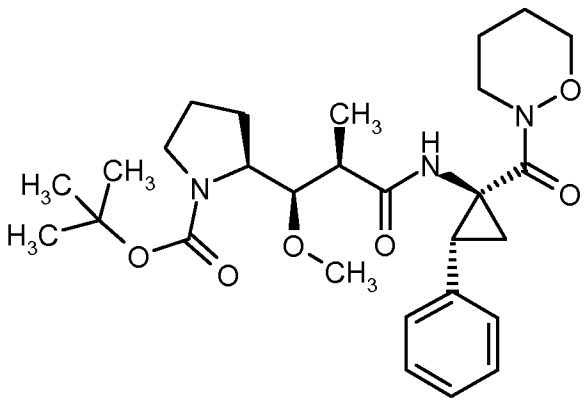
im Vakuum eingeengt und der Rückstand mit Diethylether verrührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert und mehrfach mit Diethylether gewaschen. Dann wurde der Filter-Rückstand in 5 ml Dioxan/Wasser aufgenommen und die Lösung mit 1 N Natronlauge auf pH 11 eingestellt. Unter Ultraschallbehandlung wurden in mehreren Portionen insgesamt 349 mg (1.6 mmol) Di-*tert.*-butyldicarbonat zugegeben, wobei der pH-Wert der Lösung bei 11 gehalten wurde. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Dioxan abgedampft und die wässrige Lösung mit Zitronensäure auf einen pH-Wert von 2-3 eingestellt. Man extrahierte zweimal mit je 50 ml Ethylacetat. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Diethylether aufgenommen und das der Titelverbindung mit Pentan ausgefällt. Durch Dekantieren wurde das Lösungsmittel abgetrennt. Der Rückstand wurde noch mehrmals mit Pentan digeriert und schließlich im Hochvakuum getrocknet. Es wurden so 40 mg (97% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 516 $(M+H)^+$.

**Intermediat 9**

*tert.*-Butyl-(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-carboxylat



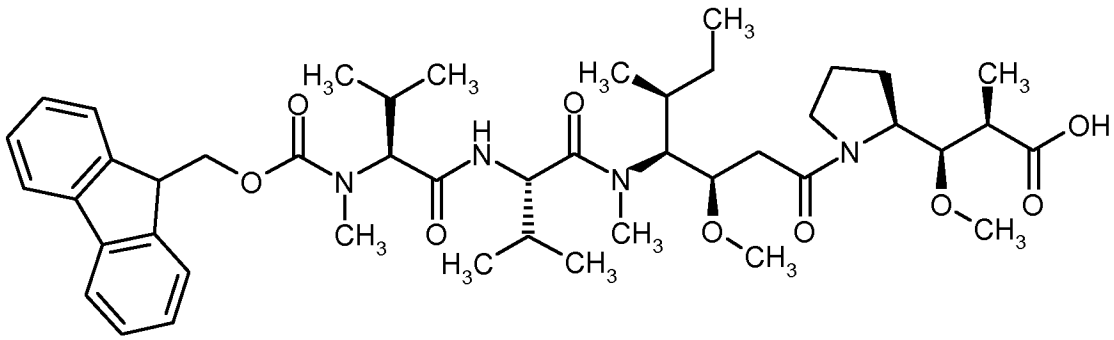
Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese der Intermediate 5, 6 und 7 über drei Stufen durch Kupplung von kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure mit 1,2-Oxazinan-Hydrochlorid (Ausgangsverbindung 5), anschließende Entschützung mit Trifluoressigsäure und Kupplung mit Ausgangsverbindung 1 hergestellt. Das Endprodukt wurde durch präparative HPLC gereinigt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.12 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 516 $(M+H)^+$.

**Intermediat 10**

*N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



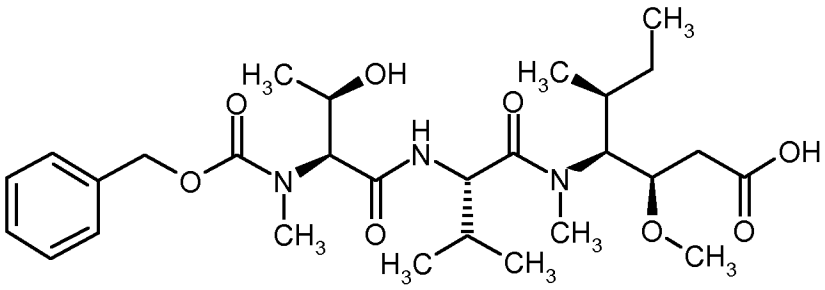
315 mg (0.494 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 12 ml DMF gelöst, mit 104 mg (0.543 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid sowie 83 mg (0.543 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat versetzt und 90 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 112 µl *N,N*-Diisopropylethylamin sowie 149 mg (0.494 mmol) (2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propansäure-Trifluoracetat, welches zuvor aus der Ausgangsverbindung 1 durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure hergestellt worden war, hinzugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde durch zweimalige präparative HPLC aufgereinigt. Es wurden 140 mg (35% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaumes erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.40 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.38 min; MS (ESIpos): m/z = 807 $(M+H)^+$.

**Intermediat 11**

*N*-[(Benzyloxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-threonyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde *N*-[(Benzyloxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-threonin aus 237 mg (0.887 mmol) seines Dicyclohexylamin-Salzes durch Aufnehmen in Ethylacetat und Ausschütteln mit 5%-iger wässriger Schwefelsäure freigesetzt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde in 16 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 365 mg (1 mmol) *tert.*-Butyl-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-5-methyl-4-[methyl(L-valyl)amino]heptanoat (Intermediat 2), 185 mg (0.967 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid sowie 148 mg (0.967 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat versetzt. Die Mischung wurde 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach in eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC aufgereinigt. Es wurden so 283 mg (53% d. Th.) des *tert.*-Butylester-Intermediats *N*-[(Benzyloxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-threonyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-*tert.*-butoxy-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.17 min.

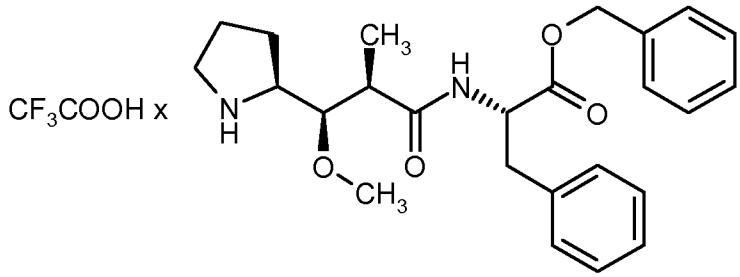
283 mg (0.466 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 5 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Hochvakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Man erhielt 156 mg (61% d. Th.) der Titelverbindung als farblosen Schaum.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.50 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 552 $(M+H)^+$.

**Intermediat 12**

Benzyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-phenylalaninat-Trifluoracetat



Im ersten Schritt wurde die Ausgangsverbindung 1 aus 600 mg (1.28 mmol) des entsprechenden Dicyclohexylammoniumsalz freigesetzt durch Auflösen des Salzes in 100 ml Ethylacetat und Ausschütteln zunächst mit 50 ml 0.5%-iger Schwefelsäure und dann mit gesättigter Natriumchloridlösung. Daraufhin wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert, eingeengt und sofort mit Benzyl-L-phenylalaninat in Analogie zur Synthese von Intermediat 7 umgesetzt und anschließend entschützt.

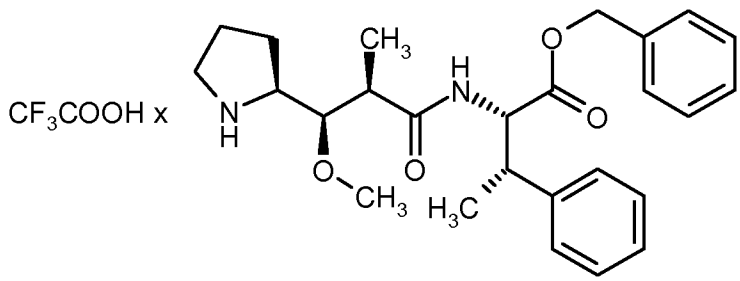
Ausbeute: 650 mg (94% über 2 Stufen)

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.76 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.68 min; MS (ESIpos): m/z = 425 $(M+H)^+$.

**Intermediat 13**

Benzyl-(β*S*)-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-β-methyl-L-phenylalaninat-Trifluoracetat



Zunächst wurde (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure aus 351 mg (0.75 mmol) des Dicyclohexylamin-Salzes (Ausgangsverbindung 1) durch Aufnehmen in Ethylacetat und Ausschütteln mit wässriger 5%iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung freigesetzt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 373 mg (0.75 mmol) Benzyl-(β*S*)-β-methyl-L-phenylalaninat-Trifluoracetat [hergestellt aus kommerziell erhältlichem (β*S*)-*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-β-methyl-L-phenylalanin durch EDC/DMAP-vermittelte Veresterung

mit Benzylalkohol und nachfolgende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure], 428 mg (1.125 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 392 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 20 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Man erhielt so 230 mg (57% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats Benzyl-(β*S*)-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropanoyl}-β-methyl-L-phenylalaninat.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.3 min;

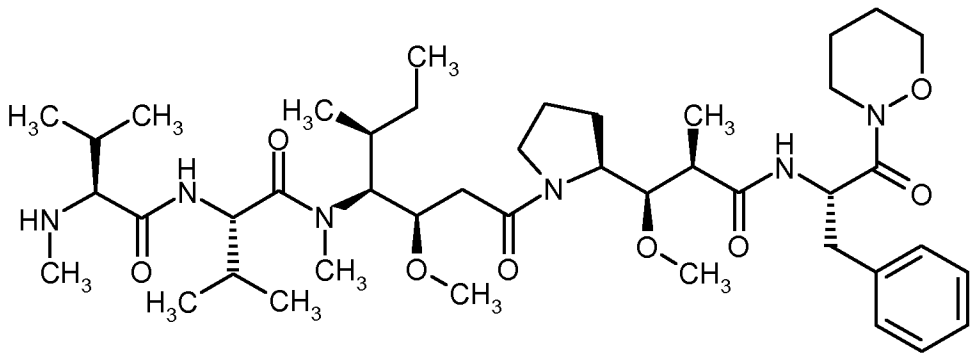
LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.36 min; MS (ESIpos): m/z = 539 $(M+H)^+$.

230 mg (0.42 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 5 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum weiter getrocknet und dann aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 230 mg (quant.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.6 min.

**Intermediat 14**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



x $CF_3COOH$

143 mg (0.223 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 15 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 141 mg (0.22 mmol) (2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat (Intermediat 7), 102 mg (0.27 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 128 µl (0.74 mmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 3 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach in eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Man erhielt so 275 mg (quant.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.73 min;

LC-MS (Methode 4): $R_t$ = 3.19 min; MS (ESIpos): m/z = 1023 $(M+H)^+$.

46 mg (0.045 mmol) dieses Intermediats wurden in 4 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 1 ml Piperidin wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt (Eluent: Acetonitril + 0.01% TFA / Wasser + 0.01% TFA). Es wurden 22 mg (54% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

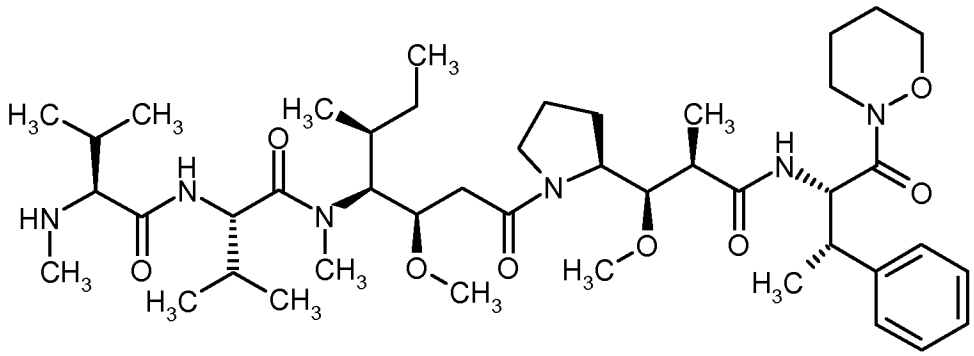
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.68 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 801 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.8 (m, 2H), 8.7 (m, 1H), 8.42 und 8.15 (2d, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 5.12 und 4.95 (2m, 1H), 4.70 und 4.62 (2m, 1H), 4.62 und 4.50 (2t, 1H), 4.1-3.9 (m, 3H), 3.85 (m, 1H), 3.75-3.6 (m, 2H), 3.23, 3.18, 3.17, 3.14, 3.02 und 2.96 (6s, 9H), 3.1-2.9 und 2.75 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.4-2.1 (m, 2H), 2.05 (br. m, 2H), 1.85-1.55 (br. m, 6H), 1.5-1.2 (br. m, 3H), 1.1-0.8 (m, 18H), 0.75 (t, 3H) [weitere Signale unter $H_2O$-Peak verborgen].

**Intermediat 15**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



x $CF_3COOH$

126 mg (0.198 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 10 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 105 mg (0.198 mmol) (2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat (Intermediat 17), 41.6 mg (0.217 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, 33 mg (0.217 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat sowie 79 µl (0.454 mmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach in eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammonium-chlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Es wurden so 220 mg (quant.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.77 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.5 min; MS (ESIpos): m/z = 1037 $(M+H)^+$.

220 mg (0.212 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 1 ml Piperidin wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt

(Eluent: Acetonitril + 0.01% TFA / Wasser + 0.01% TFA). Es wurden 91 mg (46% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

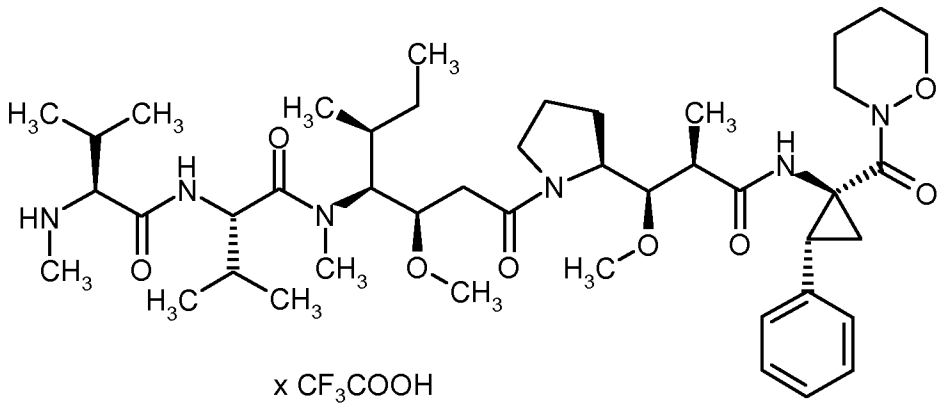
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.71 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 815 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.87 und 8.80 (2d, 2H), 8.75 (m, 1H), 8.40 und 7.98 (2d, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 5.45 und 5.2 (2t, 1H), 4.78 und 4.62 (2m, 1H), 4.73 und 4.58 (2t, 1H), 4.2-4.0 (m, 3H), 3.7-3.6 (m, 1H), 3.35, 3.20, 3.18, 3.14, 3.12 und 3.00 (6s, 9H), 3.1 und 2.95 (2m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.4-2.0 (m, 4H), 1.9-1.6 (m, 4H), 1.6-1.2 (m, 5H), 1.1-0.75 (m, 21H), 0.80 (t, 3H) [weitere Signale unter $H_2O$-Peak verborgen].

**Intermediat 16**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat




617 mg (1.2 mmol) *tert.*-Butyl-(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-carboxylat (Intermediat 24) wurden in 44 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 4.4 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand aus Dioxan/Wasser lyophilisiert. Es wurden 702 mg (quant.) der entschützten Verbindung (2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat als Rohprodukt erhalten, das ohne weitere Reinigung in der folgenden Stufe eingesetzt wurde.

470 mg (0.74 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 57 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 390 mg (ca. 0.74 mmol) des oben erhaltenen (2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetates, 336 mg (0.88 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 423 µl (2.4 mmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann in eine Mischung aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Man erhielt so 453 mg (59% d. Th.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.58 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 3.10 min; MS (ESIpos): m/z = 1035 $(M+H)^+$.

453 mg (0.438 mmol) dieses Intermediats wurden in 24 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 2.4 ml Piperidin wurde das Reaktionsgemisch 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt (Eluent: Acetonitril / 0.1% TFA in Wasser). Es wurden 260 mg (64% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

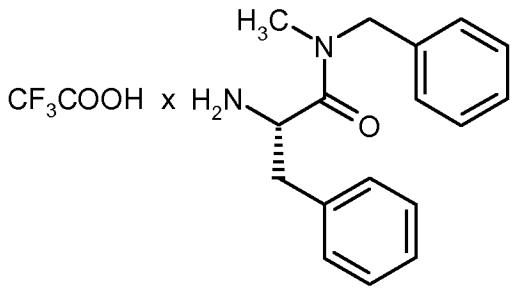
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.64 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 813 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.8 (m, 2H), 8.65 (m, 2H), 7.3-7.1 (m, 5H), 4.8-4.05 (m, 2H), 4.0 und 3.82 (2m, 2H), 3.8-3.5 (m, 8H), 3.32, 3.29, 3.20, 3.19, 3.12 und 3.00 (6s, 9H), 2.65 (t, 1H), 2.5-2.45 (m, 3H), 2.4-1.3 (m, 15H), 1.15-0.85 (m, 18H), 0.8 und 0.75 (2d, 3H) [weitere Signale unter $H_2O$-Peak verborgen].

**Intermediat 17**

*N*-Benzyl-*N*-methyl-L-phenylalaninamid-Trifluoracetat



1000 mg (3.77 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanin wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 457 mg (3.77 mmol) *N*-Methylbenzylamin, 2150 mg (5.65 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 657 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 3:1 als Laufmittel gereinigt. Die Produktfraktionen wurden eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt so 1110 mg (75% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *N*-Benzyl-$N^{\alpha}$-(*tert.*-butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-phenylalaninamid.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.14 min; MS (ESIpos): m/z = 369 $(M+H)^+$.

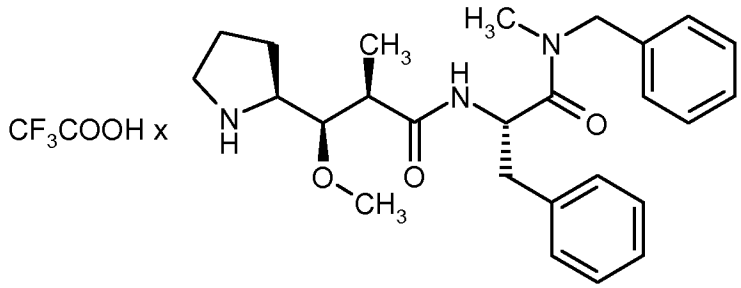
1108 mg (3.007 mmol) dieses Intermediats wurden in 30 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt, der verbliebene Rückstand mit Dichlormethan verrührt und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde noch zweimal mit Pentan verrührt, das Lösungsmittel jeweils wieder abdekantiert und das der Titelverbindung schließlich im Hochvakuum getrocknet. Es wurden so 1075 mg (93% d. Th.) der Titelverbindung als ein Harz erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.6 min; MS (ESIpos): m/z = 269 $(M+H)^+$.

**Intermediat 18**

*N*-Benzyl-$N^{\alpha}$-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-*N*-methyl-L-phenylalaninamid-Trifluoracetat



Zunächst wurde (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure (Ausgangsverbindung 1) aus 141 mg (0.491 mmol) ihres Dicyclohexylamin-Salzes durch Aufnehmen in Ethylacetat und Ausschütteln mit 5%-iger wässriger Schwefelsäure freigesetzt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml DMF aufgenommen und mit 187.6 mg (0.49 mmol) *N*-Benzyl-*N*-methyl-L-phenylalaninamid-Trifluoracetat (Intermediat 9), 190.3 mg (1.47 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 256 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach eingeengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und die Lösung nacheinander mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde per Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Acetonitril/Wasser 30:1 als Eluent gereinigt. Die Produktfraktionen wurden eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt so 168 mg (64% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *tert.*-Butyl-(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(2*S*)-1-[benzyl(methyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-carboxylat.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.22 min; MS (ESIpos): m/z = 538 $(M+H)^+$.

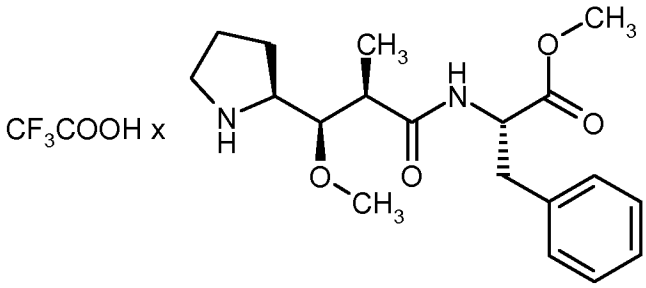
168 mg (0.312 mmol) dieses Intermediats wurden in 15 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 3 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde zunächst mit Dichlormethan, dann mit Diethylether verrührt und das Lösungsmittel jeweils wieder abdestilliert. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 170 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung als ein Harz erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.73 min; MS (ESIpos): m/z = 438 $(M+H)^+$.

**Intermediat 19**

Methyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-phenylalaninat-Trifluoracetat



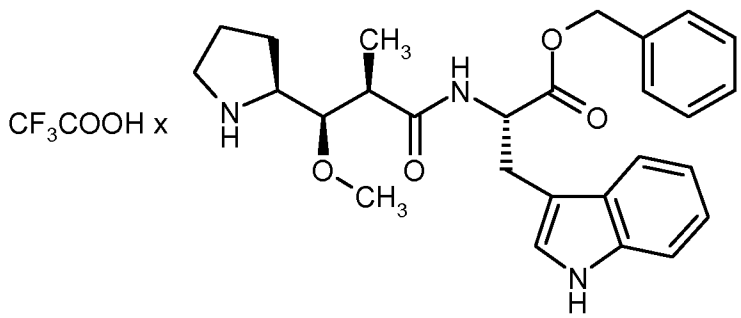
Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 18 ausgehend von (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure (Ausgangsverbindung 1), die aus dem Dicyclohexylamin-Salz freigesetzt wurde, und Methyl-L-phenylalaninat-Hydrochlorid hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 0.6 min;

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.17 min; MS (ESIpos): m/z = 349 $(M+H)^+$.

**Intermediat 20**

Benzyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-tryptophanat-Trifluoracetat



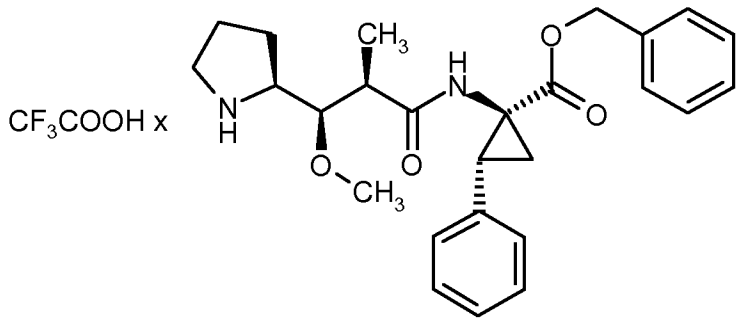
Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 18 ausgehend von (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure (Ausgangsverbindung 1), die aus dem Dicyclohexylamin-Salz freigesetzt wurde, und Benzyl-L-tryptophanat hergestellt.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 464 $(M+H)^+$.

**Intermediat 21**

Benzyl-(1*S*,2*R*)-1-({(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}amino)-2-phenylcyclopropancarboxylat-Trifluoracetat



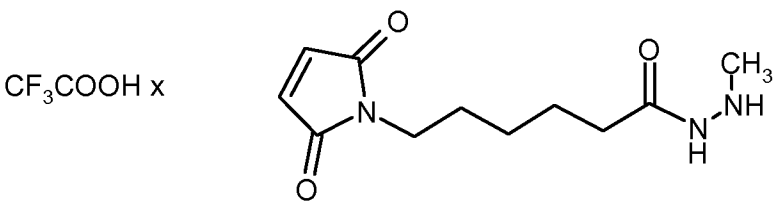
Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 18 ausgehend von (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure (Ausgangsverbindung 1), die aus dem Dicyclohexylamin-Salz freigesetzt wurde, und Benzyl-(1*S*,2*R*)-1-amino-2-phenylcyclopropancarboxylat hergestellt. Benzyl-(1*S*,2*R*)-1-amino-2-phenylcyclopropancarboxylat wurde zuvor nach Standardmethoden durch Veresterung von kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure mit Benzylalkohol und anschließende Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 437 $(M+H)^+$.

**Intermediat 22**

6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-N'-methylhexanhydrazid-Trifluoracetat



100 mg (473 µmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexansäure wurden in 71 µl DMF gelöst und anschließend mit 139 mg (947 µmol) tert.-Butyl-1-methylhydrazincarboxylat, 182 mg (947 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 145 mg (947 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und

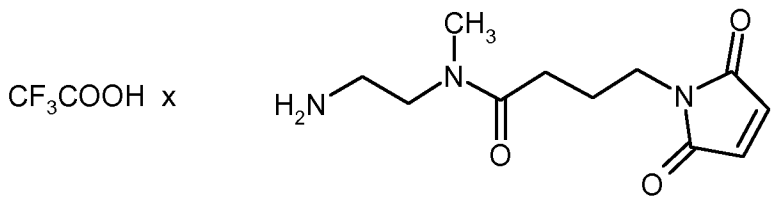
anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 129 mg (80% d. Th.) des geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

Anschließend wurden die 129 mg (380 µmol) mit 2 ml Trifluoressigsäure in 8 ml Dichlormethan deblockiert. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert und es verblieben 125 mg (83% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.38 min; MS (ESIpos): m/z = 240 $(M+H)^+$

**Intermediat 23**

N-(2-Aminoethyl)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-N-methylbutanamid-Trifluoracetat



Zunächst wurden 35 mg (164 µmol) tert.-Butyl-[2-(methylamino)ethyl]carbamat-Hydrochlorid-Trifluoracetat, 30 mg (164 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butansäure, 75 mg (197 µmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 57 µl *N,N*-Diisopropylethylamin in 5 ml DMF zusammengegeben und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und durch Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 35 mg (63% d.Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.6 min;

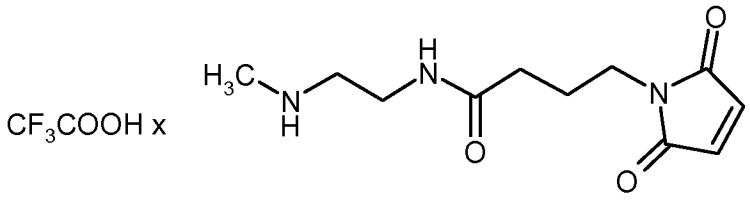
LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.71 min; MS (ESIpos): m/z = 340 $(M+H)^+$.

Anschließend wurde die gesamte Menge des geschützten Intermediats mit 1ml Trifluoressigsäre in 5 ml Dichlormethan deblockiert, wobei 28 mg (77% d.Th.) der Titelverbindung erhalten wurden.

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 0.75 min; MS (ESIpos): m/z = 240 $(M+H)^+$.

**Intermediat 24**

4-(2,5Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-N-[2-(methylamino)ethyl]butanamid-Trifluoracetat



Zunächst wurden 35 mg (164 µmol) tert.-Butyl-(2-aminoethyl)methylcarbamathydrochlorid-Trifluoracetat, 30 mg (164 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butansäure, 75 mg (197 µmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 57 µl *N,N*-Diisopropylethylamin in 5 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und durch Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 51 mg (91% d.Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.6 min;

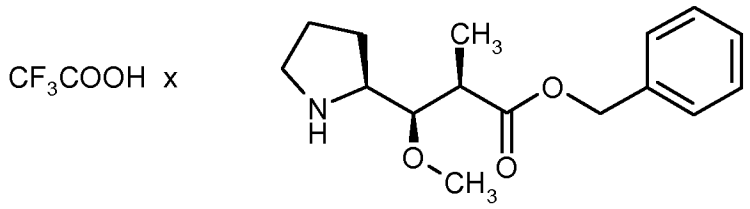
LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 340 $(M+H)^+$.

Anschließend wurde die gesamte Menge mit 1 ml Trifluoressigsäre in 5 ml Dichlormethan entschützt, wobei 45 mg (69% d.Th.) der Titelverbindung erhalten wurden.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.19 min; MS (ESIpos): m/z = 240 $(M+H)^+$.

**Intermediat 25**

Benzyl-(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoat-Trifluoracetat



Zunächst wurde (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure aus 1.82 g (3.88 mmol) ihres Dicyclohexylamin-Salzes durch Aufnehmen in 150 ml Ethylacetat und Ausschütteln mit 100 ml 0.5 %-iger Schwefelsäure freigesetzt. Die organische Phase

wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml Dioxan und 10 ml Wasser aufgenommen und mit 1517 mg (4.66 mmol) Cäsiumcarbonat versetzt, 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend im Vakuum eingeengt und einmal mit DMF nachdestilliert. Der Rückstand wurde dann in 15 ml DMF aufgenommen und mit 1990 mg (11.64 mmol) Benzylbromid versetzt. Die Mischung wurde 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die organische Phase abgetrennt und mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und anschließend eingeengt. Rer Rückstand wurde dann durch präparative HPLC gereinigt. Man erhielt so 1170 mg (80% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats.

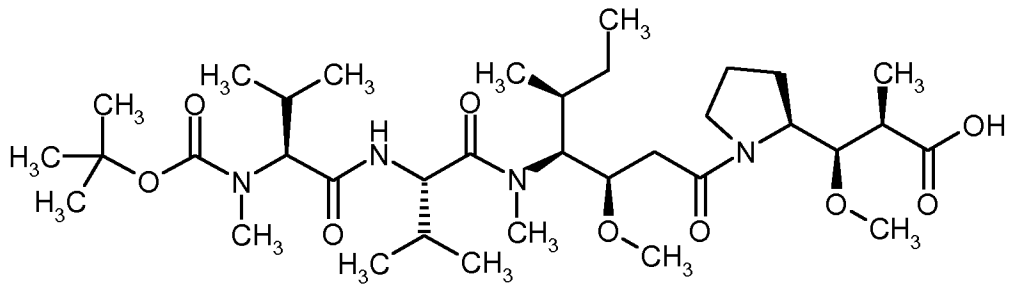
Anschließend wurden diese 1170 mg sofort mit 5 ml Trifluoressigsäure in 15 ml Dichlormethan entschützt. Nach 15 min Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde aus Dioxan lyophilisiert. Nach Trocknung im Hochvakuum verblieben 1333 mg (84% d.Th.) der Titelverbindung als gelbes Öl.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.59 min; MS (ESIpos): m/z = 278 $(M+H)^+$.

**Intermediat 26**

*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



1200 mg (2.33 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 5) wurden mit 910.8 mg (2.33 mmol) Benzyl-(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoat-Trifluoracetat (Intermediat 14), 1327 mg (3.49 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat und 2027 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin in 50 ml DMF zusammengegeben und 5 min bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organi-

sche Phase wurde abgetrennt und eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden so 1000 mg (55% d. Th.) des Benzylester-Intermediats *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-(benzyloxy)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als ein Harz erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.56 min; MS (ESIpos): m/z = 775 $(M+H)^+$.

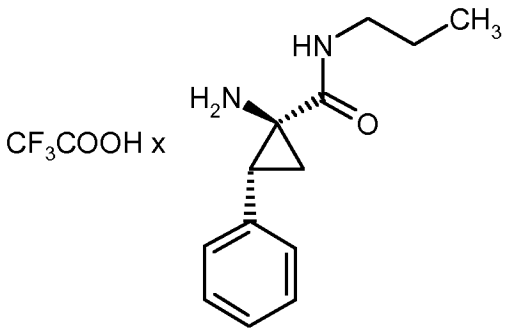
Die gesamte erhaltene Menge dieses Intermediats wurde in 25 ml einer Mischung aus Methanol und Dichlormethan (20:1) aufgenommen und die Benzylester-Gruppe durch Hydrierung unter Wasserstoff-Normaldruck mit 10% Palladium auf Aktivkohle als Katalysator entfernt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Man erhielt 803 mg (91% d. Th.) der Titelverbindung als weißen Feststoff.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 685 $(M+H)^+$.

**Intermediat 27**

(1*S*,2*R*)-1-Amino-2-phenyl-*N*-propylcyclopropancarboxamid-Trifluoracetat



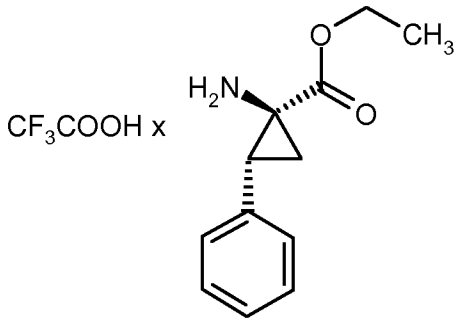

Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure mit *n*-Propylamin in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) und nachfolgende Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure hergestellt (Ausbeute 85% d. Th. über beide Stufen).

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.2 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.52 min; MS (ESIpos): m/z = 219 $(M+H)^+$.

**Intermediat 28**

Ethyl-(1*S*,2*R*)-1-amino-2-phenylcyclopropancarboxylat-Trifluoracetat

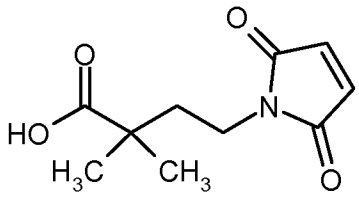



Die Titelverbindung wurde nach Standardmethoden durch Veresterung von kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure mit Ethanol und anschließende Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.50 min; MS (ESIpos): m/z = 206 $(M+H)^+$.

**Intermediat 29**

4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutansäure

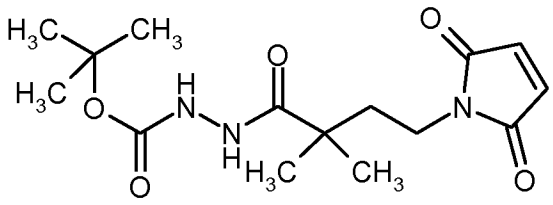



Zu einer Lösung von 1.39 g (8.95 mmol) N-Methoxycarbonylmaleinimid in 44 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurden bei 0°C 1.5 g (8.95 mmol) 4-Amino-2,2-dimethylbuttersäure gegeben und 40 min nachgerührt. Anschließend wurde das Kühlbad entfernt und das Reaktionsgemisch 1 h weitergerührt. Unter Eiskühlung wurde das Reaktionsgemisch dann durch Zugabe von Schwefelsäure auf pH 3 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Es wurden 1.17 g (79%ig, 49% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.64 min; m/z = 212 $(M+H)^+$.

**Intermediat 30**

*tert.*-Butyl-2-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanoyl]hydrazincarboxylat

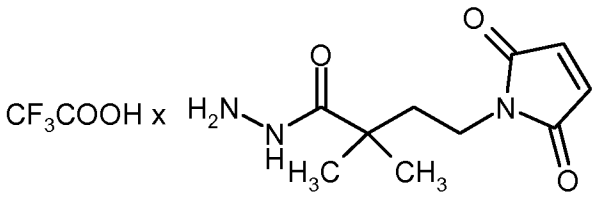


Zu einer Lösung von 50 mg (237 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutansäure in 2 ml THF wurden bei 0°C zunächst 26 µl (237 µmol) 4-Methylmorpholin und anschließend 31 µl (237 µmol) Isobutylchloroformiat gegeben. Nach Entfernen des Kühlbades und 15 min. Nachrühren bei RT wurden 31.3 mg (237 µmol) tert.-Butyloxycarbonylhydrazid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde per präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 50.8 mg (66% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.71 min; m/z = 324 $(M-H)^-$.

**Intermediat 31**

4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanhydrazid-Trifluoracetat

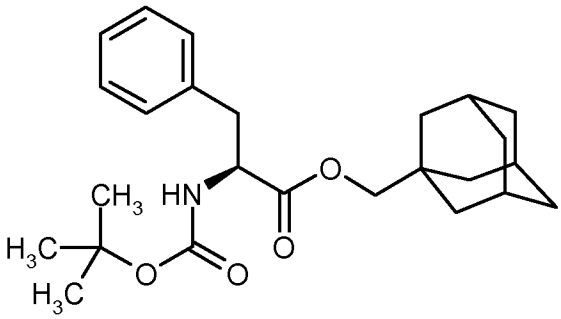


50 mg (154 mmol) *tert.*-Butyl-2-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethyl-butanoyl]hydrazincarboxylat wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst und mit 0.4 ml Trifluoressigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend eingeengt. Es wurden 55.2 mg (93%ige Reinheit, 99% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.36 min; m/z = 226 $(M+H)^+$.

**Intermediat 32**

Adamantan-1-ylmethyl-*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)-L-phenylalaninat

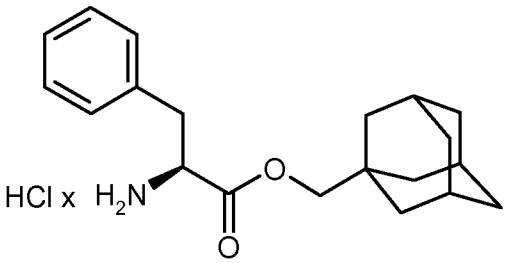


Zu einer Lösung von 500 mg (1.89 mmol) *N*-Boc-L-Phenylalanin in 25 ml Dichlormethan wurden bei RT 1192 mg (6.2 mmol) EDC, 578 µl (4.1 mmol) Triethylamin, 345 mg (2.8 mmol) DMAP und 345 mg (2.1 mmol) 1-Adamantylmethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, dann mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit 10%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, anschließend eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 769 mg (90% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.84 min; m/z = 414 $(M+H)^+$.

**Intermediat 33**

Adamantan-1-ylmethyl-*L*-phenylalaninat-Hydrochlorid

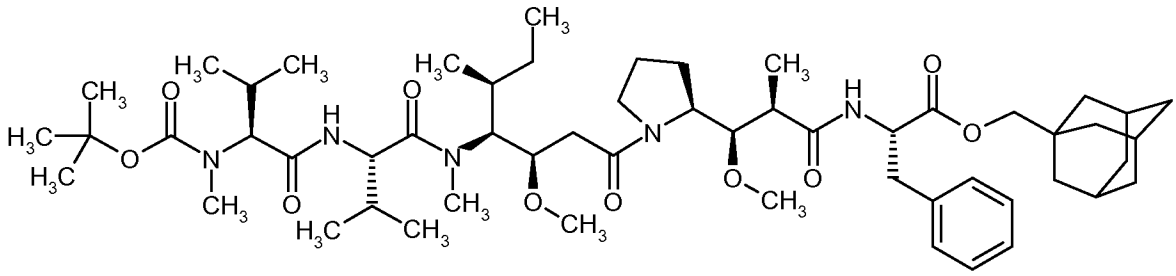


769 mg (1.86 mmol) Adamantan-1-ylmethyl-N-(*tert.*-butoxycarbonyl)-*L*-phenylalaninat (Intermediat 13) wurden in 25 ml einer 4 N Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan gelöst und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 619 mg (95% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; m/z = 314 $(M+H)^+$.

**Intermediat 34**

*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-N-methyl-*L*-valyl-N-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(adamantan-1-ylmethoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-*L*-valinamid

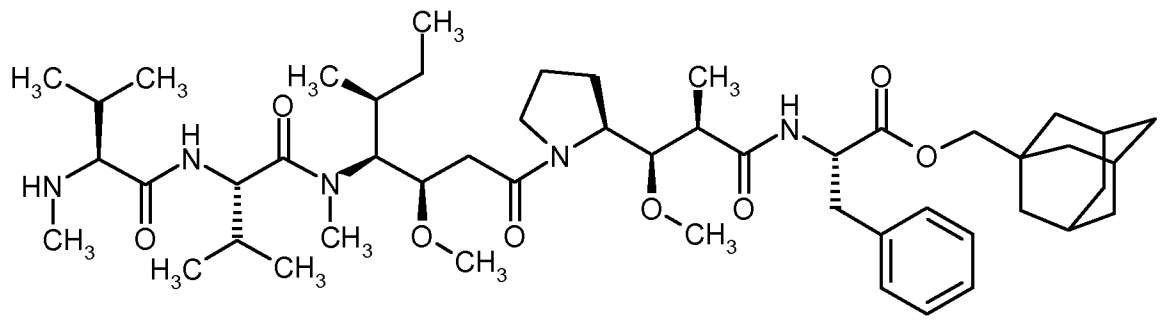


Zu einer Lösung von 20 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid in 1 ml DMF wurden bei RT 15.3 µl (88 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 6.7 mg (44 µmol) HOBt und 6.7 mg (35 µmol) EDC gegeben und die Mischung 30 min lang gerührt. Anschließend wurden 10.1 mg (32 µmol) Adamantan-1-yl-*L*-phenylalaninat-Hydrochlorid hinzugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch direkt über präparative HPLC in seine Komponenten aufgetrennt. Es wurden 27.5 mg (93% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.70 min; m/z = 980 $(M+H)^+$.

**Intermediat 35**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(adamantan-1-ylmethoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



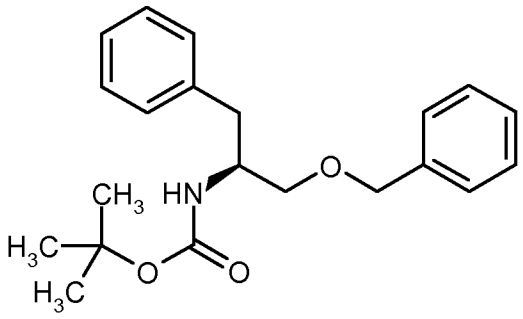
x $CF_3COOH$

27.5 mg (28 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(adamantan-1-ylmethoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 1.8 ml Dichlormethan gelöst und mit 361 µl TFA versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt und dann eingeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 22.7 mg (81% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.14 min; m/z = 880 $(M+H)^+$.

**Intermediat 36**

*tert.*-Butyl-[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]carbamat

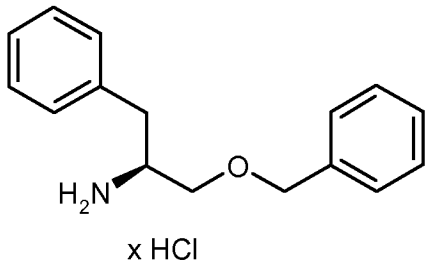


Unter Argonatmosphäre wurden 500 mg (1.99 mmol) *N*-Boc-*L*-Phenylalaninol in 5 ml DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 159 mg (3.98 mmol) einer 60%-igen Suspension von Natriumhydrid in Paraffinöl zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur Beendigung der Gasentwicklung gerührt und anschließend mit 260 µl (2.19 mmol) Benzylbromid versetzt. Das Kühlbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch eingeengt, der Rückstand in Eiswasser aufgenommen und das Gemisch mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 226 mg (33% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.28 min; m/z = 342 $(M+H)^+$.

**Intermediat 37**

(2*S*)-1-(Benzyloxy)-3-phenylpropan-2-amin-Hydrochlorid

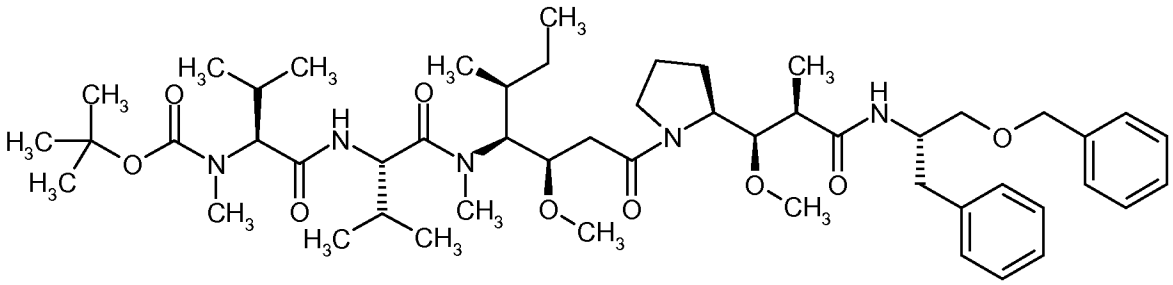



220 mg (644 µmol) *tert.*-Butyl-[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]carbamat wurden in 11 ml einer 4 N Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan gelöst und 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 138 mg (77% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.65 min; m/z = 242 $(M+H)^+$.

**Intermediat 38**

*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

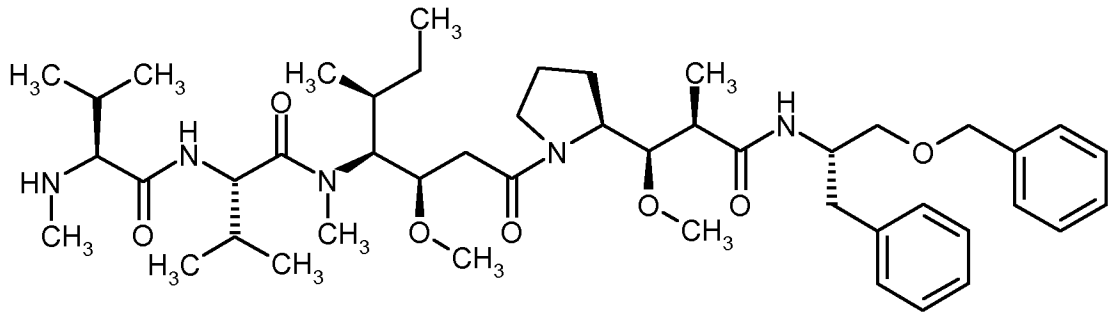


Zu einer Lösung von 20 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid in 1 ml DMF wurden bei RT 15.3 µl (88 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin, 6.7 mg (44 µmol) HOBt und 6.7 mg (35 µmol) EDC gegeben und die Mischung 30 min lang gerührt. Anschließend wurden 7.8 mg (32 µmol) (2*S*)-1-(Benzyloxy)-3-phenylpropan-2-amin-Hydrochlorid hinzugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch direkt über präparative HPLC in seine Komponenten aufgetrennt. Es wurden 26 mg (98% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): Rt = 1.51 min; m/z = 909 (M+H)+.

**Intermediat 39**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]-amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



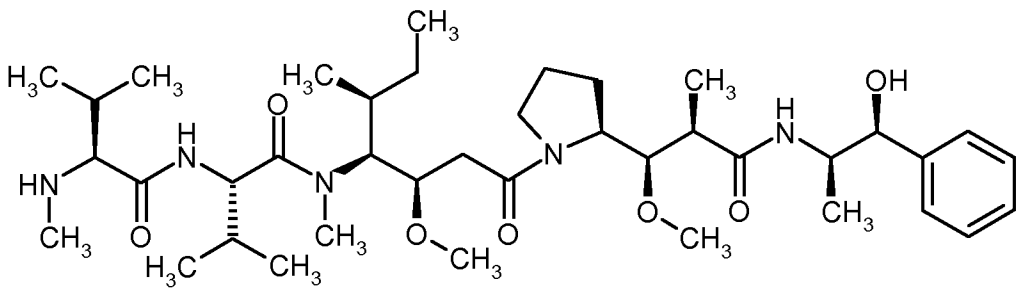
x $CF_3COOH$

26 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 1.8 ml Dichlor-methan gelöst und mit 370 µl TFA versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 26.4 mg (quant.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; m/z = 809 $(M+H)^+$.

**Intermediat 40**

N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



50 mg (70µmol) von Intermediat 26 und 11 mg (70 µmol) (1S, 2R)-2-Amino-1-phenylpropan-1-ol in 10 ml DMF wurden mit 42 mg (0.11 µmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 25 µL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und das

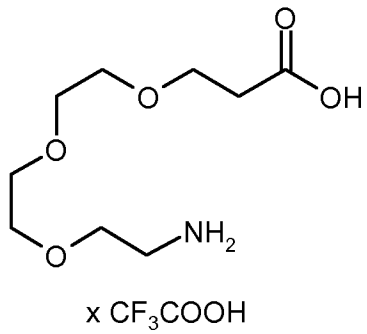
Reaktionsgemisch 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen, Einengen und Trocknung im Hochvakuum wurden 49 mg (81%) des geschützten Intermediats erhalten. Anschließend wurde die Boc-Gruppe nach bekannten Bedingungen mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten. Nach Einengen erfolgte die Reinigung der Titelverbindung durch präparative HPLC und es wurden 26 mg (52%) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.65 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 718 $(M+H)^+$.

**Intermediat 41**

3-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}propansäure-Trifluoracetat



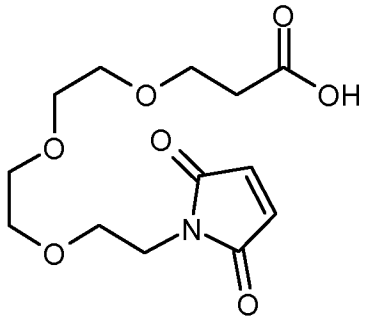

150 mg (541 µmol) *tert.*-Butyl-3-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}propanoat wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst, mit 1.5 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei RT gerührt, anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt.

Es wurden 181 mg (100% d.Th.) Produkt erhalten.

MS (EI): m/z 222 $(M+H)^+$

**Intermediat 42**

3-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propansäure



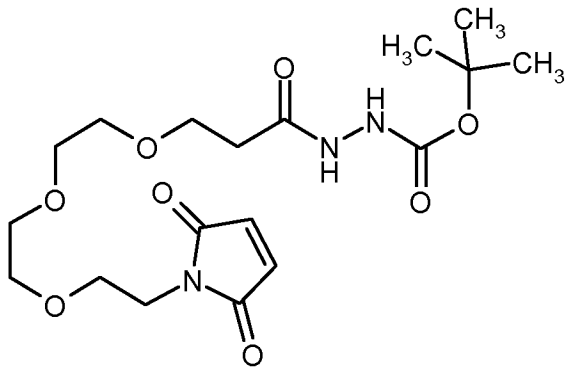
186 mg (555 µmol) 3-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}propansäure-Trifluoracetat wurden in 2.6 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und bei 0°C mit 86 mg (555 µmol) N-Methoxycarbonylmaleinimid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 40 min. bei 0 °C und 1 h bei RT gerührt, dann wieder auf 0°C abgekühlt, mit Schwefelsäure auf pH 3 eingestellt und mit 3x 25 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt.

Es wurden 126 mg (75% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.53 min; m/z = 302 $(M+H)^+$.

**Intermediat 43**

*tert.*-Butyl-15-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-4-oxo-7,10,13-trioxa-2,3-diazapentadecan-1-oat



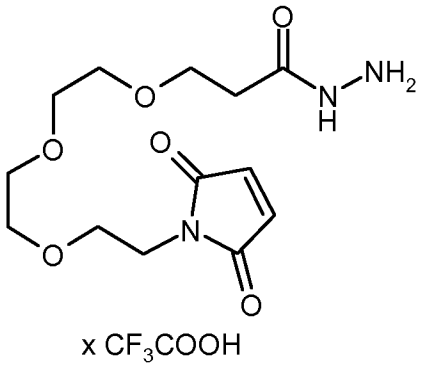
125 mg (417 µmol) 3-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy) propansäure wurden bei 0°C in 2.1 ml THF gelöst und mit 46 µl (417 mmol) 4-Methylmorpholin und 54.5 µl (417 µmol) Isobutylchloroformiat versetzt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch 30 min. bei RT gerührt. Anschließend wurden bei 0°C 55 mg (417 µmol) tert.-Butyloxycarbonylhydrazid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf RT erwärmt, eingeengt und per präparativer HPLC gereinigt.

Es wurden 60 mg (33% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.66 min; m/z = 416 $(M+H)^+$.

**Intermediat 44**

3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propanhydrazid-Trifluoracetat



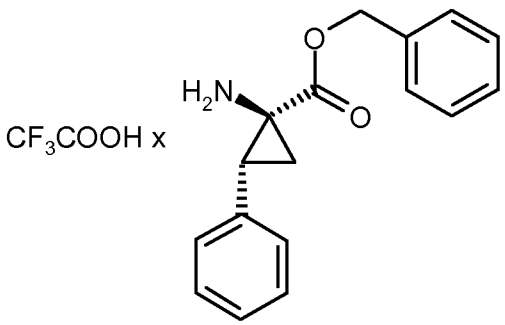

60 mg (145 µmol) *tert.*-Butyl-15-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-4-oxo-7,10,13-trioxa-2,3-diazapentadecan-1-oat wurden in 1 ml Dichlormethan gelöst und mit 0.2 ml Trifluoressigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. bei RT gerührt und anschließend eingeengt.

Es wurden 62 mg (100% d.Th.) Produkt erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.35 min; m/z = 316 $(M+H)^+$.

**Intermediat 45**

Benzyl-(1*S*,2*R*)-1-amino-2-phenylcyclopropancarboxylat-Trifluoracetat

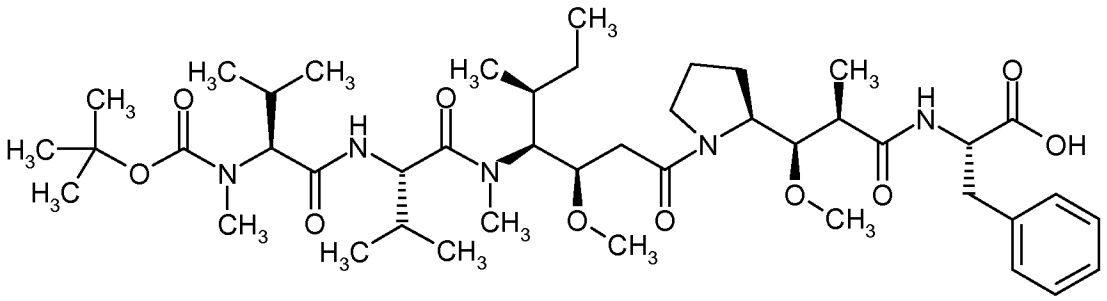



Die Titelverbindung wurde nach Standardmethoden durch Veresterung von kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure mit Benzylalkohol und anschließende Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.72 min; MS (ESIpos): m/z = 268 $(M+H)^+$.

**Intermediat 46**

*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



383 mg (0.743 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 8) wurden mit 485 mg (0.743 mmol) Benzyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-phenylalaninat-Trifluoracetat (Intermediat 12), 424 mg (1.114 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 388 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin in 15 ml DMF zusammengegeben und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 335 mg (48% d. Th.) des Benzylester-Intermediats als ein Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 922 $(M+H)^+$.

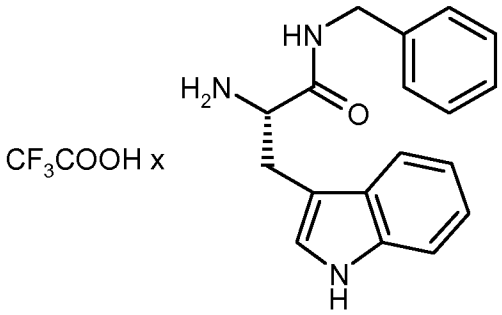
100 mg (0.11 mmol) dieses Intermediats wurden in 15 ml Methanol aufgenommen und die Benzylester-Gruppe durch Hydrierung unter Wasserstoff-Normaldruck mit 10% Palladium auf Aktivkohle als Katalysator entfernt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 85 mg (94% d. Th.) der Titelverbindung als Feststoff erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.4 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 832 $(M+H)^+$.

**Intermediat 47**

*N*-Benzyl-L-tryptophanamid-Trifluoracetat



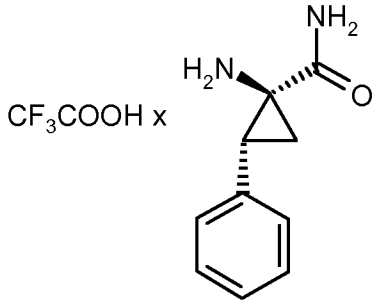

202 mg (0.5 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-*N*-(tert.-butoxycarbonyl)-L-tryptophanat und 45 mg (0.42 mmol) Benzylamin wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 110 µl (630 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/17% aq. Ammoniak 20:0.5:0.05). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und eingeengt. Der resultierende Rückstand wurde mit Diethylether digeriert und dann im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde dieser Rückstand in 10 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 3 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Nach 45 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 117 mg (57% d. Th. über beide Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.66 min; MS (ESIpos): m/z = 294 $(M+H)^+$.

**Intermediat 48**

(1*S*,2*R*)-1-Amino-2-phenylcyclopropancarboxamid-Trifluoracetat



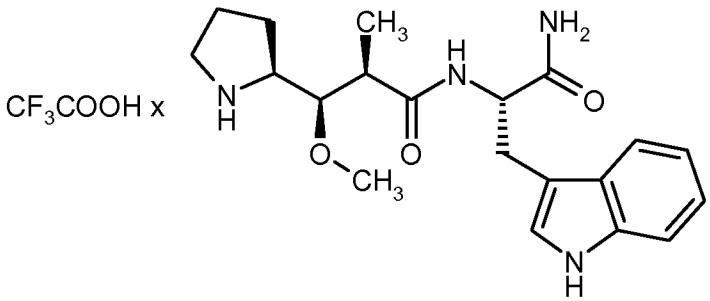
50 mg (180 µmol) kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure wurden in 5 ml DMF gelöst, mit 94 µl (541 µmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin, 31 mg (270 µmol) *N*-Hydroxysuccinimid sowie 41.5 mg (216 µmol) EDC versetzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach eingeengt, der Rückstand in Dioxan aufgenommen, mit 71 mg (901 µmol) Ammoniumhydrogencarbonat versetzt und das Reaktionsgemisch dann 3 Tage bei RT stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde danach mit einer 1:1-Mischung aus Ethylacetat und Wasser verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der resultierende Rückstand wurde anschließend in 3 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 3 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde eingeengt. Der Rückstand wurde mit Pentan verrührt, abgesaugt und aus Dioxan lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 32 mg (62% d. Th. über beide Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 0.38 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.20 min; MS (ESIpos): m/z = 177 $(M+H)^+$.

**Intermediat 49**

$N^{\alpha}$-{(2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-tryptophanamid-Trifluoracetat



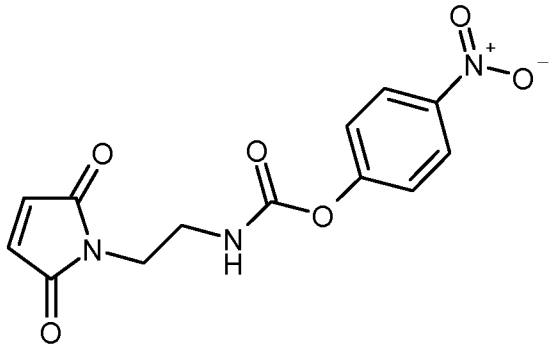

Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 13 aus der Ausgangsverbindung 1 und L-Tryptophanamid-Hydrochlorid hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.4 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 473 $(M+H)^+$.

**Intermediat 50**

4-Nitrophenyl-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamat



813 mg (3.1 mmol) Triphenylphosphin wurden in 25 ml THF gelöst und unter Argon auf -70°C abgekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von 627 mg (3.1 mmol) Diisopropylazodicarboxylat wurde die Mischung 5 min gerührt. Anschließend wurden 500 mg (3.1 mmol) tert.-Butyl-(2-aminoethyl)carbamat gelöst in 5 ml THF zugetropft und das Reaktionsgemisch weitere 5 min bei -70°C gerührt. Dann wurden 136.6 mg (1.55 mmol) 2,2 Dimethyl-1-propanol gelöst in 1 ml THF sowie 301 mg (3.1 mmol) Maleinimid zugesetzt, das Reaktionsgemisch weitere 10 min bei -70°C gerührt und anschließend auf RT erwärmt. Nach weiteren 16h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Man erhielt 463 mg (62%) des geschützten Intermediats.

Nach Entfernen der Boc-Schutzgruppe unter Standardbedingungen wurden 652 mg von 1-(2-aminoethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion als Trifluoracetat erhalten.

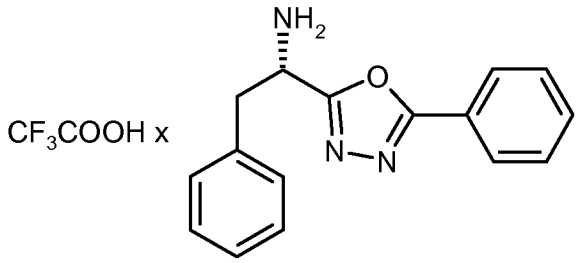
112.9 mg (543 µmol) Chlorameisensäurenitrophenylester wurden in 30 ml THF gelöst und nach Zugabe von 100 mg (271.6 µmol) 1-(2-Aminoethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Trifluoracetat 30 min bei RT gerührt. Die Mischung wurde filtriert und das Filtrat wurde bis zur Trockne eingeengt und anschließend mit Diethylether aufgeschlämmt. Nach Absaugen und Trocknen wurden 60 mg (95% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): Rt = 0.65 min;

LC-MS (Methode 1): Rt = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 306 (M+H)+.

**Intermediat 51**

(*1S*)-2-Phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethanamin-Trifluoracetat




200 mg (0.75 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-L-phenylalanin wurden bei 0°C in 5.5 ml Dichlormethan vorgelegt und mit 128 mg (0.79 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt. Nach 30 min wurden 103 mg (0.75 mmol) Benzoylhydrazid zugegeben. Nach weiteren 45 min bei 0°C wurden schließlich 500 mg (1.5 mmol) Tetrabromkohlenstoff und 395 mg (1.5 mmol) Triphenylphosphin hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 2 h bei 0°C und dann über Nacht bei RT nachgerührt. Das Gemisch wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 217 mg (78% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *tert.*-Butyl-[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]carbamat erhalten.

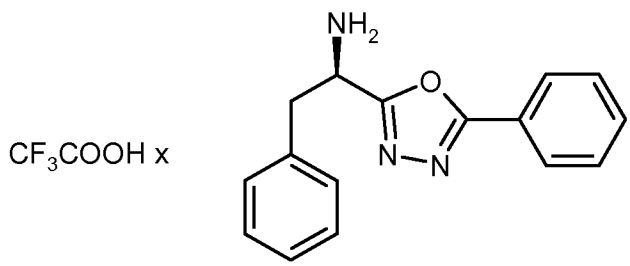
LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 1.15 min; MS (ESIpos): m/z = 366 $(M+H)^+$

217 mg (0.59 mmol) dieses Intermediats wurden in 3 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 0.6 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum weiter getrocknet und dann aus Dioxan lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 214 mg (90% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.62 min; MS (ESIpos): m/z = 266 $(M+H)^+$

**Intermediat 52**

(*1R*)-2-Phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethanamin-Trifluoracetat




200 mg (0.75 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-D-phenylalanin wurden bei 0°C in 5.5 ml Dichlormethan vorgelegt und mit 128.3 mg (0.79 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt. Nach 30 min

wurden 103 mg (0.75 mmol) Benzoylhydrazid zugegeben. Nach weiteren 45 min bei 0°C wurden schließlich 500 mg (1.5 mmol) Tetrabromkohlenstoff und 395 mg (1.5 mmol) Triphenylphosphin hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 2 h bei 0°C und dann über Nacht bei RT nachgerührt. Das Gemisch wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 219 mg (80% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *tert.*-Butyl-[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]carbamat erhalten.

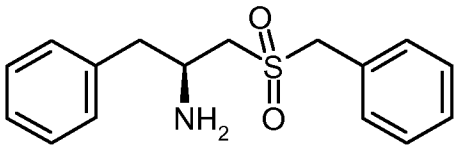
LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.36 min; MS (ESIpos): m/z = 366 $(M+H)^+$

219 mg (0.6 mmol) dieses Intermediats wurden in 3 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 0.6 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum weiter getrocknet und dann aus Dioxan lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 196 mg (86% d. Th.) der Titelverbindung als Feststoff erhalten.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.41 min

**Intermediat 53**

(*2S*)-1-(Benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-amin




200 mg (1.13 mmol) (4*S*)-4-Benzyl-1,3-oxazolidin-2-on wurden in 3 ml *tert.*-Butanol vorgelegt und mit 280 mg (2.26 mmol) Benzylmercaptan versetzt. Das Gemisch wurde anschließend 2 Tage unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingeengt und das erhaltene Intermediat (2*S*)-1-(Benzylsulfanyl)-3-phenylpropan-2-amin ohne Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.63 min

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.67 min; MS (ESIpos): m/z = 258 $(M+H)^+$

Das oben erhaltene rohe Intermediat wurde in einer Lösung von 2 ml 30%-igem Wasserstoffperoxid und 5 ml Ameisensäure gelöst und 12 h bei RT gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch auf gesättigte Natriumsulfat-Lösung gegeben und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische

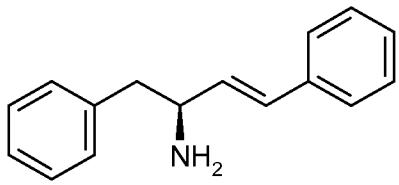
Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden so 343 mg (61% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.40 min;

LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 0.65 min; MS (ESIpos): m/z = 290 $(M+H)^+$

**Intermediat 54**

(*2S,3E*)-1,4-Diphenylbut-3-en-2-amin




552.7 mg (9.85 mmol) Kaliumhydroxid wurden in Methanol gelöst, auf 1.1 g neutrales Aluminiumoxid aufgezogen und dann im Hochvakuum getrocknet. Zu einer Lösung von 240 mg (0.82 mmol) (*2S*)-1-(Benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-amin und 1.56 g des so präparierten Kaliumhydroxid auf Aluminiumoxid in 6.2 ml *n*-Butanol wurden bei 5-10°C 307 µl (3.3 mmol) Dibrom-difluormethan getropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt, dann über Celite filtriert und der Rückstand gut mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingeengt und der resultierende Rückstand im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 98 mg (35% d. Th.) der Titelverbindung mit einem *E/Z*-Diastereomerenverhältnis von 4:1 erhalten.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.46 min;

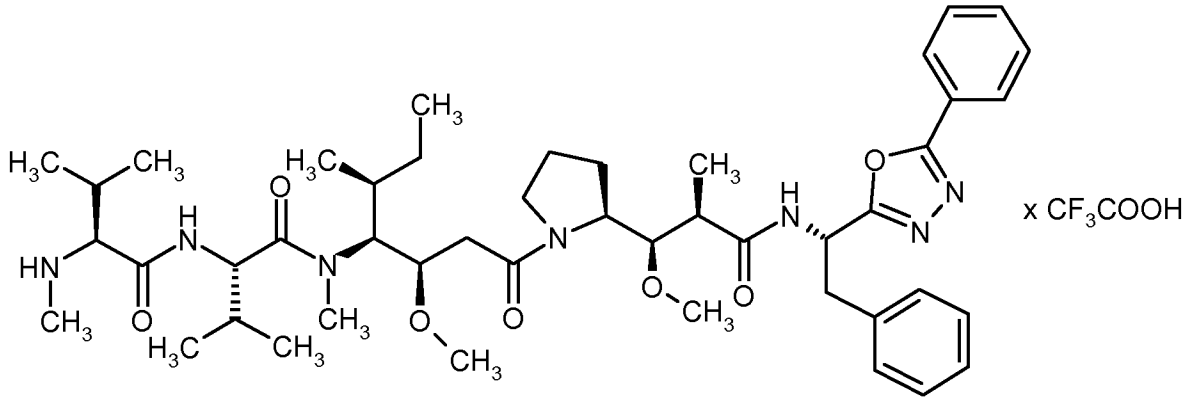
LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 0.75 min; MS (ESIpos): m/z = 224 $(M+H)^+$

Das oben erhaltene *E/Z*-Diastereomerengemisch wurde in 2 ml Ethanol und 0.2 ml *N,N*-Diisopropylethylamin gelöst und über HPLC an chiraler Phase aufgetrennt [Säule: Daicel Chiralpak AD-H, 5 µm, 250 mm x 20 mm; Eluent: Hexan/(Ethanol + 0.2% Diethylamin) 50:50 v/v; UV-Detektion: 220 nm; Temperatur: 30°C]. Die entsprechenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurden 45 mg der Titelverbindung erhalten.

$^1$H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ [ppm] = 2.62 - 2.83 (m, 2 H) 3.52 - 3.71 (m, 1 H) 6.18 - 6.30 (m, 1 H) 6.34 - 6.46 (m, 1 H) 6.98 - 7.57 (m, 10 H) [weitere Signale unter Lösungsmittel-Peaks verborgen].

**Intermediat 55**

N-Methyl-*L*-valyl-N-[(*3R,4S,5S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-*L*-valinamid-Trifluoracetat




20 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 1 mL DMF gelöst, mit 13.3 mg (35 µmol) HATU und 15.3 µl (88 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und 30 min. bei RT gerührt. Anschließend wurden 12.2 mg (32 µmol) (1*S*)-2-Phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethanamin-Trifluoracetat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend per präparativer HPLC aufgetrennt. Es wurden so 22 mg (81% d.Th) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

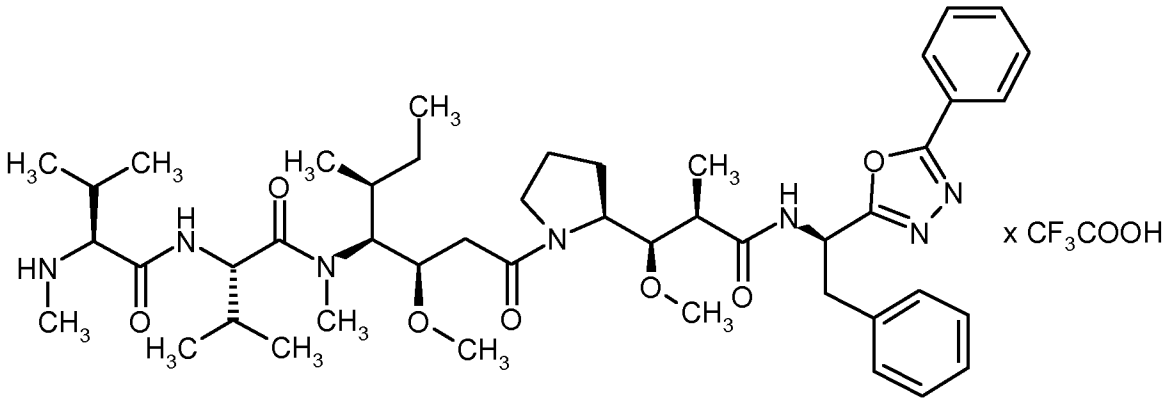
LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 1.45 min; MS (ESIpos): m/z = 933 $(M+H)^+$

Durch nachfolgende Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure wurden dann 22.4 mg (98% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 833 $(M+H)^+$

**Intermediat 56**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat




*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 55 durch Umsetzung von 20 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxy-propyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid mit 12.2 mg (32 µmol) (1*R*)-2-Phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethanamin-Trifluoracetat hergestellt.

Ausbeute: 17 mg (64 % d. Th.)

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 3.74 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.45 min; MS (ESIpos): m/z = 933 $(M+H)^+$

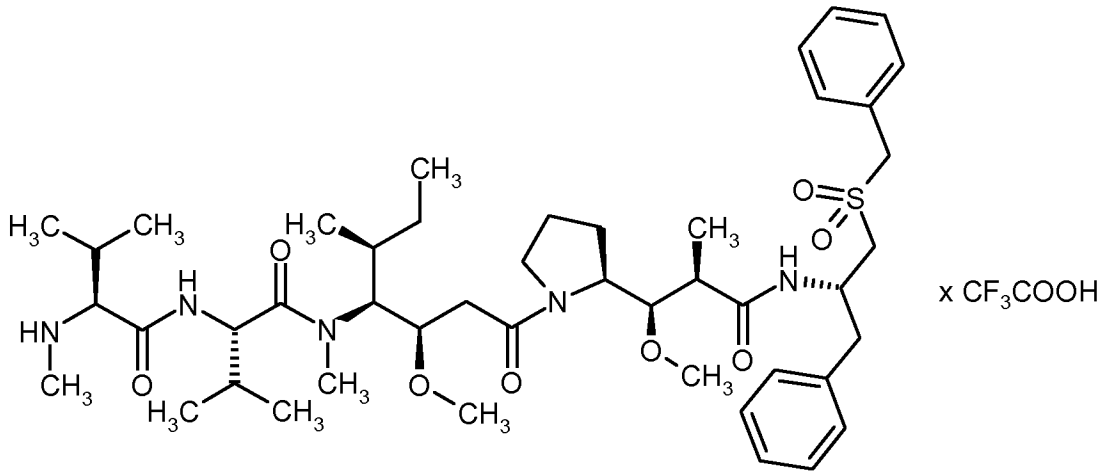
Durch nachfolgende Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure erhielt man dann 17.1 mg (99 % d. Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.55 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 833 $(M+H)^+$

**Intermediat 57**

N-Methyl-*L*-valyl-N-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-*L*-valinamid-Trifluoracetat



*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 55 durch Umsetzung von 20 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid mit 9.3 mg (20 µmol) (2*S*)-1-(Benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-amin hergestellt.

Ausbeute: 19.2 mg (68 % d. Th.)

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 3.5 min;

LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 957 $(M+H)^+$

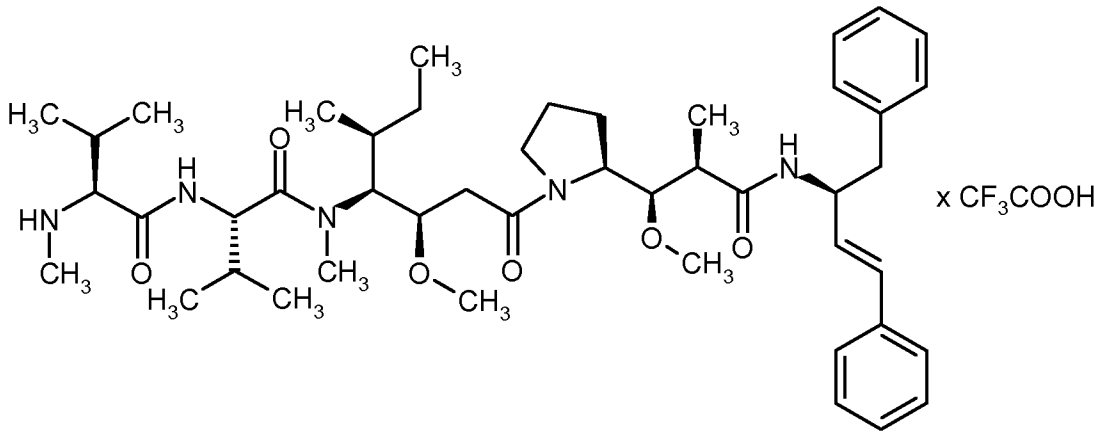
Durch nachfolgende Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure erhielt man dann 19.3 mg (99 % d. Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.52 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 857 $(M+H)^+$

**Intermediat 58**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*E*)-1,4-diphenylbut-3-en-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat




*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*E*)-1,4-diphenylbut-3-en-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 55 durch Umsetzung von 20 mg (29 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(*3R,4S,5S*)-1-{(*2S*)-2-[(*1R,2R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid mit 7.1 mg (32 µmol) (2*S*,3*E*)-1,4-Diphenylbut-3-en-2-amin hergestellt.

Ausbeute: 15.1 mg (58 % d. Th.)

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 4.2 min;

LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 891 $(M+H)^+$

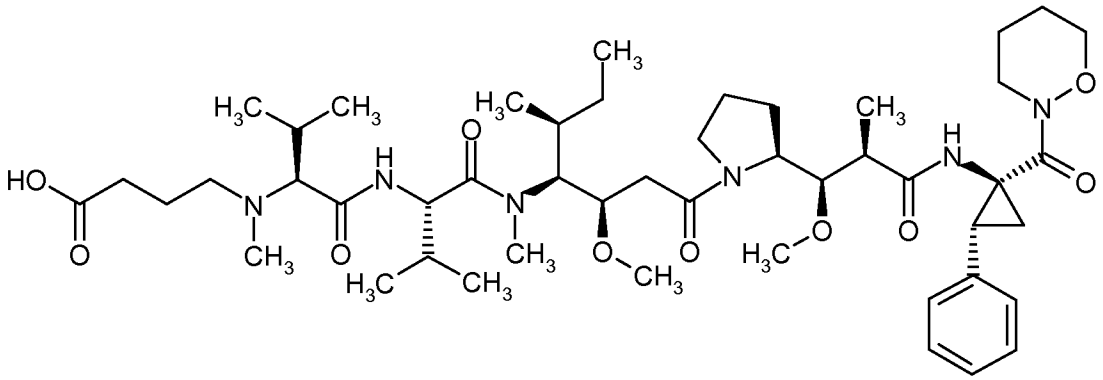
Durch nachfolgende Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure erhielt man dann 15.7 mg (99 % d. Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.62 min;

LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 791 $(M+H)^+$

**Intermediat 61**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



50 mg (0.054 mmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 16) wurden in 8 ml Dioxan/Wasser gelöst und mit 70 ml (0.108 mmol) einer 15%-igen Lösung von 4-Oxobutansäure in Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 1 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurden 3.7 mg (0.059 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Mischung durch Zugabe von etwa 300 µl 0.1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach weitere 2 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen wurden erneut 70 ml (0.108 mmol) der 15%-igen 4-Oxobutansäure-Lösung zugesetzt und das Reaktionsgemisch wiederum 1 h bei 100°C gerührt. Dann wurden weitere 3.7 mg (0.059 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und anschließend mit etwa 300 µl 0.1 N Salzsäure der pH-Wert wieder auf 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach erneut 2 h bei 100°C gerührt. Bei immer noch nicht vollständiger Umsetzung wurde diese Prozedur noch ein drittes Mal wiederholt. Das Reaktionsgemisch wurde schließlich eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden auf diese Weise 32 mg (65% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.64 min;

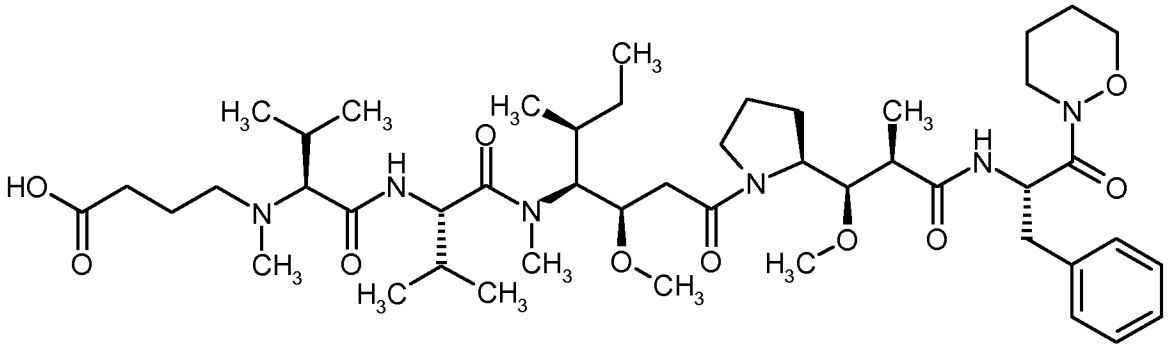
LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.76 min; MS (ESIpos): m/z = 899 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.95 und 8.8 (2m, 1H), 8.88 und 8.65 (2s, 1H), 7.4-7.1 (m, 5H), 5.0, 4.78, 4.65 und 4.55 (4m, 2H), 4.1-3.7 (m, 5H), 3.32, 3.29, 3.20, 3.12, 3.1 und 3.0 (6s,

9H), 2.75 (m, 2H), 2.63 (t, 1H), 2.4-2.2 (m, 4H), 2.1-1.2 (m, 12H), 1.2-0.8 (m, 16H), 0.75 (m, 3H) [weitere Signale unter $H_2O$- und DMSO-Peaks verborgen].

**Intermediat 62**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 61 durch Umsetzung von 50 mg *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 14) mit 4-Oxobutansäure hergestellt.

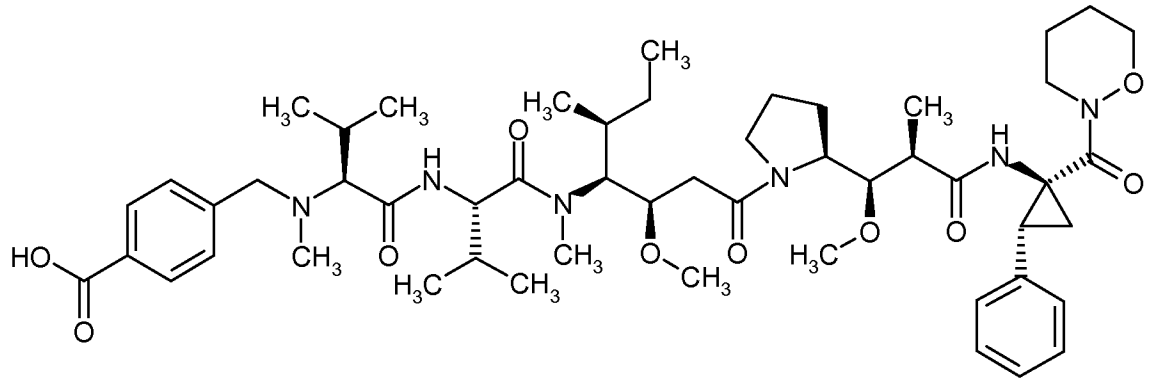
Ausbeute: 34 mg (70% d. Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.64 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.77 min; MS (ESIpos): m/z = 887 $(M+H)^+$.

**Intermediat 63**

*N*-(4-Carboxybenzyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 61 durch Umsetzung von 15 mg *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 16) mit 4-Formylbenzoesäure hergestellt.

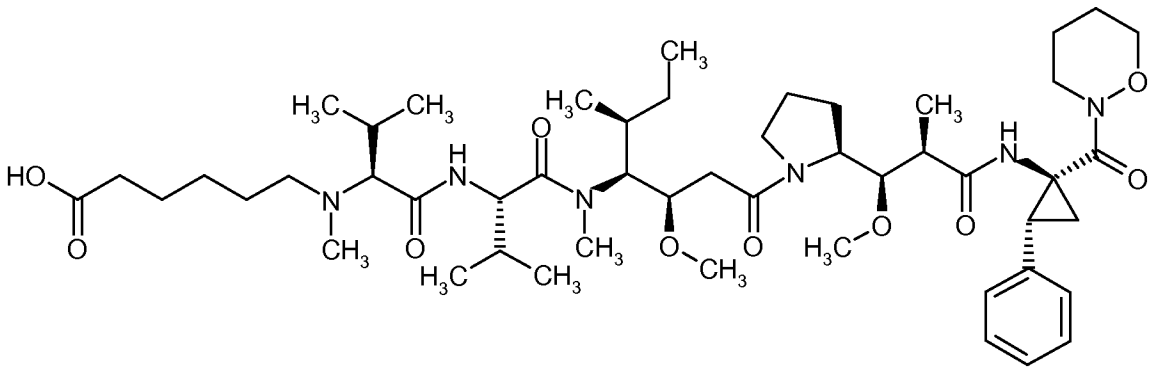
Ausbeute: 7.5 mg (48% d. Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.75 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 947 $(M+H)^+$.

**Intermediat 64**

*N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



10 mg (0.011 mmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 16)

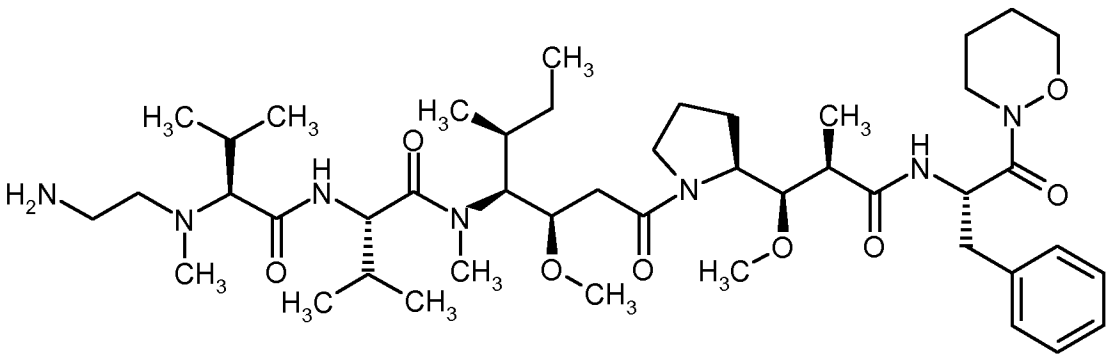
wurden in 2 ml Dioxan/Wasser gelöst und mit 2.8 mg (0.022 mmol) 6-Oxohexansäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 1 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurden 0.75 mg (0.012 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Mischung durch Zugabe von 0.1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach eine weitere Stunde bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen wurden erneut 2.8 mg (0.022 mmol) 6-Oxohexansäure zugesetzt und das Reaktionsgemisch wiederum 1 h bei 100°C gerührt. Es wurden weitere 0.75 mg (0.012 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und anschließend mit 0.1 N Salzsäure der pH-Wert wieder auf 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach erneut 1 h bei 100°C gerührt. Diese Prozedur wurde dann noch ein drittes Mal wiederholt. Das Reaktionsgemisch wurde schließlich eingeengt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden so 6.4 mg (64% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.68 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.86 min; MS (ESIpos): m/z = 927 $(M+H)^+$.

**Intermediat 65**

*N*-(2-Aminoethyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Bistrifluoracetat



x 2 $CF_3COOH$

Die Titelverbindung wurde durch Umsetzung von 68 mg *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 14) mit *tert.*-Butyl-(2-oxoethyl)carbamat und nachfolgende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure hergestellt.

Ausbeute: 49 mg (62% d. Th. über zwei Stufen)

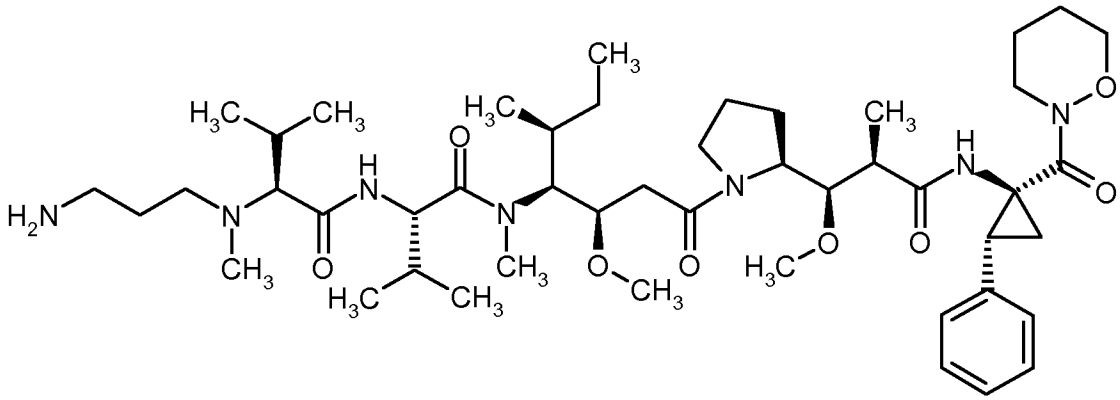
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.58 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.05 min; MS (ESIpos): m/z = 844 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.25 (m, 1H), 8.45 und 8.15 (2d, 1H), 7.65-7.55 (m, 3H), 7.23-7.1 (m, 5H), 5.12 und 4.95 (2m, 1H), 4.72 und 4.62 (2m, 1H), 4.6 und 4.52 (2t, 1H), 4.2-3.8 (m, 4H), 3.7 (d, 1H), 3.23, 3.20, 3.19, 3.18, 3.03 und 2.98 (6s, 9H), 3.0-2.7 (m, 6H), 2.4-1.2 (m, 15H), 1.05, 1.0, 0.88 und 0.82 (4d, 6H), 0.92 (m, 6H), 0.73 (m, 6H) [weitere Signale unter $H_2O$-Peak verborgen].

**Intermediat 66**

*N*-(3-Aminopropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 65 durch Umsetzung von 25 mg (0.027 mmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 16) mit Benzyl-(3-oxopropyl)carbamat und nachfolgende hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe (mit 10% Palladium auf Kohle als Katalysator, in Ethanol als Lösungsmittel) hergestellt.

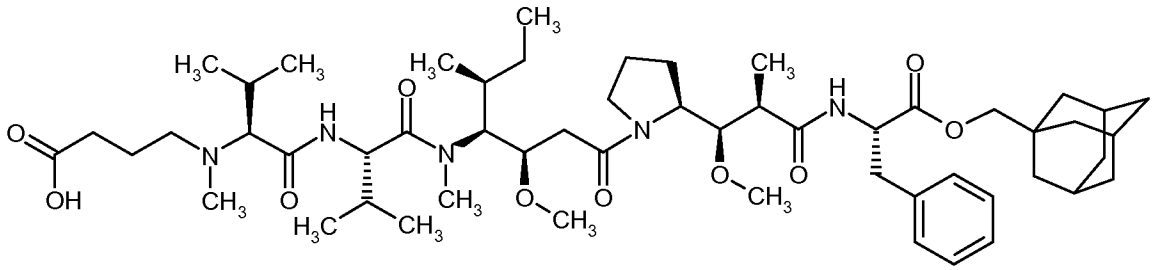
Ausbeute: 11 mg (41% d. Th. über zwei Stufen)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.53 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.72 min; MS (ESIpos): m/z = 870 $(M+H)^+$.

**Intermediat 67**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(adamantan-1-ylmethoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

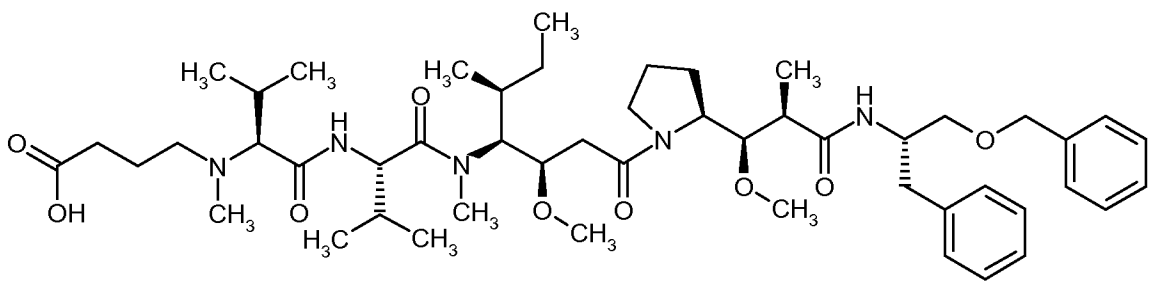


26 mg (26 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(adamantan-1-yl-methoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat und 33.9 µl einer 15%-igen wässrigen Bernsteinaldehydsäure-Lösung (53 µmol) wurden in 957 µl eines 1:1-Dioxan/Wasser-Gemisches gelöst und für 1 h auf 100 °C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden 1.81 mg (29 µmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 0.1 N Salzsäure auf pH 3 eingestellt und für weitere 2 h auf 100°C erhitzt. Nach erneuter Zugabe gleicher Mengen an Bernsteinaldehydsäure-Lösung, Natriumcyanoborhydrid und Salzsäure wurde nochmals für 2 h auf 100 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde danach direkt mittels präparativer HPLC in seine Komponenten aufgetrennt. Es wurden so 18.5 mg (73% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.17 min; m/z = 967 $(M+H)^+$.

**Intermediat 68**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

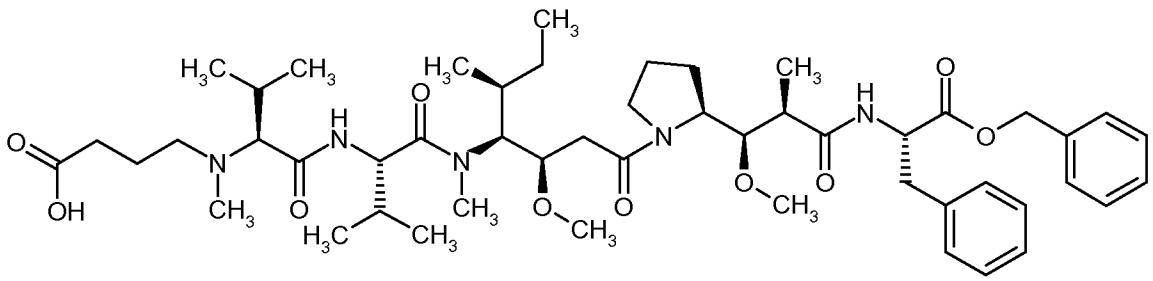


24 mg (26 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat und 33.7 µl einer 15%-igen wässrigen Bernsteinaldehydsäure-Lösung (52 µmol) wurden in 953 µl eines 1:1-Dioxan/Wasser-Gemisches gelöst und für 1 h auf 100°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden 1.80 mg (29 µmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 0.1 N Salzsäure auf pH 3 eingestellt und für weitere 2 h auf 100°C erhitzt. Nach erneuter Zugabe gleicher Mengen an Bernsteinaldehydsäure-Lösung, Natriumcyanoborhydrid und Salzsäure wurde nochmals für 2 h auf 100°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde danach direkt mittels präparativer HPLC in seine Komponenten aufgetrennt. Es wurden so 15.2 mg (65% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; m/z = 895 $(M+H)^+$

**Intermediat 69**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



53 mg (84 µmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) und 45 mg (84 µmol) Benzyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-phenylalaninat-Trifluoracetat (Intermediat 12) wurden in 2 ml DMF aufgenommen, mit 19 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin, 14 mg (92 µmol) HOBt sowie 17.6 mg (92 µmol) EDC versetzt und dann über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden so 59 mg (68% d. Th.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.55 min; m/z = 1044 $(M+H)^+$.

57 mg (0.055 mmol) dieses Intermediats wurden zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 1.2 ml Piperidin in 5 ml DMF behandelt. Nach Einengen und Reinigung mittels präparativer HPLC wurden 39 mg (76% d. Th.) des freien Amin-Intermediats *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; m/z = 822 $(M+H)^+$.

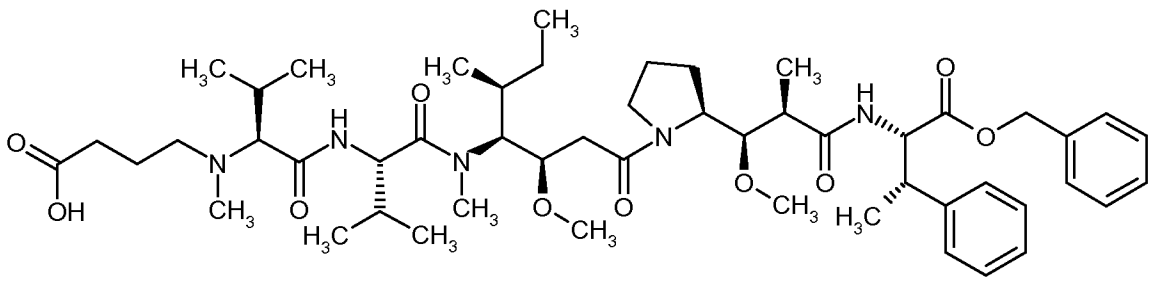
37 mg (0.045 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml Dioxan/Wasser gelöst und analog zur Herstellung der Verbindung in Intermediat 66 mit einer 15%-igen wässrigen Lösung von 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Es wurden 16 mg (39% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 908 $(M+H)^+$.

**Intermediat 70**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 14 beschriebenen Synthese ausgehend von den Intermediaten 4 und 26 die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid hergestellt.

30 mg (0.032 mmol) dieser Verbindung wurden in 6 ml Dioxan/Wasser gelöst und mit 41 µl (0.063 mmol) einer 15%-igen wässrigen Lösung von 4-Oxobutansäure versetzt. Das Reaktionsgemisch

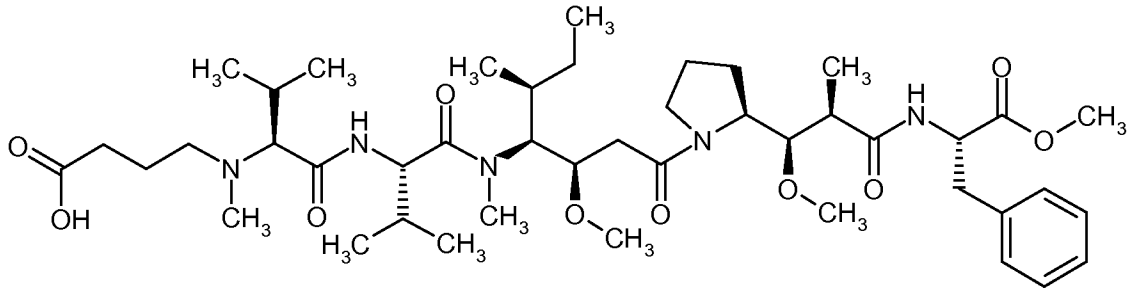
wurde anschließend 1 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurden 2.2 mg (0.035 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Mischung durch Zugabe von etwa 300 µl 0.1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach weitere 2 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen wurden erneut 41 µl (0.063 mmol) der 15%-igen 4-Oxobutansäure-Lösung zugesetzt und das Reaktionsgemisch wiederum 1 h bei 100°C gerührt. Dann wurden weitere 2.2 mg (0.035 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und anschließend mit etwa 300 µl 0.1 N Salzsäure der pH-Wert wieder auf 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach erneut 2 h bei 100°C gerührt. Bei immer noch nicht vollständiger Umsetzung wurde diese Prozedur noch ein drittes Mal wiederholt. Das Reaktionsgemisch wurde schließlich eingeengt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden so 24 mg (82% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.15 min; MS (ESIpos): m/z = 922 $(M+H)^+$.

**Intermediat 71**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-3-{[(2*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



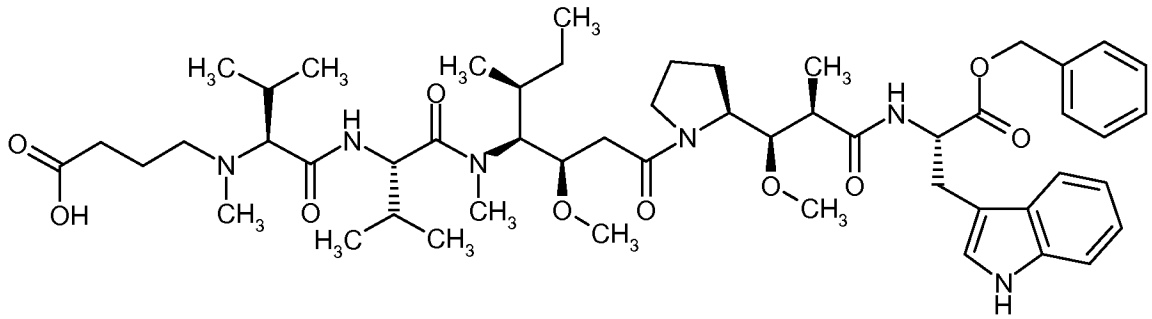
Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 14 beschriebenen Synthese ausgehend von den Intermediaten 4 und 39 die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-3-{[(2*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid hergestellt. Aus 7 mg (0.009 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 2 mg (22% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.06 min; MS (ESIpos): m/z = 832 $(M+H)^+$.

**Intermediat 72**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



212 mg (411 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 8) und 237 mg (411 µmol) Benzyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-tryptophanat-Trifluoracetat (Intermediat 20) wurden in 30 ml DMF aufgenommen und mit 188 mg (493 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat sowie 215 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden so 315 mg (80% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.45 min; m/z = 961 $(M+H)^+$.

50 mg (52 µmol) dieses Intermediats wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 1 ml Trifluoressigsäure in 9 ml Dichlormethan behandelt. Nach Einengen und Reinigung mittels präparativer HPLC wurden 29 mg (57% d. Th.) des freien Amin-Intermediats *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.99 min; m/z = 861 $(M+H)^+$.

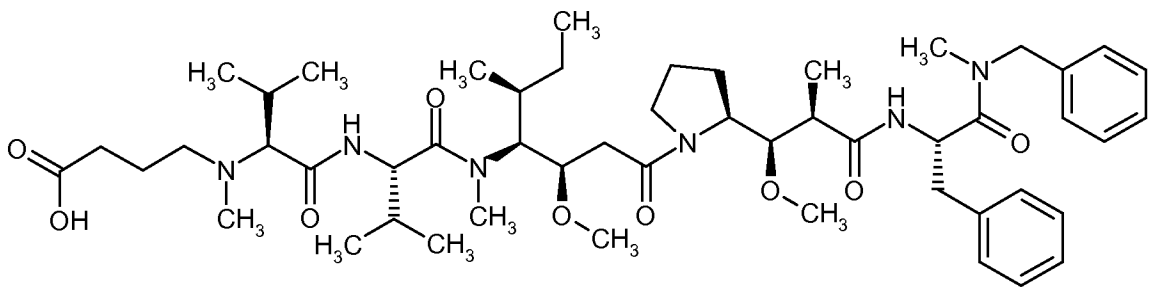
29 mg (0.03 mmol) dieses Intermediats wurden in 6 ml Dioxan/Wasser gelöst und mit 39 µl (0.059 mmol) einer 15%-igen wässrigen Lösung von 4-Oxobutansäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 1 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurden 2 mg (0.033 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Mischung durch Zugabe von etwa 300 µl 0.1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde danach weitere 2 h bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen wurden erneut 39 µl (0.059 mmol) der 15%-igen 4-Oxobutansäure-Lösung zugesetzt und das Reaktionsgemisch wiederum 1 h bei 100°C gerührt. Dann wurden weitere 2 mg (0.033 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben und anschließend mit etwa 300 µl 0.1 N Salzsäure der pH-Wert wieder auf 3 eingestellt. Das Gemisch wurde erneut 2 h bei 100°C gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf ein 1:1-Gemisch aus halbgesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung und Ethylacetat gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde aus Wasser/ Acetonitril gefriergetrocknet. Es wurden so 27 mg (94% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.04 min; MS (ESIpos): m/z = 947 $(M+H)^+$.

**Intermediat 73**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(2*S*)-1-[benzyl(methyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der für Intermediat 14 beschriebenen Synthese ausgehend von den Intermediaten 4 und 38 die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(2*S*)-1-[benzyl(methyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid hergestellt. Aus 25 mg (0.026 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von

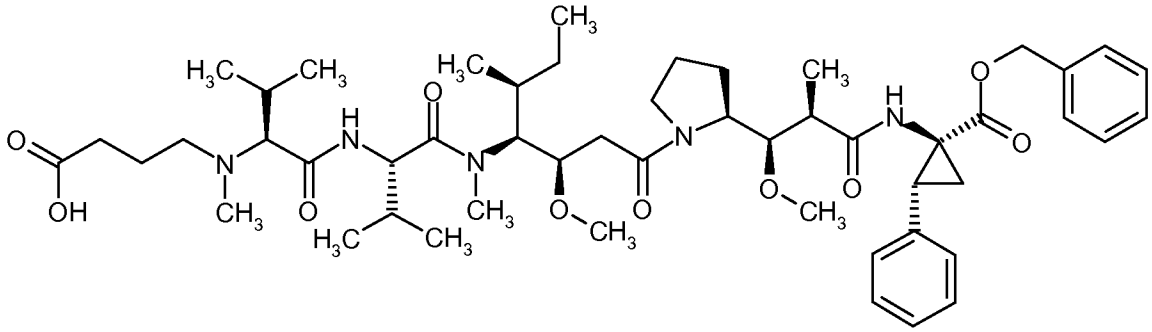
Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 13 mg (54% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.01 min; MS (ESIpos): m/z = 921 $(M+H)^+$.

**Intermediat 74**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(1*S*,2*R*)-1-[(benzyloxy)carbonyl]-2-phenylcyclopropyl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



50 mg (73 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und 28 mg (73 µmol) Benzyl-(1*S*,2*R*)-1-amino-2-phenylcyclopropancarboxylat-Trifluoracetat (Intermediat 45) wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 42 mg (110 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 38 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und eingeengt. Nach Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 35 mg (51% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(1*S*,2*R*)-1-[(benzyloxy)carbonyl]-2-phenylcyclopropyl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.52 min; m/z = 934 $(M+H)^+$.

35 mg dieses Intermediats wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 1 ml Trifluoressigsäure in 5 ml Dichlormethan behandelt. Nach Einengen und Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 34 mg (97% d. Th.) des freien Amin-Intermediats *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-

[(1*R*,2*R*)-3-({(1*S*,2*R*)-1-[(benzyloxy)carbonyl]-2-phenylcyclopropyl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valina m i d a l s Trifluoracetat erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.91 min; m/z = 834 $(M+H)^+$.

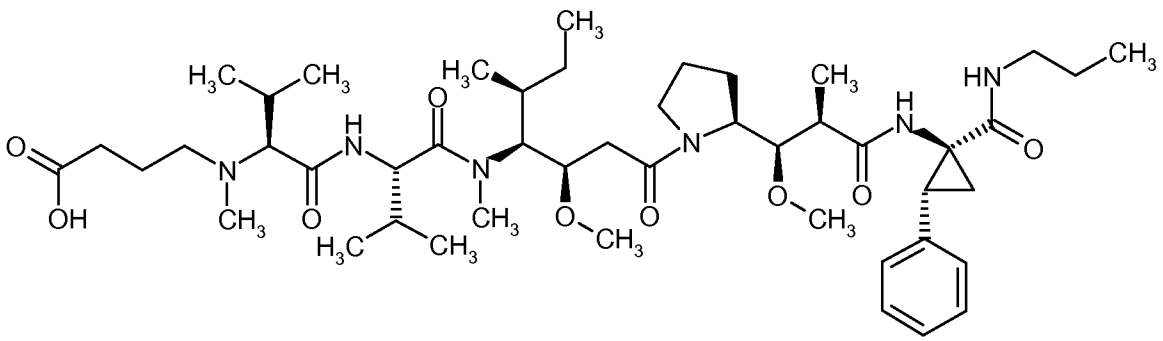
Aus 11 mg (0.011 mmol) dieses Intermediats wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 66 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 2.5 mg (24% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.1 min; MS (ESIpos): m/z = 920 $(M+H)^+$.

**Intermediat 75**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*,2*R*)-2-phenyl-1-(propylcarbamoyl)cyclopropyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 74 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und (1*S*,2*R*)-1-Amino-2-phenyl-*N*-propylcyclopropancarboxamid-Trifluoracetat (Intermediat 27) in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*,2*R*)-2-phenyl-1-(propylcarbamoyl)cyclopropyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 14 mg (0.016 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch

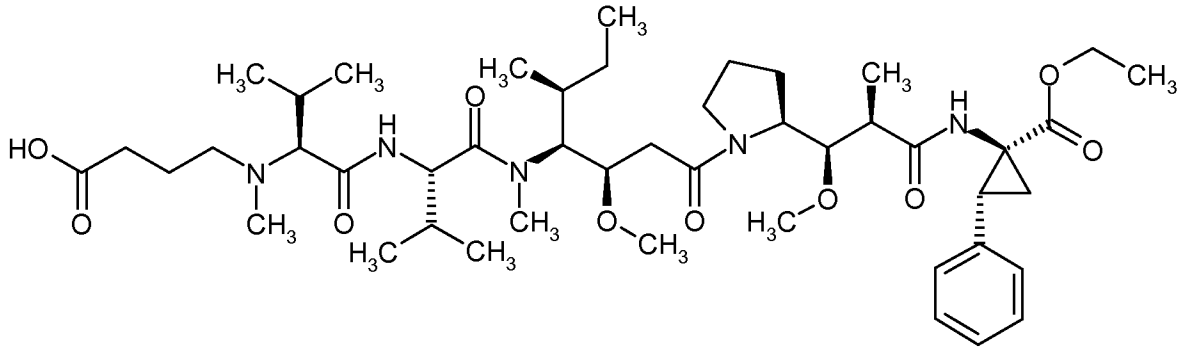
Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 11.3 mg (83% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.27 min; MS (ESIpos): m/z = 871 $(M+H)^+$.

**Intermediat 76**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(ethoxycarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



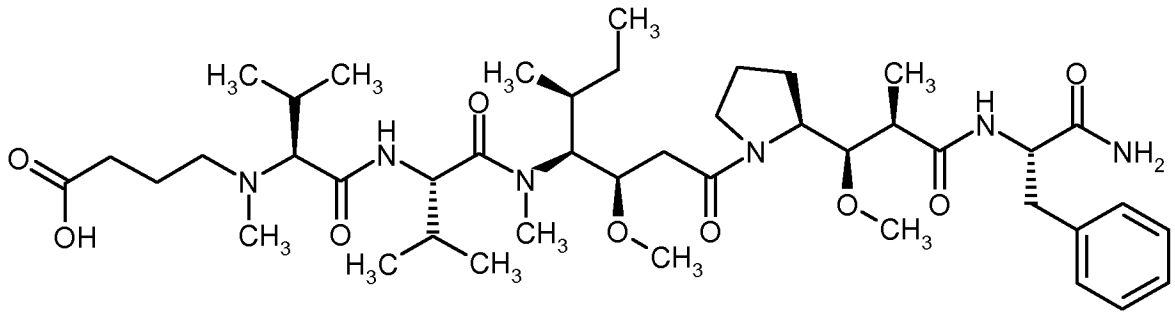
Zunächst wurde durch Kupplung von Intermediat 46 (*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid) mit Intermediat 48 (Ethyl-(1*S*,2*R*)-1-amino-2-phenylcyclopropancarboxylat-Trifluoracetat) in Gegenwart von O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Boc-Abspaltung die Ausgangsverbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(ethoxycarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat hergestellt. Aus 70 mg (0.079 mmol) dieses Ausgangsmaterials wurden dann durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Analogie zu Intermediat 61 46 mg (68% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.28 min; MS (ESIpos): m/z = 858 $(M+H)^+$

**Intermediat 77**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 75 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und L-Phenylalaninamid-Hydrochlorid in Gegenwart von O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 47 mg (0.049 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 39 mg (96% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

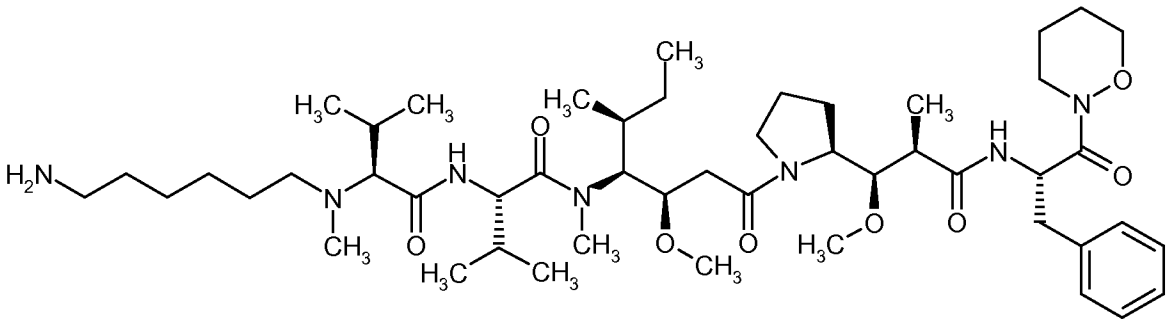
HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.44 min; MS (ESIpos): m/z = 817 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.95 und 8.8 (2m, 1H), 8.25 und 8.0 (2d, 1H), 7.45, 7.35 und 7.0 (3s, breit, 2H), 7.3-7.1 (m, 5H), 4.8-4.4 (2m, 3H), 3.95 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.72 (d, 1H), 3.22, 3.18, 3.15, 3.05 und 3.00 (5s, 9H), 2.85-2.7 (m, 4H), 2.45-1.6 (m, 12H), 1.5-1.2 (m, 3H), 1.1-0.7 (m, 21H) [weitere Signale unter Lösungsmittel-Peaks verborgen].

**Intermediat 78**

*N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5S)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 66 über 2 Stufen ausgehend von 20 mg (16 µmol) der Verbindung aus Intermediat 14 und Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat hergestellt, wobei die Hydrierung in Methanol als Lösungsmittel durchgeführt wurde.

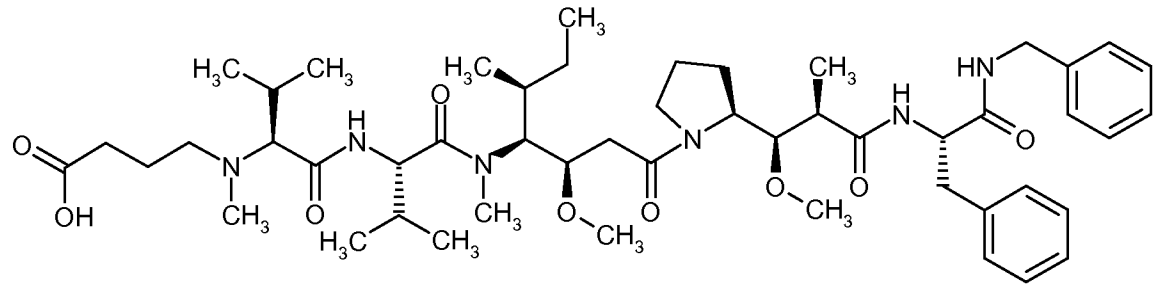
Ausbeute: 7.6 mg (55% d.Th. über 2 Stufen)

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.7 min; MS (ESIpos): m/z = 901 $(M+H)^+$.

**Intermediat 79**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



36 mg (43 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 46) und 4.6 mg (43 µmol) Benzylamin wurden in 5 ml DMF aufgenommen, mit 7.5 µl (88 µmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin, 10 mg (65 µmol) HOBt sowie 10 mg (52 µmol) EDC versetzt und dann über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 29 mg (73% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-

oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.43 min; m/z = 921 $(M+H)^+$.

29 mg dieses Intermediats wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 1 ml Trifluoressigsäure in 6 ml Dichlormethan behandelt. Nach Einengen und Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 30 mg (quant.) des freien Amin-Intermediats *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.95 min; m/z = 821 $(M+H)^+$.

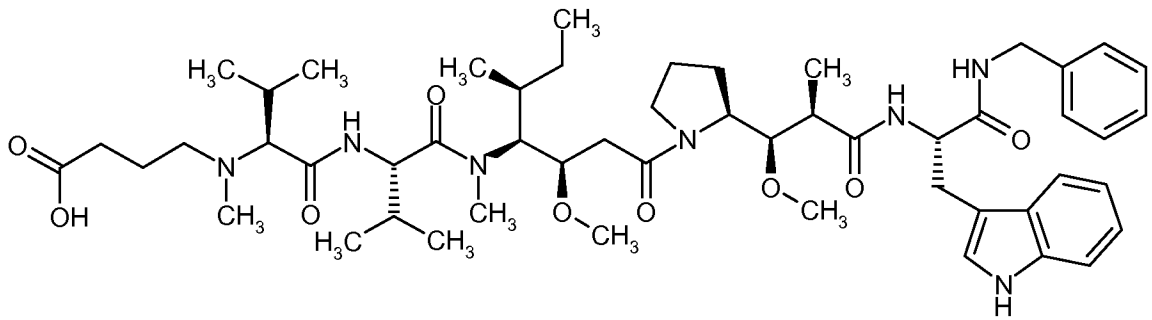
Aus 17 mg (0.018 mmol) dieses Intermediats wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 13 mg (80% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines farblosen Schaums erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.97 min; MS (ESIpos): m/z = 907 $(M+H)^+$.

**Intermediat 80**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 74 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und *N*-Benzyl-L-tryptophanamid-Trifluoracetat (Intermediat 47) in Gegenwart von *O*-(7-

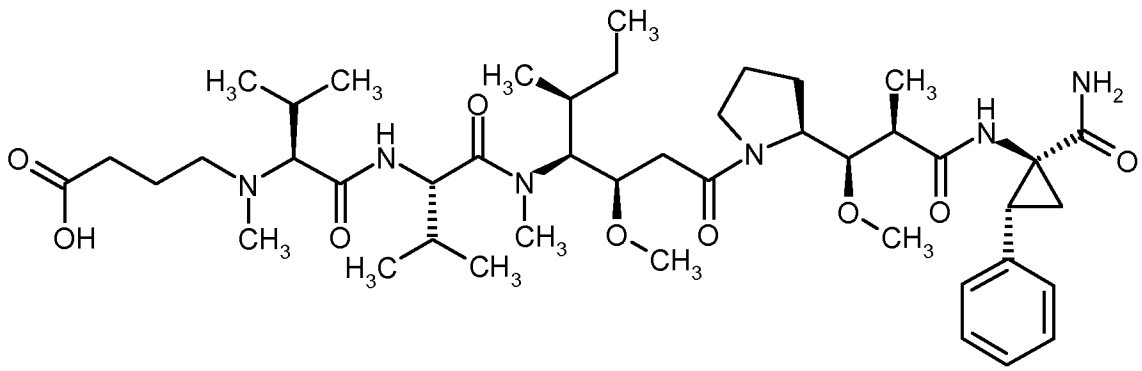
Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 10 mg (0.01 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 2.5 mg (26% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 946 $(M+H)^+$.

**Intermediat 81**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-carbamoyl-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 74 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und (1*S*,2*R*)-1-Amino-2-phenylcyclopropancarboxamid-Trifluoracetat (Intermediat 48) in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-carbamoyl-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 14 mg (0.0163 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-

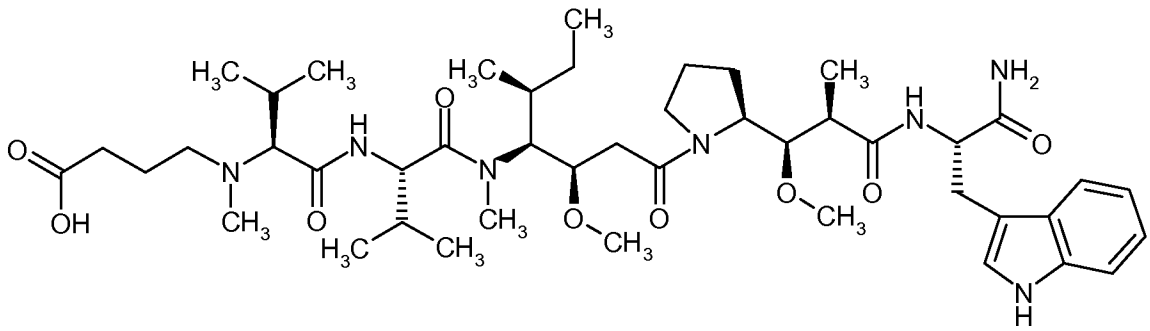
Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 8 mg (57% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.64 min; MS (ESIpos): m/z = 829 $(M+H)^+$.

**Intermediat 82**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



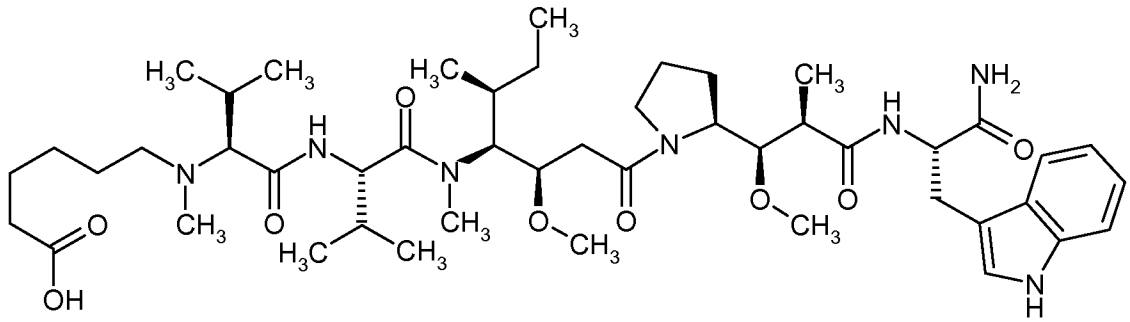
Zunächst wurde in Analogie zu der in den Intermediat 69 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) und $N^{\alpha}$-{(2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-tryptophanamid-Trifluoracetat (Intermediat 49) in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 78 mg (0.088 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 68 mg (90% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.49 min; MS (ESIpos): m/z = 856 $(M+H)^+$.

**Intermediat 83**

*N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu der Verbindung in Intermediat 82 hergestellt ausgehend von 20 mg (26 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid hergestellt.

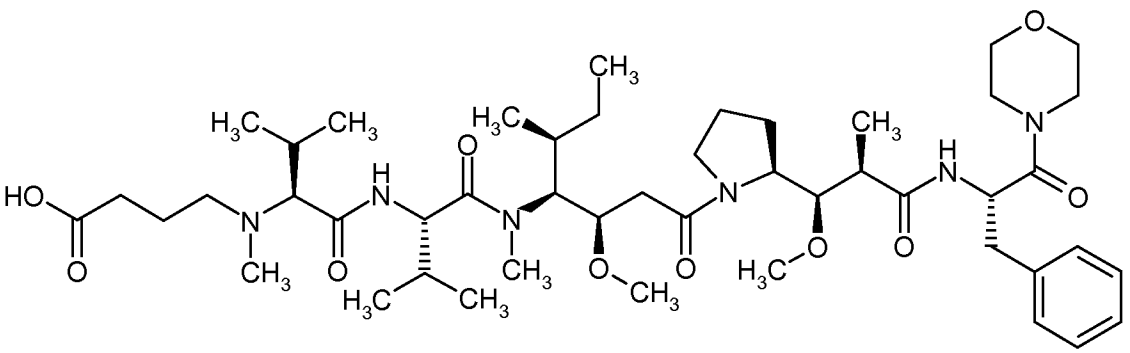
Ausbeute: 5 mg (25% d. Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.72 min; MS (ESIpos): m/z = 884 $(M+H)^+$.

**Intermediat 84**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(morpholin-4-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



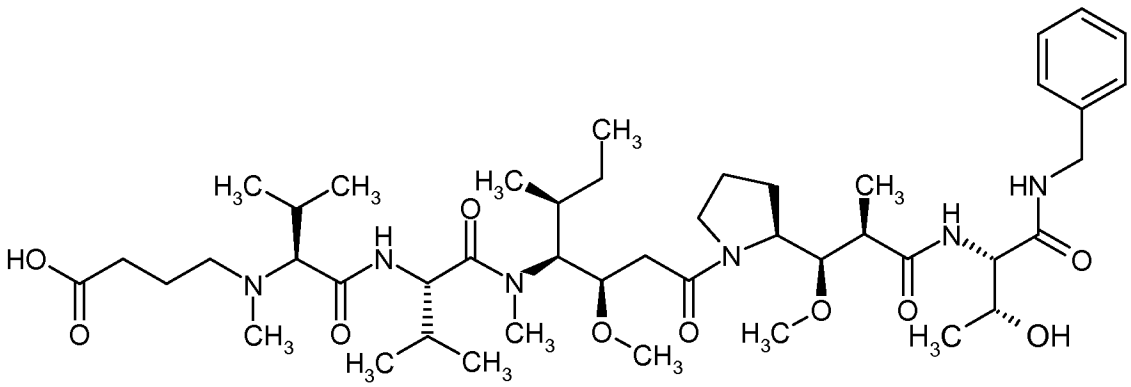
Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 79 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 46) und Morpholin in Gegenwart von EDC und HOBT und anschließender Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(morpholin-4-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 30 mg (0.033 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 22 mg (76% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.58 min; MS (ESIpos): m/z = 887 $(M+H)^+$.

**Intermediat 85**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*R*)-1-(benzylamino)-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 79 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 46) und *N*-Benzyl-L-threoninamid-Trifluoracetat in Gegenwart von HATU und anschließender Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*R*)-1-(benzylamino)-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-

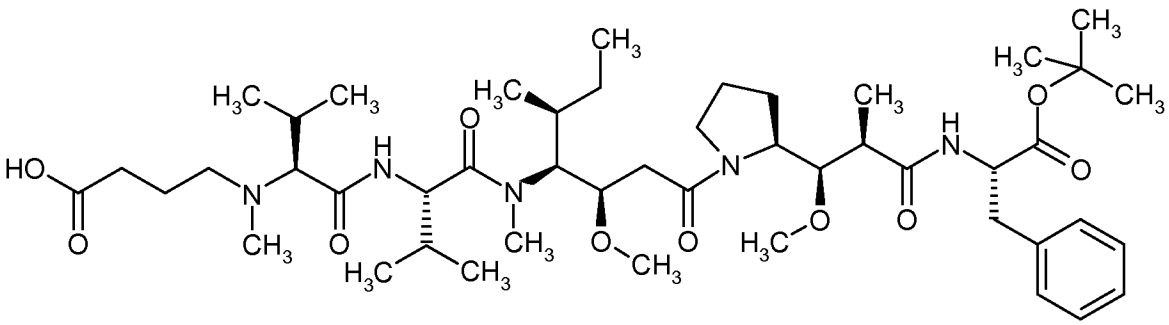
propyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 21 mg (0.024 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 20 mg (97% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.54 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.49 min; MS (ESIpos): m/z = 861 $(M+H)^+$.

**Intermediat 86**

N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-tert-butoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



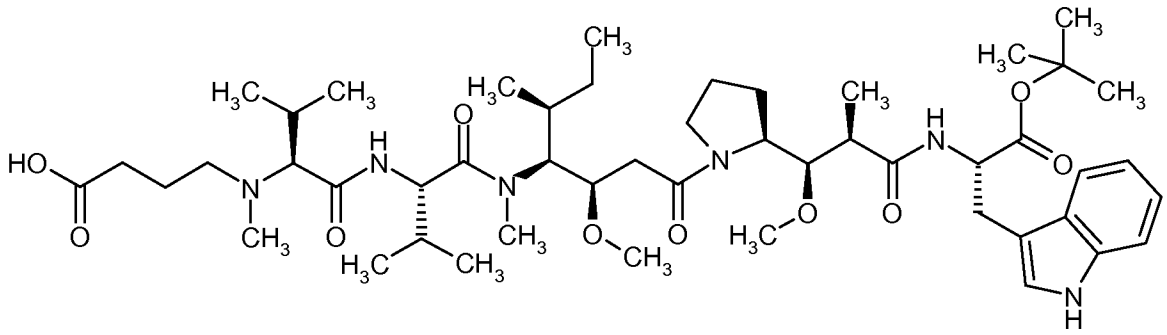
Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 74 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und *tert.*-Butyl-L-phenylalaninat-hydrochlorid in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure unter Erhalt des *tert.*-Butylesters (40 min Rühren mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan) die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-*tert.*-butoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 22 mg (0.02 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 16 mg (94% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.05 min; MS (ESIpos): m/z = 874 $(M+H)^+$.

**Intermediat 87**

N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-tert-butoxy-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Die Herstellung dieser Verbindung erfolgte in Analogie zur in Intermediat 86 beschriebenen Synthese ausgehend von 230 mg (336 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und *tert.*-Butyl-L-tryptophanat-Hydrochlorid über 3 Stufen.

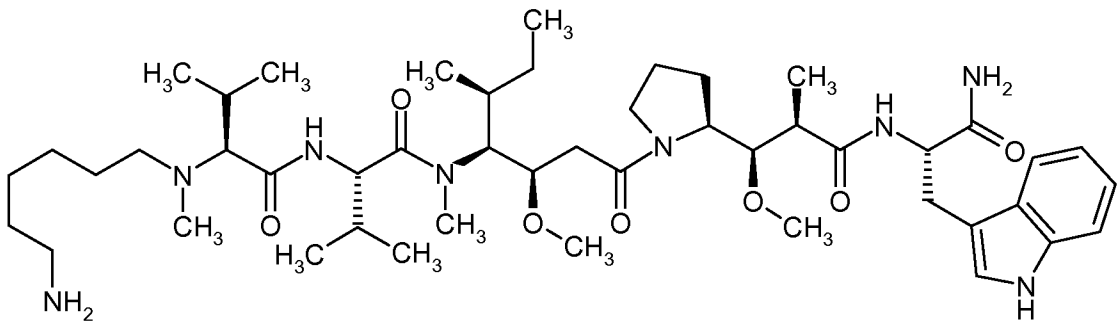
Ausbeute: 95 mg (31% d.Th. über 3 Stufen)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.05 min; MS (ESIpos): m/z = 913 $(M+H)^+$.

**Intermediat 88**

*N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in den Intermediat 69 beschriebenen Synthesen durch Kupplung von *N*-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) und $N^{\alpha}$-{(2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-tryptophanamid-Trifluoracetat (Intermediat 49) in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 30 mg (0.03 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung der Verbindung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat, das vorher durch Oxidation von Benzyl-(6-hydroxyhexyl)carbamat gewonnen wurde, in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 17 mg (45% d. Th.) der Z-geschützten Verbindung erhalten. Anschließend wurde durch Hydrogenolyse in Methanol über 10% Palladium/Aktivkohle die Titelverbindung erhalten.

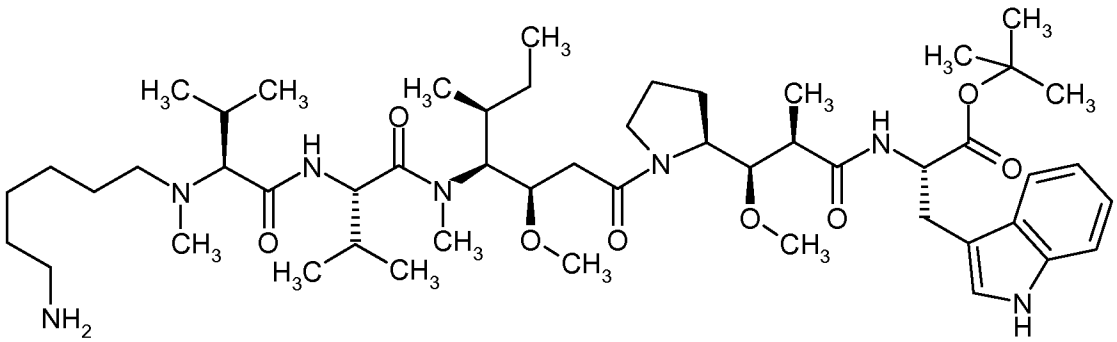
Ausbeute: 14 mg (95% d. Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.73 min; MS (ESIpos): m/z = 869 $(M+H)^+$.

**Intermediat 89**

*N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-*tert.*-butoxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 86 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

(Intermediat 26) und *tert.*-Butyl-L-tryptophanat-hydrochlorid in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure unter Erhalt des *tert.*-Butylesters (30 min Rühren mit Trifluoressigsäure/Dichlormethan 1:10) die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-*tert.*-butoxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 71 mg (0.075 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung der Verbindung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat, das vorher durch Oxidation von Benzyl-(6-hydroxyhexyl)carbamat gewonnen wurde, in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 35 mg (44% d. Th.) der Z-geschützten Verbindung erhalten. Anschließend wurde durch Hydrogenolyse in Methanol über 10% Palladium/Aktivkohle die Titelverbindung erhalten.

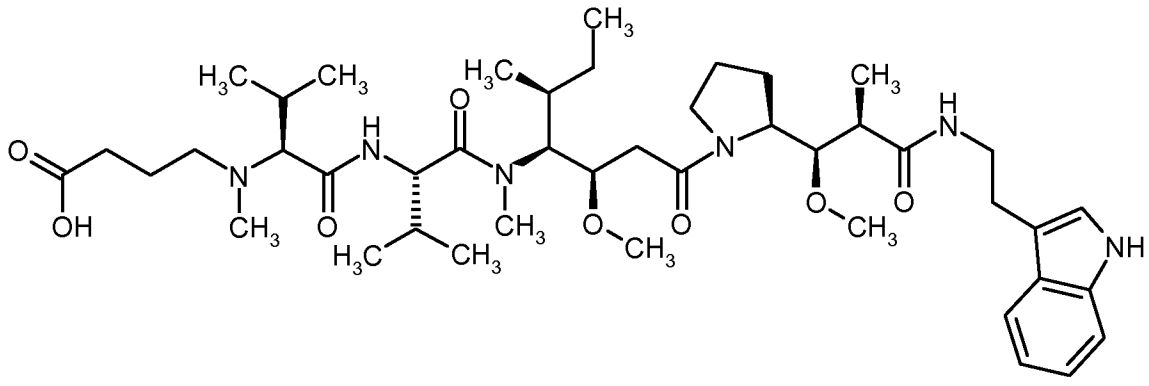
Ausbeute: 30 mg (98% d. Th.)

HPLC (Methode 5): Rt = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): Rt = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 926 (M+H)+.

**Intermediat 90**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 74 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethanamin in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-

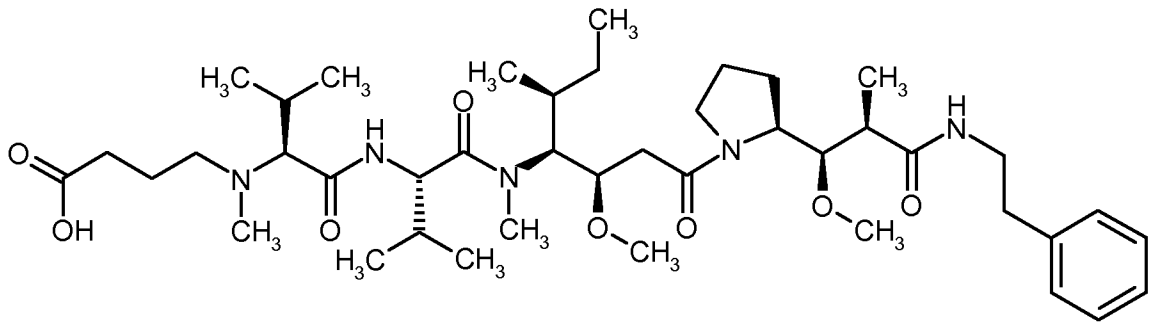
Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 100 mg (0.119 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 50 mg (49% d. Th.) der Titelverbindung erhalten. Die Reinigung der Titelverbindung erfolgte hier durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17% als Eluent, wobei das Mischungsverhältnis von zunächst 15/2/02 auf 15/4/0.5 umgestellt wurde.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 813 $(M+H)^+$.

**Intermediat 91**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-{(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-{(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(2-phenylethyl)amino]propyl}pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl}-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 74 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und Phenylethylamin in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-{(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-{(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(2-phenylethyl)amino]propyl}pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl}-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt. Aus 57 mg (0.071 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 44 mg (80% d. Th.) der Titelverbindung erhalten. Die Reinigung der Titelverbindung kann auch hier durch Flash-

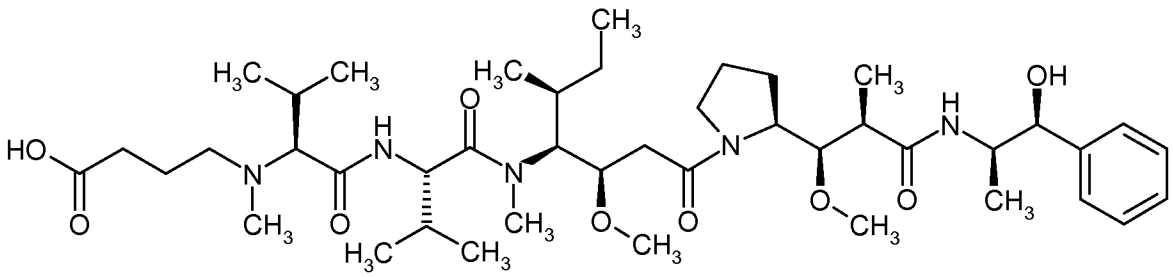
Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17% als Eluent erfolgen (15/2/02 -> 15/4/0.5).

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.64 min; MS (ESIpos): m/z = 774 $(M+H)^+$.

**Intermediat 92**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



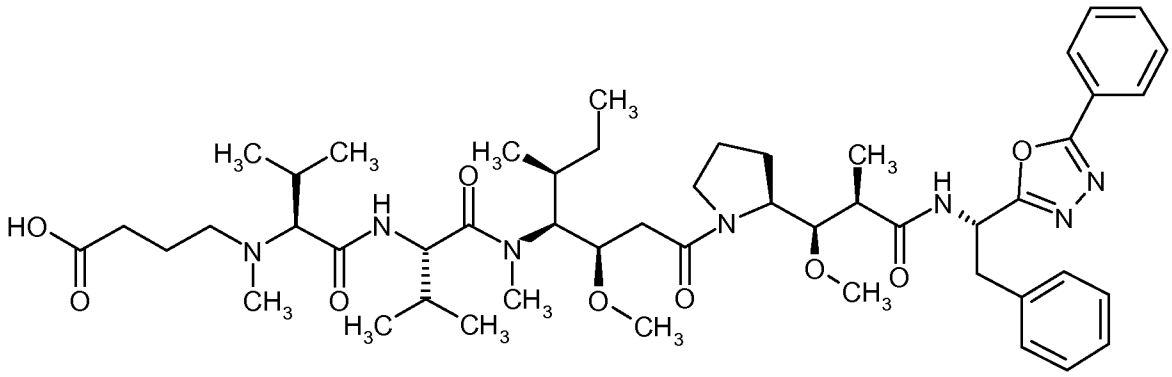
Aus 100 mg (0.139 mmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(*1R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 40) wurden in Analogie zur Herstellung von Intermediat 61 durch Umsetzung mit 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid 94 mg (84% d. Th.) der Titelverbindung erhalten. Die Reinigung der Titelverbindung erfolgte durch präparative HPLC.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.46 min; MS (ESIpos): m/z = 804 $(M+H)^+$.

**Intermediat 93**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



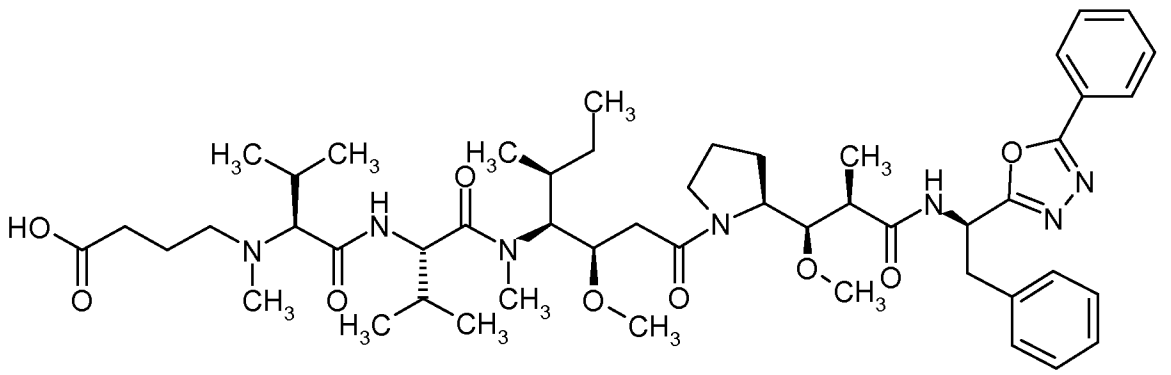
22.4 mg (24 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat wurden in 1.4 ml Dioxan/Wasser gelöst und analog zur Herstellung von Intermediat 61 mit 15%-iger wässriger Lösung von 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 8.2 mg (38% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines weißen Feststoffs erhalten.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.54 min

LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 919 $(M+H)^+$

**Intermediat 94**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



17.1 mg (18 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-

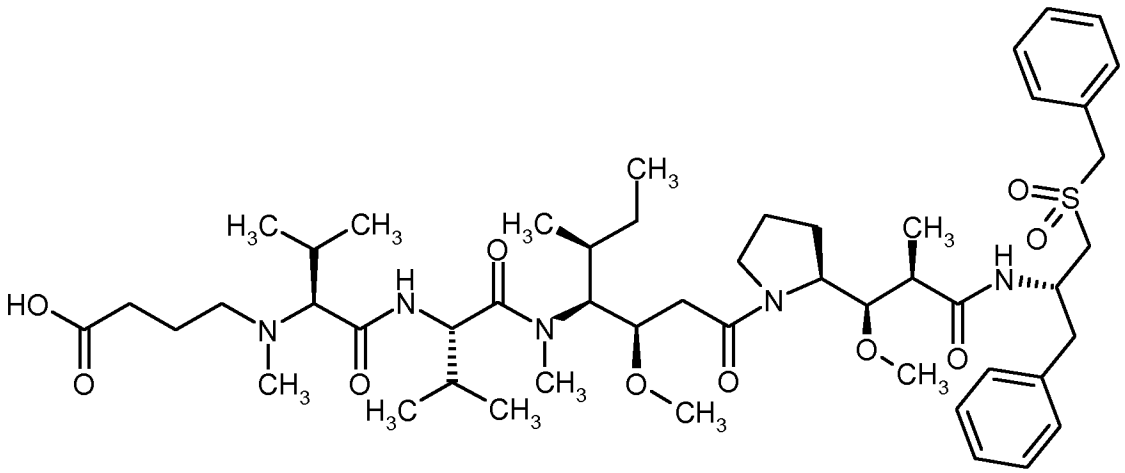
yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat wurden in 1.1 ml Dioxan/Wasser gelöst und analog zur Herstellung von Intermediat 61 mit 15%-iger wässriger Lösung von 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 14.8 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines weißen Feststoffs erhalten.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.54 min;

LC-MS (Methode 12): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 919 $(M+H)^+$

**Intermediat 95**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

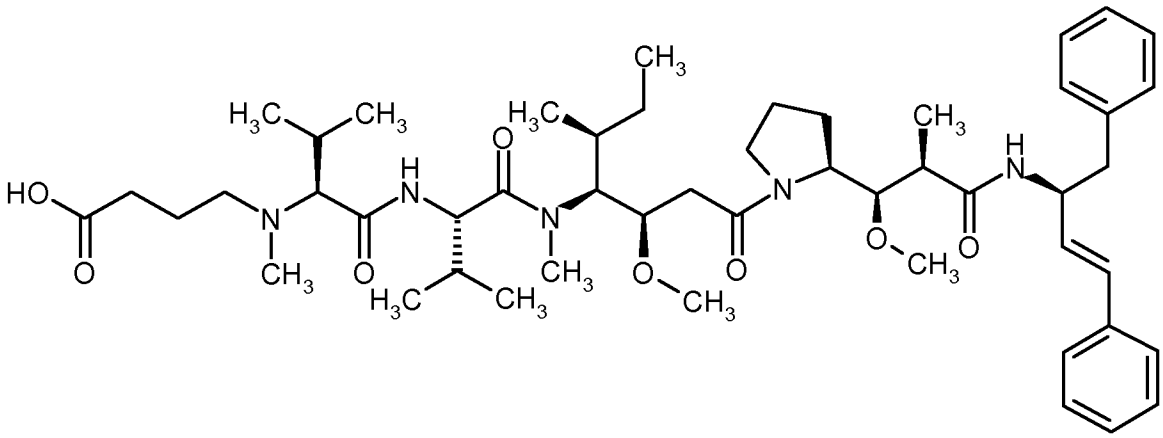


19.3 mg (20 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat wurden in 1.2 ml Dioxan/Wasser gelöst und analog zur Herstellung von Intermediat 61 mit 15%-iger wässriger Lösung von 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 8.6 mg (45% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines Feststoffs erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 943 $(M+H)^+$

**Intermediat 96**

*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*E*)-1,4-diphenylbut-3-en-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



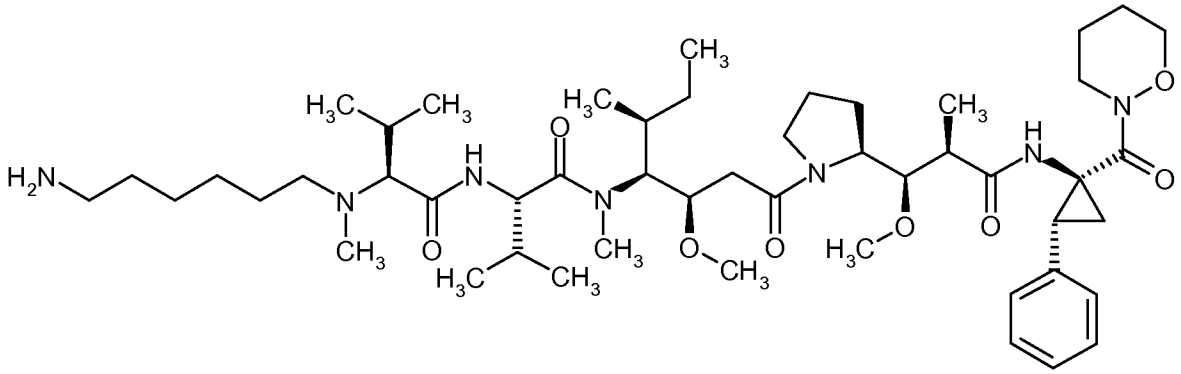
15.5 mg (10 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*E*)-1,4-diphenylbut-3-en-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat wurden in 1.0 ml Dioxan/Wasser gelöst und analog zur Herstellung von Intermediat 61 mit 15%-iger wässriger Lösung von 4-Oxobutansäure in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 10.3 mg (68% d. Th.) der Titelverbindung in Form eines weißen Feststoffs erhalten.

HPLC (Methode 10): $R_t$ = 2.59 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 877 $(M+H)^+$

**Intermediat 97**

*N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 66 durch Umsetzung von 200 mg (0.108 mmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 16) mit Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat und nachfolgende hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe (mit 5% Palladium auf Kohle als Katalysator, in Methanol als Lösungsmittel) hergestellt.

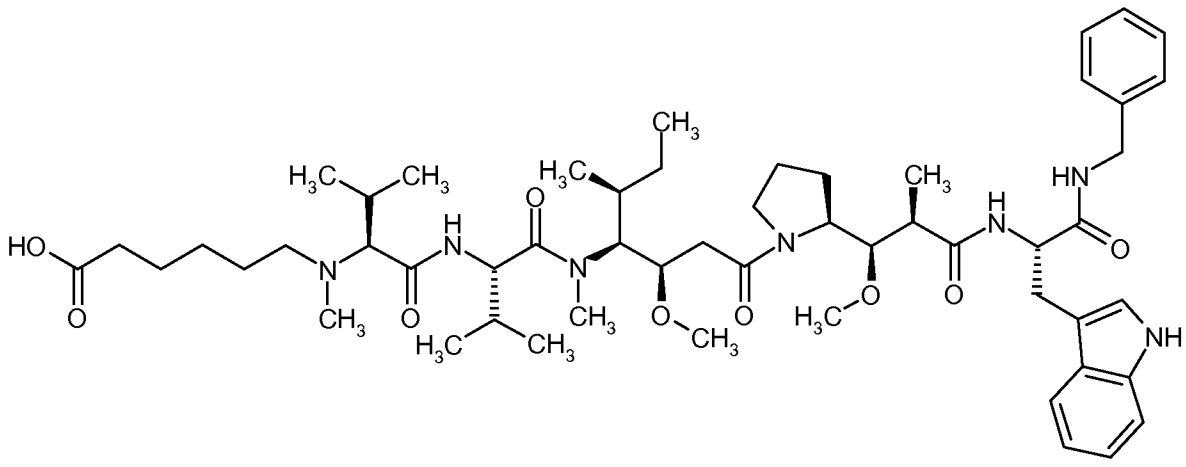
Ausbeute: 69 mg (65% d. Th. über zwei Stufen)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 912 $(M+H)^+$.

**Intermediat 98**

*N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Die Herstellung dieser Verbindung erfolgte in Analogie zur in Intermediat 80 beschriebenen Synthese. Die Reinigung erfolgte durch präparative HPLC.

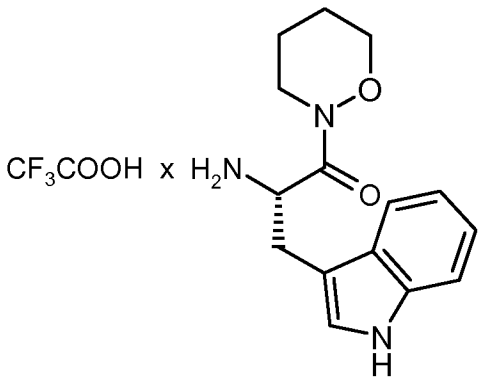
Ausbeute: 40 mg (29% d.Th. über 3 Stufen)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 974 $(M+H)^+$.

**Intermediat 99**

(2*S*)-2-Amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)propan-1-on-Trifluoracetat




324 mg (0.81 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)-L-tryptophanat wurden in 20 ml DMF gelöst und mit 200 mg (1.62 mmol) 1,2-Oxazinan-Hydrochlorid (Ausgangsverbindung 5) und 850 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 50°C gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 4:1 als Laufmittel gereinigt. Die Produktfraktionen wurden eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt so 147.5 mg (48% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 374 $(M+H)^+$.

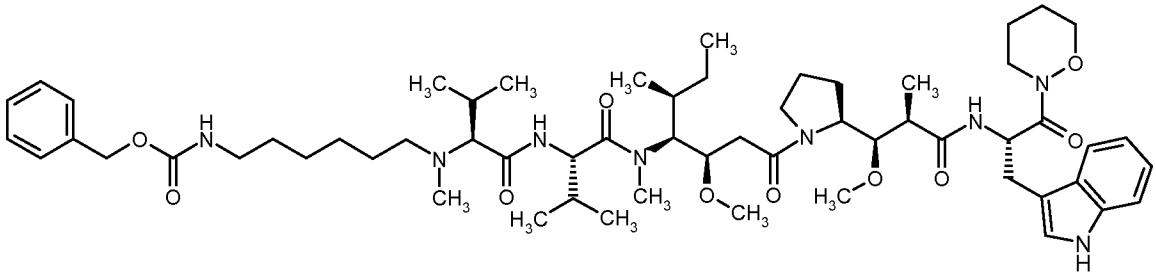
Aus 166 mg (444.5 µmol) dieses Intermediats wurde nach Standardbedingungen mit 3 ml Trifluoressigsäure in 20 ml Dichlormethan die Boc-Schutzgruppe abgespalten und nach HPLC Reinigung 155 mg (86% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.43 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.56 min; MS (ESIpos): m/z = 274 $(M+H)^+$.

**Intermediat 100**

*N*-(6-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}hexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



177 mg (260 µmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und 100 mg (260 µmol) (2*S*)-2-Amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)propan-1-on-Trifluoracetat (Intermediat 99) wurden in 15 ml DMF aufgenommen und mit 118 mg (310 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 140 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und eingeengt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 170 mg (68% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.36 min; m/z = 940 $(M+H)^+$.

170 mg dieses Intermediats wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe 30 min mit 3 ml Trifluoressigsäure in 30 ml Dichlormethan behandelt. Dann wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt, wobei 155 mg (86% d.Th.) des entschützten Intermediats N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl] pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid erhalten wurden.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.85 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 840 $(M+H)^+$.

Aus 50 mg (0.052 mmol) dieses Intermediats wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 97 mit Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid und nachfolgender hydrogenolytischer Abspaltung der Z-Schutzgruppe (mit 5% Palladium auf Kohle als Katalysator, in Methanol als Lösungsmittel) hergestellt die Titelverbindung hergestellt.

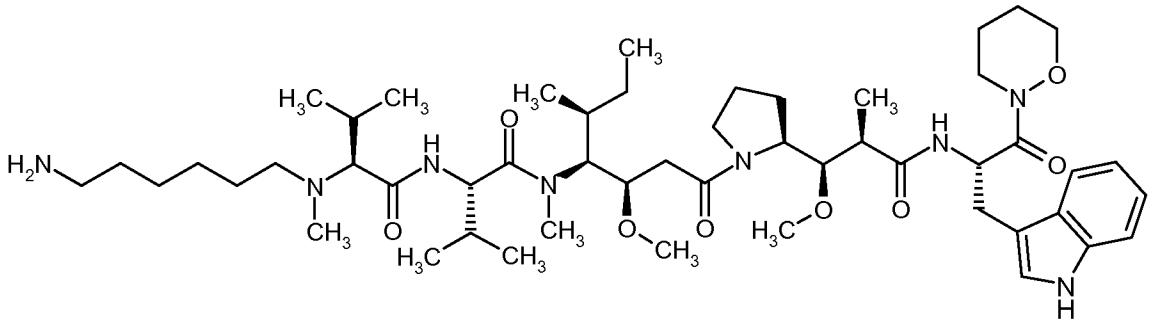
Ausbeute: 21 mg (37% d. Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.02 min; MS (ESIpos): m/z = 1073 $(M+H)^+$.

**Intermediat 101**

*N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



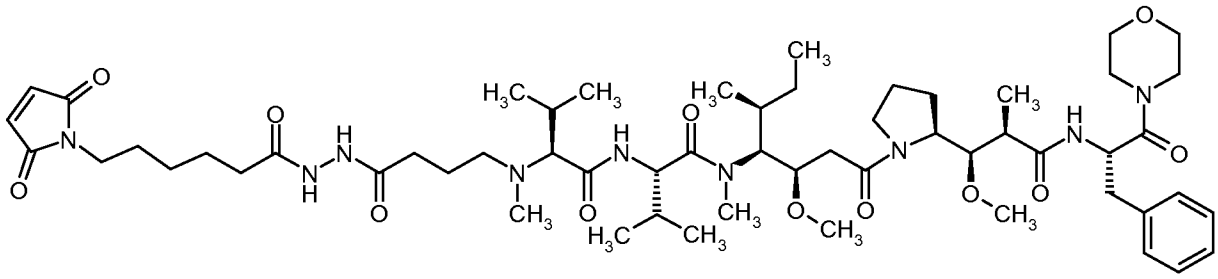
26.7 mg (24.87 µmol) von Intermediat 100 wurden in 10 ml Methanol gelöst und über Palladium/Aktivkohle (5%) 30 min bei Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Nach Trocknung des Rückstands im Hochvakuum wurden 22.5 mg (96% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 939 $(M+H)^+$.

**Intermediat 102**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(morpholin-4-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese aus *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(morpholin-4-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

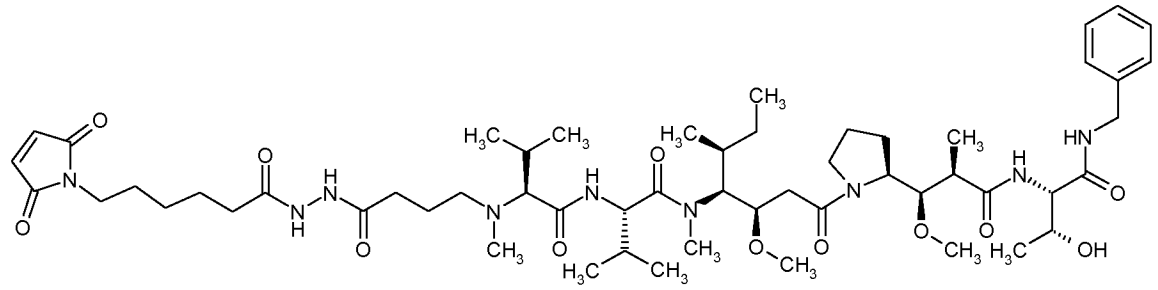
Ausbeute: 8 mg (71% d.Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1094 $(M+H)^+$.

**Intermediat 103**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*R*)-1-(benzylamino)-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese aus *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*R*)-1-(benzylamino)-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

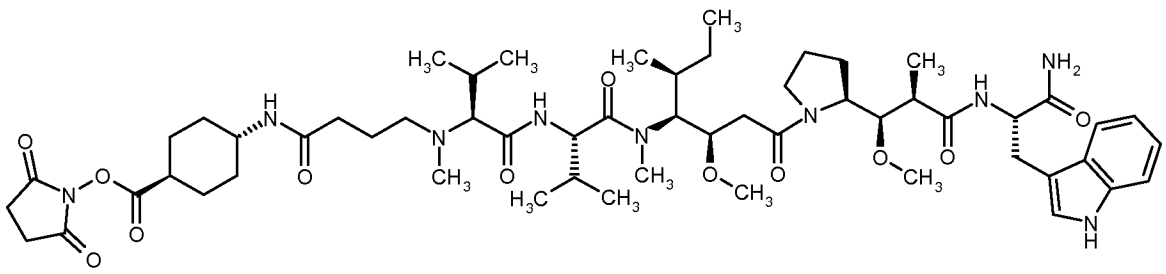
Ausbeute: 3 mg (22% d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 1069 $(M+H)^+$.

**Intermediat 104**

*N*-{4-[(trans-4-{[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl}cyclohexyl)amino]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde Benzyl-trans-4-aminocyclohexancarboxylat-Trifluoracetat aus *trans*-4-Aminocyclohexancarbonsäure durch Einführung der Boc-Schutzgruppe, anschließende Einführung der Benzylesterschutzgruppe und nachfolgende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt.

15 mg (18 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden dann in 5 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend mit 13 mg (35 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 9 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin sowie mit 15 mg (44 µmol) Benzyl-*trans*-4-aminocyclohexancarboxylat-Trifluoracetat versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittels im Vakuum abgedampft. Nach Trocknung des Rückstands im Hochvakuum wurden 14.7 mg (78% d. Th.) des geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 1072 $(M+H)^+$.

Von diesem geschützten Intermediat wurde zunächst hydrogenolytisch der Benzylester entfernt und die freie Carboxylkomponente in quantitativer Ausbeute erhalten. 14 mg (14 µmol; 1 Äquiv.) der entschützten Verbindung wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 3.3 mg (29 µmol; 2.1 Äquiv.)

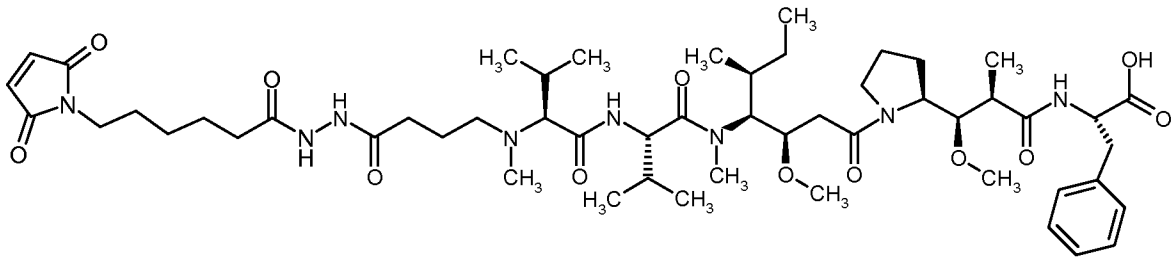
*N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von 4.1 mg (21 µmol; 1.5 Äquiv.) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 7.5 µL (44 µmol; 3.1 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylethylamin und 0.9 mg (7 µmol; 0.5 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin umgesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 10 Äquiv. *N*-Hydroxysuccinimid, 5 Äquiv. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 5 Äquiv. *N,N*-Diisopropylethylamin und 0.5 Äquiv. 4-Dimethylaminopyridin nachgesetzt und das Reaktionsgemisch 5 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt und eingeengt. Nach Lyophilisation des Rückstandes aus Dioxan wurden 9.7 mg (62% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 1078 $(M+H)^+$.

**Intermediat 105**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



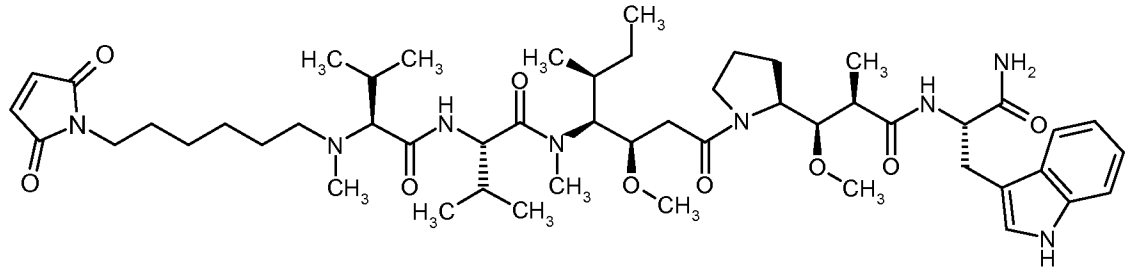
Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese ausgehend von 4-{[(2*S*)-1-{[(2*S*)-1-{[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-*tert.*-Butoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl](methyl)amino}-3-methylbutan-2-yl]amino}-3-methyl-1-oxobutan-2-yl](methyl)amino}butansäure und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt. Das Ester-Intermediat wurde in 42%-iger Ausbeute erhalten. In einem zweiten Schritt wurde aus 6 mg (6 µmol) dieses Intermediats mit Trifluoressigsäure der tert.-Butylester gespalten. Nach HPLC Reinigung wurden 3.4 mg (48% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.66 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.04 min; MS (ESIpos): m/z = 1025 $(M+H)^+$.

**Intermediat 106**

*N*-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



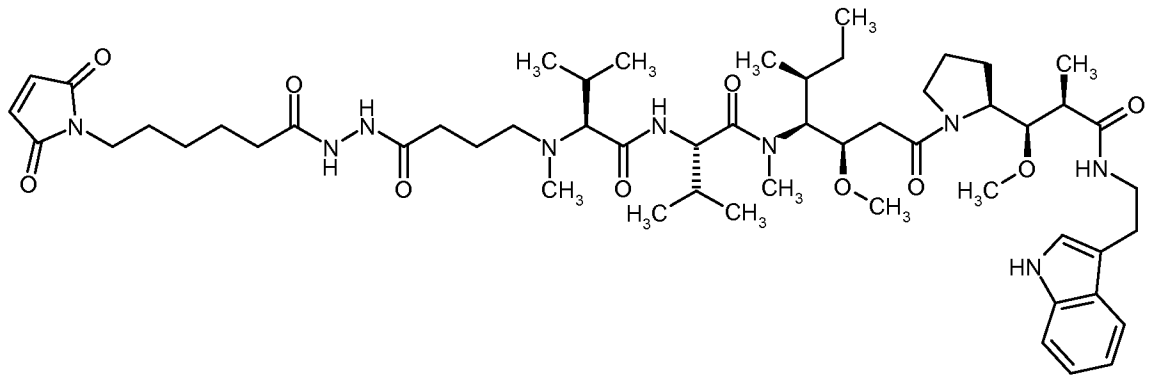
14 mg (16 µmol) *N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl] pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 88) wurden in 750 µl Dioxan aufgenommen und mit 1.5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 3.2 mg (21 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-carboxylat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1h bei RT gerührt und danach im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 5.5 mg (36% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 949 $(M+H)^+$.

**Intermediat 107**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



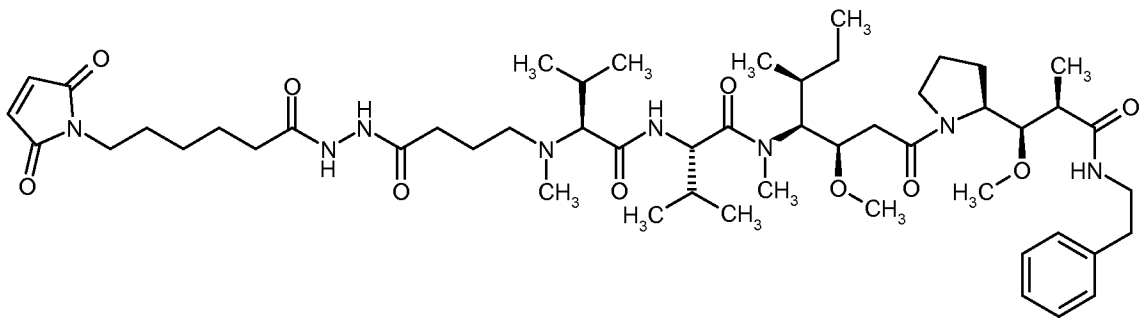
38 mg (47 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 37 ml DMF gelöst und anschließend mit 71 mg (187 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 33 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 37 mg (140 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Hochvakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 12.2 mg (26 % d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1020 $(M+H)^+$.

**Intermediat 108**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-{(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-{(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(2-phenylethyl)amino]propyl}pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl}-*N*-methyl-L-valinamid



Die Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 107 hergestellt.

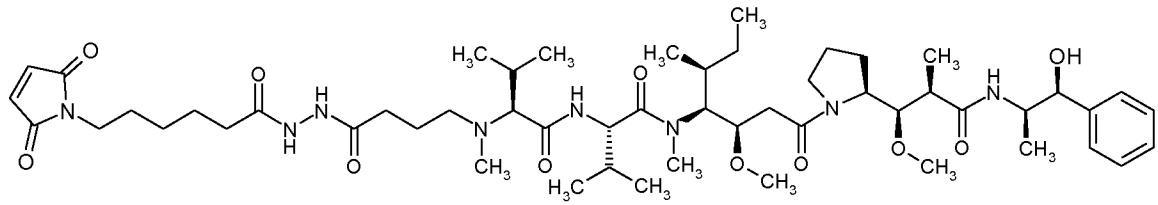
Ausbeute: 2.5 mg (30 % d.Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 981 $(M+H)^+$.

**Intermediat 109**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Die Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 107 aus der Verbindung in Intermediat 92 hergestellt.

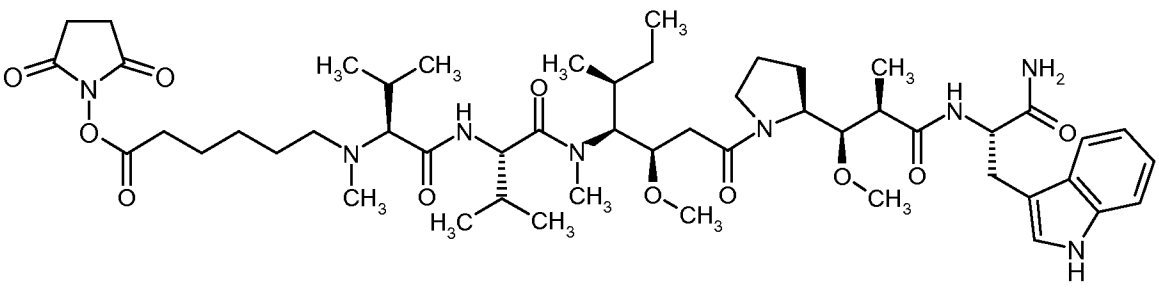
Ausbeute: 35 mg (65 % d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1011 $(M+H)^+$.

**Intermediat 110**

*N*-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 147 aus der Verbindung in Intermediat 83 hergestellt.

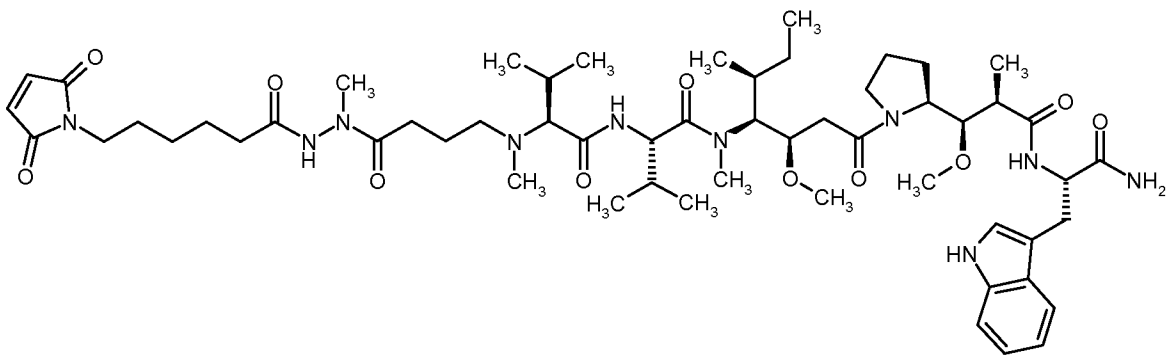
Ausbeute: 2.4 mg (24 % d.Th.)

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 981 $(M+H)^+$.

**Intermediat 111**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-1-methylhydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 140 aus Intermediat 82 und Intermediat 22 hergestellt.

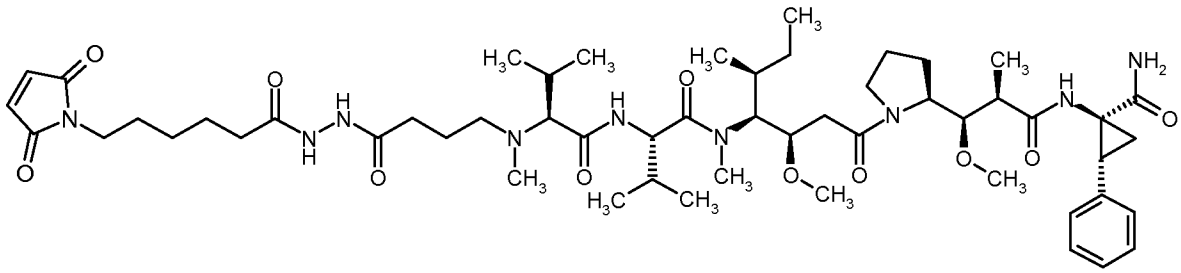
Ausbeute: 6.5 mg (51 % d.Th.)

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 4.71 min; MS (ESIpos): m/z = 1077 $(M+H)^+$.

**Intermediat 112**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-carbamoyl-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 157 aus der Verbindung in Intermediat 81 hergestellt.

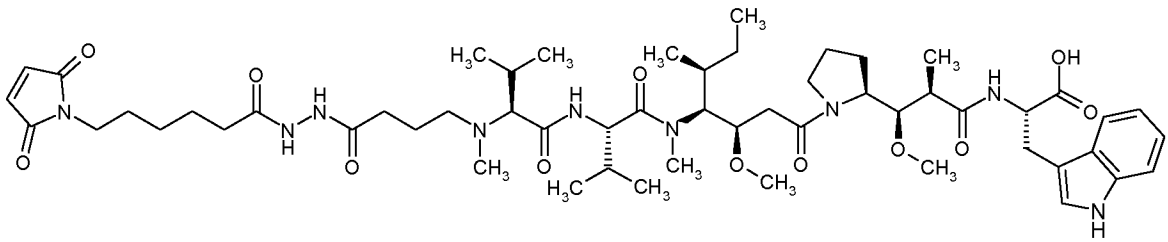
Ausbeute: 5.7 mg (57 % d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1036 $(M+H)^+$.

**Intermediat 113**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



95 mg (104 µmol) von 4-{[(2*S*)-1-{[(2*S*)-1-{[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-*tert.*-Butoxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl](methyl)amino}-3-methylbutan-2-yl]amino}-3-methyl-1-oxobutan-2-yl](methyl)amino}butansäure wurden in DMF gelöst und anschließend mit 79.5 mg (209 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 73 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin sowie mit 68 mg (261 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Hochvakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer

HPLC aufgereinigt. So wurden 104 mg (89 % d.Th.) des tert.-Butylesters der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1121 $(M+H)^+$.

Das Intermediat wurde in 33.4 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 17 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt.

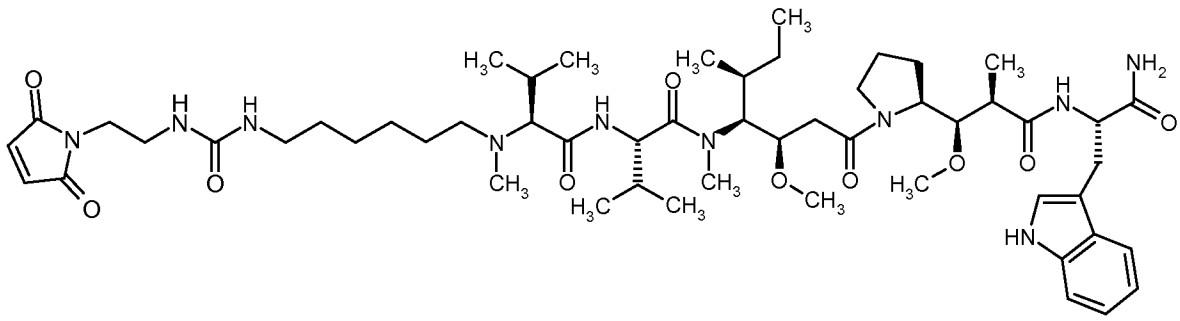
So wurden 61 mg (62 % d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1064 $(M+H)^+$.

**Intermediat 114**

*N*-[6-({[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}amino)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



5 mg (5µmol) von *N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 885 µl DMF aufgenommen und mit 5.3 mg (8 µmol) 4-Nitrophenyl-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamat sowie 2.8 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt und anschließend bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

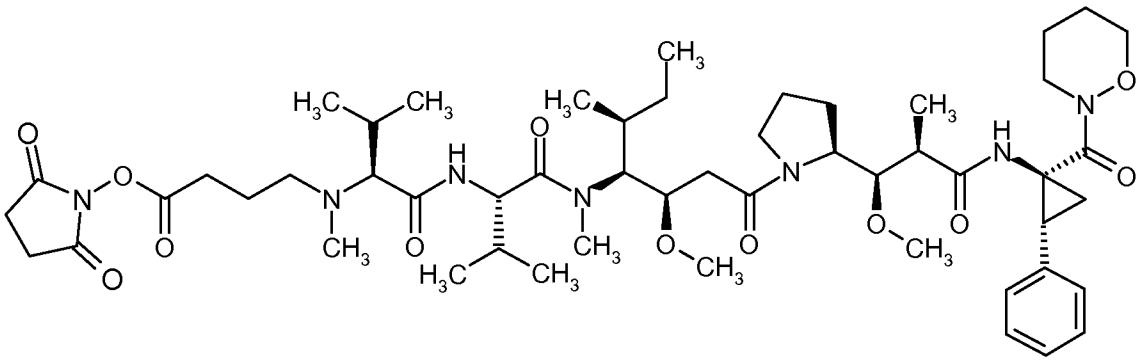
Ausbeute: 0.58 mg (11% d.Th.) eines farblosen Schaums

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.83 min; MS (ESIpos): m/z = 1035 $(M+H)^+$.

**Intermediat 115**

*N*-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu der Verbindung in Intermediat 147 ausgehend von 8 mg (9 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid hergestellt. Nach dem Einengen wurde der aktivierte Ester mittels präparativer HPLC gereinigt und nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum sofort mit dem Antikörper umgesetzt.

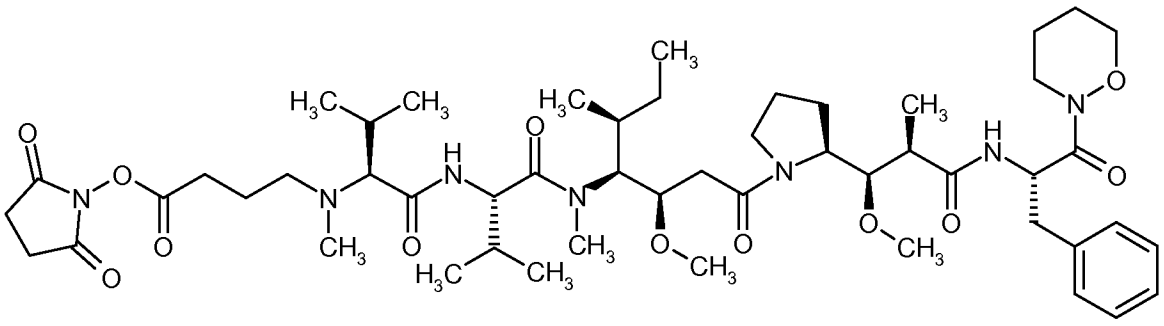
Ausbeute: 3 mg (27% d.Th.) (hydrolyseempfindlich)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 996 $(M+H)^+$.

**Intermediat 116**

*N*-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu der Verbindung in Intermediat 147 ausgehend von 5 mg (6 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid hergestellt. Nach dem Einengen wurde der aktivierte Ester mittels präparativer HPLC gereinigt und nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum sofort mit dem Antikörper umgesetzt.

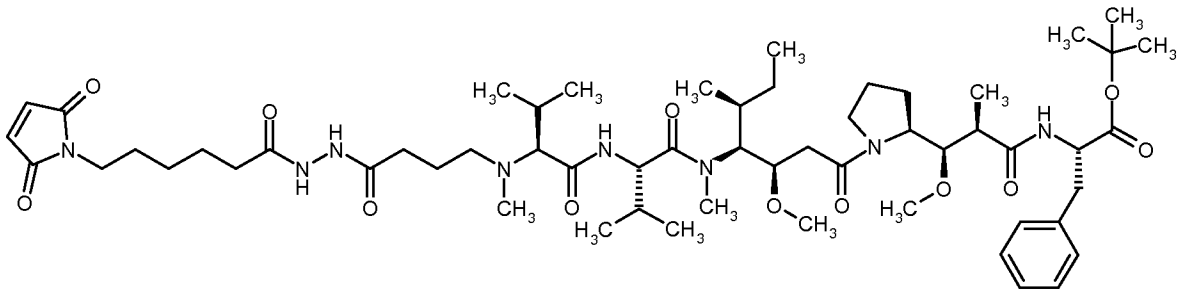
Ausbeute: 3.2 mg (43% d.Th.) (hydrolyseempfindlich)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 984 $(M+H)^+$.

**Intermediat 117**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-tert.-butoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 157 aus der Verbindung in Intermediat 86 hergestellt.

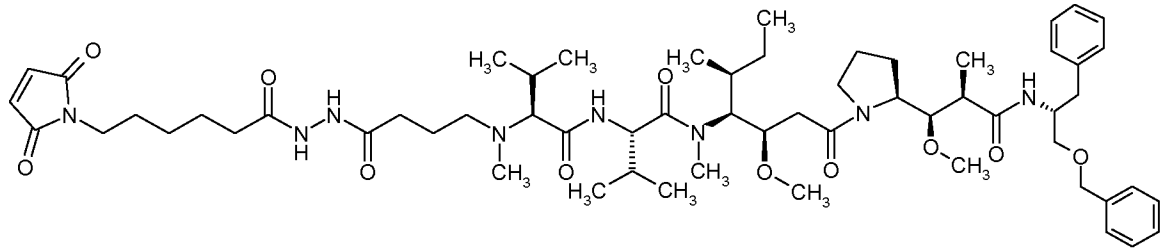
Ausbeute: 7 mg (42 % d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1081 $(M+H)^+$.

**Intermediat 118**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*R*)-1-(benzyloxy)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

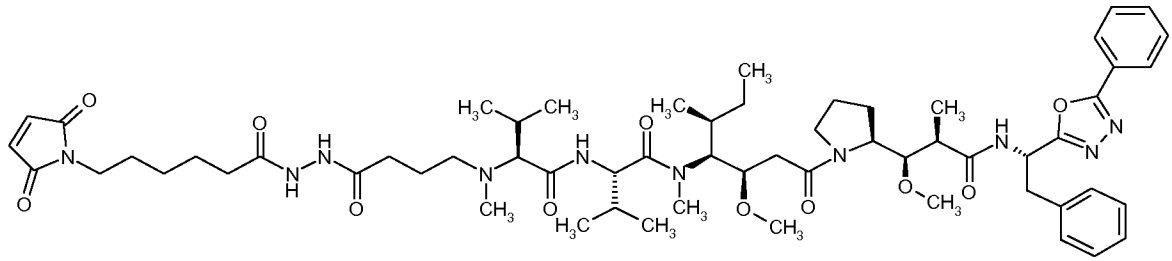


Die Zielverbindung wurde analog zu Intermediat 157 aus 7 mg (7.8 µmol) der Verbindung in Intermediat 68 hergestellt. Ausbeute: 6.3 mg (53% d.Th.)

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.00 min; MS (ESIpos): m/z = 1102 $(M+H)^+$.

**Intermediat 119**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



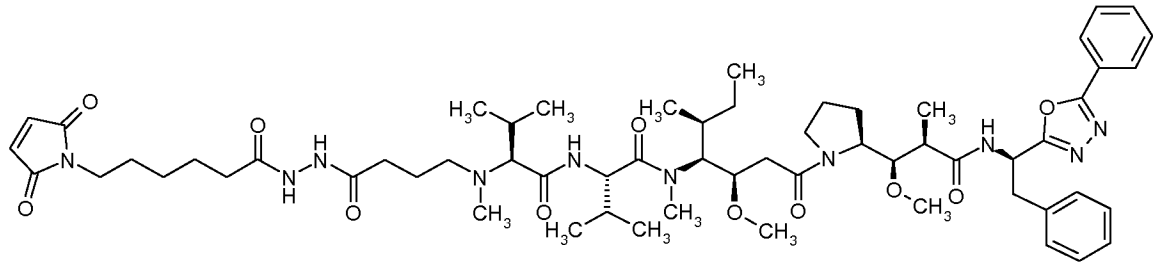
7.4 mg (8.1 mmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-

yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und 6.3 mg (24.2 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid-hydrochlorid wurden in Analogie zu Intermediat 157 gekuppelt und aufgearbeitet. Es wurden 1.6 mg (13%. d. Th.) der Titelverbindung als Feststoff erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1126 $(M+H)^+$

**Intermediat 120**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

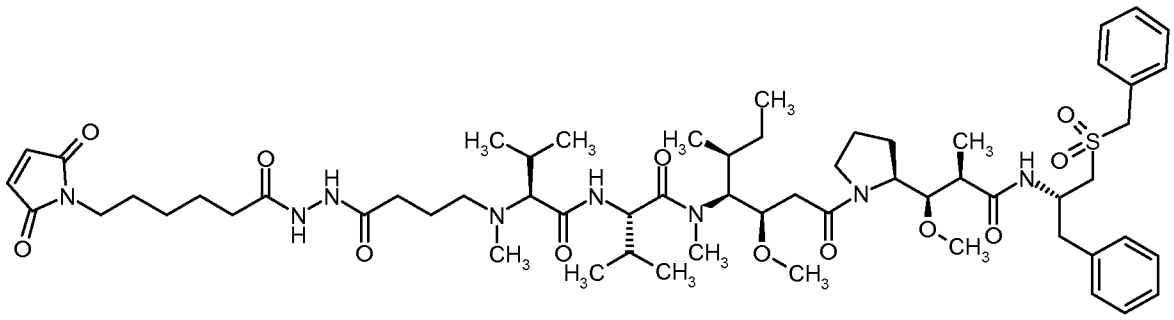


12.8 mg (13.9 mmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*R*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und 10.9 mg (41.8 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid-Hydrochlorid wurden in Analogie zu Intermediat 157 gekuppelt und aufgearbeitet. Es wurden 10.8 mg (59%. d. Th.) der Titelverbindung als Feststoff erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 1126 $(M+H)^+$

**Intermediat 121**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

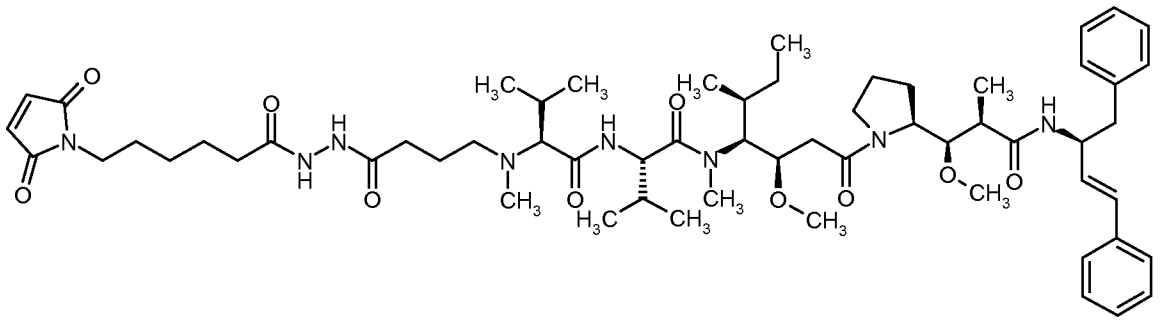


7.4 mg (7.9 mmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylsulfonyl)-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und 6.2 mg (23.5 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid-Hydrochlorid wurden in Analogie zu Intermediat 157 gekuppelt und aufgearbeitet. Es wurden 6.9 mg (7 4% d. Th.) der Titelverbindung als Feststoff erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1150 $(M+H)^+$

**Intermediat 122**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3***E***)-1,4-diphenylbut-3-en-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

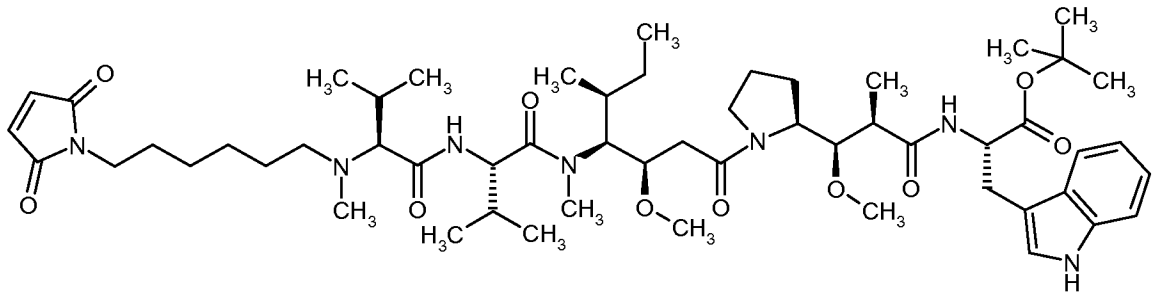


8 mg (9.1 mmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*E*)-1,4-diphenylbut-3-en-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und 7.2 mg (27.4 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid-Hydrochlorid wurden in Analogie zu Intermediat 157 gekuppelt und aufgearbeitet. Es wurden 8.2 mg (82 % d. Th.) der Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 1083 $(M+H)^+$

**Intermediat 123**

*N*-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-*tert.*-butoxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



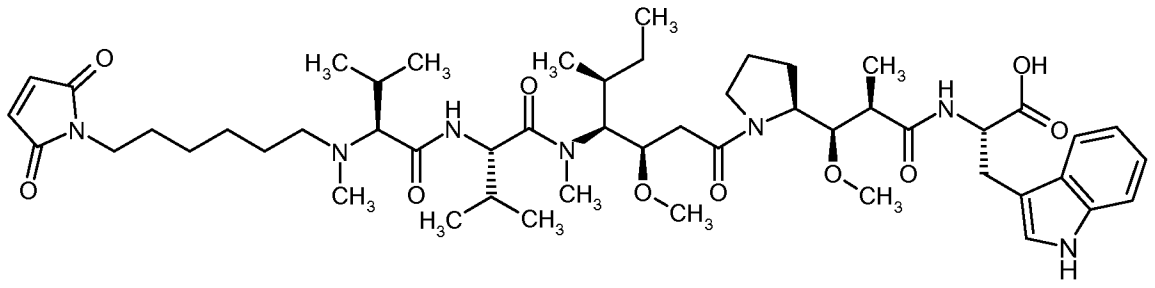
30 mg (30 µmol) von Intermediat 89 wurden in 2 ml 1,4-Dioxan aufgenommen und mit 4 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 7.5 mg (50 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-carboxylat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1h bei RT gerührt und danach im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 24 mg (74% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 1006 $(M+H)^+$.

**Intermediat 124**

*N*-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



22 mg (20 µmol) von Intermediat 123 wurden mit 4 ml Trifluoressigsäure in 8 ml Dichlormethan 1 h bei RT umgesetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene

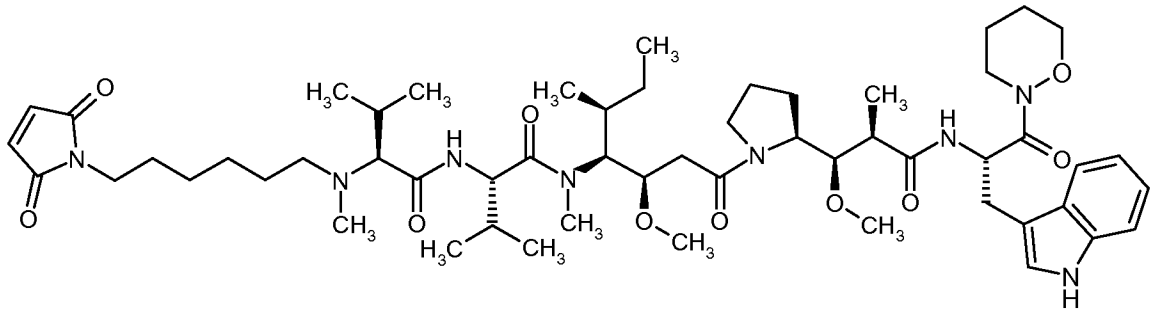
Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 11 mg (54% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 950 $(M+H)^+$.

**Intermediat 125**

*N*-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



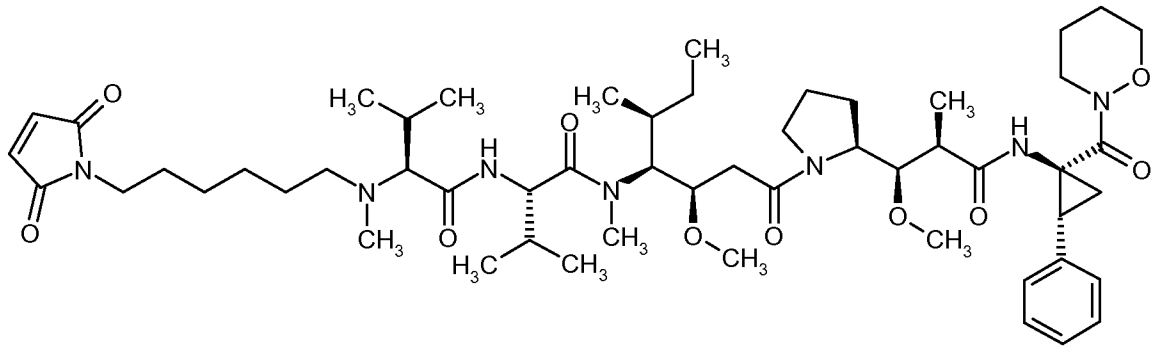
22.5 mg (20 µmol) von Intermediat 101 wurden in 2 ml Dioxan/Wasser 1:1 aufgenommen und anschließend mit 5.6 mg (40 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-carboxylat sowie mit 0.25 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 0.25 ml der gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 15 min bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 12.8 mg (50% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 1019 $(M+H)^+$.

**Intermediat 126**

*N*-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



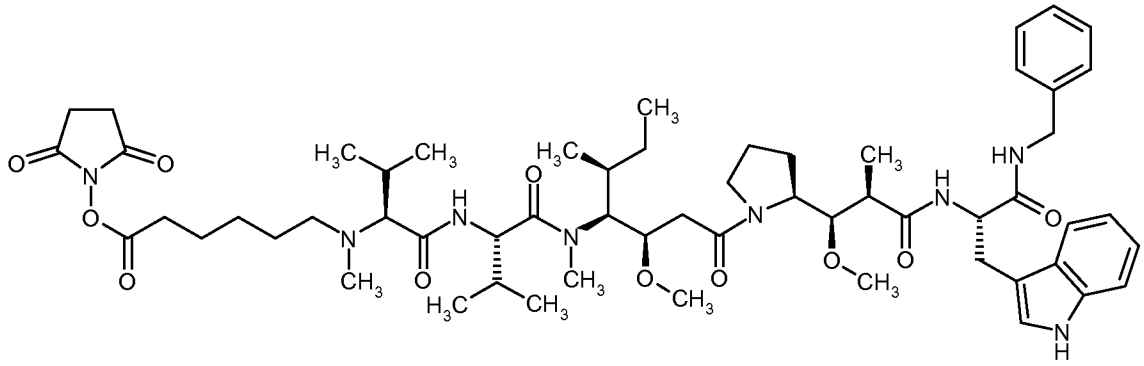
64 mg (70 µmol) *N*-(6-Aminohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 97) wurden in 3 ml Dioxan/Wasser 1:1 aufgenommen, dann mit 4 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 9 eingestellt und anschließend mit 16.3 mg (110 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-carboxylat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt und danach im Vakuum eingeengt. Dann wurden nochmals 8 mg (55 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-carboxylat nachgesetzt, das Reaktionsgemisch erneut auf pH 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Isoliert wurden zunächst 31 mg eines noch nicht cyclisierten Intermediats. 27 mg von diesem Intermediat wurden erneut in 2 ml Dioxan/Wasser 1:1 aufgenommen und dann mit 250 µl gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Nach 2 Stunden Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 20 mg (29% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.96 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 992 $(M+H)^+$.

**Intermediat 127**

*N*-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



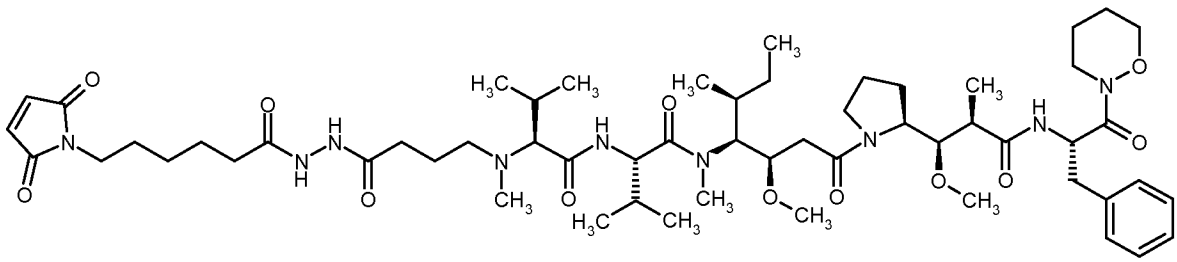
17 mg (18 µmol) *N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 98) wurden in 2.8 ml Dichlormethan gelöst und mit 20 mg (174 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und anschließend mit 10 mg (52 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 0.21 mg (0.17 µmol) DMAP versetzt. Nach 4 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 8.2 mg (43% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 $(M+H)^+$.

**Intermediat 128**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



5 mg (5.6 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 845 µl

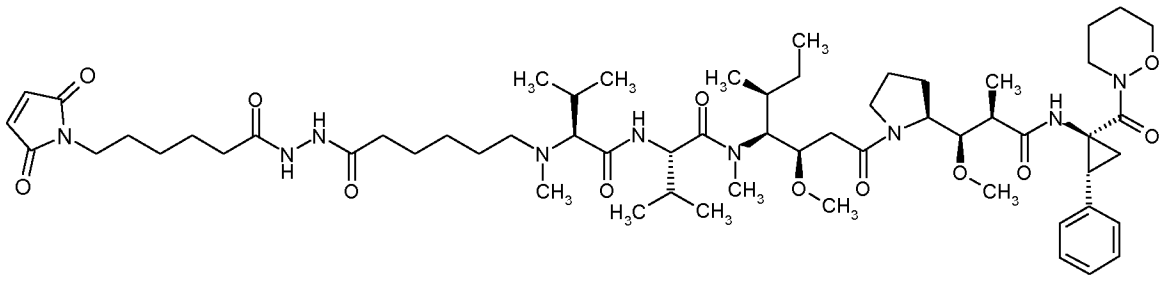
DMF gelöst und anschließend mit 3.2 mg (17 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 2.6 mg (17 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 1.96 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 5.9 mg (22.5 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 2.2 mg (36%) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 1094 $(M+H)^+$.

**Intermediat 129**

*N*-(6-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-6-oxohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



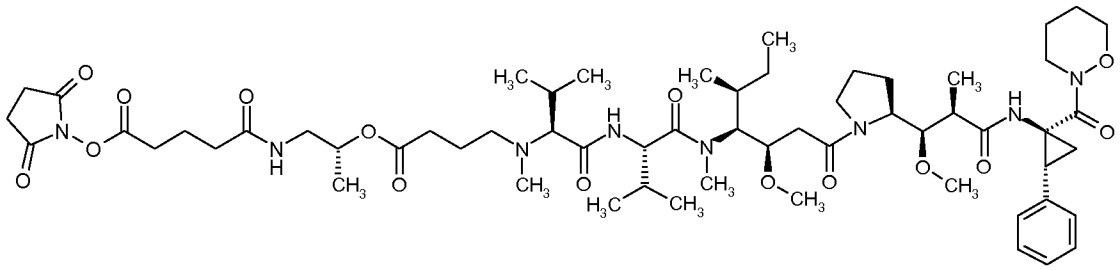
4 mg (4.3 µmol) *N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 646 µl DMF gelöst und anschließend mit 2.5 mg (13 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 2.0 mg (13 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 2.25 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 4.5 mg (17 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde 3h bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 1.9 mg (39%) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1134 $(M+H)^+$.

**Intermediat 130**

*N*-(4-{[(2*R*)-1-({5-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-5-oxopentanoyl}amino)propan-2-yl]oxy}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



10.5 mg (11.7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 3.7 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit 6.7 mg (35 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 0.7 mg (5.8 µmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie mit 8.2 mg (47 µmol) von kommerziell erhältlichem *tert.*-Butyl-[(2*R*)-2-hydroxypropyl]carbamat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 7.5 mg (61% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 1056 $(M+H)^+$.

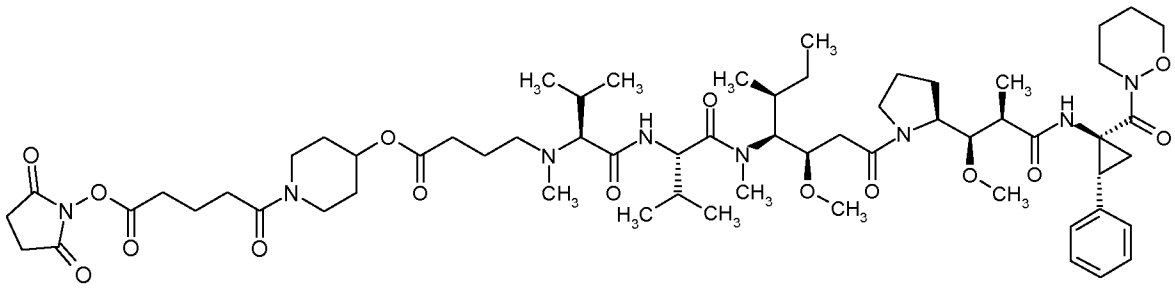
Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten. 4.9 mg (0.005 mmol) des entschützten Rohprodukts wurden dann ohne weitere Reinigung in 1.8 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 3.7 mg (0.011 mmol) 1,1'-[(1,5-Dioxopentan-1,5-diyl)bis(oxy)]dipyrrolidin-2,5-dion, 2.4 µl (0.014 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin und 0.6 mg (5 µmol) 4-Dimethylaminopyridin versetzt. Die Mischung wurde 2h bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 0.77 mg (15% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1167 $(M+H)^+$.

**Intermediat 131**

*N*-{4-[(1-{5-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-5-oxopentanoyl}piperidin-4-yl)oxy]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



10 mg (11 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit 4.3 mg (22 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 0.88 mg (6 µmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie mit 5.2 mg (22 µmol) kommerziell erhältlichem Benzyl-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 5 mg (40% d. Th.) des Z-geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.04 min; MS (ESIpos): m/z = 1116 $(M+H)^+$.

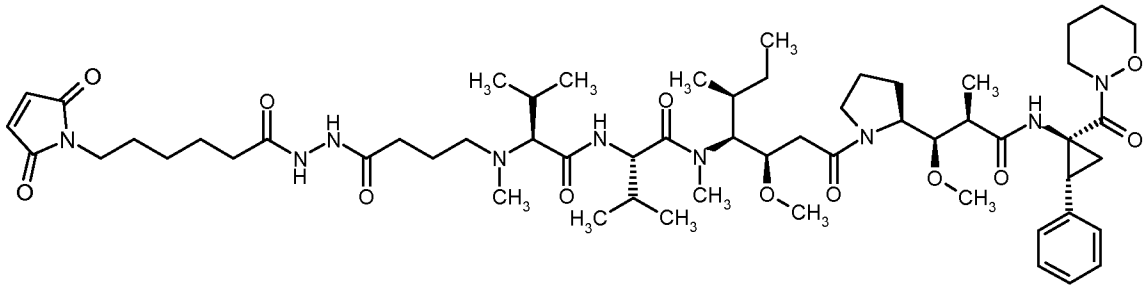
Anschließend wurde die Z-Schutzgruppe hydrogenolytisch in Ethanol über Palladium/Aktivkohle abgespalten. 4.6 mg (0.005 mmol) des entschützten Rohprodukts wurden dann ohne weitere Reinigung in 1.8 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 3.8 mg (0.012 mmol)1,1'-[(1,5-Dioxopentan-1,5-diyl)bis(oxy)]dipyrrolidin-2,5-dion, 0.8 µl (0.005 mmol) *N,N*-Diisopropylethyl amin und 0.6 mg (5 µmol) 4-Dimethylaminopyridin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 0.96 mg (16% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1193 $(M+H)^+$.

**Intermediat 132**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazinyl}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



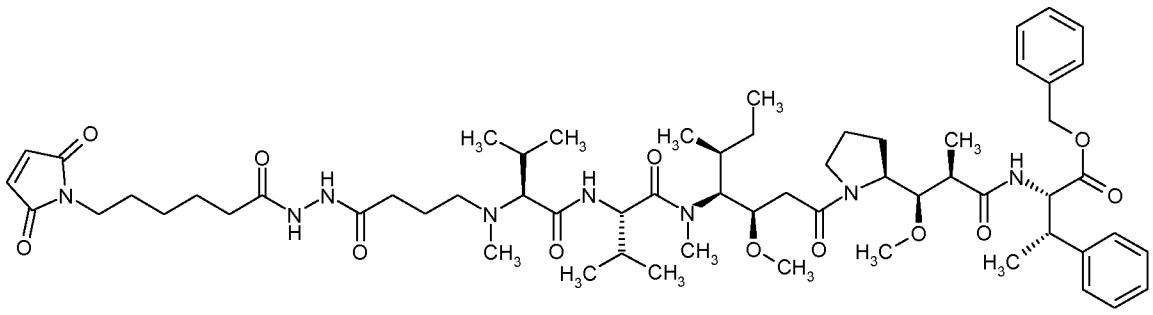
15 mg (16.7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 2500 µl DMF gelöst und anschließend mit 9.6 mg (50 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 7.6 mg (50 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 5.8 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 17.4 mg (67 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 11.2 mg (52% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 1106 $(M+H)^+$.

**Intermediat 133**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazinyl}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



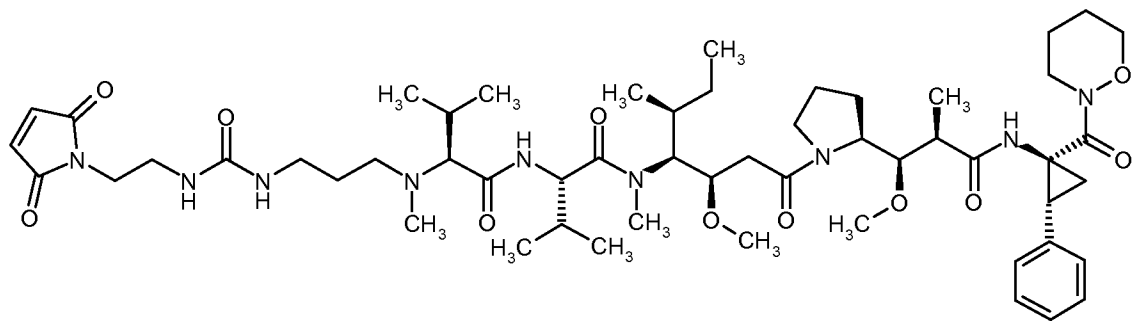
5.8 mg (6.3 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 943 µl DMF gelöst und anschließend mit 3.6 mg (19 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 2.9 mg (19 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 2.2 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 6.6 mg (25 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 4.5 mg (64% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 1129 $(M+H)^+$.

**Intermediat 134**

*N*-[3-({[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}amino)propyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde 4-Nitrophenyl-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamat nach Standardbedingungen ausgehend von kommerziell erhältlichem 1-(2-Aminoethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Trifluoracetat und 4-Nitrophenylchlorocarbonat hergestellt.

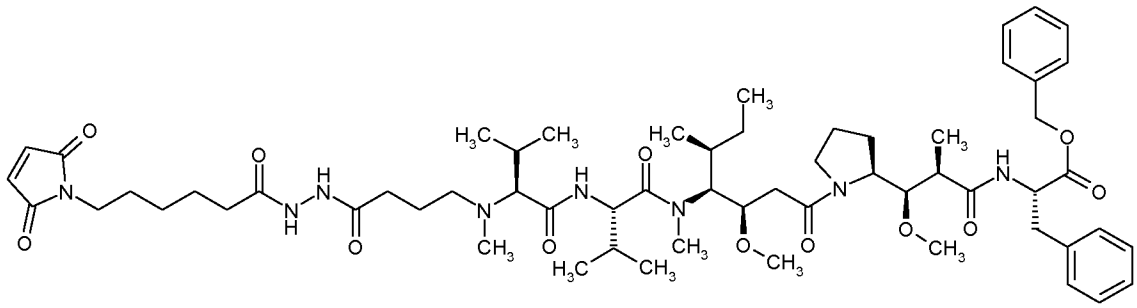
5 mg (6 µmol) *N*-(3-Aminopropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl] amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 1000 µl DMF gelöst und anschließend mit 2 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 2.2 mg (9 µmol) 4-Nitrophenyl-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamat versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 1.6 mg (23% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 1036 $(M+H)^+$.

**Intermediat 135**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



10 mg (11 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 4000 µl DMF gelöst und anschließend mit 6.3 mg (33 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 4.5 mg (33 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 5.7 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 11.5 mg (44 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-

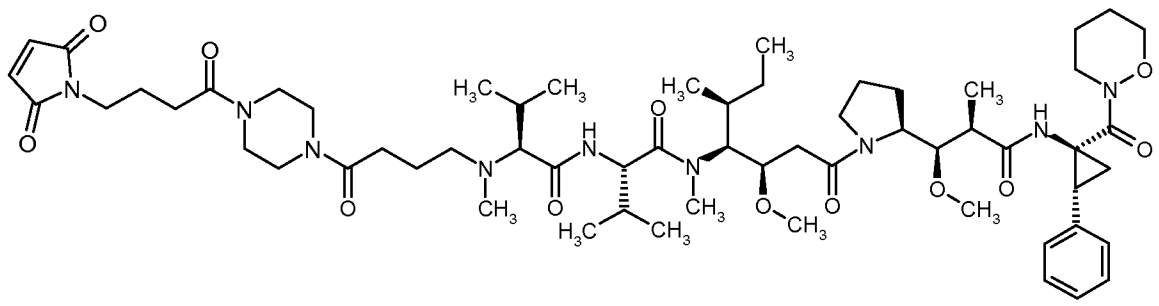
dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 2.6 mg (14% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 1115 $(M+H)^+$.

**Intermediat 136**

*N*-(4-{4-[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butanoyl]piperazin-1-yl}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde 1-[4-Oxo-4-(piperazin-1-yl)butyl]-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Trifluoracetat nach Standardbedingungen ausgehend von tert.-Butylpiperazin-1-carboxylat und 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butansäure über 2 Stufen hergestellt.

5 mg (5.6 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 1000 µl DMF gelöst und anschließend mit 2.1 mg (11 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 1.7 mg (11 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 2 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 3.5 mg (5.6 µmol) 1-[4-Oxo-4-(piperazin-1-yl)butyl]-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Trifluoracetat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden 2.1 mg (5.6 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat hinzugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 3h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC

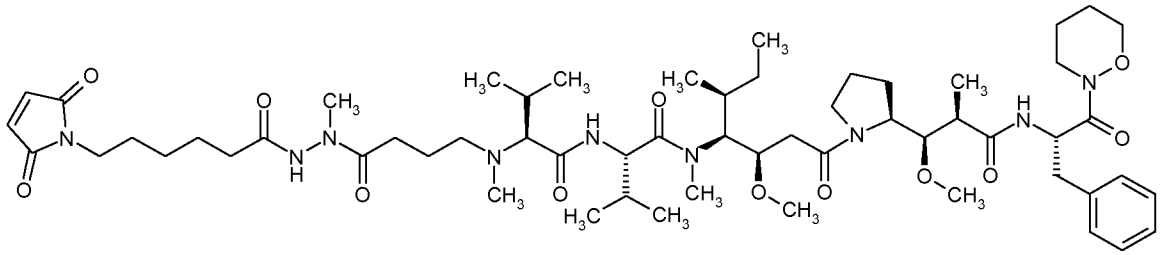
aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und durch Lyophilisation aus Wasser wurden 0.6 mg (10% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1132 $(M+H)^+$.

**Intermediat 137**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-1-methylhydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*'-methylhexanhydrazid-Trifluoracetat nach Standardbedingungen ausgehend von kommerziell erhältlicher 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexansäure und *tert.*-Butyl-1-methylhydrazincarboxylat über 2 Stufen hergestellt.

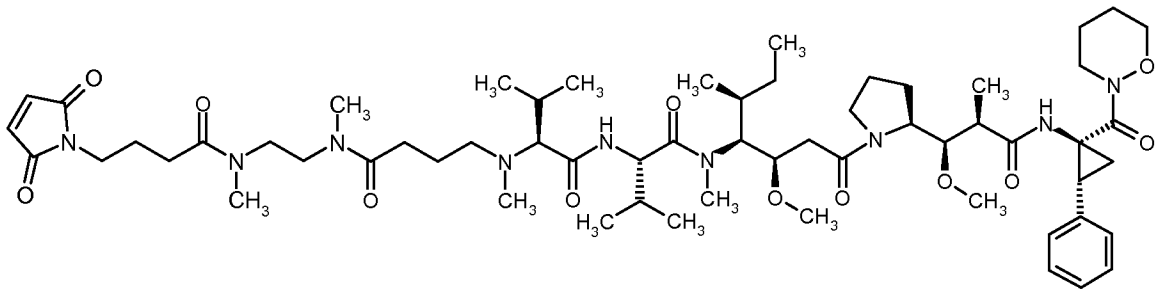
6.9 mg (8 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 2540 µl DMF gelöst und anschließend mit 3.6 mg (9 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 3 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin sowie mit 4.1 mg (12 µmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*'-methylhexanhydrazid-Trifluoracetat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 3.9 mg (45% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1108 $(M+H)^+$.

**Intermediat 138**

*N*-{4-[(2-{[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butanoyl](methyl)amino}ethyl)(methyl)amino]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Ausgehend von *tert.*-Butyl-methyl[2-(methylamino)ethyl]carbamat und 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butansäure wurde zunächst über 2 Stufen 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-methyl-*N*-[2-(methylamino)ethyl]butanamid-Trifluoracetat nach hergestellt.

6.6 mg (7.3 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 2000 µl DMF gelöst und anschließend mit 5.6 mg (14.7 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 2.6 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin sowie mit 4.1 mg (9 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-methyl-*N*-[2-(methylamino)ethyl]butanamid-Trifluoracetat versetzt. Nach 3 h Rühren bei RT wurden noch mal die gleichen Mengen an HATU und *N*,*N*-Diisopropylethylamin zugesetzt und das Reaktionsgemisch dann über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 4 mg (44% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

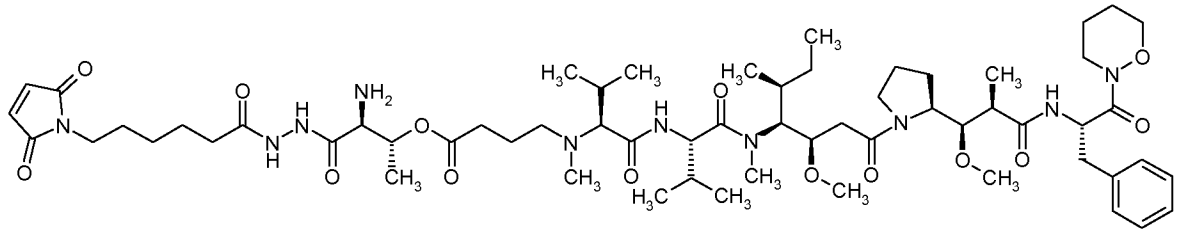
HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1134 $(M+H)^+$.

**Intermediat 139**

(2*R*,3*S*)-3-Amino-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutan-2-yl-(3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-[(2*S*)-butan-2-yl]-7,10-diisopropyl-3-(2-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-

methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-oat



13 mg (14.7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit 8.4 mg (44 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 5.4 mg (44 µmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie mit 9 mg (29.3 µmol) von kommerziell erhältlichem Benzyl-*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)-L-threoninat versetzt. Die Mischung wurde 5h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zweimal mit Wasser ausgeschüttelt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 14 mg (81% d. Th.) des geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.3 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 1178 $(M+H)^+$.

Anschließend wurde die Z-Schutzgruppe hydrogenolytisch in Methanol über 10% Palladium/Aktivkohle abgespalten. 9.5 mg (0.0087 mmol) des entschützten Rohprodukts wurden dann ohne weitere Reinigung in 5 ml DMF aufgenommen und 5 mg (26.2 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 4 mg (26.2 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 54.6 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 9.1 mg (34.9 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 9.5 mg (84% d.Th.) des Boc-geschützten Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 1295 $(M+H)^+$.

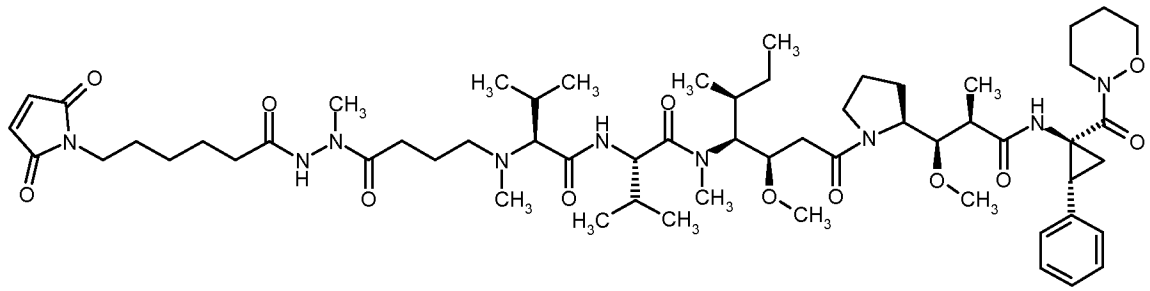
Anschließend wurden 9.5 mg (7.3 µmol) mit 0.5 ml Trifluoressigsäure in 2 ml Dichlormethan des Boc-geschützten Intermediats entschützt und nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 9 mg (82% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 1195 $(M+H)^+$.

**Intermediat 140**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-1-methylhydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



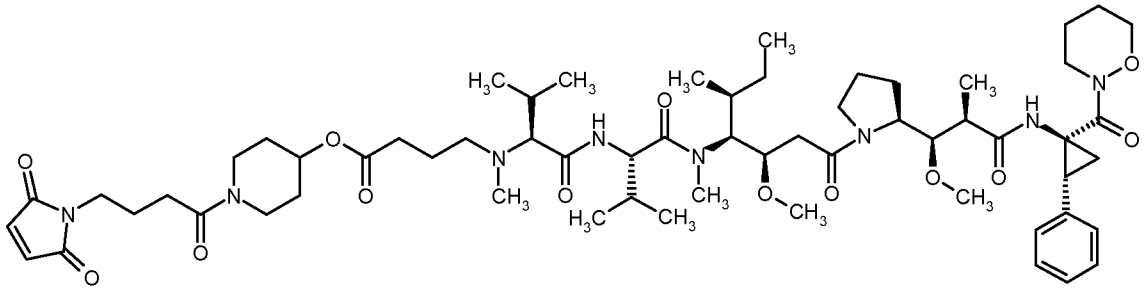
4.1 mg (12µmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*'-methylhexanhydrazid-Trifluoracetat (Intermediat 22) wurden zusammen mit 6.9 mg (8 µmol) der Verbindung aus Intermediat 61 in 2.5 ml DMF gelöst und anschließend mit 3.5 mg (9 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 3 µL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 2.6 mg (30% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.90 und 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1120 $(M+H)^+$.

**Intermediat 141**

*N*-[4-({1-[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butanoyl]piperidin-4-yl}oxy)-4-oxobutyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



44 mg (49 µmol) N-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit 18.8 mg (98 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 3.8 mg (24 µmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie mit 23 mg (98 µmol) von kommerziell erhältlichem Benzyl-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 22 mg (40% d. Th.) des Z-geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.04 min; MS (ESIpos): m/z = 1116 $(M+H)^+$.

Anschließend wurde die Z-Schutzgruppe hydrogenolytisch in Ethanol über Palladium/Aktivkohle abgespalten.

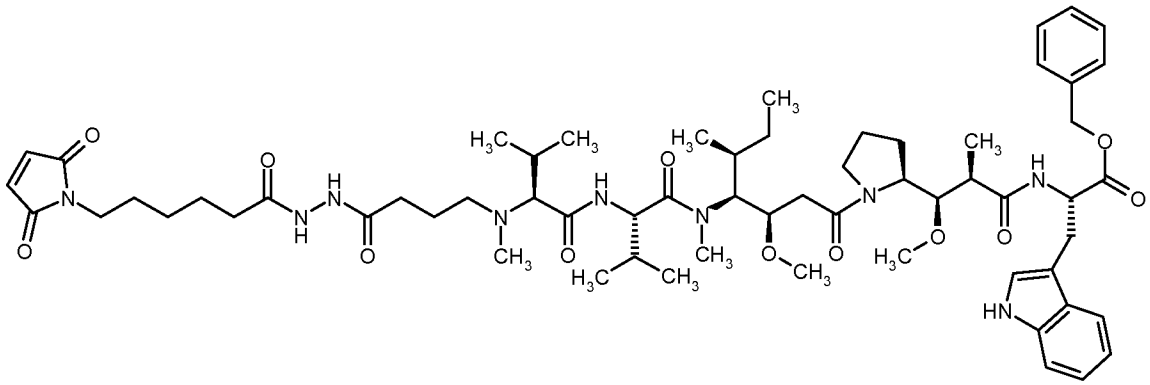
19 mg (19 µmol) des entschützten Rohprodukts wurden dann ohne weitere Reinigung in 4 ml DMF aufgenommen und mit 7 mg (39 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butansäure, 11 mg (29 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 5 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 7.5 mg (34% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1147 $(M+H)^+$.

**Intermediat 142**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



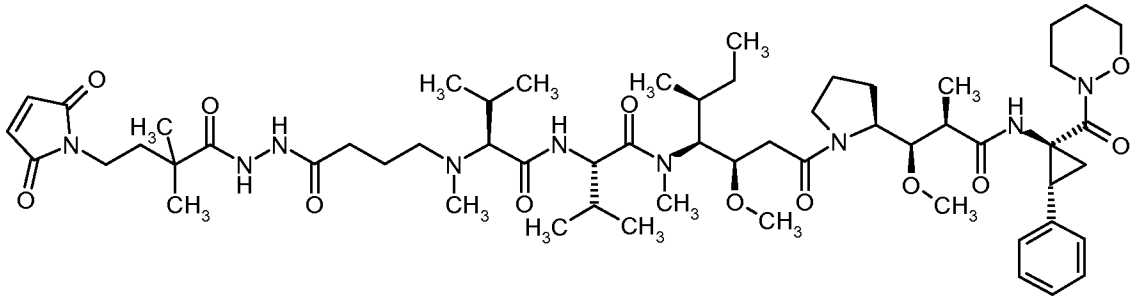
9 mg (9.5 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 72) wurden in 1000 µl DMF gelöst und anschließend mit 10 mg (38 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid, 7.2 mg (19µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 8 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt und das Reaktionsgemisch 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und durch Lyophilisation wurden 6.4 mg (58% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.99 min; MS (ESIpos): m/z = 1154 $(M+H)^+$.

**Intermediat 143**

*N*-(4-{2-[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



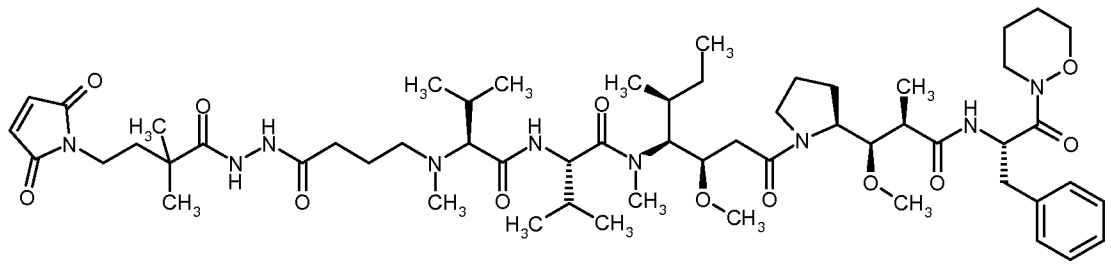
6 mg (6.7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 61) wurden mit 3 mg (8.7 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanhydrazid-Trifluoracetat in Analogie zu Intermediat 142 zu 2 mg (27% d.Th.) der Titeleverbindung umgesetzt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.92 min; MS (ESIpos): m/z = 1106 $(M+H)^+$.

**Intermediat 144**

*N*-(4-{2-[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



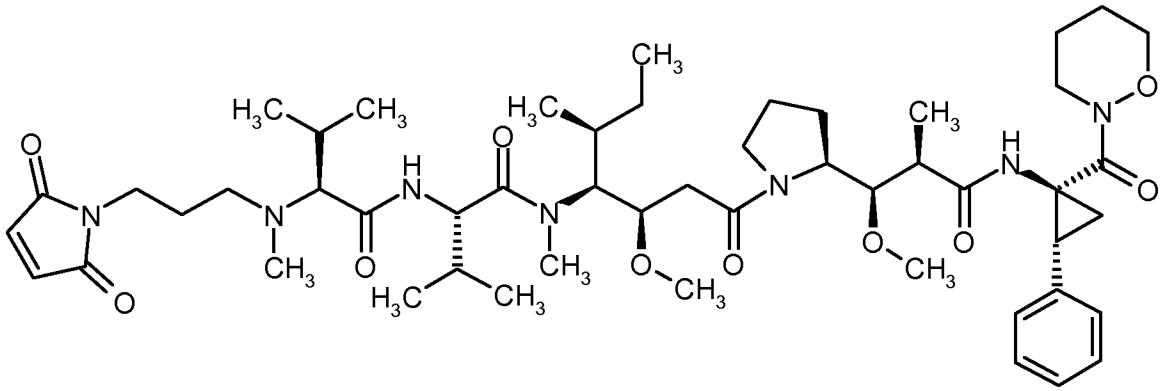
Zu einer Lösung von 5 mg (5.6 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid in 1 ml DMF wurden 7.65 mg (22.5 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanhydrazid-Trifluoracetat, 3.2 mg (16.9 µmol) EDC, 1.96 µl (11.3 µmol) Diisopropylethylamin sowie 2.6 mg (16.9 µmol) HOBT gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurden weitere 0.95 mg (2.8 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-

pyrrol-1-yl)-2,2-dimethylbutanhydrazid-Trifluoracetat nachgegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und per präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 3.5 mg (85%ig, 48% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.86 min; m/z = 1094 $(M+H)^+$.

**Intermediat 145**

*N*-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



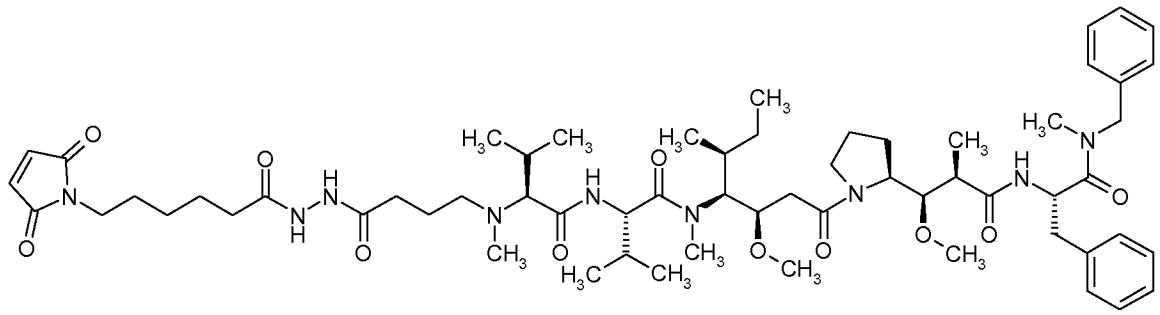
12 mg (14 µmol) *N*-(3-Aminopropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 66) wurden in 750 µl Dioxan aufgenommen und mit 1.5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 3.2 mg (21 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-carboxylat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1h bei RT gerührt und danach im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 4.2 mg (32% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 950 $(M+H)^+$.

**Intermediat 146**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(2*S*)-1-[benzyl(methyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



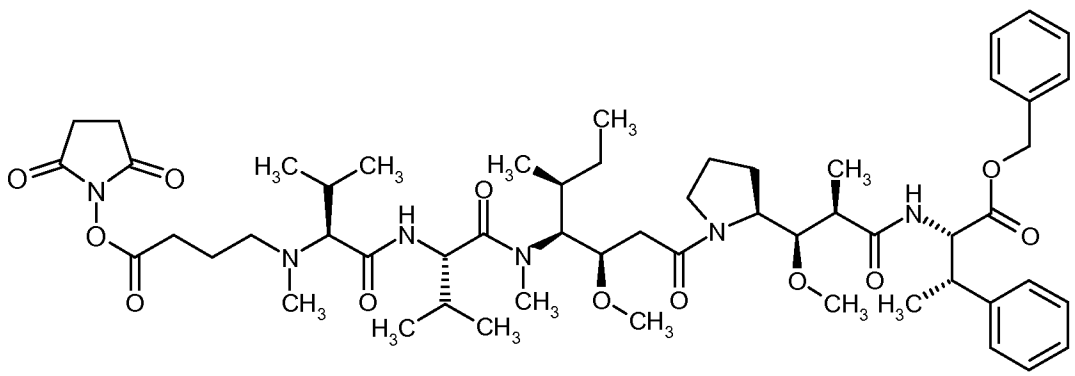
9 mg (9.8 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-({(2*S*)-1-[benzyl(methyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 73) wurden in Analogie zu Intermediat 133 mit 10 mg (39 µmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid zu 1.8 mg (15% d.Th.) der Titelverbindung umgesetzt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 5.11 min; MS (ESIpos): m/z = 1128 $(M+H)^+$.

**Intermediat 147**

*N*-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

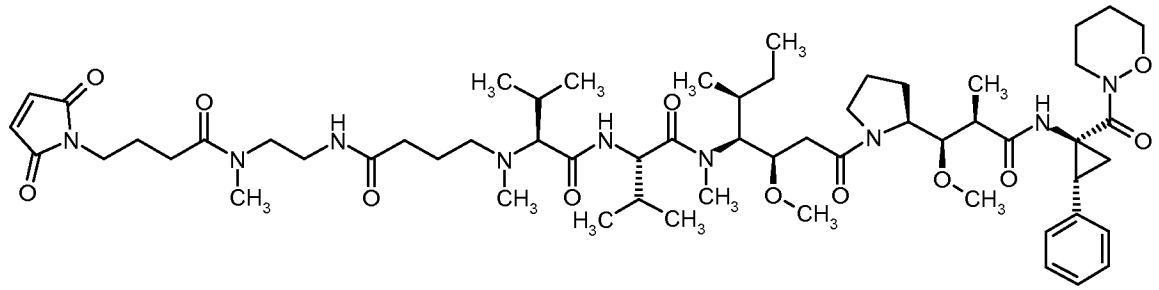


16 mg (17 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 70) wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst und mit 2.6 mg (23 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und anschließend mit 4 mg (21 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurden nochmals die gleichen Mengen an 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid nachgesetzt. Dann Rühren über Nacht bei RT wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 10 mg (56% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

**Intermediat 148**

*N*-{4-[(2-{[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butanoyl](methyl)amino}ethyl)amino]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



6 mg (7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 61) wurden mit 2.8 mg (8 µmol) *N*-(2-Aminoethyl)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-methylbutanamid-Trifluoracetat, 10.1 mg (27 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 5 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin in 2 ml DMF zusammengegeben und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 5 mg (23.5 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 3 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin nachgesetzt. Nach weiteren 5 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die

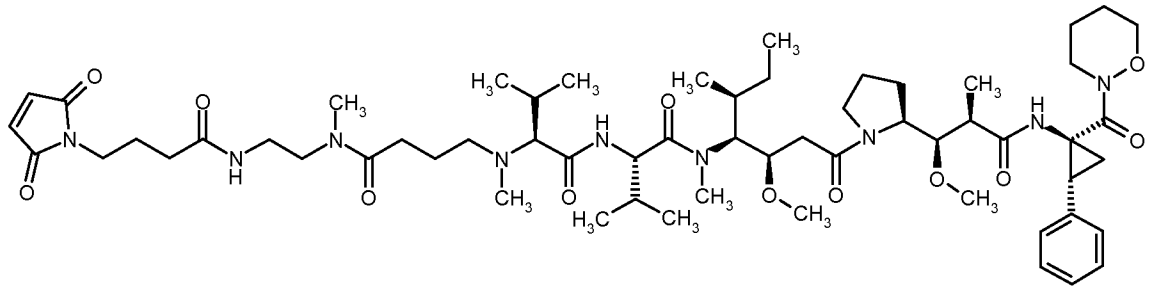
entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und durch Lyophilisation aus Dioxan wurden 1.3 mg (15% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.21 min; MS (ESIpos): m/z = 1120 $(M+H)^+$.

**Intermediat 149**

*N*-{4-[(2-{[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butanoyl]amino}ethyl)(methyl)amino]-4-oxobutyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



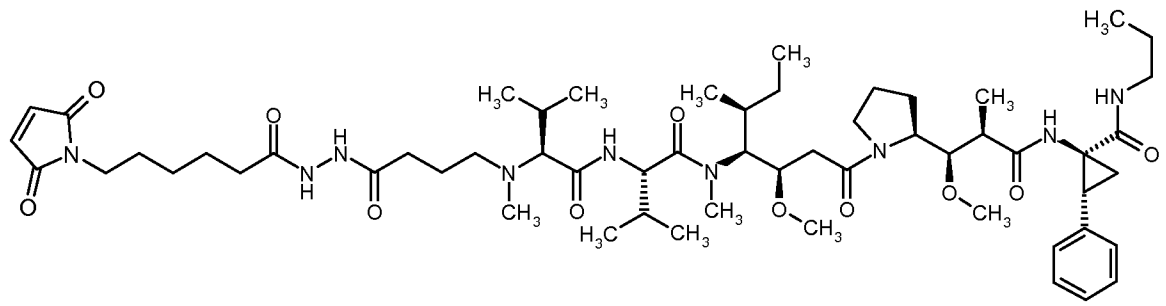
6 mg (7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 61) wurden mit 3.1 mg (9 µmol) 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-[2-(methylamino)ethyl]butanamid-Trifluoracetat, 10.1 mg (27 µmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und 5 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin in 2 ml DMF zusammengegeben und 4 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und durch Lyophilisation aus Dioxan wurden 1 mg (13.4% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1121 $(M+H)^+$.

**Intermediat 150**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*,2*R*)-2-phenyl-1-(propylcarbamoyl)cyclopropyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



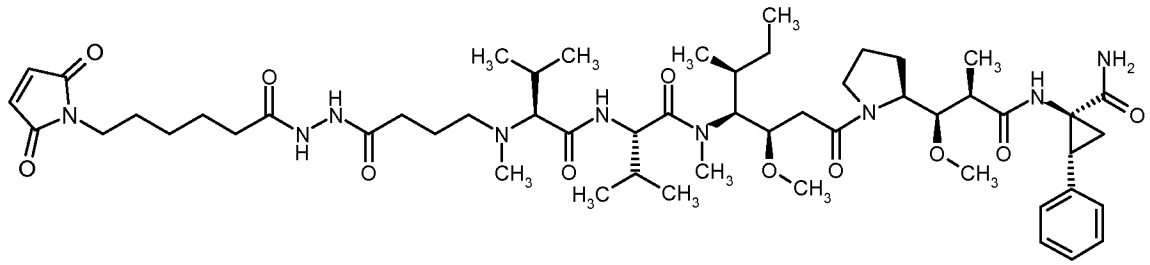
7.9 mg (9 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*,2*R*)-2-phenyl-1-(propylcarbamoyl)cyclopropyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 3 ml DMF gelöst und anschließend mit 10.4 mg (54 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 8.3 mg (54 µmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat, 9 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 9.5 mg (36 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 4.3 mg (22% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1078 $(M+H)^+$.

**Intermediat 151**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-carbamoyl-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



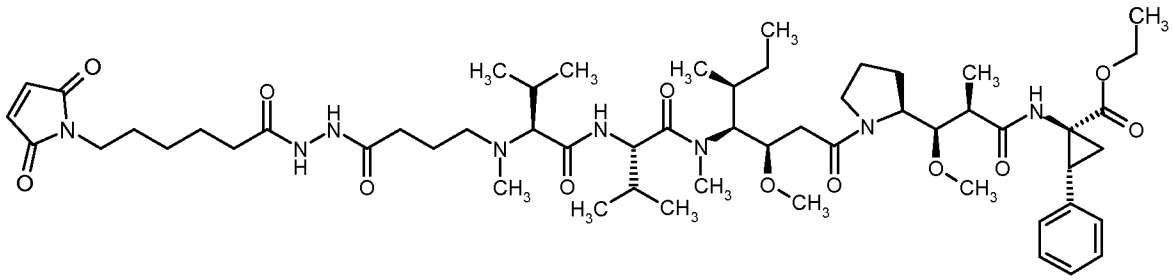
Die Verbindung wurde ausgehend von der Verbindung in Intermediat 81 analog zu Intermediat 150 hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1036 $(M+H)^+$.

**Intermediat 152**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(ethoxycarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



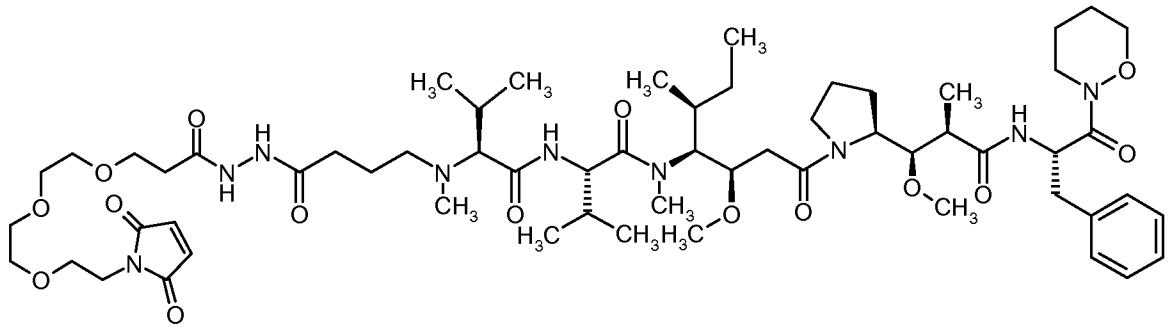
10 mg (12 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(ethoxycarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 3 ml DMF gelöst und anschließend mit 8.9 mg (23 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 10 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 12 mg (47 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Hochvakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 5.8 mg (37 % d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.99 min; MS (ESIpos): m/z = 1066 $(M+H)^+$.

**Intermediat 153**

*N*-[1-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-12,15-dioxo-3,6,9-trioxa-13,14-diazaoctadecan-18-yl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



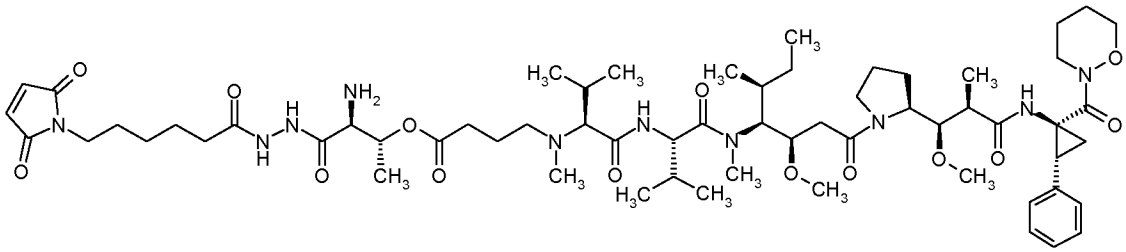
Zu einer Lösung von 5 mg (5.6 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid in 1 ml DMF wurden 9.7 mg (22.5 µmol) 3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propanhydrazid-Trifluoracetat, 3.2 mg (16.9 µmol) EDC, 1.96 µl (11.3 µmol) N,N-Diisopropylethylamin sowie 2.6 mg (16.9 µmol) HOBT gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurden weitere 1.2 mg (2.8 µmol) 3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propanhydrazid-Trifluoracetat nachgegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend per präparativer HPLC gereinigt.

Es wurden 3.6 mg (51% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.90 min; m/z = 1185 $(M+H)^+$.

**Intermediat 154**

(2*R*,3*S*)-3-Amino-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutan-2-yl-(3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-[(2*S*)-butan-2-yl]-7,10-diisopropyl-3-(2-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-oat



15 mg (17 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und anschließend mit 12.8 mg (67 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 10 mg (83 µmol) 4-Dimethylaminopyridin sowie mit 10.3 mg (33 µmol) von kommerziell erhältlichem Benzyl-*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)-L-threoninat versetzt. Die Mischung wurde 4 h zum Rückfluß erhitzt. Dann wurden erneut die gleichen Mengen an Kupplungsreagenz und 4-Dimethylaminopyridin nachgesetzt und das Reaktionsgemisch über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan verdünnt, einmal mit Wasser ausgeschüttelt, die organische Phase abgetrennt und im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 7.7 mg (37% d. Th.) des geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 1190 $(M+H)^+$.

Anschließend wurde die Benzylester-Schutzgruppe durch Hydrierung unter Wasserstoff-Normaldruck in Methanol über 10% Palladium/Aktivkohle entfernt, und die so erhaltene Säure wie in Intermediat 151 beschrieben mit 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid verknüpft. In einem letzten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure abgelöst. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 0.22 mg (2.5% d. Th. über 3 Stufen) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

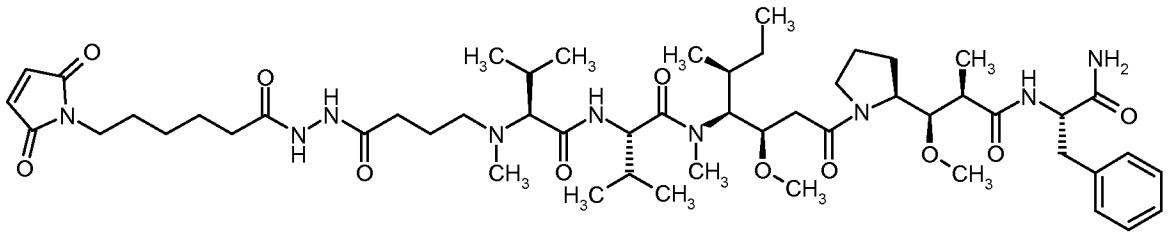
HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 1207 $(M+H)^+$.

**Intermediat 155**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-

methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



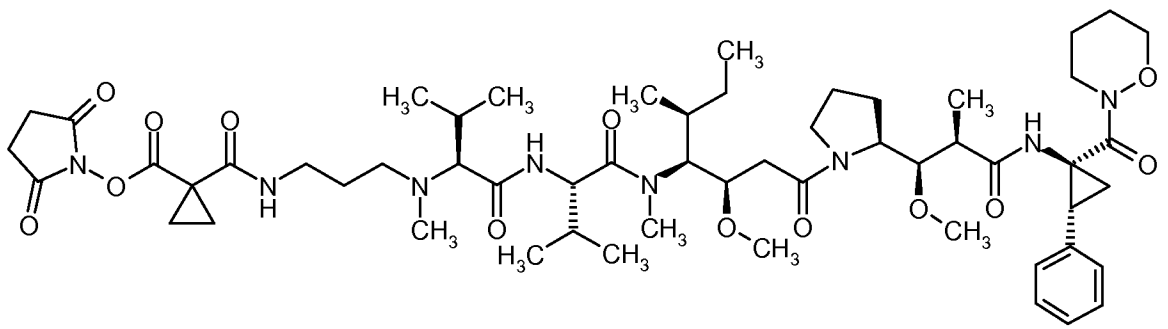
Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 152 beschriebenen Synthese aus *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1024 $(M+H)^+$.

**Intermediat 156**

*N*-(3-{[(1-{[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl}cyclopropyl)carbonyl]amino}propyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur letzten Stufe der in Intermediat 131 beschriebenen Synthese aus *N*-(3-Aminopropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und 1,1'-

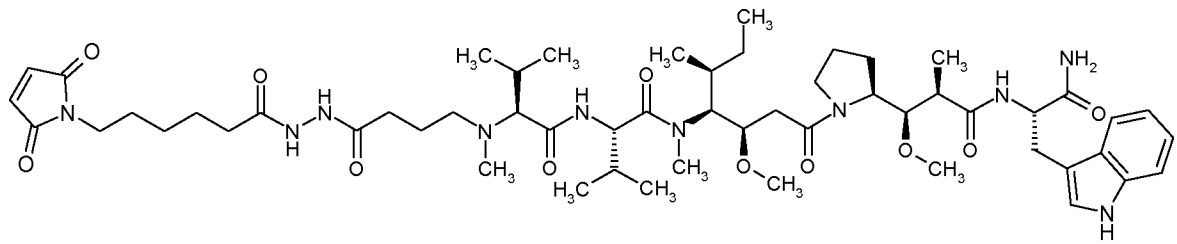
[Cyclopropan-1,1-diylbis(carbonyloxy)]dipyrrolidin-2,5-dion, das zuvor aus der entsprechenden Dicarbonsäure gewonnen wurde, hergestellt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 1080 $(M+H)^+$.

**Intermediat 157**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



15 mg (18 µmol) (*N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 3.8 ml DMF gelöst und anschließend mit 27 mg (70 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 12 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin sowie mit 14 mg (53 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 6.2 mg (33 % d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

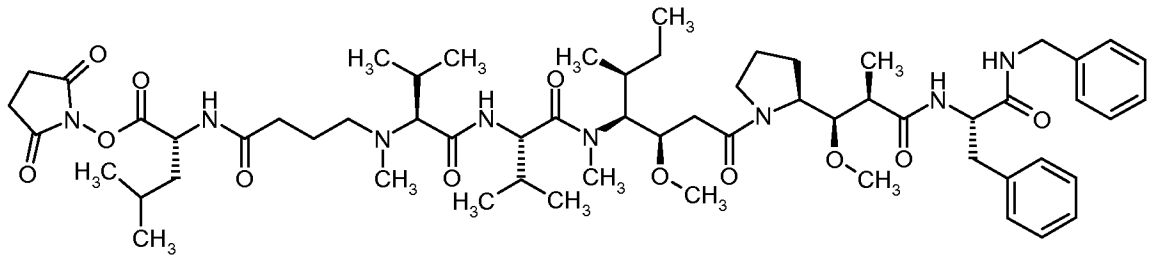
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1063 $(M+H)^+$.

$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, charakteristische Signale): δ = 10.8 (d, 1H), 9.8-9.7 (m, 2H), 9.6 und 9.4 (2m, 1H), 8.9, 8.88, 8.78 und 8.75 (4d, 1H), 8.08 und 7.85 (2d, 1H), 7.6-6.9 (m, 9H), 4.7-4.4 (m, 3H), 3.4 (t, 2H), 3.23, 3.2, 3.18, 3.0, und 2.99 (5s, 9H), 2.8 (m, 3H), 2.1 (t, 2H), 1.06 und 1.01 (2d, 3H), 0.95-0.8 (m, 15H), 0.8-0.75 (dd, 3H).

**Intermediat 158**

*N*-[4-({(2*R*)-1-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-methyl-1-oxopentan-2-yl}amino)-4-oxobutyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



13 mg (14.7 µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid wurden in 4 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend mit 9.4 mg (25 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 6 µL *N*,*N*-Diisopropylethylamin sowie mit 7 mg (31 µmol) von kommerziell erhältlichem *tert.*-Butyl-D-leucinat-Hydrochlorid versetzt. Die Mischung wurde 5h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan/Wasser wurden 6.5 mg (49% d. Th.) des geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

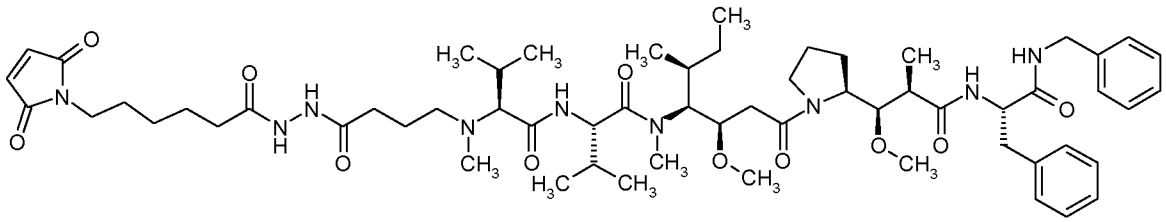
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.21 min; MS (ESIpos): m/z = 1076 $(M+H)^+$.

Aus diesem geschützten Intermediat wurde zunächst mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan die Boc-Schutzgruppe abgspalten, wobei 6.2 mg (99% d.Th.) der entschützten Verbindung erhalten wurden. 5.2 mg (5µmol) dieses Intermediats wurden in 1.5 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 0.8 mg (7 µmol) *N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von 1.2 mg (6 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 0.16 mg (1 µmol) 4-Dimethylaminopyridin umgesetzt. Nach 2h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 1.3 mg der Titelverbindung erhalten, die teilweise zum Edukt hydrolysierte.

**Intermediat 159**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese aus *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

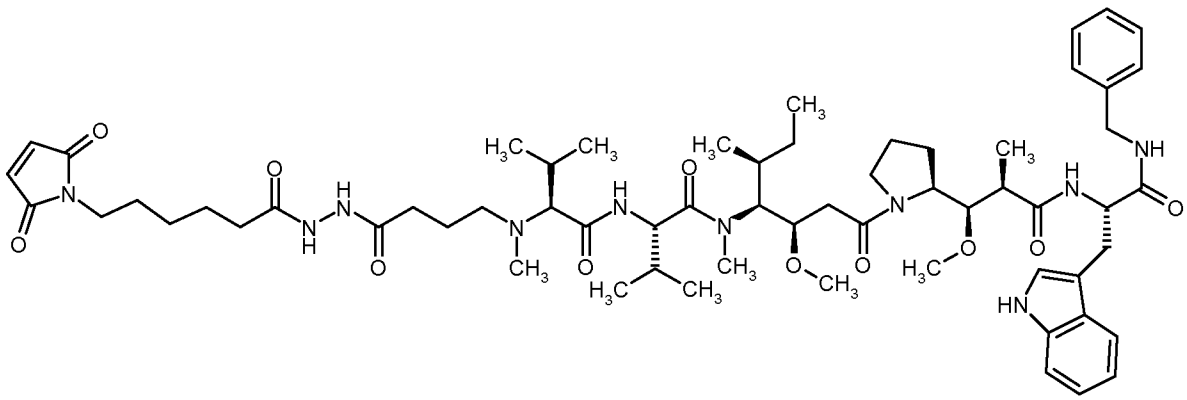
Ausbeute: 6 mg (53% d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1114 $(M+H)^+$.

**Intermediat 160**

*N*-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese aus 20 mg

(21µmol) *N*-(3-Carboxypropyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

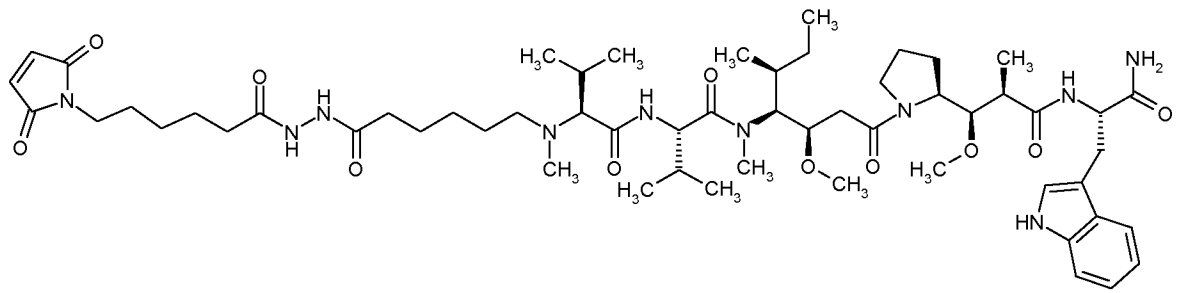
Ausbeute: 13 mg (52% d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 1153 $(M+H)^+$.

**Intermediat 161**

*N*-(6-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-6-oxohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese aus *N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

Ausbeute: 0.8 mg (16% d.Th.)

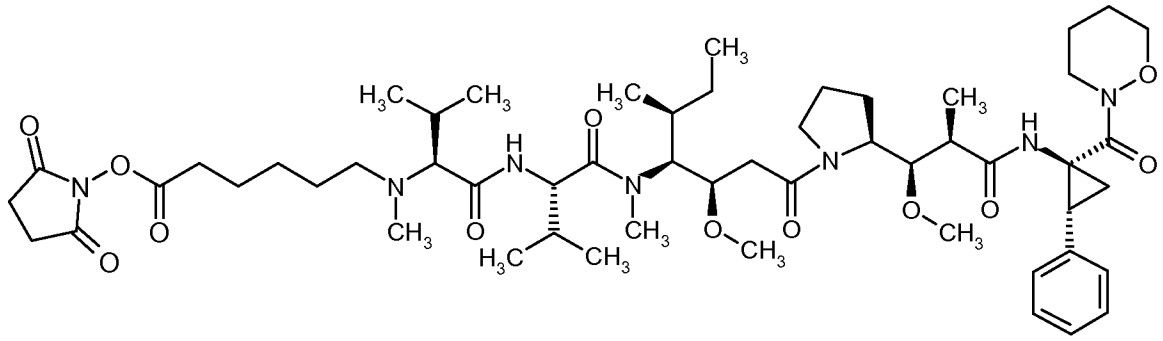
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 1092 $(M+H)^+$.

**Intermediat 162**

*N*-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-

phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



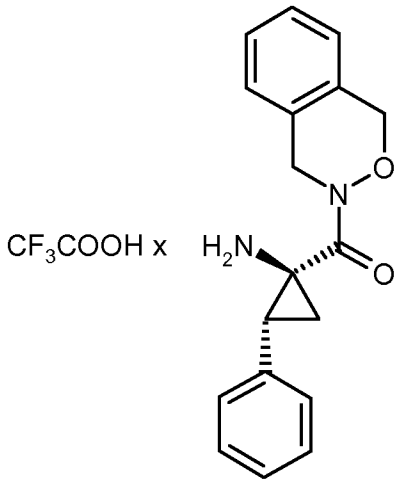
18 mg (20 µmol) *N*-(5-Carboxypentyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 64) wurden in 3.2 ml Dichlormethan gelöst und mit 22 mg (190 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und anschließend mit 11 mg (60 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 0.24 mg (0.17 µmol) DMAP versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurden erneut 22 mg (190 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion, 11 mg (60 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 0.24 mg (0.17 µmol) DMAP zugegeben und das Reaktionsgemisch eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 8.2 mg (41% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1024 $(M+H)^+$.

**Intermediat 163**

[(1*S*,2*R*)-1-Amino-2-phenylcyclopropyl](1,4-dihydro-3*H*-2,3-benzoxazin-3-yl)methanon-Trifluoracetat




Zunächst wurde ausgehend von 265 mg (0.82 mmol) *tert.*-Butyl-[(1*S*,2*R*)-1-(hydroxycarbamoyl)-2-phenylcyclopropyl]carbamat (Ausgangsverbindung 7) durch Reaktion mit 1,2-Bis(brommethyl)benzol analog einer Literaturvorschrift (siehe H. King, *J. Chem. Soc.* 1942, 432) das Boc-geschützte Intermediat tert.-Butyl-[(1S,2R)-1-(1,4-dihydro-3H-2,3-benzoxazin-3-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]carbamat hergestellt.

Ausbeute: 108 mg (34% d. Th.)

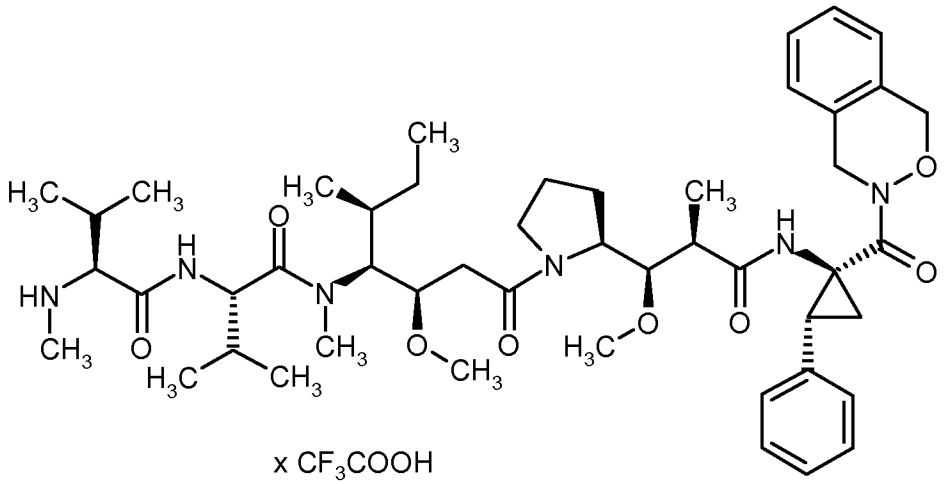
LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.3 min; MS (ESIpos): m/z = 395 $(M+H)^+$.

108 mg (0.27 mmol) dieses Intermediats wurden in 3.7 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 1.8 ml Trifluoressigsäure versetzt und 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand aus Dioxan lyophilisiert. Es wurden 112 mg der Titelverbindung in quantitativer Ausbeute als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.7 min; MS (ESIpos): m/z = 295 $(M+H)^+$.

**Intermediat 164**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,4-dihydro-3*H*-2,3-benzoxazin-3-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat




166 mg (0.196 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 10) wurden in 40 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 80 mg (0.196 mmol) [(1*S*,2*R*)-1-Amino-2-phenylcyclopropyl](1,4-dihydro-3*H*-2,3-benzoxazin-3-yl)methanon-Trifluoracetat (Intermediat 163), 112 mg (0.294 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 682 µl (3.9 mmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach im Vakuum eingeengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und die Lösung mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde schließlich durch präparative HPLC gereinigt. Man erhielt auf diese Weise 19 mg (9% d. Th.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,4-dihydro-3*H*-2,3-benzoxazin-3-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.68 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 1083 $(M+H)^+$.

19 mg (0.015 mmol) dieses Intermediats wurden in 4 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 817 µl Piperidin wurde das Reaktionsgemisch 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand zunächst mit Diethylether digeriert und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Eluent: Acetonitril + 0.1% TFA / 0.1% aq. TFA). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand dann aus

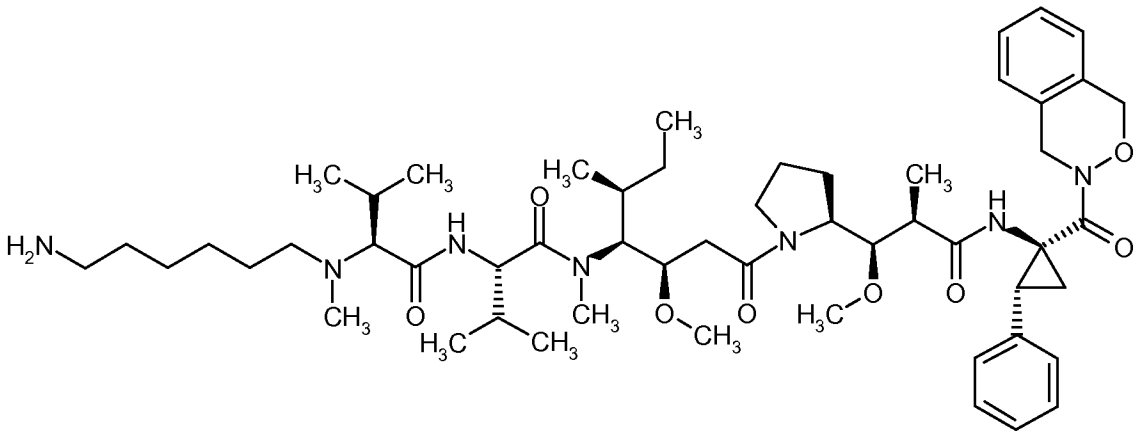
Dioxan/Wasser lyophilisiert. Es wurden 12 mg (92% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 861 $(M+H)^+$.

**Intermediat 165**

N-(6-Aminohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-(1,4-dihydro-3H-2,3-benzoxazin-3-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Aus 20 mg (0.021 mmol) von Intermediat 164 wurden in Analogie zur Herstellung von Intermediat 97 mit Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid und nachfolgender hydrogenolytischer Abspaltung der Z-Schutzgruppe (mit 5% Palladium auf Kohle als Katalysator, in Methanol als Lösungsmittel) die Titelverbindung hergestellt.

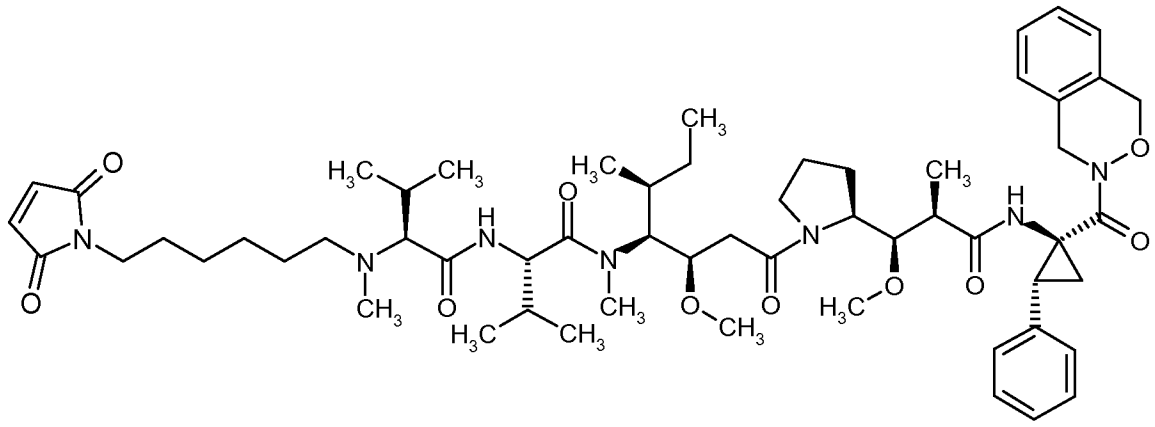
Ausbeute: 4.5 mg (23% d. Th. Über 2 Stufen)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 960 $(M+H)^+$.

**Intermediat 166**

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-(1,4-dihydro-3H-2,3-benzoxazin-3-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



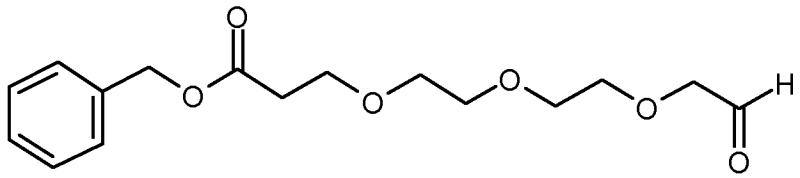
4.4 mg (4.5 µmol) von Intermediat 165 wurden in 1 ml Dioxan/Wasser 1:1 aufgenommen und anschließend mit 1 mg (6.8 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat sowie mit 50µl gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 50 µl der gesättigten wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 15 min bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 1 mg (21% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.08 min; MS (ESIpos): m/z = 1040 $(M+H)^+$.

**Intermediat 167**

Benzyl-3-{2-[2-(2-oxoethoxy)ethoxy]ethoxy}propanoat



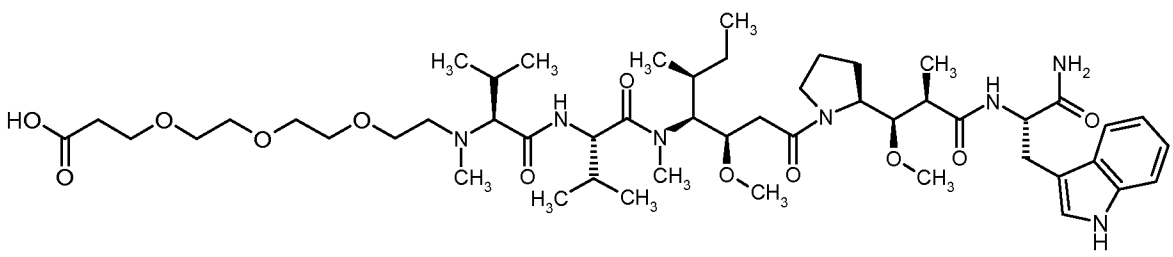
Die Titelverbindung wurde aus 6 g (21.55 mmol) von kommerziell erhältlicher 3-{2-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy}propansäure nach Standardbedingungen zunächst durch Veresterung mit Benzylchlorid und Caesiumcarbonat und anschließender Oxidation mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex hergestellt.

Ausbeute: 611 mg (10% d.Th. über 2 Stufen)

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.69 min; MS (ESIpos): m/z = 311 $(M+H)^+$.

**Intermediat 168**

N-(2-{2-[2-(2-Carboxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in den Intermediat 69 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) und $N^{\alpha}$-{(2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-tryptophanamid-Trifluoracetat (Intermediat 49) in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin die Amin-Verbindung *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt.

25 mg (0.028 mmol) dieser Verbindung und 17.5 mg (0.06 mmol) von Intermediat 167 wurden in 2 ml Methanol zusammengegeben und mit 12.6 mg (0.14 mmol) Boran-Pyridin-Komplex und 2.5 ml Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals die gleichen Mengen Boran-Pyridin-Komplex und Essisäure zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 24h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation aus Dioxan/Wasser 1:1 wurden 26.5 mg (88% d.Th.) der Z-geschützten Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.04 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 1064 $(M+H)^+$.

25 mg (0.024 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml Methanol aufgenommen und über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 45 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der

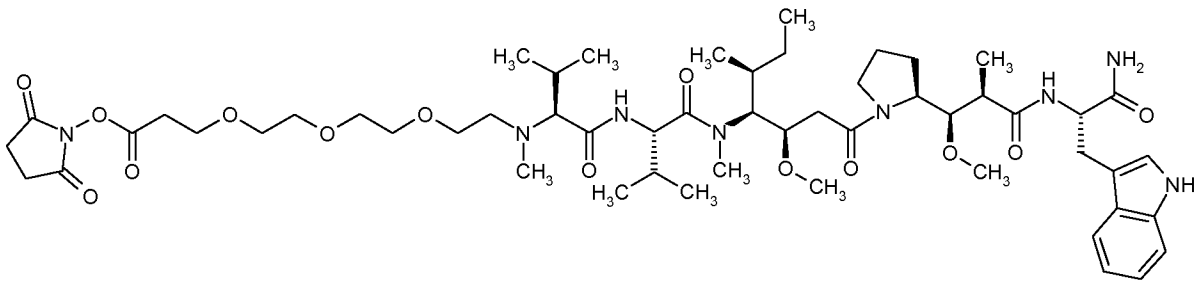
Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation aus Dioxan erhielt man 19.7 mg (85% d.Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.83 min; MS (ESIpos): m/z = 974 $(M+H)^+$.

**Intermediat 169**

N-{2-[2-(2-{3-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-oxopropoxy}ethoxy)ethoxy]ethyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



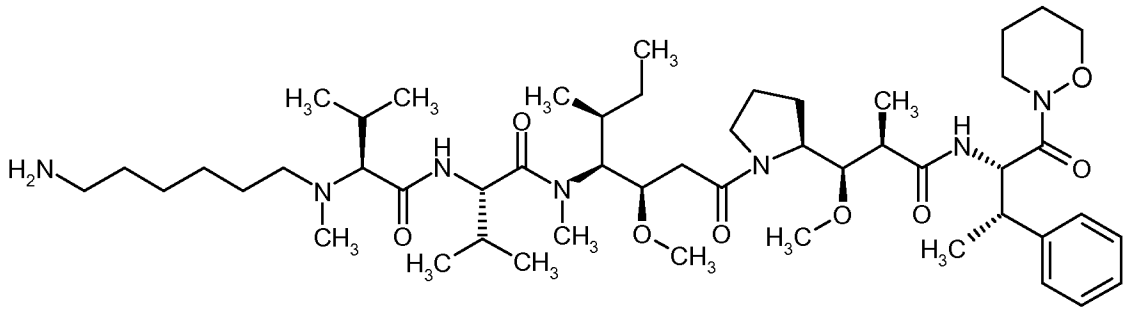
10 mg (10 µmol) von Intermediat 168 wurden in 3 ml DMF gelöst und mit 3.5 mg (30 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und anschließend mit 2.4 mg (10 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 5 µl N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 20 h Rühren bei RT wurden 8 mg (0.02 mmol) HATU zugegeben und das Reaktionsgemisch nochmals über Nacht bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 8.6 mg (64% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): Rt = 1.9 min;

LC-MS (Methode 11): Rt = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 (M+H)+.

**Intermediat 170**

N-(6-Aminohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S,3S)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 101 über 2 Stufen ausgehend von 26 mg (0.028 mmol) Intermediat 15 hergestellt.

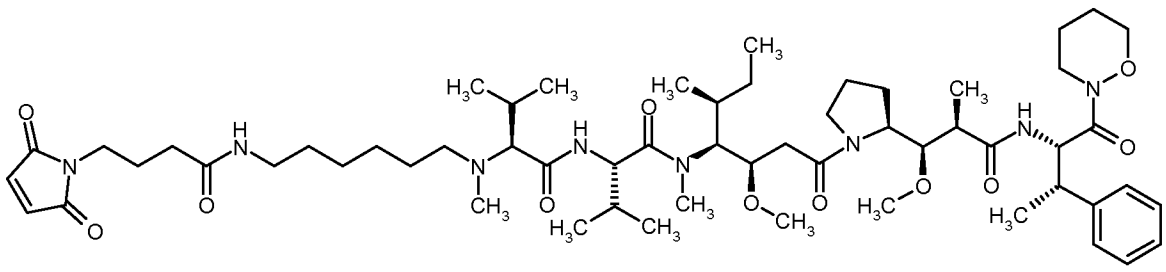
Ausbeute: 16.7 mg (63% d.Th. über 2 Stufen)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 914 $(M+H)^+$.

**Intermediat 171**

N-(6-{[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butanoyl]amino}hexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S,3S)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



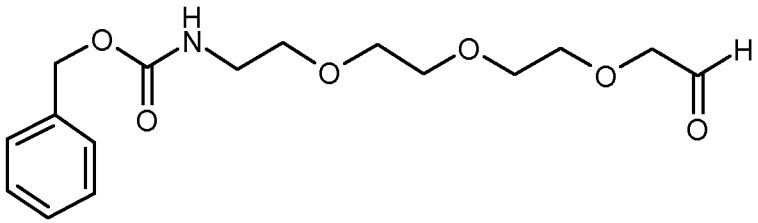
6.7 mg (7.3 µmol) der Verbindung aus Intermediat 170 und 3 mg (14.7 µmol) von kommerziell erhältlicher 4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butansäure wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 5.6 mg (14.7 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 2 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 30 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend aus Dioxan lyophilisiert. So wurden 4.5 mg (56% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.12 min; MS (ESIpos): m/z = 1079 $(M+H)^+$.

**Intermediat 172**

Benzyl-(2-{2-[2-(2-oxoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbamat



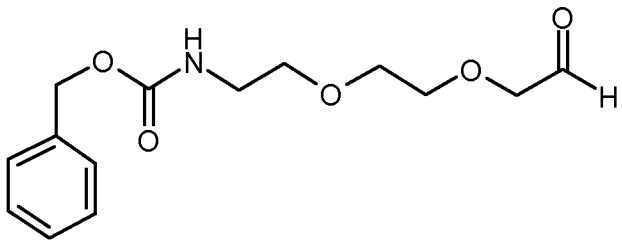
Die Titelverbindung wurde aus kommerziell erhältlichem 2-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethanol nach Standardbedingungen zunächst durch Einführung der Z-Schutzgruppe und anschließender Oxidation mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex hergestellt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.4 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.65 min; MS (ESIpos): m/z = 326 $(M+H)^+$.

**Intermediat 173**

Benzyl-{2-[2-(2-oxoethoxy)ethoxy]ethyl}carbamat



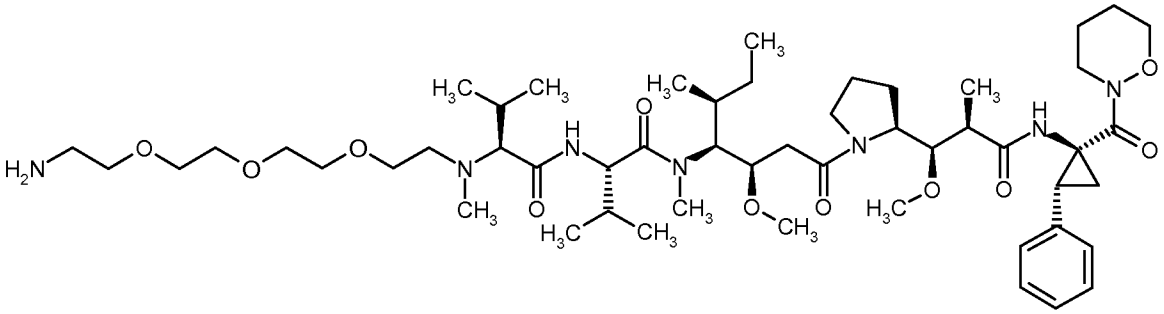
Die Titelverbindung wurde analog zu Intermediat 172 aus kommerziell erhältlichem 2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanol nach Standardbedingungen zunächst durch Einführung der Z-Schutzgruppe und anschließender Oxidation mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex hergestellt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.3 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.68 min; MS (ESIpos): m/z = 282 $(M+H)^+$.

**Intermediat 174**

N-(2-{2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenyl cyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



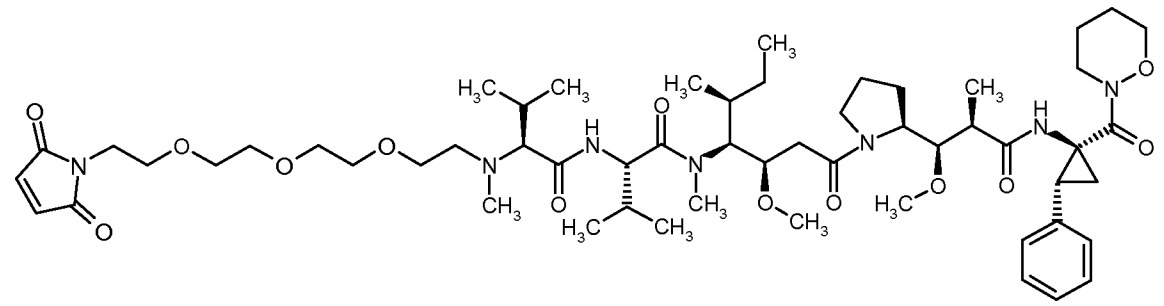
47 mg (0.05 mmol) von Intermediat 16 wurden in Analogie zur Herstellung von Intermediat 167 mit Benzyl-(2-{2-[2-(2-oxoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbamat in Gegenwart von Boran-Pyridin Komplex reduktiv aminiert. Anschließend wurde die Z-Schutzgruppe hydrogenolytisch mit 5% Palladium auf Kohle als Katalysator und in Methanol als Lösungsmittel entfernt und 38 mg (66% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 988 $(M+H)^+$.

**Intermediat 175**

N-[2-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Intermediat 166 ausgehend von 34 mg (0.03 mmol) von Intermediat 174.

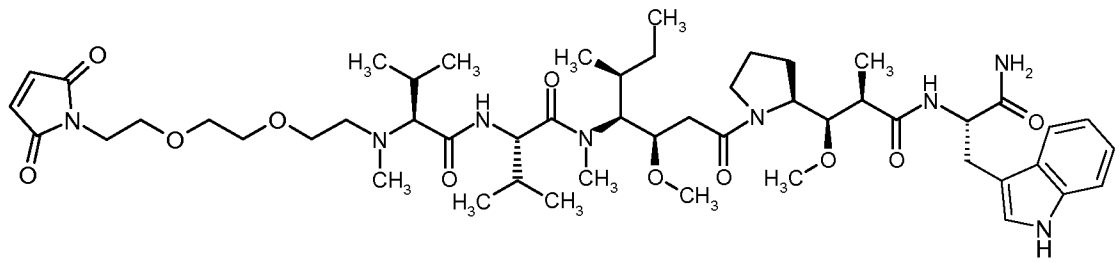
Ausbeute: 8.3 mg (23% d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 1068 $(M+H)^+$.

**Intermediat 176**

N-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



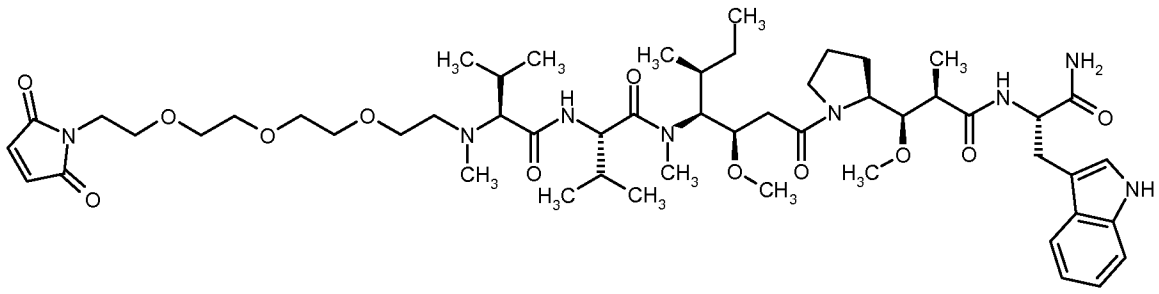
Die Herstellung erfolgte in Analogie zu den Intermediaten 174 und 175 beginnend mit der reduktive Aminierung von Intermediat 16 mit Intermediat 173, anschließender Entschützung und Aufbau des Maleinimids.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 981 $(M+H)^+$.

**Intermediat 177**

N-[2-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



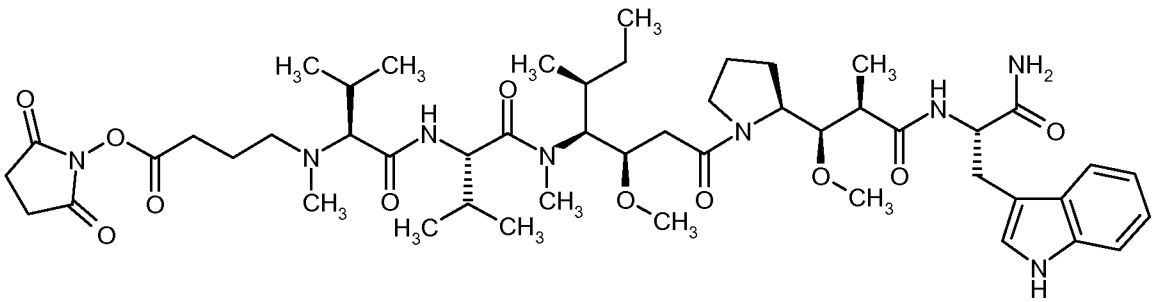
Die Herstellung erfolgte in Analogie zu den Intermediaten 174 und 175 beginnend mit der reduktive Aminierung von Intermediat 16 mit Intermediat 172, anschließender Entschützung und Aufbau des Maleinimids.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1025 $(M+H)^+$.

**Intermediat 178**

N-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

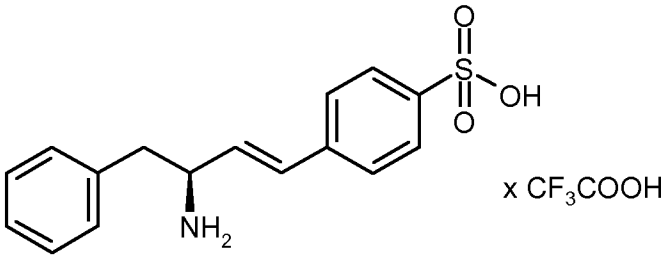


Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Intermediaten 162 ausgehend von 6 mg von Intermediat 82.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 953 $(M+H)^+$.

**Intermediat 179**

4-[(1E,3S)-3-Amino-4-phenylbut-1-en-1-yl]benzolsulfonsäure-Trifluoracetat



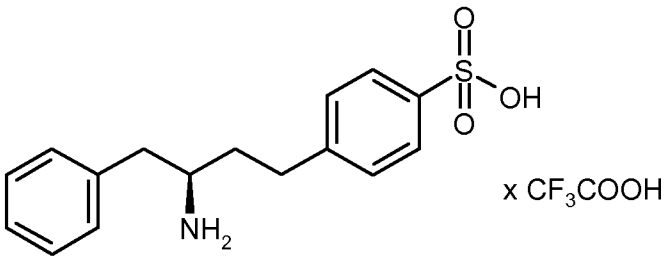

Eine Mischung aus 13.6 mg (0.06 mmol) Palladium(II)-Acetat, 469 mg (1.46 mmol) Kalium-4-iodbenzolsulfonat, 300 mg (1.21 mmol) (S)-tert.-Butyl-1-phenylbut-3-en-2-yl-carbamat, 16.5 mg (0.12 mmol) Phenylharnstoff und 167.6 mg (1.21 mmol) Kaliumcarbonat in 7.5 mL DMF wurde in der Mikrowelle für 15 min. auf 160°C erhitzt. Das Rohprodukt wurde anschließend direkt per präparativer HPLC gereinigt. Es wurden so 312 mg eines Gemisches aus 31% der BOC-geschützten Verbindung und 69% des freien Amins erhalten.

Dieses Gemisch wurde anschließend in 30 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt und 20h bei RT gerührt. Nach Einengen im Vakuum wurde der Rückstand mit Diethylether verrührt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Diethylether nachgewaschen. Es wurden so 200 mg (62% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.44 min; MS (ESIpos): m/z = 304 $(M+H)^+$.

**Intermediat 180**

4-[(3R)-3-Amino-4-phenylbutyl]benzolsulfonsäure



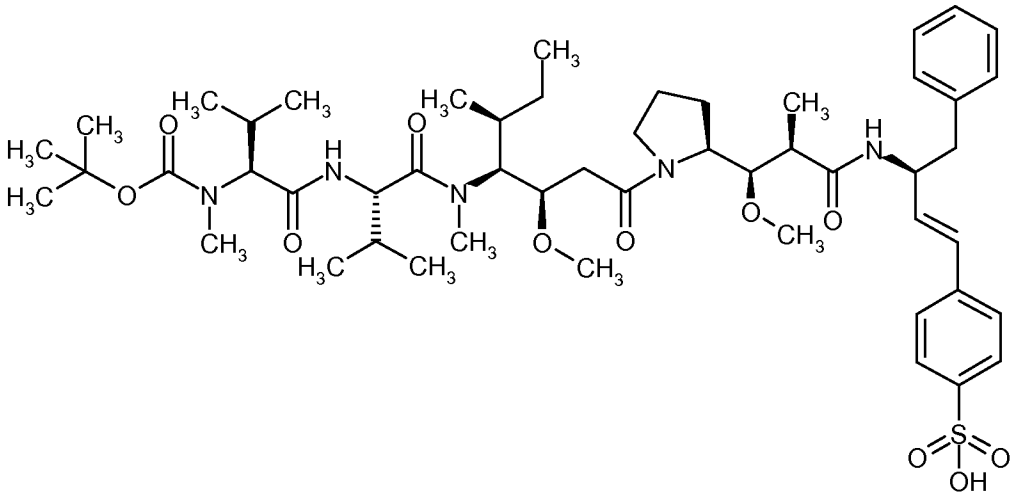

100 mg (0.25 mmol) 4-[(1E,3S)-3-Amino-4-phenylbut-1-en-1-yl]benzolsulfonsäure-Trifluoracetat wurden in 10 mL Essigsäure sowie einigen Tropfen DMF und Wasser suspendiert, mit 70 mg (0.07 mmol) Palladium auf Kohle (10%-ig) versetzt und 24h bei 2.2 bar Wasserstoff-Druck hydriert. Die Lösung wurde filtriert, das Filtrat per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 29 mg (76%ig, 21% d.Th.) Produkt erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.46 min; MS (ESIpos): m/z = 306 $(M+H)^+$.

**Intermediat 181**

N-(tert.-Butoxycarbonyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

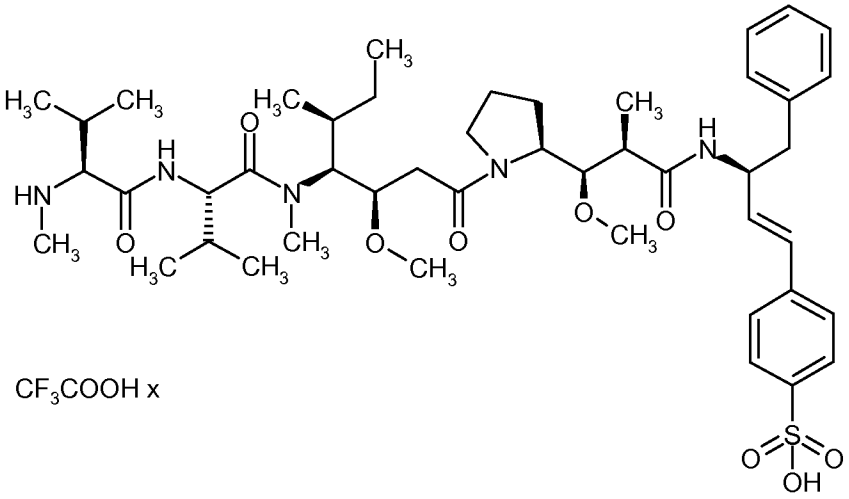


Zu einer Lösung von 90 mg (0.13 mmol) N-(tert.-Butoxycarbonyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid in 4 mL DMF wurden 60 mg (0.16 mmol) HATU und 69 µL (0.39 mmol) Hünig-Base gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. bei RT gerührt und anschließend mit 60 mg (0.15 mmol) 60.3 mg (0.13 mmol) 4-[(1E,3S)-3-Amino-4-phenylbut-1-en-1-yl]benzolsulfonsäure-Trifluoracetat versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch per präp. HPLC gereinigt. Es wurden so 127 mg eines 44:56-Gemisches der Titelverbindung und des bereits entschützten Amins erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.21 min; MS (ESIpos): m/z = 971 $(M+H)^+$; $R_t$ = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 871 $(M+H)^+$ für die entschützte Verbindung.

**Intermediat 182**

N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



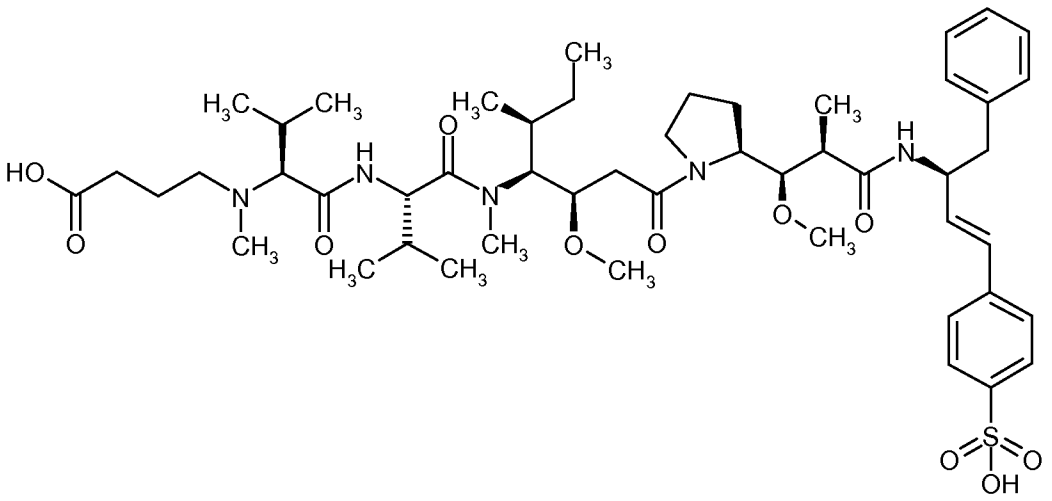

90 mg Intermediat 180 wurden in 4.6 mL Dichlormethan gelöst und mit 0.92 mL Trifluoressigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. bei RT gerührt und anschließend eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 91 mg (98% d.Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 871 $(M+H)^+$

**Intermediat 183**

N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Es wurden 16.7 µL (0.03 mmol) einer 15%igen wässrigen Bernsteinaldehyd-Lösung in 943 µL Methanol vorgelegt und mit 17 mg (0.02 mmol) N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-

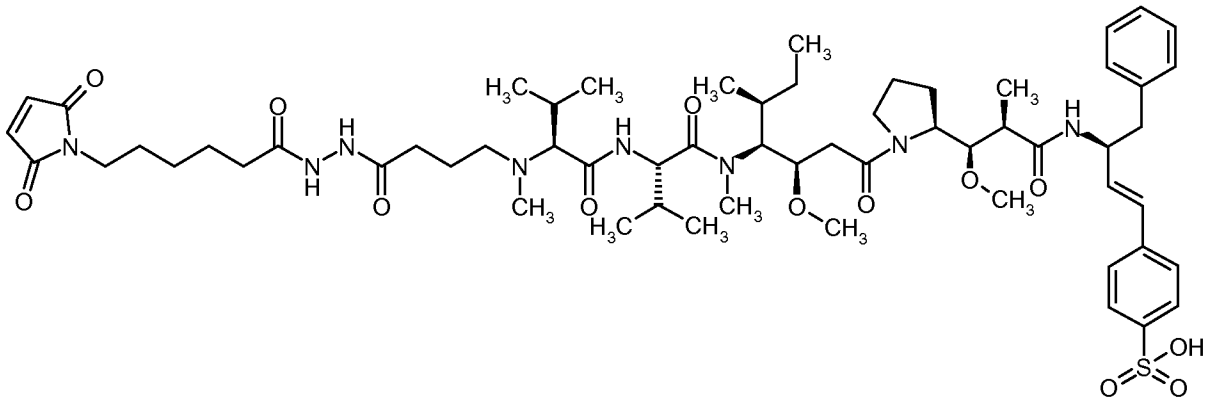
{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 181) sowie 1.1 µL (0.02 mmol) Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min. bei RT gerührt und anschließend mit 2.9 µL (0.02 mmol) Boran-Pyridin-Komplex versetzt. Nach 1h wurden jeweils weitere 2 Äquivalente Bernsteinaldehyd, Essigsäure und Boran-Pyridin-Komplex zugegeben und 20h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden so 20 mg (83%ig, 80% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 957 $(M+H)^+$

**Intermediat 184**

N-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



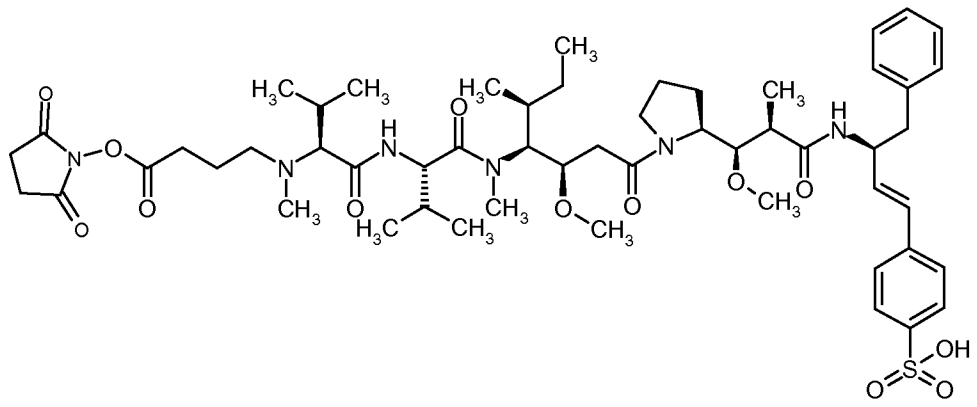
Es wurden 8 mg (7.5 µmol) N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid, 2.8 mg (8.2 µmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid-Trifluoracetat, 3.4 mg (9 µmol) HATU sowie 3.9 µL Hünig-Base in 0.77 mL DMF 20h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 3 mg (31% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 1164 $(M+H)^+$

**Intermediat 185**

N-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

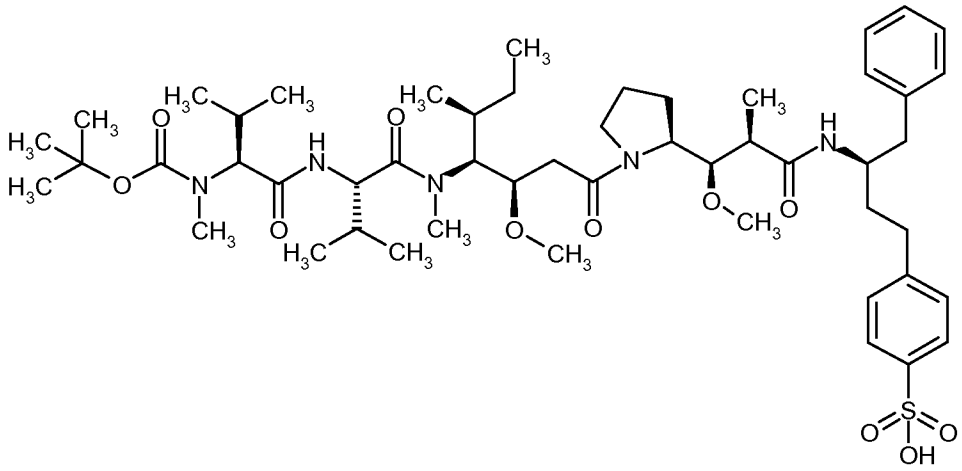


Zu einer Lösung von 8 mg (7.5 µmol) N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2S,3E)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)but-3-en-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid in 2 mL DMF wurden 8.6 mg (74.8 µmol) N-Hydroxysuccinimid, 8.5 mg (22.4 µmol) EDCI und 0.1 mg (0.75 µmol) DMAP gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20h bei RT gerührt. Anschließend wurden 1.3 µL (7.5 µmol) Hünig-Base zugegeben und 1h nachgerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann per präp. HPLC gereinigt. Es wurden 2.6 mg (72% Reinheit; 21% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1054 $(M+H)^+$

**Intermediat 186**

N-(tert.-Butoxycarbonyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

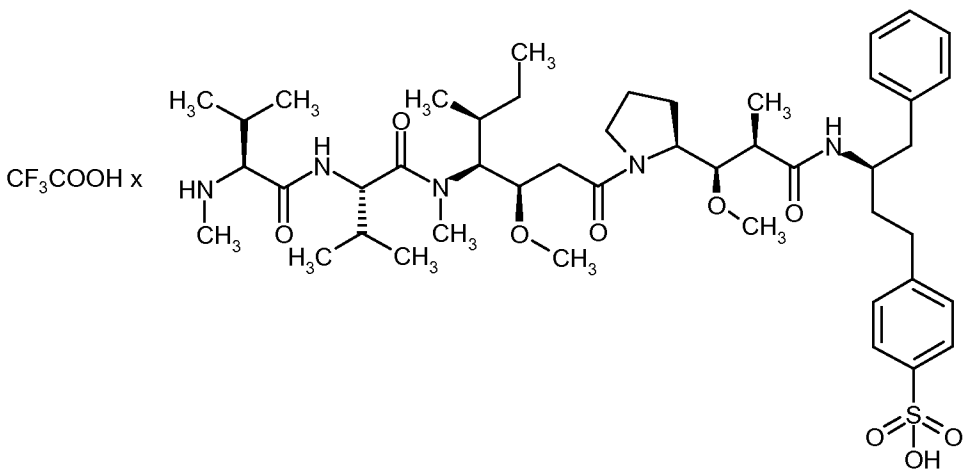


Zu einer Lösung von 43 mg (0.06 mmol) N-(tert.-Butoxycarbonyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid in 1.9 mL DMF wurden 29 mg (0.07 mmol) HATU und 33 µL (0.19 mmol) Hünig-Base gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. bei RT gerührt und anschließend mit 29 mg (0.07 mmol) 4-[(3R)-3-Amino-4-phenylbutyl]benzolsulfonsäure-Trifluoracetat versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch per präp. HPLC gereinigt. Es wurden so 58 mg eines 45:55-Gemisches der Titelverbindung und des bereits entschützten Amins erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 973 $(M+H)^+$; $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 873 $(M+H)^+$ für die entschützte Verbindung.

**Intermediat 187**

N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



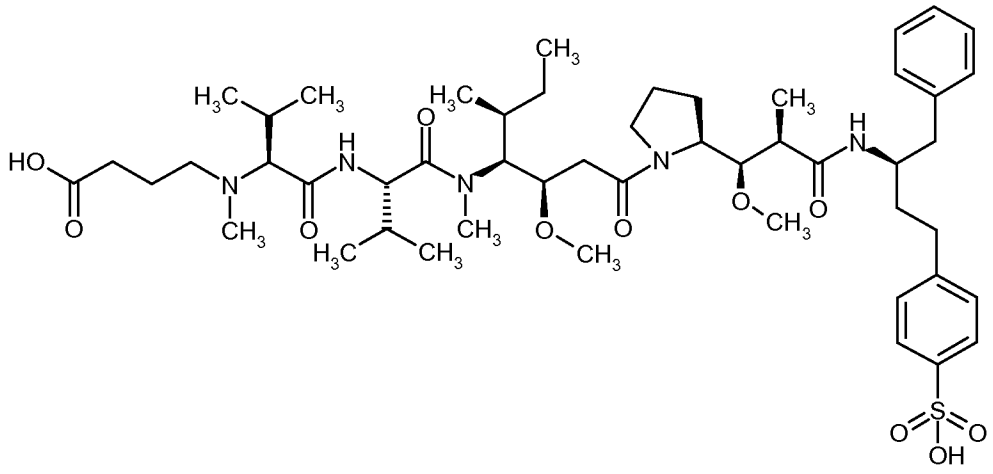
58 mg Intermediat 186 wurden in 4.1 mL Dichlormethan gelöst, mit 0.41 mL Trifluoressigsäure versetzt und 30 min. bei RT gerührt. Nach Einengen im Vakuum wurde das Rohprodukt per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 50 mg (90%-ige Reinheit; 85% d.Th.) Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 873 $(M+H)^+$

**Intermediat 188**

N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



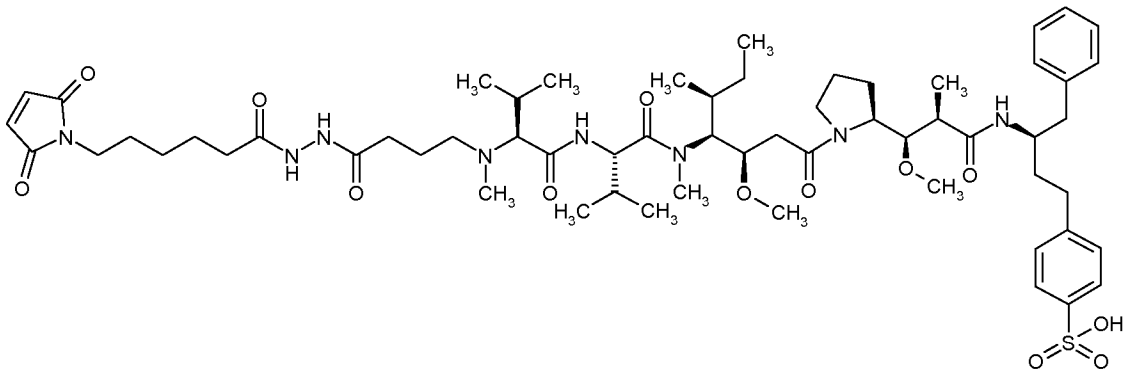
Es wurden 171 µL (0.26 mmol) einer 15%igen wässrigen Bernsteinaldehyd-Lösung in 2.5 mL Methanol vorgelegt und mit 50 mg (0.05 mmol) N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat sowie 11.6 µL (0.2 mmol) Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min. bei RT gerührt und anschließend mit 30 µL (0.24 mmol) Boran-Pyridin-Komplex versetzt. Nach 24stündigem Rühren wurde ein weiteres Äquivalent Boran-Pyridin-Komplex zugegeben und 2h nachgerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 40 mg (90%-ige Reinheit; 66% d.Th.) Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 959 $(M+H)^+$

**Intermediat 189**

N-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



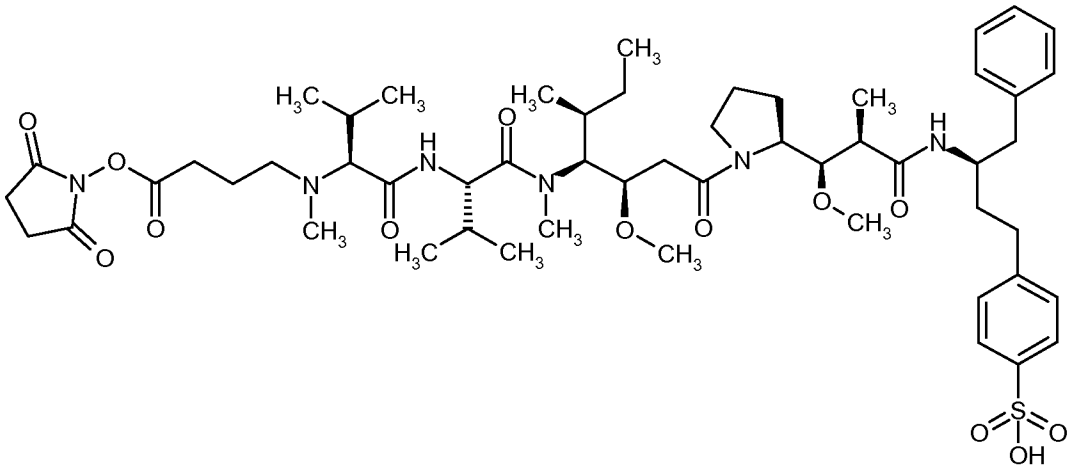
Es wurden 10 mg (9.3 µmol) N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid, 3.5 mg (10.3 µmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid-Trifluoracetat, 4.3 mg (11.2 µmol) HATU sowie 4.9 µL (28 µmol) Hünig-Base in 1 mL DMF 20h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 4.2 mg (92%-ige Reinheit; 33% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1166 $(M+H)^+$

**Intermediat 190**

N-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



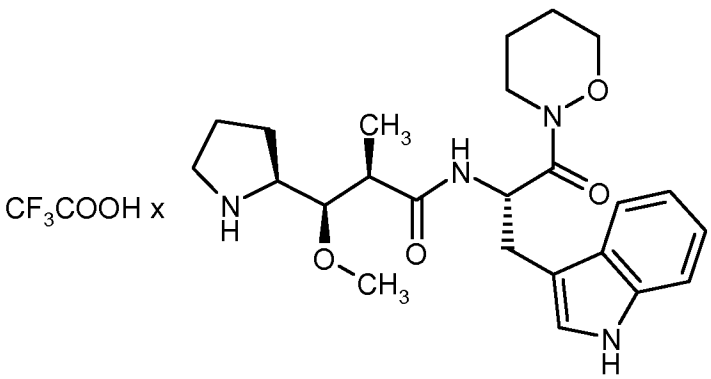
Zu einer Lösung von 10 mg (9.3 µmol) N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(2R)-1-phenyl-4-(4-sulfophenyl)butan-2-yl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid in 2.5 mL DMF wurden 10.7 mg (93 µmol) N-Hydroxysuccinimid, 10.6 mg (28 µmol) EDCI sowie 0.12 mg (0.9 µmol) DMAP gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20h bei RT gerührt und anschließend per präp. HPLC gereinigt.

Es wurden 3.8 mg (72%-ige Reinheit; 25% d.Th.) Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 1055 $(M+H)^+$

**Intermediat 191**

(2*R*,3*R*)-*N*-[(2*S*)-3-(1*H*-Indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat 7 über zwei Stufen aus Ausgangsverbindung 1 und (2*S*)-2-Amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)propan-1-on Trifluoracetat (Intermediat 99) hergestellt.

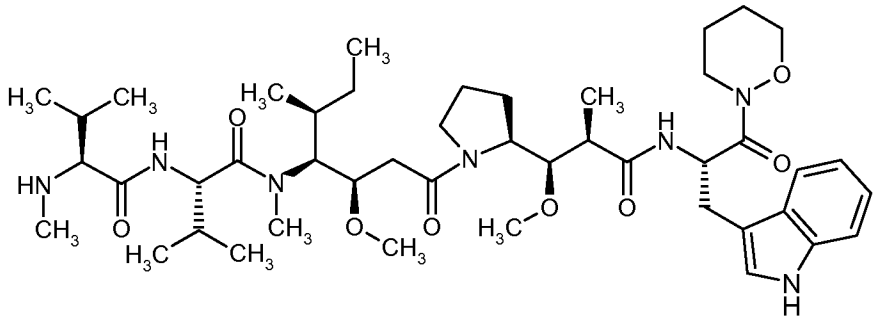
Ausbeute über 2 Stufen: 62 mg (67% d. Th.)

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.65 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.7 min; MS (ESIpos): m/z = 443 $(M+H)^+$.

**Intermediat 192**

N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



1015 mg (1.59 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 50 ml DMF aufgenommen, mit 654 mg (2.39 mmol) 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP) und 2.8 ml *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und 10 min bei RT gerührt. Dann wurden 1083 mg (1.75 mmol) (2*R*,3*R*)-*N*-[(2*S*)-3-(1*H*-Indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat (Intermediat 191) zugegeben und die Mischung anschließend 30 min im Ultraschallbad bei RT behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde dann im Vakuum eingeengt und der Rückstand in 300 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und 5%-iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt (1684 mg) wurde ohne weitere Reinigung in 20 ml Acetonitril aufgenommen, mit 2 ml Piperidin versetzt und das Reaktionsgemisch anschließend 10 min bei RT gerührt. Dann wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand mit Diethylether versetzt. Das Lösungsmittel wurde erneut eingedampft und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/17%iger wässriger Ammoniak-Lösung 15:1:0.1 -> 15:2:0.2) gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. So wurden 895 mg (67% über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

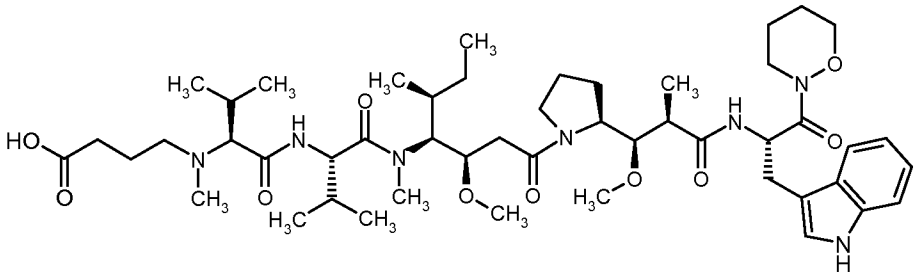
HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 840 $(M+H)^+$.

$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 10.8 (d, 1H), 8.3 und 8.05 (2d, 1H), 8.0 (d, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.15 und 7.08 (2s, 1H) 7.05-6.9 (m, 2H), 5.12 und 4.95 (2m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.1-3.8 (m, 4H), 3.75 (d, 1H), 3.23, 3.18, 3.17, 3.12, 2.95 und 2.88 (6s, 9H), 3.1-3.0 und 2.85 (2m, 2H), 2.65 (d, 1H), 2.4-2.2 (m, 3H), 2.15 (m, 3H), 1.95 (br. m, 2H), 1.85-0.8 (br. m, 11H), 1.08 und 1.04 (2d, 3H), 0.9-0.75 (m, 15H), 0.75-0.65 (dd, 3H) [weitere Signale unter $H_2O$-Peak verborgen].

**Intermediat 193**

N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



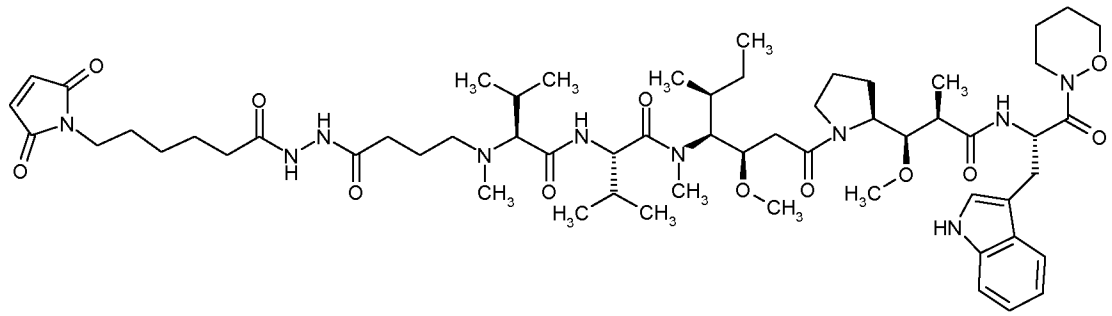
50 mg (0.052 mmol) N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 192) und 204µl einer 15%igen wässrigen Lösung von 4-Oxobutansäure wurden in 2 ml Methanol zusammengegeben und mit 23.4 mg (0.252 mmol) Boran-Pyridin-Komplex und 6µl Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen wurden 38 mg (78% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 9): $R_t$ = 4.7 min; MS (ESIpos): m/z = 926 $(M+H)^+$.

**Intermediat 194**

N-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zur in Intermediat 157 beschriebenen Synthese aus 10 mg (11µmol) N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid und kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

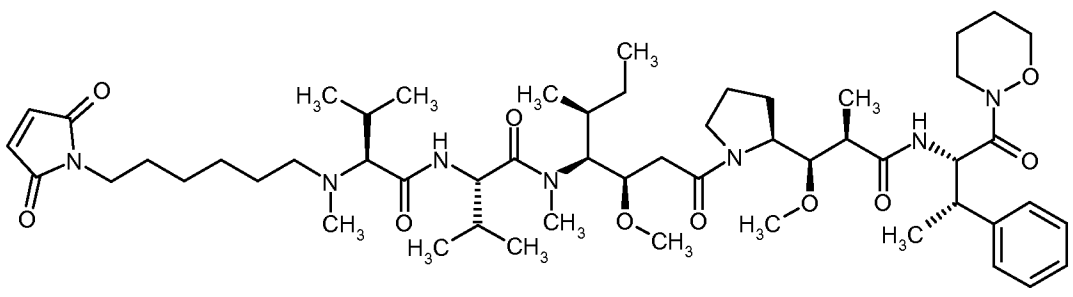
Ausbeute: 4.4 mg (35% d.Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 1133 $(M+H)^+$.

**Intermediat 195**

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S,3S)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 166 ausgehend von 9 mg (0.010 mmol) Intermediat 170 hergestellt.

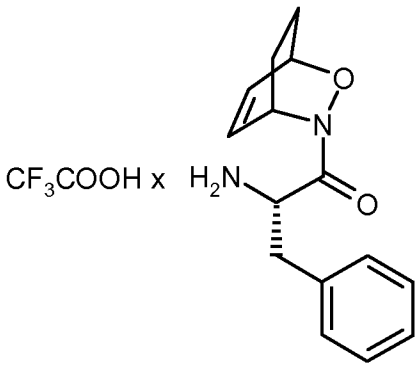
Ausbeute: 1.1 mg (10% d.Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.99 min; MS (ESIpos): m/z = 994 $(M+H)^+$.

**Intermediat 196**

(2*S*)-2-Amino-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-3-phenylpropan-1-on-Trifluoracetat




41 mg (0.37 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-*N*-(*tert.*-butoxycarbonyl)-L-phenylalaninat wurden in 10 ml DMF aufgenommen und mit 149 mg (0.41 mmol) 2-Oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en (Ausgangsverbindung 6) sowie 72 µl (0.41 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde danach im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und anschließend mit 5%-iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Toluol/Ethanol 10:1 als Eluent gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen des Rückstands im Hochvakuum wurden so 69 mg (47% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *tert.*-Butyl-[(2*S*)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]carbamat als Diastereomerengemisch erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.1 min; MS (ESIpos): m/z = 359 $(M+H)^+$.

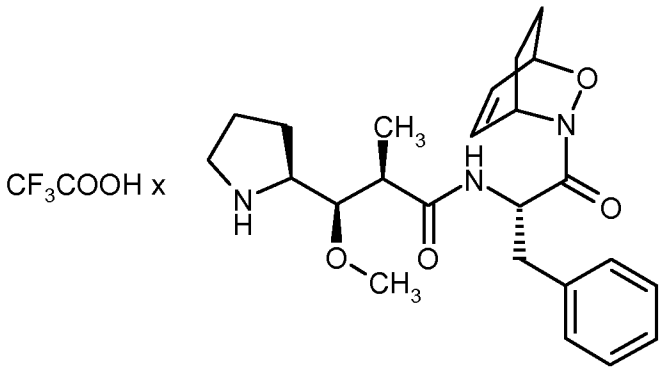
64 mg (0.18 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand aus Wasser/Dioxan lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 66 mg (quant.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.45 min;

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.12 min; MS (ESIpos): m/z = 259 $(M+H)^+$.

**Intermediat 197**

(2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(2*S*)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat




Zunächst wurde (2*R*,3*R*)-3-[(2*S*)-1-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropansäure (Ausgangsverbindung 1) aus 83 mg (0.18 mmol) ihres Dicyclohexylamin-Salzes durch Aufnehmen in Ethylacetat und Ausschütteln mit 5%-iger wässriger Kaliumhydrogensulfat-Lösung freigesetzt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 66 mg (0.18 mmol) (2*S*)-2-Amino-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-3-phenylpropan-1-on-Trifluoracetat (Intermediat 196), 101 mg (0.266 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HATU) sowie 93 µl (0.53 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 30 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Man erhielt so 52 mg (56% d. Th.) des Boc-geschützten Intermediats *tert.*-Butyl-(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-carboxylat.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.13 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 528 $(M+H)^+$.

52 mg (0.1 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt und 20 min bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mit 20 ml Diethylether verrührt. Nach 10 min wurde abfiltriert und

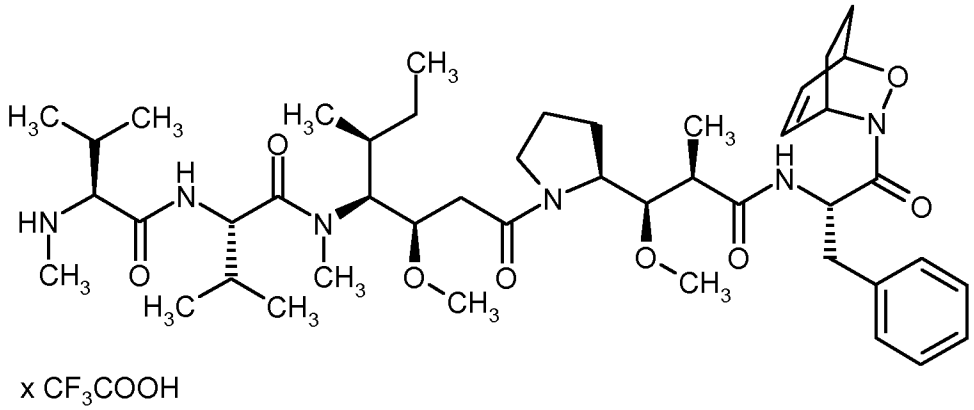
der Filter-Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Auf diese Weise wurden 39 mg (72% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.62 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.68 min; MS (ESIpos): m/z = 428 $(M+H)^+$.

**Intermediat 198**

*N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat




44.5 mg (0.071 mmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) wurden in 10 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 38.6 mg (0.071 mmol) (2*R*,3*R*)-3-Methoxy-2-methyl-*N*-[(2*S*)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanamid-Trifluoracetat (Intermediat 197), 32.5 mg (0.086 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HATU) sowie 41 µl (0.235 mmol) *N*,*N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann im Vakuum eingeengt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und 5%-iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Es wurden so 73 mg (98% d. Th.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

HPLC (Methode 6): $R_t$ = 2.78 min;

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 2.96 min; MS (ESIpos): m/z = 1047 $(M+H)^+$.

73 mg (0.071 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 0.5 ml Piperidin wurde das Reaktionsgemisch 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand mehrfach mit Diethylether digeriert. Nach Abdekantieren des Diethylethers wurde der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt (Eluent: Acetonitril / 0.1% aq. TFA). Es wurden 16 mg (26% d. Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

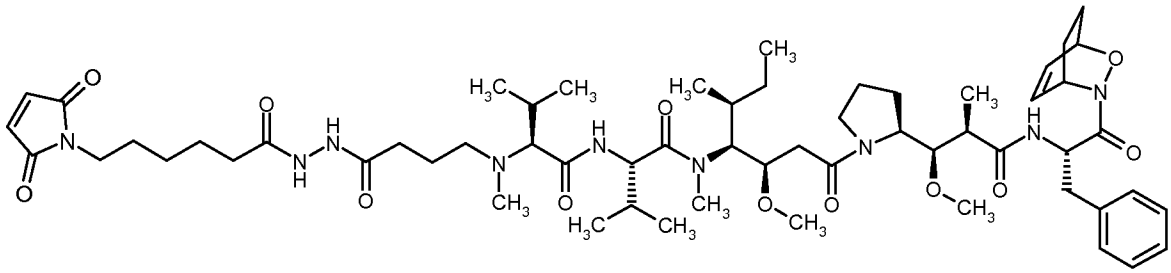
HPLC (Methode 6): $R_t$ = 1.94 min;

LC-MS (Methode 3): $R_t$ = 1.71 min; MS (ESIpos): m/z = 825 $(M+H)^+$

$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$): δ = 8.9-8.6 (m, 3H), 8.4, 8.3, 8.1 und 8.0 (4d, 1H), 7.3-7.1 (m, 5H), 6.7-6.5 (m, 2H), 5.2-4.8 (m, 3H), 4.75-4.55 (m, 3H), 4.05-3.95 (m, 1H), 3.7-3.4 (m, 4H), 3.22, 3.17, 3.15, 3.05, 3.02 und 2.95 (6s, 9H), 3.0 und 2.7 (2 br. m, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.4-1.2 (br. m, 13H), 1.1-0.85 (m, 18H), 0.75 (m, 3H) [weitere Signale unter $H_2O$-Peak verborgen].

**Intermediat 199**

N-(4-{2-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



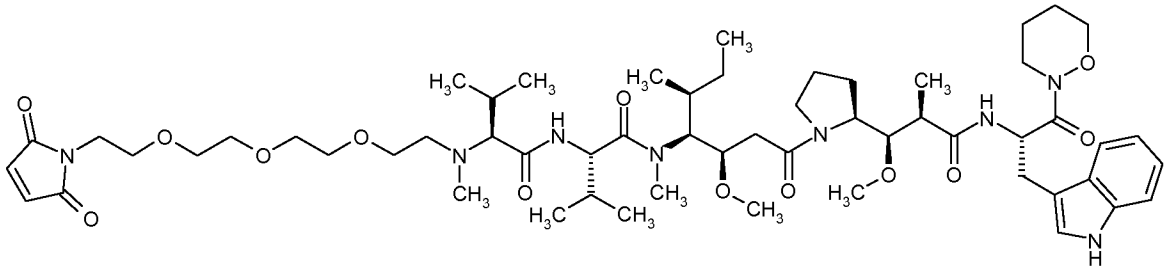
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu den Intermediaten 193 und 194 ausgehend von 23 mg (24µmol) N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S)-1-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 198) hergestellt.

HPLC (Methode 12): Rt = 1.9 min;

LC-MS (Methode 2): Rt = 2.1 min; MS (ESIpos): m/z = 1118 (M+H)+.

**Intermediat 200**

N-[2-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



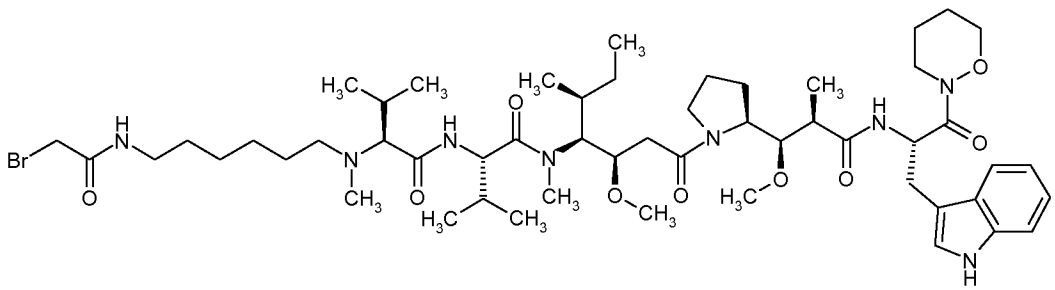
Die Herstellung erfolgte in Analogie zu den Intermediaten 174 und 175 beginnend mit der reduktive Alkylierung von Intermediat 192 mit Intermediat 172, anschließender Entschützung und Aufbau des Maleinimids.

HPLC (Methode 12): Rt = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): Rt = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1025 (M+H)+.

**Intermediat 201**

N-{6-[(Bromacetyl)amino]hexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



22 mg (0.023 mmol) N-(6-Aminohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 101) wurden in 9.5 ml THF gelöst und bei 0°C wird mit 4.2 µl Triethylamin versetzt. Eine

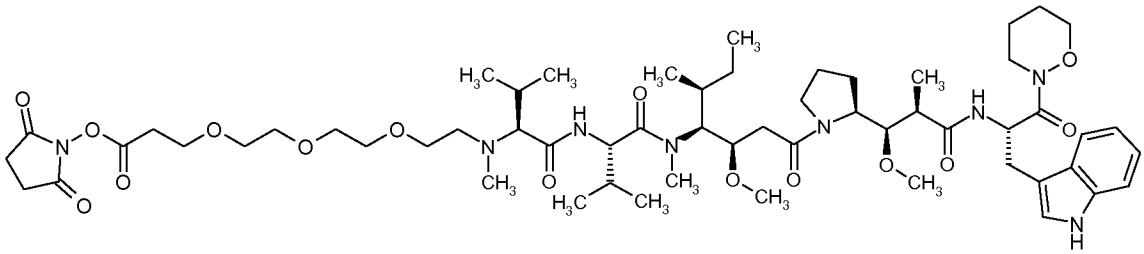
Lösung aus Bromacetylchlorid in THF wurde zutropft und das Reaktionsgemisch 30 min bei 0°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. So wurden 6.9 mg (26% d.Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1059 und 1061 $(M+H)^+$.

**Intermediat 202**

N-{2-[2-(2-{3-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-oxopropoxy}ethoxy)ethoxy]ethyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Die Herstellung erfolgte zunächst in Analogie zu Intermediat 168 beginnend mit der reduktiven Alkylierung von Intermediat 192 mit Intermediat 167 und anschließender hydrogenolytischer Spaltung des Benzylesters zu N-(2-{2-[2-(2-Carboxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid.

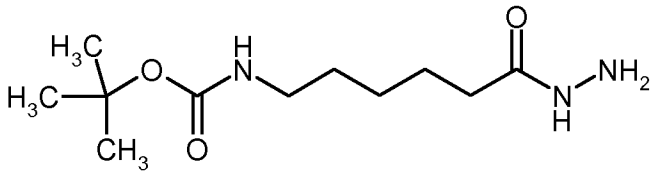
13 mg (10 µmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml DMF gelöst und mit 2.1 mg (20 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion, 6.5 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und 7.1 mg (0.02 mmol) HATU versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 9.2 mg (62% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 2.1 min; MS (ESIpos): m/z = 1141 $(M+H)^+$.

**Intermediat 203**

*tert.*-Butyl-(6-hydrazino-6-oxohexyl)carbamat

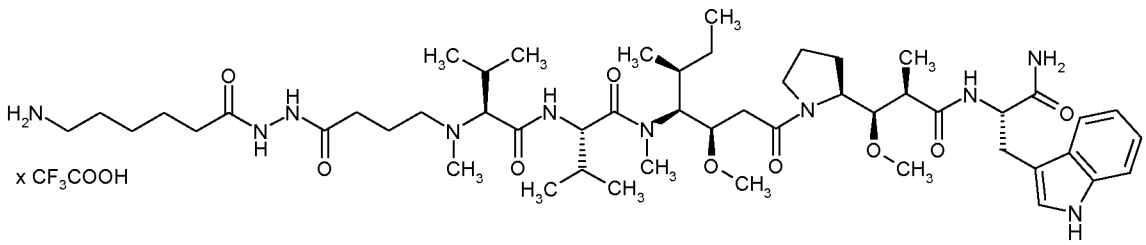


Diese Verbindung wurde nach Standardmethoden der Peptidchemie hergestellt durch Kupplung von 6-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]hexansäure mit Benzylhydrazincarboxylat in Gegenwart von EDCI und HOBT und anschließender hydrogenolytischer Spaltung der Benzyloxycarbonylschutzgruppe.

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.59 min; MS (ESIpos): m/z = 246 $(M+H)^+$.

**Intermediat 204**

N-{4-[2-(6-Aminohexanoyl)hydrazino]-4-oxobutyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



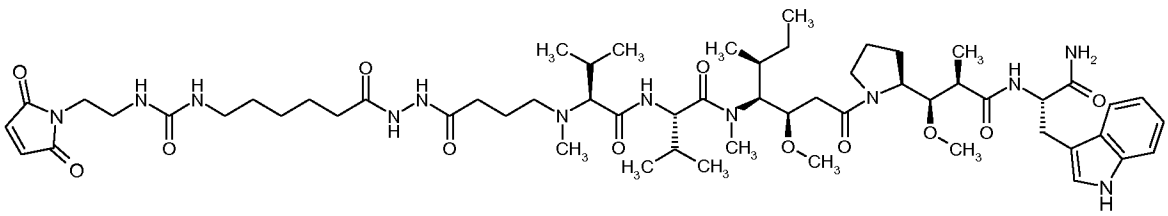
146 mg (50 µmol) (N-(3-Carboxypropyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-propyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid wurden in 5 ml DMF gelöst und anschließend mit 30.6 mg (80 µmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat, 19 µL N,N-Diisopropylethylamin sowie mit 22.4 mg (60 µmol) von *tert.*-Butyl-(6-hydrazino-6-oxohexyl)carbamat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Hochvakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 43 mg (68 % d.Th.) des geschützten Intermediats erhalten, welche dann in 10 ml Dichlormethan aufgenommen wurden und mit 1 ml Trifluoressigsäure entschützt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und der Rückstand mit Dichlormethan verrührt und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. So wurden 45 mg (68% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.66 min; MS (ESIpos): m/z = 983 $(M+H)^+$.

**Intermediat 205**

N-(4-{2-[6-({[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}amino)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 114 ausgehend von den Intermediaten 50 und 204 hergestellt.

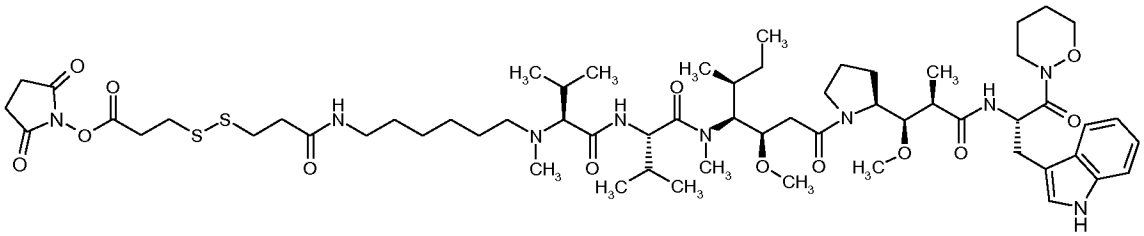
Ausbeute: 4 mg (78% d.Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.73 min; MS (ESIpos): m/z = 1149 $(M+H)^+$.

**Intermediat 206**

N-(6-{[3-({3-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-oxopropyl}disulfanyl)propanoyl]amino}hexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



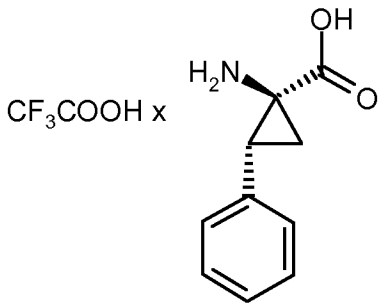
8 mg (10 µmol) von Intermediat 101 wurden in 2 ml DMF gelöst und mit 8.6 mg (20 µmol) 1,1'-{Disulfandiylbis[(1-oxopropan-3,1-diyl)oxy]}dipyrrolidin-2,5-dion und 3.7 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 7.2 mg (68% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 615 [½ $(M+2H^+)$]

**Intermediat 207**

(1S,2R)-1-Amino-2-phenylcyclopropancarbonsäure-Trifluoracetat

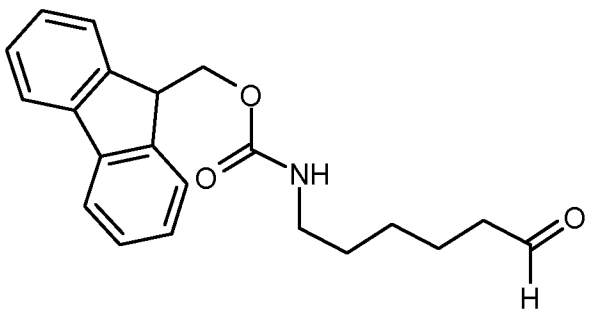



Die Titelverbindung wurde durch Entschützung von 210 mg (0.76 mmol) kommerziell erhältlicher (1*S*,2*R*)-1-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-2-phenylcyclopropancarbonsäure mit Trifluoressigsäure in quantitativer Ausbeute erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.23 min; MS (ESIpos): m/z = 178 $(M+H)^+$.

**Intermediat 208**

9H-Fluoren-9-ylmethyl-(6-oxohexyl)carbamat



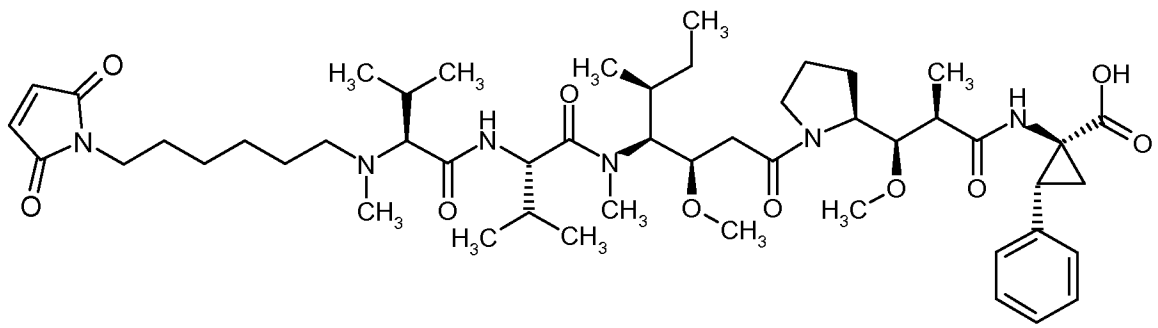
Die Titelverbindung wurde aus 1 g (2.95 mmol) von kommerziell erhältlichem 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(6-hydroxyhexyl)carbamat nach Standardbedingungen durch Oxidation mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex hergestellt. Es wurden 840 mg (85% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.1 min; MS (ESIpos): m/z = 338 $(M+H)^+$.

**Intermediat 209**

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-carboxy-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 75 beschriebenen Synthese durch Kupplung von N-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und (1S,2R)-1-Amino-2-phenylcyclopropancarbonsäure-Trifluoracetat (Intermediat 207) in Gegenwart von O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Amin-Verbindung N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-carboxy-2-phenylcyclopropyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat hergestellt.

Zu 22 mg (0.026 mmol) dieser Verbindung in 10 ml Methanol wurden dann 17 mg (0.05 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(6-oxohexyl)carbamat (Intermediat 208) und 2.3 mg Essigsäure sowie 11.4 mg (0.12 mmol) Boran-Pyridin-Komplex zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals die gleichen Mengen Boran-Pyridin-Komplex und Essigsäure sowie 8 mg Fluoren-9-ylmethyl-(6-oxohexyl)carbamat zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 24h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer

HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen wurde das Produkt sofort in die nächste Stufe eingesetzt.

33 mg des noch verunreinigten Intermediats wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 1 ml Piperidin versetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der erhaltene Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. So wurden 11 mg (55% d.Th. über 2 Stufen) des Aminocarbonsäure-Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.7 min; MS (ESIpos): m/z = 843 $(M+H)^+$.

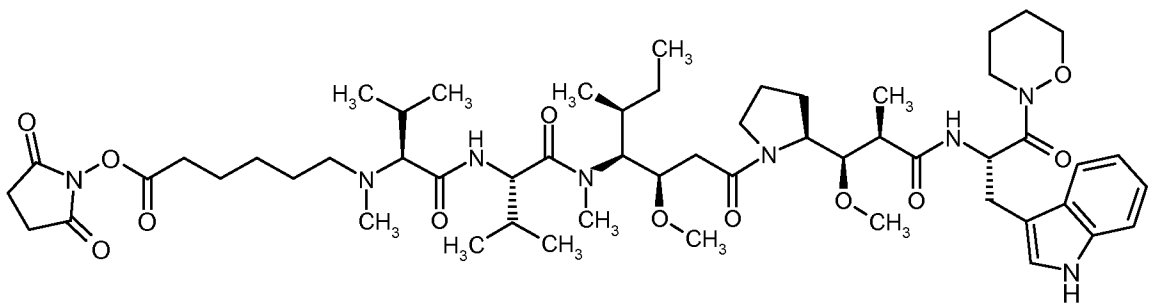
6 mg (7.12 µmol) dieses Intermediats wurden in 1 ml Dioxan aufgenommen und anschließend mit 6.6 mg (42.7 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat sowie mit 5µl gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1h bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 3 Portionen von jeweils 50 µl der gesättigten wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 30 min bei RT gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit Trifluoressigsäure auf pH 2 angesäuert und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 4 mg (60% d.Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 923 $(M+H)^+$.

**Intermediat 210**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde 6-Oxohexansäure nach Literaturvorschrift hergestellt (J.Org.Chem. 58, 1993, 2196-2200).

80 mg (0.08 mmol) N-Methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 192) und 65.4 mg (0.5 mmol) 6-Oxohexansäure wurden in 9 ml Methanol zusammengegeben und mit 10 µl Essigsäure und 37.4 mg (0.4 mmol) Boran-Pyridin-Komplex versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde erneut eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen wurden 70 mg (86% d. Th.) N-(5-Carboxypentyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 955 $(M+H)^+$.

$^1$H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$, charakteristische Signale): δ = 12.0 (br. M, 1H), 10.8 (s, 1H), 9.4 (m, 1H), 8.9 und 8.8 (2d, 1H), 8.3 und 8.02 (2d, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.15 und 7.1 (2s, 1H) 7.05-6.9 (m, 2H), 5.12 und 4.95 (2m, 1H), 4.7-4.5 (m, 2H), 4.1-3.8 (m, 4H), 3.75 (d, 1H), 3.25, 3.2, 3.18, 3.13, 2.98 und 2.88 (6s, 9H), 2.8 (m, 3H), 1.08 und 1.04 (2d, 3H), 0.95-0.8 (m, 15H), 0.8-0.65 (dd, 3H).

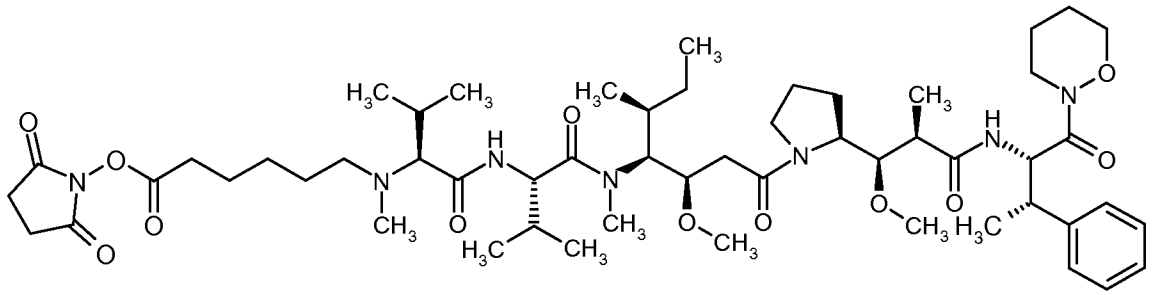
22 mg (23 µmol) dieses Intermediats wurden in 1.8 ml Dichlormethan gelöst und mit 13.2 mg (70 µmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 26.5 mg (230 µmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion sowie 0.28 mg (2 µmol) Dimethylaminopyridin versetzt und das Reaktionsgemisch 2h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 21.3 mg (88% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1052 $(M+H)^+$.

**Intermediat 211**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S,3S)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



15 mg (20 µmol) *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2*S*,3*S*)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl] pyrrolidin-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat (Intermediat 15) wurden in Analogie zu Intermediat 210 mit 6-Oxohexansäure reduktiv alkyliert.

Ausb.: 9.2 mg (61% d.Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 929 $(M+H)^+$.

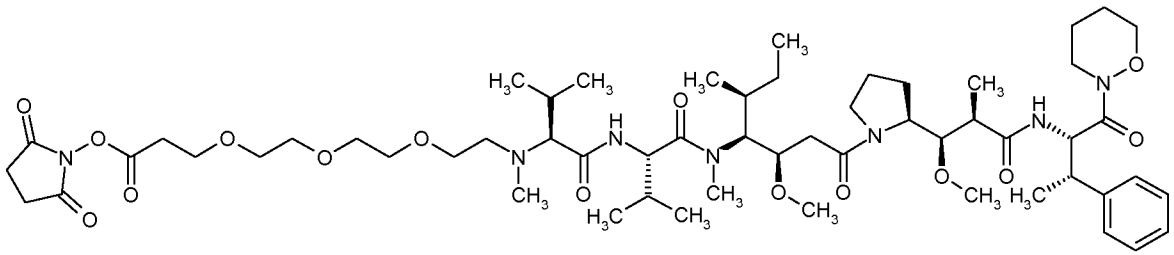
9 mg (10 µmol) dieses Intermediats wurden in 3 ml DMF gelöst und mit 5.6 mg (48 µmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion, 5 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und 5.5 mg (0.015 mmol) HATU versetzt und das Reaktionsgemisch 6 h im Ultraschallbad behandelt. Dabei wurden stündlich 5.5 mg HATU nachgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt, der Rückstand in Acetonitril/Wasser aufgenommen und mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht. Nach erneutem Einengen im Vakuum wurde der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 5.8 mg (57 % d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 1027 $(M+H)^+$.

**Intermediat 212**

N-{2-[2-(2-{3-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-oxopropoxy}ethoxy)ethoxy]ethyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S,3S)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Die Herstellung erfolgte zunächst in Analogie zu Intermediat 168 beginnend mit der reduktiven Alkylierung von Intermediat 15 mit Intermediat 167 und anschließender hydrogenolytischer Spaltung des Benzylesters zu N-(2-{2-[2-(2-Carboxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(2S,3S)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxo-3-phenylbutan-2-yl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid.

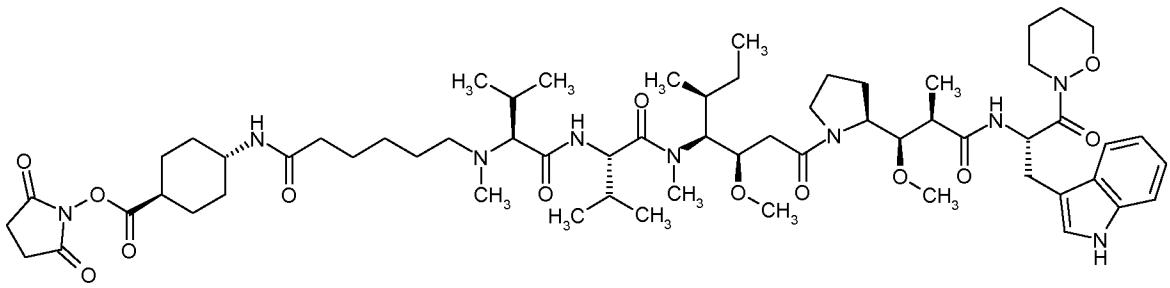
8.4 mg (8 µmol) dieses Intermediats wurden in 3 ml DMF gelöst und mit 9.5 mg (80 µmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion, 10 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und 9.4 mg (25 µmol) HATU versetzt und das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt, der Rückstand in Acetonitril/Wasser aufgenommen und mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht. Nach erneutem Einengen im Vakuum wurde der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 4 mg (32% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 1117 $(M+H)^+$.

**Intermediat 213**

N-{6-[(trans-4-{[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl}cyclohexyl)amino]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



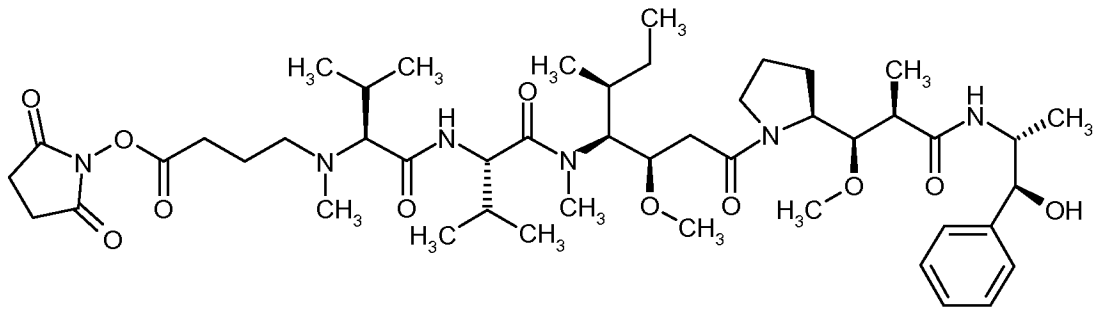
Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 104 ausgehend von N-(5-Carboxypentyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid, dessen Synthese unter Intermediat 210 beschrieben wurde, hergestellt. Es wurden 9.3 mg der Titelverbindung (37% d.Th. über 3 Stufen) erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1177 $(M+H)^+$.

**Intermediat 214**

N-{4-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-4-oxobutyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



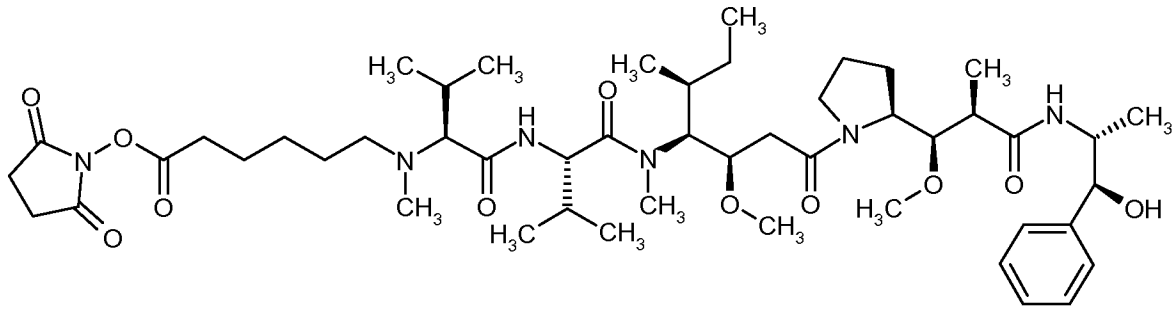
Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 210 durch Überführung von Intermediat 92 in den Aktivester hergestellt.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 901 $(M+H)^+$.

**Intermediat 215**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



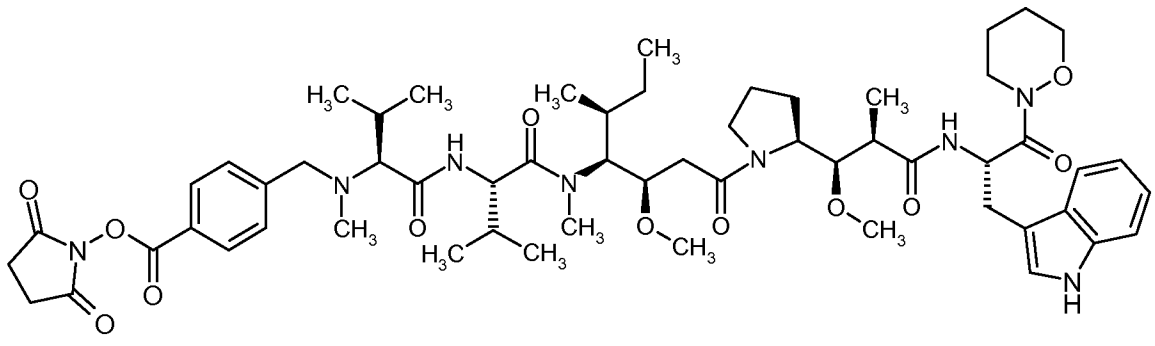
Zunächst wurde aus Intermediat 40 in Analogie zu Intermediat 183 mit Boran-Pyridin-Komplex N-(5-Carboxypentyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid hergestellt. Aus dieser Verbindung wurde dann in Analogie zu Intermediat 210 der Aktivester generiert. Es wurden 34 mg (36% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 930 $(M+H)^+$.

**Intermediat 216**

N-(4-{[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl}benzyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



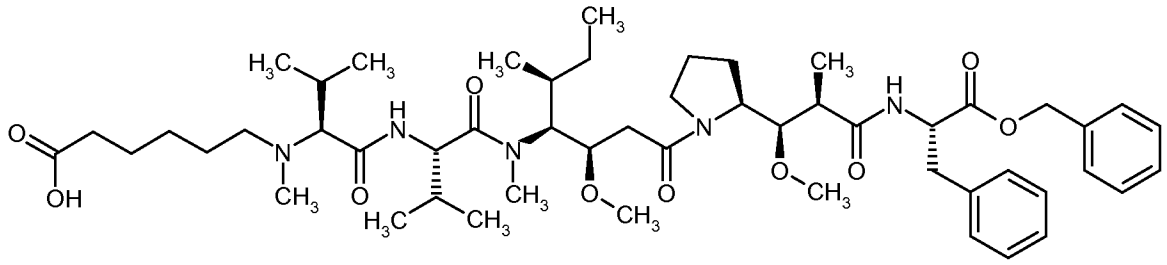
Zunächst wurde in Analogie zur Herstellung von Intermediat 183 Intermediat 192 mit 4-Formylbenzoesäure mit Boran-Pyridin-Komplex zu N-(4-Carboxybenzyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid umgesetzt. Aus dieser Verbindung wurden dann in Analogie zu Intermediat 210 11 mg (68% d. Th.) der Titelverbindung generiert.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 1072 $(M+H)^+$.

**Intermediat 217**

N-(5-Carboxypentyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



53 mg (84 µmol) *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(2*R*,3*S*,4*S*)-1-carboxy-2-methoxy-4-methylhexan-3-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 4) und 45 mg (84 µmol) Benzyl-*N*-{(2*R*,3*R*)-3-methoxy-2-methyl-3-[(2*S*)-pyrrolidin-2-yl]propanoyl}-L-phenylalaninat-Trifluoracetat (Intermediat 12) wurden in 2 ml DMF aufgenommen, mit 19 µl *N*,*N*-Diisopropylethylamin, 14 mg (92 µmol) HOBt sowie 17.6 mg (92 µmol) EDC versetzt und dann über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden so 59 mg (68% d. Th.) des Fmoc-geschützten Intermediats *N*-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]-pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.55 min; m/z = 1044 $(M+H)^+$.

57 mg (0.055 mmol) dieses Intermediats wurden zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 1.2 ml Piperidin in 5 ml DMF behandelt. Nach Einengen und Reinigung mittels präparativer HPLC wurden

39 mg (76% d. Th.) des freien Amin-Intermediats *N*-Methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid als Trifluoracetat erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; m/z = 822 $(M+H)^+$.

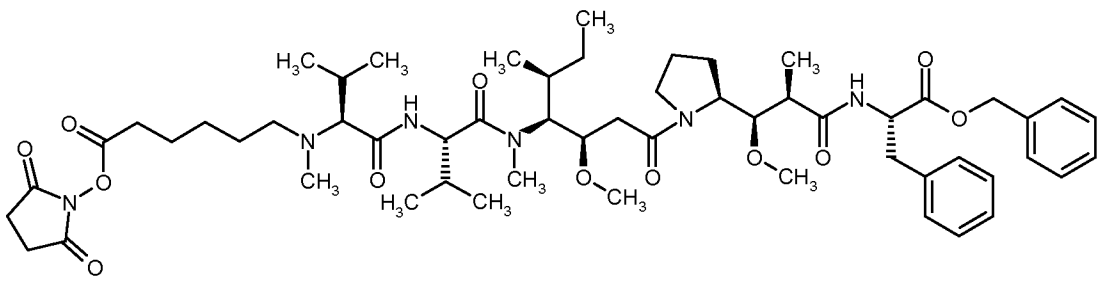
60 mg (0.06 mmol) dieses Intermediats wurden in Analogie zu Intermediat 210 mit 6-Oxohexansäure in Gegenwart von Boran-Pyridin-Komplex umgesetzt. Es wurden 45 mg (75% d. Th.) der Titelverbindung als Schaums erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 9936 $(M+H)^+$.

**Intermediat 218**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde durch Überführung von 42 mg (0.05 mmol) von Intermediat 217 in den Aktivester hergestellt.

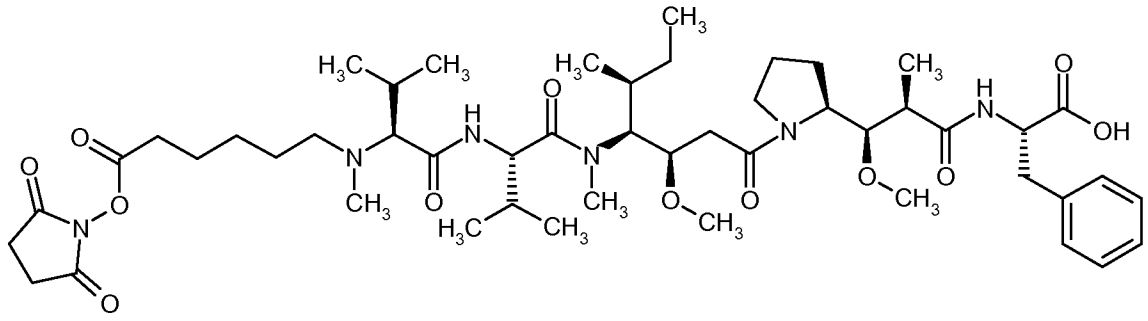
Ausbeute: 26 mg (54%)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 1034 $(M+H)^+$.

**Intermediat 219**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



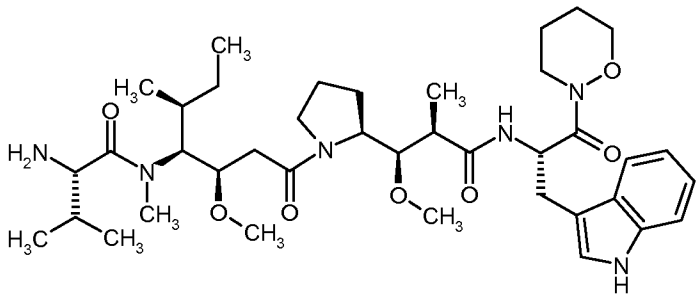
20 mg (0.02 mol) der Verbindung aus Intermediat 218 wurden in 2.4 ml Methanol aufgenommen und über 5%-igem Palladium auf Aktivkohle 30 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Acetonitri/Wasser 1:1 lyophilisiert. Man erhielt 14 mg (92% d.Th.) der Titelverbindung als farblosen Schaum.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 944 $(M+H)^+$.

**Intermediat 220**

N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



0.5 g (1.01 mmol) von Intermediat 1 wurden in 10 ml Dichlormethan mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 30 min Behandlung im Ultraschallbad wurde der Ansatz eingeengt und zunächst mit DCM und dann mit Diethylether nachdestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der ölige Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

500 mg dieses Zwischenproduktes wurden in 20 ml DMF gelöst und mit 466 mg (3.8 mmol) von Intermediat 191, 382 mg (1.01 mmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 440 µL (2.5 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und danach eingeengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und zuerst zweimal mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und dann mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 95:5 als Eluent gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen des Rückstands im Hochvakuum wurden 562 mg (65% d. Th. über 2 Stufen) des Z-geschützten Intermediats erhalten.

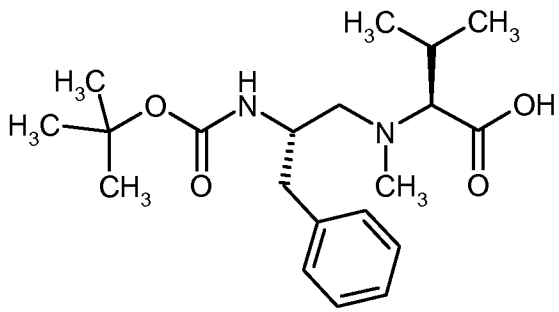
562 mg (0.57 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 50 ml Methanol aufgenommen und mit 155 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 20 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand aus Dioxan lyophilisiert. Man erhielt 361 mg (87% d.Th.) der Titelverbindung als Schaum.

HPLC (Methode 5): Doppelpeak mit Rt = 1.75 und 1.86 min;

LC-MS (Methode 1): Doppelpeak bei Rt = 0.84 min und 0.91 min mit gleicher Masse; MS (ESIpos): m/z = 944 $(M+H)^+$.

**Intermediat 221**

N-{(2S)-2-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-3-phenylpropyl}-N-methyl-L-valin



100 mg (0.76 mmol) von kommerziell erhältlichem N-Methyl-L-valin und 285 mg (1.14 mmol) von kommerziell erhältlichem *tert.*-Butyl-[(2S)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]carbamat wurden in 22 ml Methanol zusammengegeben und mit 340 mg (3.66 mmol) Boran-Pyridin-Komplex und 70 µL Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde

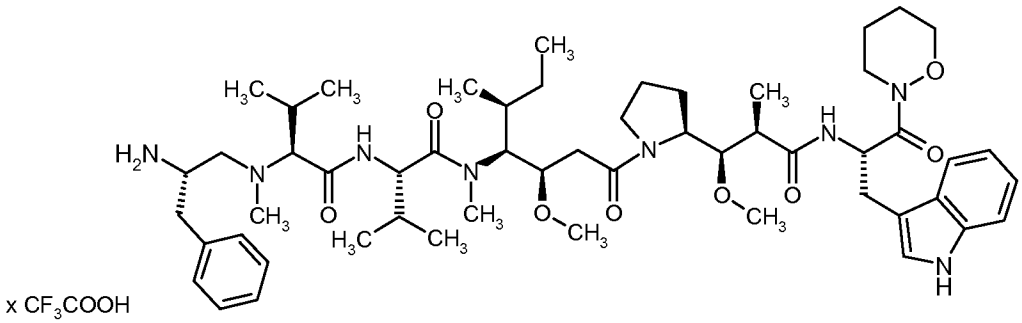
im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methano/17%iger wässriger Ammoniak-Lösung als Eluent gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation aus Dioxan/Wasser 1:1 wurden 259 mg (93%d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 365 $(M+H)^+$.

**Intermediat 222**

N-[(2S)-2-Amino-3-phenylpropyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat




40 mg (0.11 mmol) N-{(2S)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-3-phenylpropyl}-N-methyl-L-valin (Intermediat 221) wurden in 5 ml DMF gelöst und mit 80 mg (0.11 mmol) N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 220), 50 mg (0.13 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 57 µL (2.5 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und danach eingeengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und zuerst mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und dann mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 60 mg (50% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.2 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.17 min; MS (ESIpos): m/z = 1073 $(M+H)^+$.

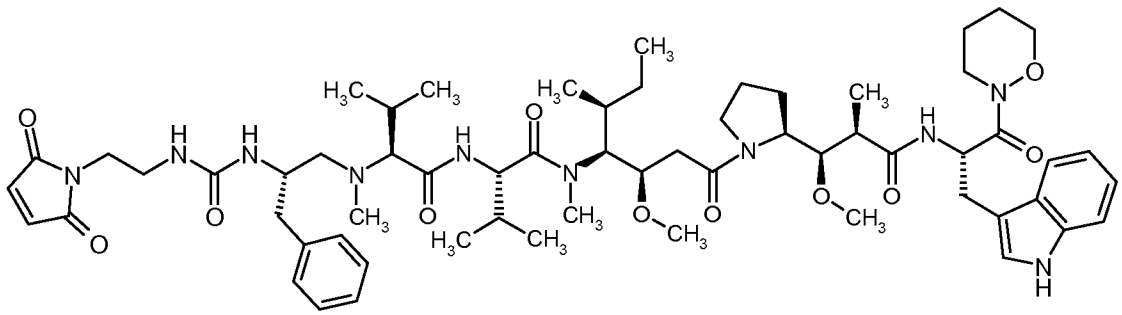
60 mg (0.05 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt und das Reaktionsgemisch 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Farktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Dioxan/Wasser lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 25 mg (42% d.Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 974 $(M+H)^+$.

**Intermediat 223**

N-[(2S)-2-({[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}amino)-3-phenylpropyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



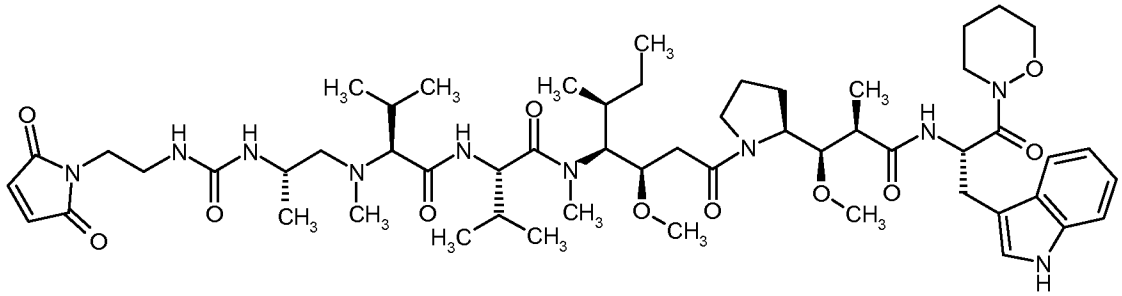
Die Herstellung erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat 134 ausgehend von 5 mg (4.6 µmol) von Intermediat 222. Es wurden 3.4 mg (65% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.99 min; MS (ESIpos): m/z = 1140 $(M+H)^+$.

**Intermediat 224**

N-[(2S)-2-({[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}amino)propyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



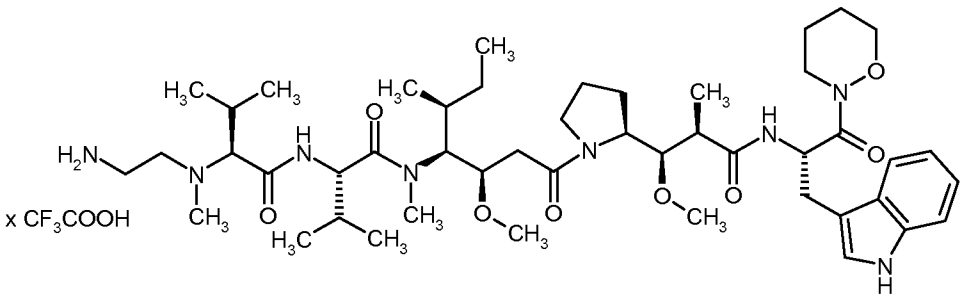
Die Herstellung erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat 223.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 1064 $(M+H)^+$.

**Intermediat 225**

N-(2-Aminoethyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



100 mg (0.76 mmol) von kommerziell erhältlichem N-Methyl-L-valin und 182 mg (1.14 mmol) von kommerziell erhältlichem *tert.*-Butyl-(2-oxoethyl)carbamat wurden in 20 ml Methanol zusammengegeben und mit 340 mg (3.66 mmol) Boran-Pyridin-Komplex und 65 µL Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methano/17%iger wässriger Ammoniak-Lösung (15/4/0.5) als Eluent gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation aus Dioxan/Wasser 1:1 wurden 190 mg in 39%-iger Reinheit (35% d.Th.) des Intermediats erhalten, das ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wurde.

50 mg (0.07 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 52 mg (0.07 mmol) N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-

yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 220), 32 mg (0.09 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HATU) sowie 37 µL (0.2 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und danach eingeengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und zuerst mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und dann mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 53 mg (76% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.02 min; MS (ESIpos): m/z = 984 $(M+H)^+$.

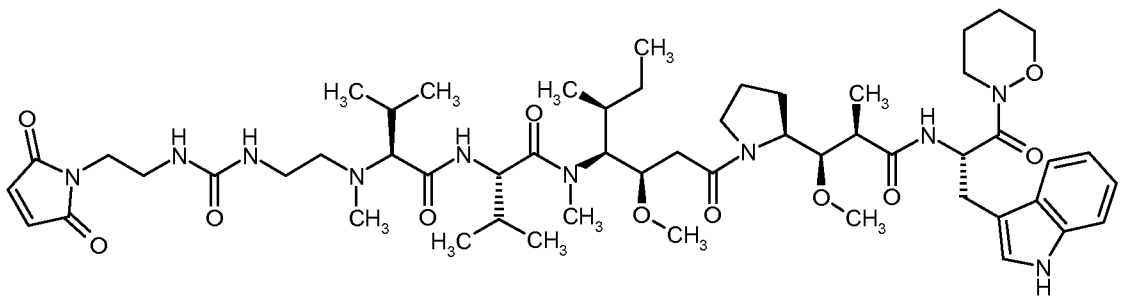
53 mg (0.05 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml Dichlormethan aufgenommen, mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt und das Reaktionsgemisch 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Farktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Dioxan/Wasser lyophilisiert. Auf diese Weise wurden 21 mg (40% d.Th.) der Titelverbindung in 65%-iger Reinheit erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 884 $(M+H)^+$.

**Intermediat 226**

N-[2-({[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}amino)ethyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



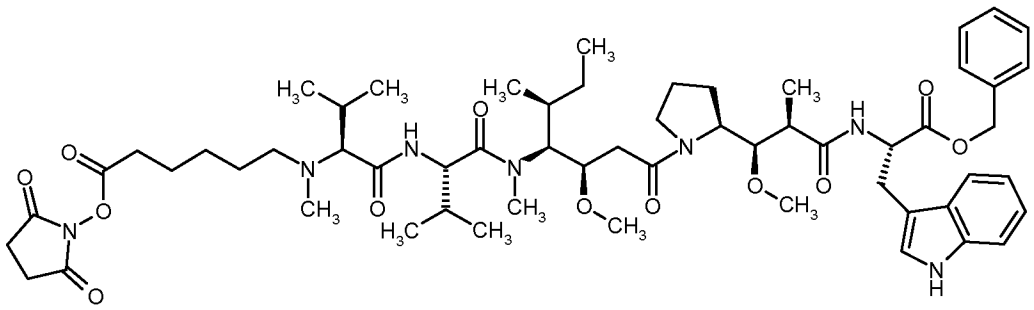
Die Herstellung erfolgte ausgehend von Intermediat 225 in Analogie zur Synthese von Intermediat 134. Es wurden 11.6 mg (59% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 1050 $(M+H)^+$.

**Intermediat 227**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzyloxy)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Diese Verbindung wurde analog zu Intermediat 218 durch Überführung in den Aktivester hergestellt.

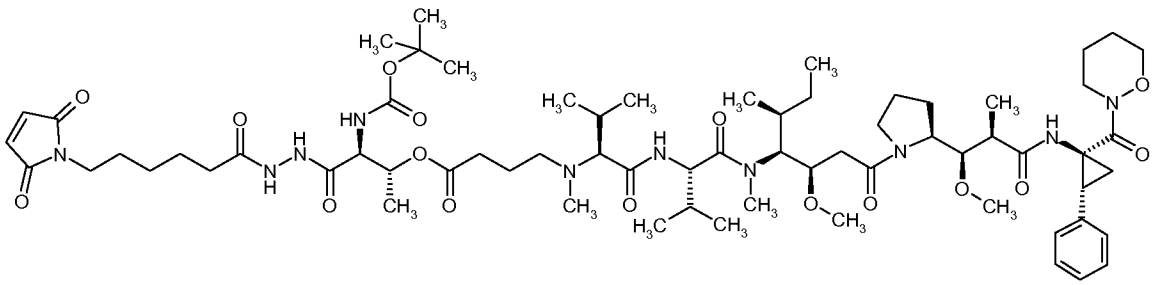
Ausbeute: 18 mg (51% d. Th.)

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 1073 $(M+H)^+$.

**Intermediat 228**

(2R,3S)-3-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutan-2-yl-(3R,4S,7S,10S)-4-[(2S)-butan-2-yl]-7,10-diisopropyl-3-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-oat



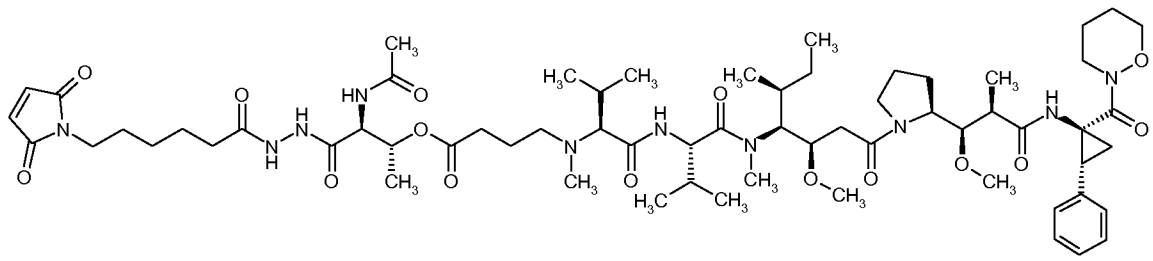
Die Titelverbindung wurde durch Kupplung der bei der Synthese von Intermediat 154 angefallenen Boc-geschützten Zwischenstufe mit kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid hergestellt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 1308 $(M+H)^+$.

**Intermediat 229**

(2R,3S)-3-Acetamido-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutan-2-yl-(3R,4S,7S,10S)-4-[(2S)-butan-2-yl]-7,10-diisopropyl-3-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-oat



Die Titelverbindung wurde aus 7.5 mg (2.5 µmol) von Intermediat 154 durch Acetylierung mit 2.3 µl Acetanhydrid in 1 ml DMF in Gegenwart von 0.4 µl *N,N*-Diisopropylethylamin hergestellt.

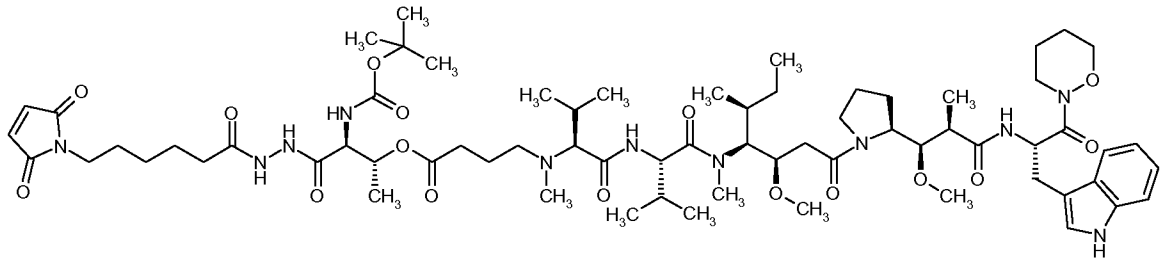
Ausbeute: 1.4 mg (40% d. Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1250 $(M+H)^+$.

**Intermediat 230**

(2R,3S)-3-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutan-2-yl-(3R,4S,7S,10S)-4-[(2S)-butan-2-yl]-3-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-7,10-diisopropyl-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-oat



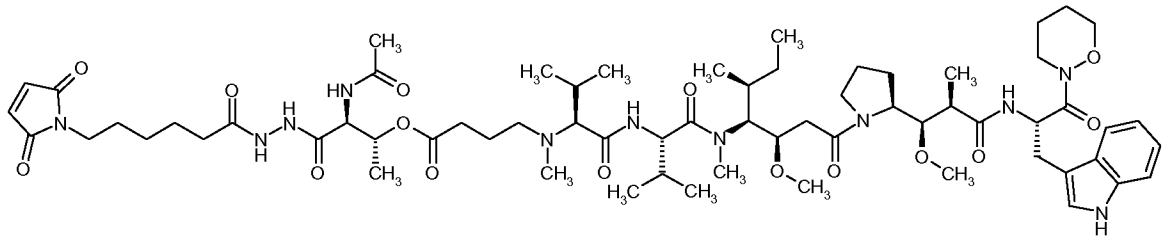
Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 228 ausgehend von Intermediat 193 hergestellt. Es wurden 16 mg (30% d. Th. über 3 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.02 min; MS (ESIpos): m/z = 1335 $(M+H)^+$.

**Intermediat 231**

(2R,3S)-3-Acetamido-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutan-2-yl-(3R,4S,7S,10S)-4-[(2S)-butan-2-yl]-3-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-7,10-diisopropyl-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-oat



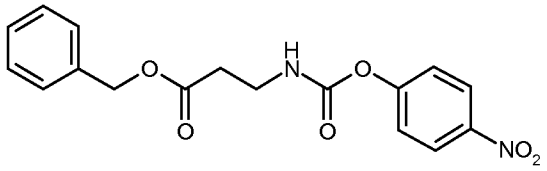
Diese Verbindung wurde aus 8 mg (6 µmol) von Intermediat 230 zunächst durch Entschützung mit Trifluoressigsäure und nachfolgende Acetylierung mit Acetanhydrid in DMF in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin hergestellt. Es wurden 2 mg (37% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 1277 $(M+H)^+$.

**Intermediat 232**

Benzyl-N-[(4-nitrophenoxy)carbonyl]-beta-alaninat



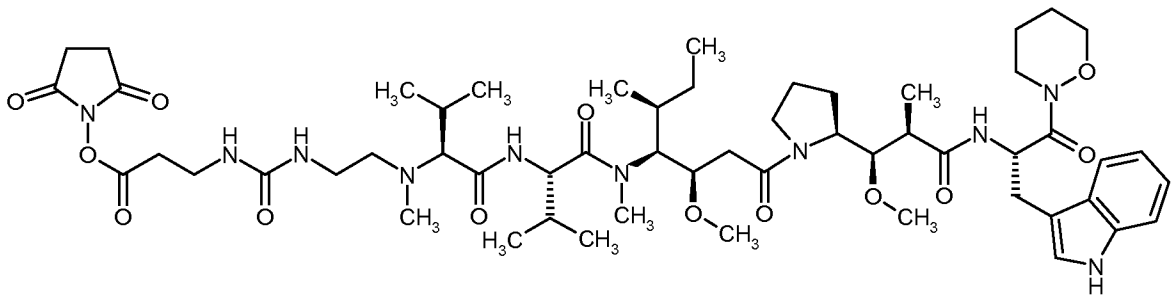
200 mg (0.57 mmol) von kommerziell erhältlichem 4-Methylbenzolsulfonsäure-benzyl-beta-alaninat sowie 229 mg (1.14 mmol) 4-Nitrophenylchlorocarbonat wurden in 15 ml Tetrahydrofuran aufgenommen und das Reaktionsgemisch dann 30 min zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknen des Rückstandes im Hochvakuum wurden 86 mg (44% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 345 $(M+H)^+$.

**Intermediat 233**

N-{2-[({3-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-oxopropyl}carbamoyl)amino]ethyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



13 mg (10 µmol) von Intermediat 225 und 6.7 mg (20 µmol) von Intermediat 232 wurden in 3 ml DMF gelöst und anschließend mit 7 µL N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Hochvakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknen des Rückstandes im Hochvakuum wurden 5.4 mg (38% d.Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0. 6in; MS (ESIpos): m/z = 1089 $(M+H)^+$.

5.4 mg (5 µmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 20 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen des Rückstands im Hochvakuum wurden 5 mg (quant.) des Säure-Intermediats erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 999 $(M+H)^+$.

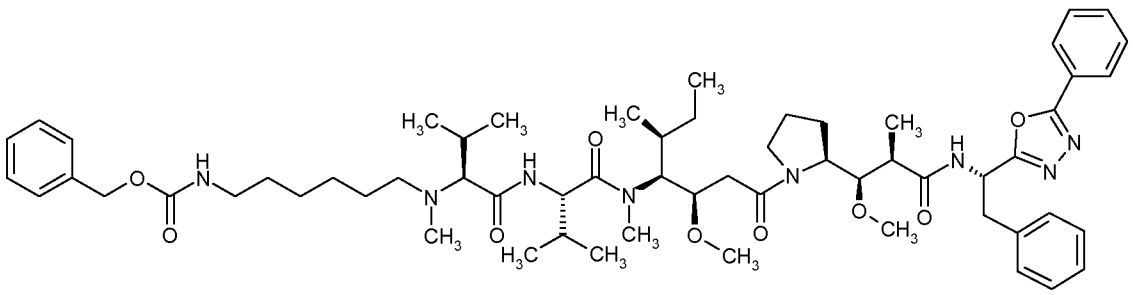
5 mg (10 µmol) dieses Intermediats wurden in 1 ml DMF gelöst und mit 5.8 mg (50 mmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und anschließend mit 2.6 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und 3.8 mg (10 µmol) HATU versetzt. Nach 20 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan/Wasser 1:1 wurden 1.1 mg (20% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1096 $(M+H)^+$.

**Intermediat 234**

N-(6-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}hexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



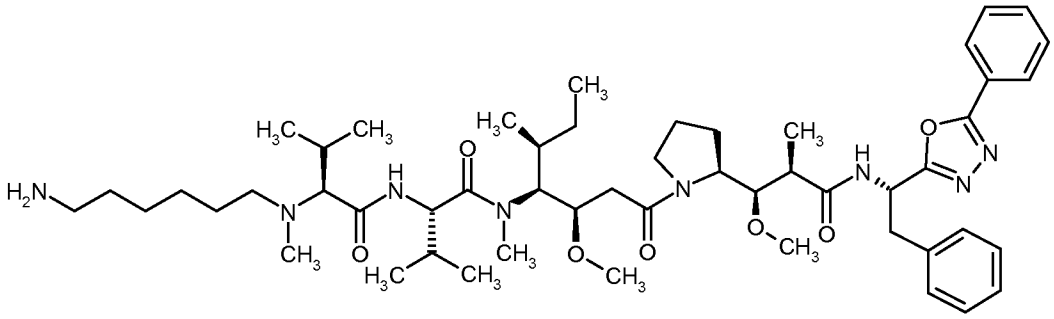
25 mg (30 µmol) N-Methyl-*L*-valyl-N-[(*3R,4S,5S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-*L*-valinamid (Intermediat 55) und 45 mg (180 µmol) Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat wurden in 3 ml Methanol aufgenommen und mit Essigsäure sauer gestellt. Bei Raumtemperatur wurden anschliessend 15 µl (144 µmol; 9.4M) Boran-Pyridin-Komplex zugegeben. Der Ansatz wurde anschliessend für 24 h bei RT gerührt, wobei nach 8 h erneut Essigsäure sowie 15 µl (144 µmol; 9.4M) Boran-Pyridin-Komplex zugegeben wurden. Das

Reaktionsgemisch wurde anschliessend mit TFA auf pH 2 eingestellt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden so 15 mg (46% d. Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.03 min; m/z = 1066 $(M+H)^+$.

**Intermediat 235**

N-(6-Aminohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

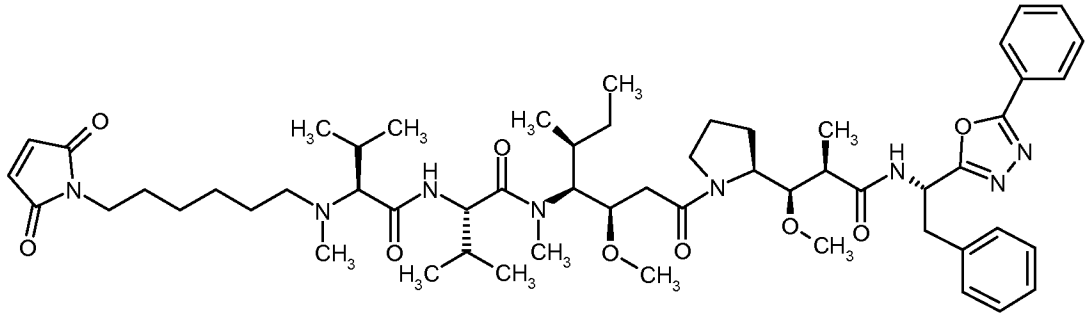


15 mg (14 µmol) N-(6-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}hexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 234) wurden in 3 ml Methanol aufgenommen und 1.8 mg Palladium auf Kohle (5%) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend 2 h bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Es wurden 11 mg (86% d. Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.81 min; m/z = 932 $(M+H)^+$.

**Intermediat 236**

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

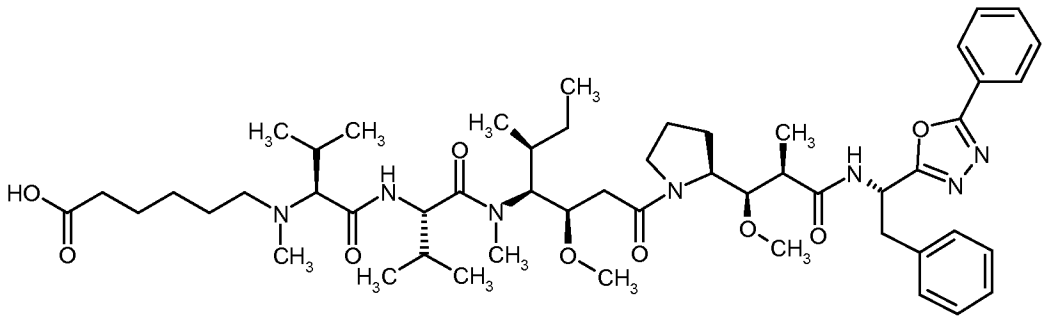


11 mg (12 µmol) N-(6-Aminohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Intermediat 235) wurden in 500 µl Dioxan/Wasser 1:1 aufgenommen und mit 253 µl 1M wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 2.8 mg (18 µmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und danach mit Trifluoressigsäure sauer gestellt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation wurden 0.8 mg (7% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; m/z = 1012 $(M+H)^+$.

**Intermediat 237**

N-(5-Carboxypentyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



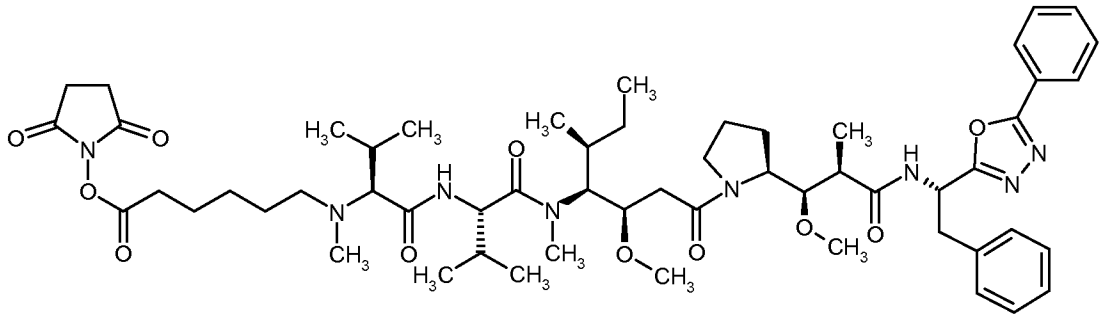
25 mg (30 µmol) N-Methyl-*L*-valyl-N-[(*3R,4S,5S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1*S*)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-*L*-valinamid (Intermediat 55) ) und 23 mg (180 µmol) 6-Oxohexansäure wurden in 3 ml Methanol aufgenommen und mit Essigsäure sauer gestellt. Bei Raumtemperatur wurden anschliessend 15 µl (144 µmol; 9.4M) Boran-Pyridin-Komplex zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend für 20 h bei RT gerührt, wobei nach 8 h erneut

Essigsäure sowie 15 µl (144 µmol; 9.4M) Boran-Pyridin-Komplex zugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend mit Trifluoressigsäure auf pH 2 eingestellt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand lyophilisiert. Es wurden so 21 mg (74% d. Th.) der Titelverbindung als Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.91 min; m/z = 947 $(M+H)^+$.

**Intermediat 238**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-{[(1S)-2-phenyl-1-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)ethyl]amino}propyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

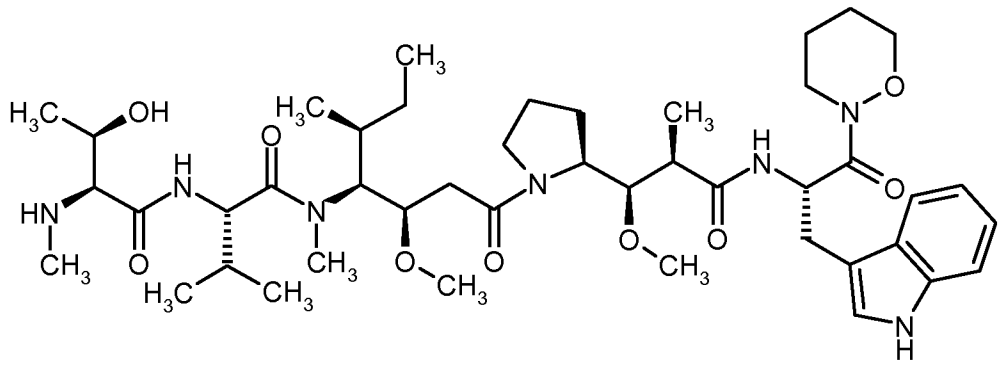


21 mg (22 µmol) von Intermediat 237 wurden in 1 ml DMF gelöst und mit 38 mg (333 µmol) 1-Hydroxypyrrolidin-2,5-dion und anschließend mit 2.4 mg (10 µmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) und 19 µl N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 22 mg (96% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.95 min; m/z = 1044 $(M+H)^+$.

**Intermediat 239**

N-Methyl-L-threonyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl] pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



Zunächst wurde *N*-[(Benzyloxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-threonin aus 237 mg (0.887 mmol) seines Dicyclohexylamin-Salzes durch Aufnehmen in Ethylacetat und Ausschütteln mit 5%-iger wässriger Schwefelsäure freigesetzt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. 14.7 mg (0.055 mmol) von *N*-[(Benzyloxy)carbonyl]-*N*-methyl-L-threonin wurden in 3 ml DMF aufgenommen und nacheinander mit 40 mg (0.055 mmol) von Intermediat 220, 12.7 mg (0.066 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und 10 mg (0.066 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat versetzt. Die Mischung wurde anschließend 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde danach im Vakuum entfernt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden so 29 mg (54% d. Th.) des Z-geschützten Intermediats erhalten.

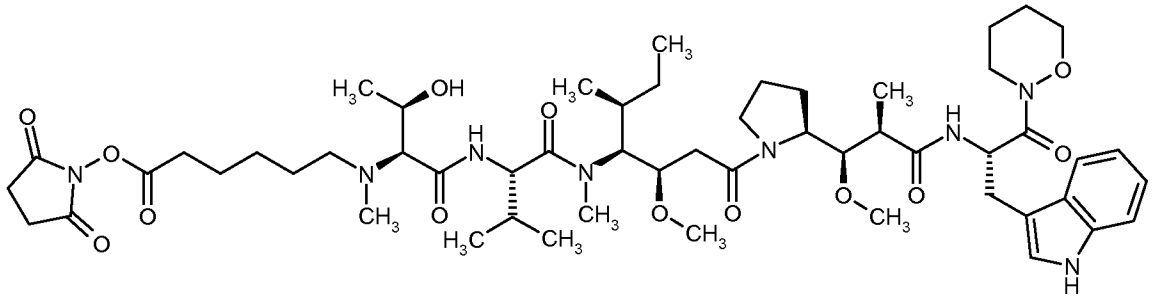
LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.15 min; MS (ESIpos): m/z = 976 $(M+H)^+$.

29 mg (0.003 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml Methanol gelöst und bei RT und Normaldruck 1 h lang über 5 mg 5% Palladium/Kohle hydriert. Der Katalysator wurde anschließend abfiltriert und das Lösungsmittel abgedampft. Der verbliebene Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 17 mg (54% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 842 $(M+H)^+$.

**Intermediat 240**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-threonyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



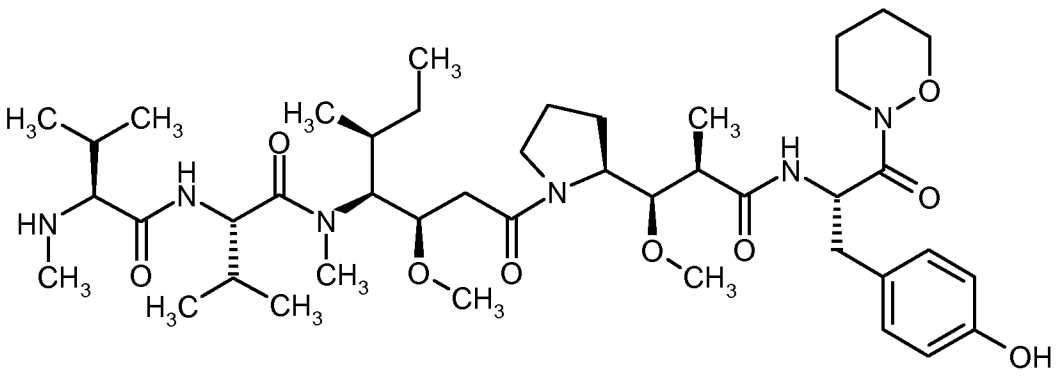
Diese Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat 210 aus 15.6 mg (0.016 mmol) Intermediat 239 hergestellt. Es wurden 10.8 mg (67% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0. 85 min; MS (ESIpos): m/z = 1053 $(M+H)^+$.

**Intermediat 241**

N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



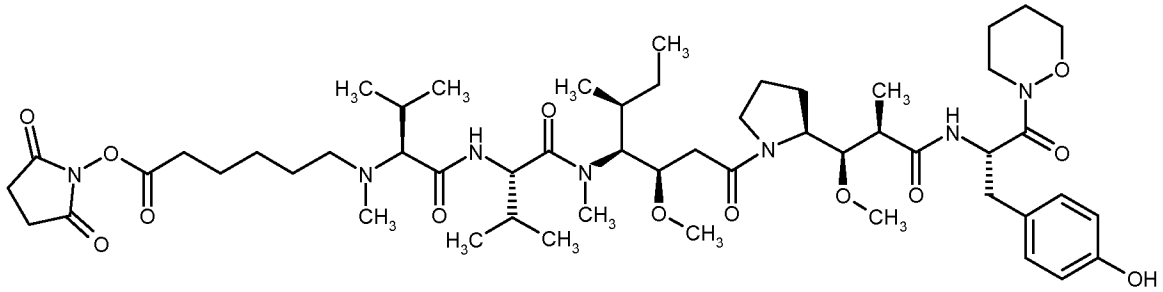
Zunächste wurde in Analogie zu Intermediat 5 Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)propan-1-on(1:1) hergestellt. Aus diesem Baustein wurde dann in Analogie zu der in Intermediat 75 beschriebenen Synthese durch Kupplung mit *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) in Gegenwart von O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure die Titelverbindung hergestellt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0. 75 min; MS (ESIpos): m/z = 817 $(M+H)^+$.

**Intermediat 242**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



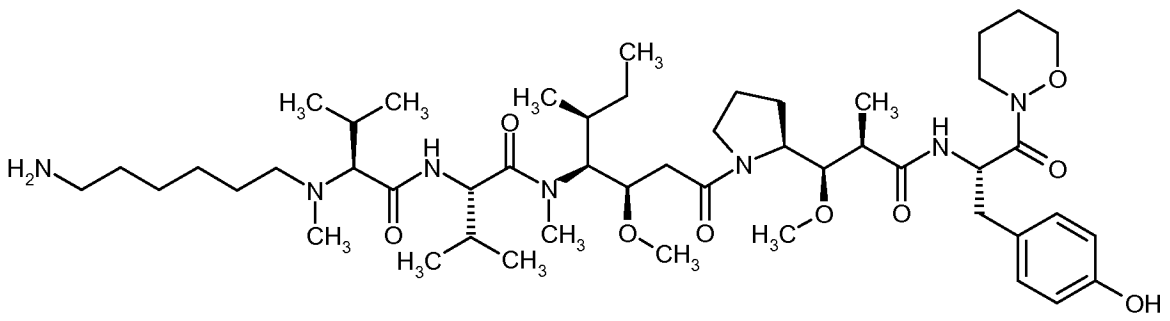
50 mg (0.05 mmol) von Intermediat 241 wurden in Analogie zu Intermediat 210 mit 6-Oxohexansäure in Gegenwart von Boran-Pyridin-Komplex umgesetzt. Anschließend wurden 22.5 mg (0.02 mmol) der erhaltenen Säure in den aktivierten Ester überführt. Es wurden 13.5 mg (36% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0. 86 min; MS (ESIpos): m/z = 1028 $(M+H)^+$.

**Intermediat 243**

N-(6-Aminohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Intermediat 78 durch reduktive Alkylierung von Intermediat 241 mit Benzyl-(6-oxohexyl)carbamat und Boran-Pyridin-Komplex und anschließender Hydrierung in Methanol als Lösungsmittel.

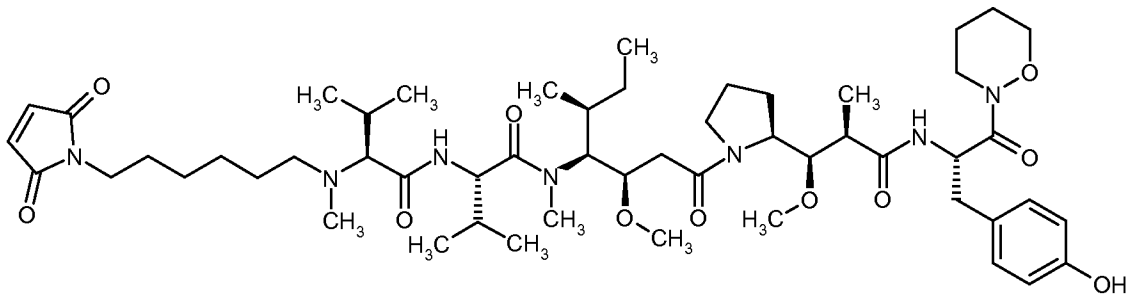
Ausbeute: 17.5 mg (34% d.Th. über 2 Stufen)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.63 min; MS (ESIpos): m/z = 916 $(M+H)^+$.

**Intermediat 244**

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Intermediat 166 ausgehend von Intermediat 243.

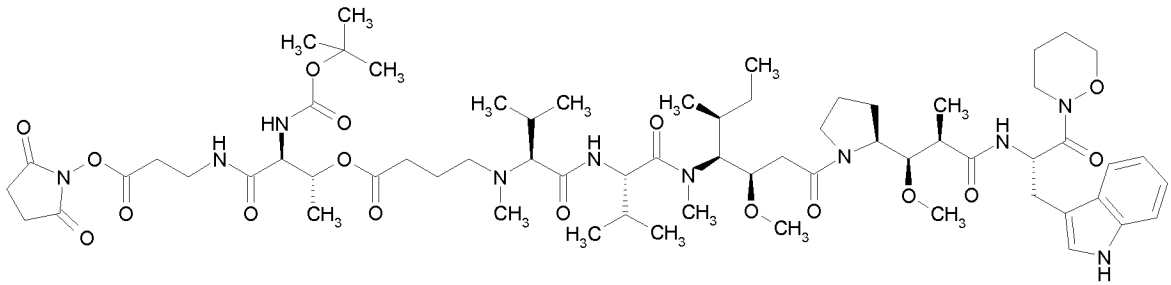
Ausbeute: 1.3 mg (12% d.Th.)

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 996 $(M+H)^+$.

**Intermediat 245**

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-O-[(3R,4S,7S,10S)-4-[(2S)-butan-2-yl]-3-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-2-oxoethyl)-7,10-diisopropyl-5,11-dimethyl-6,9,15-trioxo-2-oxa-5,8,11-triazapentadecan-15-yl]-N-(tert.-butoxycarbonyl)-L-threonyl-beta-alaninat



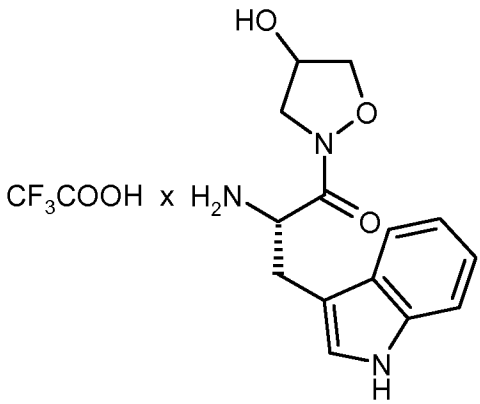
Zunächst wurde Intermediat 193 wie für Intermediat 154 beschrieben mit Benzyl-N-(tert.-butoxycarbonyl)-L-threoninat umgesetzt und anschließend der Benzylester hydrogenolytisch entfernt. 30 mg (0.027 mmol) von dem so erhaltenen N-[4-({(1S,2R)-1-[(tert.-Butoxycarbonyl)amino]-1-carboxypropan-2-yl}oxy)-4-oxobutyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid wurden dann mit 4-Methylbenzolsulfonsäure-benzyl-beta-alaninat in Gegenwart von HATU gekuppelt und der Benzylester erneut durch Hydrogenolyse entfernt (Ausbeute: 24 mg (71% d. Th. über 2 Stufen). Schließlich wurden 10 mg (0.008 mmol) der erhaltenen Säure in den aktivierten Ester überführt. Nach HPLC Reinigung wurden 2.7 mg (23% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 1295 $(M+H)^+$

**Intermediat 246a**

(2S)-2-Amino-1-(4-hydroxy-1,2-oxazolidin-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propan-1-on-Trifluoracetat (Diastereomer 1)



1.6 g (3.982 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert.-butoxycarbonyl)-L-tryptophanat wurden in 15 ml DMF gelöst und mit 500 mg (3.982 mmol) 1,2-Oxazolidin-4-ol und 100 µl *N,N*-

Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 100 µl *N,N*-Diisopropylethylamin hinzugegeben, der Ansatz zunächst 5 h im Ultraschallbad behandelt, dann über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und zuerst zweimal mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung, dann mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und schließlich mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 95:5 als Eluent in die Diastereomere aufgetrennt. Die entsprechenden Fraktionen von beiden Diastereomeren wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen der Rückstände im Hochvakuum wurden 272 mg (18% d.Th.) von Diastereomer 1 ($R_f$ = 0.18 (Dichlormethan/Methanol 95:5) und 236 mg (16% d.Th.) von Diastereomer 2 ($R_f$ = 0.13 (Dichlormethan/Methanol 95:5) sowie 333 mg (22% d.Th.) einer Mischfraktion der Boc-geschützten Intermediate erhalten.

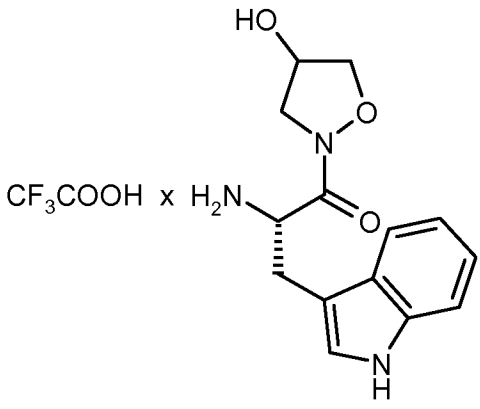
Aus 272 mg (725 µmol) von Diastereomer 1 dieses Intermediats wurde nach Standardbedingungen mit 5 ml Trifluoressigsäure in 20 ml Dichlormethan die Boc-Schutzgruppe abgespalten und nach Lyophilisation aus Dioxan/Wasser 290 mg (quant) der Titelverbindung in 75%iger Reinheit erhalten und ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt..

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.1 min;

LC-MS (Methode 13): $R_t$ = 1.80 min; MS (ESIpos): m/z = 276 $(M+H)^+$

**Intermediat 246b**

(2S)-2-Amino-1-(4-hydroxy-1,2-oxazolidin-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propan-1-on-Trifluoracetat (Diastereomer 2)

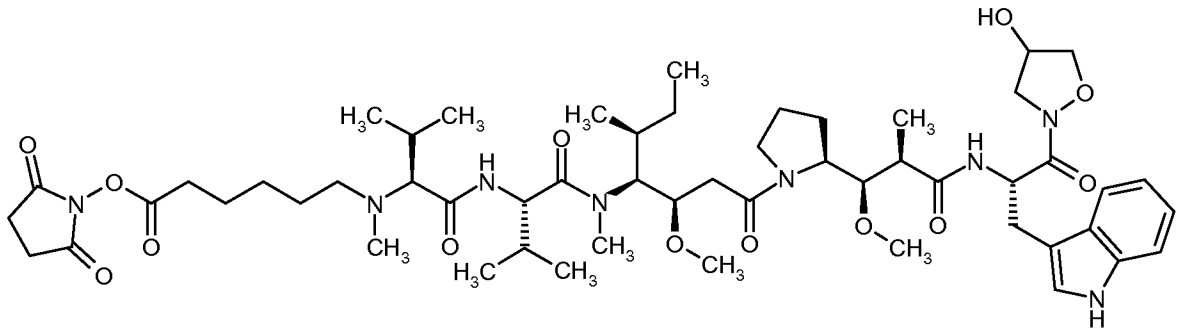


Aus 236 mg (630 µmol) von Diastereomer 2 des unter 246a beschriebenen Intermediats wurden nach Standardbedingungen mit 5 ml Trifluoressigsäure in 20 ml Dichlormethan die Boc-Schutzgruppe abgespalten und nach Einengen, Verrühren mit Diethylether und Trocknen des Rückstandes im Hochvakuum 214 mg (76%) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 13): $R_t$ = 1.84 min; MS (ESIpos): m/z = 276 $(M+H)^+$

**Intermediat 247a**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(4-hydroxy-1,2-oxazolidin-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Diastereomer 1)



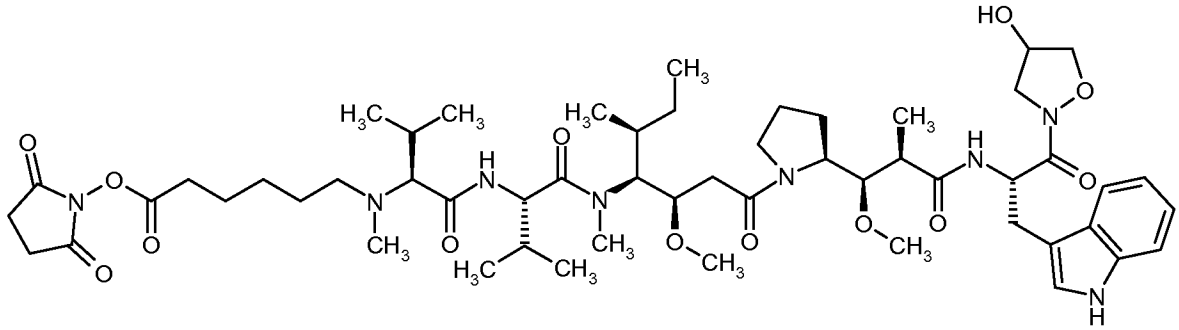
Zur Synthese dieser Verbindung wurde zunächst wie für Intermediat 74 beschrieben die Kupplung der Intermediate 26 und 246a mit anschließender Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durchgeführt. Anschließend wurde wie für Intermediat 210 beschrieben die Alkylierung mit 6-Oxohexansäure in Gegenwart von Boran-Pyridin-Komplex und anschließende Überführung der Säure in den Aktivester durchgeführt. Die Titelverbindung wurde durch präparative HPLC gereinigt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1053 $(M+H)^+$

**Intermediat 247b**

N-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(4-hydroxy-1,2-oxazolidin-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid (Diastereomer 2)



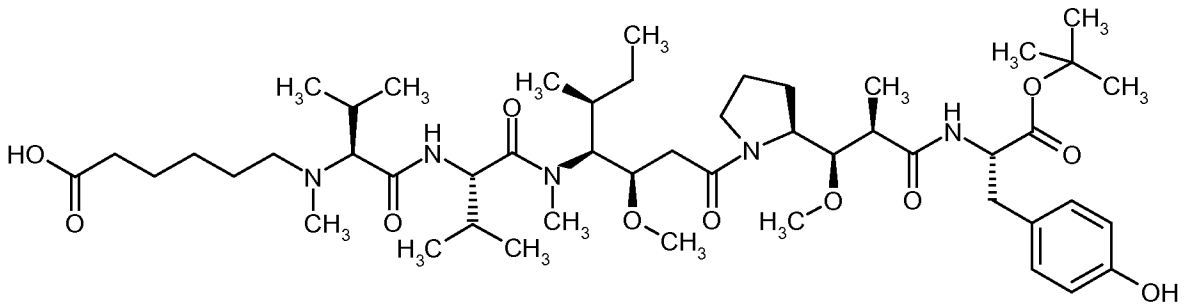
Zur Synthese dieser Verbindung wurde zunächst wie für Intermediat 74 beschrieben die Kupplung der Intermediate 26 und 246b mit anschließender Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durchgeführt. Anschließend wurde wie für Intermediat 210 beschrieben die Alkylierung mit 6-Oxohexansäure in Gegenwart von Boran-Pyridin-Komplex und anschließende Überführung der Säure in den Aktivester durchgeführt. Die Titelverbindung wurde durch präparative HPLC gereinigt.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1053 $(M+H)^+$

**Intermediat 248**

N-(5-Carboxypentyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-tert.-butoxy-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



Zunächst wurde in Analogie zu der in Intermediat 86 beschriebenen Synthese durch Kupplung von *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-2-carboxy-1-methoxypropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid (Intermediat 26) und tert.-Butyl-L-tyrosinat in Gegenwart von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure unter Erhalt des tert.-Butylesters (40 min Rühren mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan) die Amin-Verbindung tert.-Butyl-N-[(2R,3R)-3-methoxy-3-{(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-5-methyl-4-(methyl{(2S)-3-methyl-2-[(N-methyl-L-valyl)amino]butyl}amino)heptanoyl]

pyrrolidin-2-yl}-2-methylpropanoyl]-L-tyrosinat als Trifluoracetat hergestellt. Aus 38 mg (0.04 mmol) dieser Verbindung wurden dann in Analogie zur Herstellung von Intermediat 210 durch Umsetzung mit 6-Oxohexansäure in Gegenwart von Boran-Pyridin-Komplex 31 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 918 $(M+H)^+$.

**Ausführungsbeispiele:**

**Verwendete anti-EGFR1-Antikörper**

**Cetuximab (INN Num. 7906)**

weitere Namen: IMC-225, C225, EMR-62202, BMS-564717, Fab C225

Cetuximab (Drug Bank Accession Number DB00002) ist ein chimärer anti-EGFR1-Antikörper, der in SP2/0 Maus-Myelom-Zellen produziert wird 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:

Leichte Kette (kappa):

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS
RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Panitumumab (INN Num. 8499)**

Panitumumab (weitere Namen: ABX-EGF, E7.6.3) (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:

Leichte Kette (kappa):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Schwere Kette:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTN
YNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**Nimotuzumab (INN Num. 8545)**

Bei Nimotuzumab (weitere Namen: TheraCIM-h-R3; h-R3; Theraloc; BioMab; BIOMAb-EGFR; Vecthix; KI-0501) (Patente 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.

**B. Herstellung von ADCs**

Die oben beschriebenen Intermediate können beispielsweise an die anti-EGF-Rezeptor Antikörper Cetuximab, Nimotuzumab oder Panitumumab sowie weitere im Folgenden aufgeführte Antikörper geknüpft werden, wobei solche Verknüpfungen nach den unten aufgeführten Verfahren wahlweise über Cystein- oder über Lysin-Seitenketten des Antikörperproteins erfolgen kann.

**B-1.1** Aufarbeitung der EGFR-Antikörper vor Konjugation

Erbitux Handelsware (Erbitux® 5mg/ml Infusionslösung 100 ml, PZN 0493540, N1, 500 mg, Fa. Merck), Vectibix Handelsware (Vectibix® 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, 1 Durchstechfl. (N1) 100 mg, 20 ml, PZN 6078606, Fa. Amgen) oder CIMAher Handelsware (CIMAher® 50 mg AMP 4 x 10 ml, Import aus Kuba, Fa. YM BioScienecs Inc. (Mississauga Canada).) wurden kommerziell aus der Apotheke bezogen.

Zur Entfernung des in der Formulierung enthaltenen Polysorbat 80 wurde an Protein A (MabSelectSure) gebunden und mit 15% Isopropanol gespült. Nach der Elution mit saurem Acetatpuffer wurde mittels einer Gelfiltration auf D-PBS umgepuffert und das so erhaltene Material mit den jeweiligen Toxophoren gekuppelt.

**B-1.2** Allgemeines Verfahren zur Expression von Antikörpern in Säugerzellen

Die Antikörper, zum Beispiel anti-PDL1 oder weitere Antikörper gegen die verschiedenen Targets, werden in Säugerzellkultur produziert. Dazu wurden HEK293 6E Zellen transient mit einem geeigneten CMV-Promotor basierenden Expressionplasmid transfiziert. Die schweren und leichten Ketten der Antikörper wurden entweder zusammen in ein Einvektorsystem, oder getrennt in ein Zweivektorsystem kloniert. Der Zellkulturmassstab war entweder bis 1.5 L im Schüttelkolben oder 10 L im „Wave-Bag“. Die Expression erfolgte bei 37°C für 5-6 Tage in F17 Medium (Invitrogen) ergänzt mit Tryptone TN1 (Organotechnie) mit 1 % „FCS ultra low IgG“ (Invitrogen) und 0.5 mM Valproinsäure. Die Expressionsausbeuten lagen zwischen 7 und 310 mg/l.

**B-1.3** Allgemeines Verfahren zur Aufreinigung von Antikörpern aus Zellüberständen.

Die Antikörper, zum Beispiel anti-PDL1 oder weitere Antikörper gegen die verschiedenen Targets, wurden aus den Zellkulturüberständen. gewonnen. Die Zellkulturüberstände wurden durch Zentrifugation von Zellen geklärt. Anschließend wurde der Überstand durch Affinitäts-chromatographie auf einer MabSelect Sure (GE Healthcare) Chromatographiesäule gereinigt. Dazu wurde die Säule in DPBS pH 7.4 (Sigma/Aldrich) equilibriert, der Zellüberstand aufgetragen 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.

**B-1.4** Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Cystein-Seitenketten

In die Kupplungsreaktionen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

*Anti-EGFR1 Antikörper:*

Cetuximab

Nimotuzumab

Panitumumab

*Andere Antikörper*:

anti-PDL1

anti-ICOSLG

anti-FGFR3

Herceptin

anti-TYRP1

anti-Glypican-3

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden 3 Äquivalente Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP), gelöst in PBS-Puffer, gegeben und 1h bei RT gerührt. Anschließend wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 10 Äquivalenten der zu kuppelnden Maleinimid-Vorläufer-Verbindung oder Halogenid-Vorläufer-Verbindung aus (Intermediate 102, 103, 105-109, 111-114, 117-126, 128, 129, 132-146, 148-155, 157, 159-161, 166, 171, 175-177, 184, 189, 194-195, 199-201, 205, 209, 223-224, 226, 228-231, 236 und 244) als Lösung in DMSO hinzugefügt. Dabei sollte die Menge an DMSO 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Der Ansatz wurde 60-120 min bei RT gerührt und anschließend über in PBS equillibierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugation durchgeführt.

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. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt. Weiterhin wurde die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 1-34, 36-37, 39-41, 43-44, 52-53, 55, 338-339, 341-344, 349, 351-352, 354, 356-358 und 374 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_{1A}$-$AK_{1J}$ die Bedeutung:

$AK_{1A}$ = Cetuximab (partiell reduziert)-S§[1]

$AK_{1B}$ = Nimotuzumab (partiell reduziert)-S§[1]

$AK_{1C}$ = Panitumumab (partiell reduziert)-S§[1]

$AK_{1D}$ = anti-PDL1 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{1E}$ = anti-ICOSLG (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{1F}$ = anti-FGFR3 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{1G}$ = Herceptin (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{1H}$ = anti-TYRP1 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{1J}$ = anti-Glypican-3 (partiell reduziert)- S§[1]

wobei

§[1] die Verknüpfung mit der Succinimid-Gruppe bedeutet,

und

S für das Schwefelatom eines Cystein-Restes des partiell reduzierten Antikörpers steht.

**B-1.5** Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Lysin-Seitenketten

In die Kupplungsreaktionen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

*Anti-EGFR1 Antikörper:*

Cetuximab

Nimotuzumab

Panitumumab

*Andere Antikörper*:

anti-PDL1

anti-ICOSLG

anti-FGFR3

Herceptin

anti-TYRP1 hIgG1-kapp

anti-Glypican-3

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 5 Äquivalente der zu kuppelnden Vorläufer-Verbindung aus den Intermediaten 104, 110, 115, 116, 127, 130, 131, 147, 156, 158, 162, 169, 178, 185, 190, 202, 206, 210-216, 218, 219, 227, 233, 238, 240, 242, 245, 247a und 247b als Lösung in DMSO gegeben. Nach 30 min 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 Rühren bei RT wurde der Ansatz über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermlekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt.

Üblicherweise wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 mg des entsprechenden Antikörpers in PBS Puffer zur Kupplung eingesetzt. Nach Aufreinigung über die PD10 Säule wurden so jeweils Lösungen des entsprechenden ADCs in 3,5 ml PBS-Puffer erhalten. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt sowie die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 35, 38, 42, 54, 337, 340, 345-348, 350, 353, 355, 359, 363, 375 und 376 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_{2A}$, $AK_{2B}$, $AK_{2C}$, $AK_{2D}$, $AK_{2E}$, $AK_{2F}$, $AK_{2G}$, $AK_{2H}$ und $AK_{2J}$ die Bedeutung:

$AK_{2A}$ = Cetuximab-NH§$^2$

$AK_{2B}$ = Nimotuzumab-NH§$^2$

$AK_{2C}$ = Panitumumab-NH§$^2$

$AK_{2D}$ = anti-PDL1- NH§$^2$

$AK_{1E}$ = anti-ICOSLG- NH§$^2$

$AK_{2F}$ = anti-FGFR3- NH§$^2$

$AK_{2G}$ = Herceptin-NH§$^2$

$AK_{2H}$ = anti-TYRP1- NH§$^2$

$AK_{2J}$ = anti-Glypican-3- NH§$^2$

wobei

§$^2$ die Verknüpfung mit der Carbonylgruppe bedeutet,

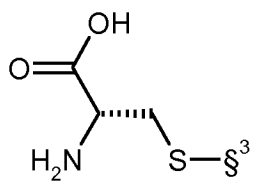
und

NH für die Seitenketten-Aminogruppe eines Lysin-Restes des Antikörpers steht.

**B-1.6a** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Cystein-Addukten

10 µmol der oben beschriebenen Maleinimid-Vorläuferverbindungen wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei Cys die Bedeutung




,

wobei

§[3] die Verknüpfung mit der Linker-Toxophor-Einheit bedeutet.

**B-1.6b** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Lysin-Addukten:

10 µmol der oben beschriebenen Aktivester-Vorläuferverbindungen wurden in 5 ml DMF aufgenommen und in Gegenwart von 30 µmol *N,N*-Diisopropylethylamin mit α-Amino-geschütztem L-Lysin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h 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 Ultrazentrifugation 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-1.7** Bestimmung der Toxophorbeladung

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 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.

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 bestätigte.

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 Co-Elutionen einiger Peaks nicht exakt möglich ist.

**B-1.8** 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).

## B2 Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC)

Die zuvor beschriebenen Intermediate wurden beispielsweise an den anti-Mesothelin-Antikörper MF-Ta geknüpft, wobei die Verknüpfung nach den nachfolgend aufgeführten Verfahren wahlweise über Cystein- oder Lysin-Seitenketten des Antikörperproteins erfolgte. Die Herstellung des anti-Mesothelin-Antikörpers MF-Ta wurde analog zu den in WO 2009/068204-A1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der Antikörper MF-Ta wurde in eukaryotischen CHO-Zellen (stabile

Zelllinie) exprimiert und über Protein A und Gelfiltration aufgereinigt, bevor er in D-PBS-Puffer der Konjugation unterzogen wurde.

**B-2.1** Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (Kupplung über Cystein):

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden 3 Äquivalente Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP), gelöst in PBS-Puffer, gegeben und 1h bei RT gerührt. Anschließend wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 10 Äquivalente der zu kuppelnden Maleinimid-Vorläufer-Verbindung oder Halogenid-Vorläufer-Verbindung (Intermediate 128, 129, 132-146, 148-155, 157, 159-161, 171, 175-177, 184, 189, 194-195, 199-201, 205, 209, 223-224, 226, 228-231, 236 und 244) als Lösung in DMSO hinzugefügt. Dabei sollte die Menge an DMSO 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Das Reaktionsgemisch wurde 60-120 min bei RT gerührt und anschließend über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermlekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt.

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. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt. Weiterhin wurde die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unter B-4. beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 56, 57, 60-74, 76-83, 85, 86, 88-92, 94-101, 103, 106-112, 114, 115, 126, 128-131, 133-135, 137-139, 141-142, 151, 153-154, 366 und 377 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_3$ die Bedeutung

$$AK_3 = \text{MF-Ta (partiell reduziert)-S}\S^1 \ ,$$

wobei

$\S^1$ die Verknüpfung mit der Succinimid-Gruppe bedeutet,

MF-Ta (partiell reduziert) für den partiell reduzierten MF-Ta Antikörper steht (schwere Kette SEQ ID NO: 408 und leichte Kette SEQ ID NO: 409),

und

S für das Schwefelatom eines Cystein-Restes des partiell reduzierten Antikörpers steht.

**B-2.2** Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (Kupplung über Lysin-Seitenketten):

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 5 Äquivalente der zu kuppelnden Vorläufer-Verbindung (Intermediate 104, 110, 115, 116, 127, 130, 131, 147, 156, 158, 162, 169, 178, 185, 190, 202, 206, 210-216, 218, 219, 227, 233, 238, 240, 242, 245, 247a und 247b) als Lösung in DMSO gegeben. Nach 30 min 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 Rühren bei RT wurde der Ansatz über PD10-Säulen (Sephadex® G-25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermlekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt.

Üblicherweise wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 mg des entsprechenden Antikörpers in PBS Puffer zur Kupplung eingesetzt. Nach Aufreinigung über die PD10 Säule wurden so jeweils Lösungen des entsprechenden ADCs in 3.5 ml PBS-Puffer erhalten. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt sowie die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unter B-4. beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 58, 59, 75, 84, 87, 93, 102, 104, 105, 113, 116, 127, 132, 136, 140, 143- 150, 152, 367-369 und 378-380 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_4$ die Bedeutung

$$AK_4 = MF\text{-}Ta\text{-}NH\S^2 \quad ,$$

wobei

$\S^2$ die Verknüpfung mit der Carbonylgruppe bedeutet,

MF-Ta für den nicht reduzierten MF-Ta Antikörper (schwere Kette SEQ ID NO: 408 und leichte Kette SEQ ID NO: 409) steht,

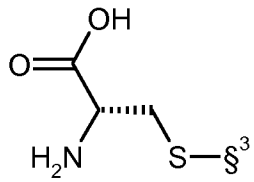
und

NH für die Seitenketten-Aminogruppe eines Lysin-Restes des Antikörpers steht.

**B-2.3a** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Cystein-Addukten:

10 µmol der oben beschriebenen Maleinimid-Vorläuferverbindungen wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei Cys die Bedeutung




,

wobei

§[3] die Verknüpfung mit der Linker-Toxophor-Einheit bedeutet.

**B-2.3b** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Lysin-Addukten:

10 µmol der oben beschriebenen Aktivester-Vorläuferverbindungen wurden in 5 ml DMF aufgenommen und in Gegenwart von 30 µmol *N,N*-Diisopropylethylamin mit α-Amino-geschütztem L-Lysin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h 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-2.4** Bestimmung der Toxophorbeladung

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 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.

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 bestätigte.

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 Bestimmung der Toxophorbeladung aufgrund von Ko-Elutionen einiger Peaks nicht exakt möglich ist.

**B-2.5** 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).

**B3: Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC)**

**B-3.1** Allgemeines Verfahren zur Generierung von anti-C4.4a Antikörpern

Die anti-C4.4a Antikörper beschrieben durch die Sequenzen gemäß Tabelle1 und Tabelle 2 wurden durch Screening einer Phagen Display Bibliothek auf rekombinantem humanem C4.4a SEQ ID NO: 1 und murinem C4.4a SEQ ID NO: 2 und auf C4.4a exprimierenden Zellen generiert. Die so gewonnenen Antikörper wurden ins humane IgG1 Format reformatiert und für die hier beschriebenen Ausführungsbeispiele verwendet.

**B-3.2** Allgemeines Verfahren zur Expression von anti-C4.4a Antikörpern in Säugerzellen

Die Antikörper, zum Beispiel M31-B01 (leichte Kette SEQ ID NO: 346 und schwere Kette SEQ ID NO: 347) oder weitere Antikörper gemäß Tabelle 2 wurden in Säugerzellkultur produziert. Dazu wurden HEK293 6E Zellen transient mit einem geeigneten CMV-Promotor basierenden Expressionplasmid transfiziert. Die schweren und leichten Ketten der Antikörper wurden entweder zusammen in ein Einvektorsystem, oder getrennt in ein Zweivektorsystem kloniert. Der Zellkulturmassstab war entweder bis 1,5 l im Schüttelkolben oder 10 l im „Wave-Bag". Die Expression erfolgte bei 37°C für 5-6 Tage in F17 Medium (Invitrogen) ergänzt mit Tryptone TN1 (Organotechnie) mit 1 % „FCS ultra low IgG" (Invitrogen) und 0,5 mM Valproinsäure. Die Expressionsausbeuten lagen zwischen 100 und 600 mg/l

**B-3.3** Allgemeines Verfahren zur Aufreinigung von Antikörpern aus Zellüberständen.

Die Antikörper, zum Beispiel M31-B01 (leichte Kette SEQ ID NO: 346 und schwere Kette SEQ ID NO: 347) oder weitere Antikörper gemäß Tabelle 2 wurden 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 NaCl gewaschen. Die Antikörper wurden in 50 mM Na-Acetat pH 3,5 + 500 mM NaCl eluiert und anschliessend durch Gelfiltrationschromatographie auf einer Superdex 200 Säule (GE Helthcare) in DPBS pH 7,4 weiter gereinigt.

**B-3.4** Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Cystein-Seitenketten

In die Kupplungsreaktionen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

anti-C4.4a M31-B01

anti-C4.4a B01-3

anti-C4.4a B01-10

anti-C4.4a B01-7

anti-C4.4a D02-4

anti-C4.4a D02-6

anti-C4.4a D02-7

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden 3 Äquivalente Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP), gelöst in PBS-Puffer, gegeben und 1h bei RT gerührt. Anschließend wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 10 Äquivalenten der zu kuppelnden Maleinimid-Vorläufer-Verbindung aus Intermediat 128, 129, 132-146, 148-155, 157, 159-161, 166, 171, 175-177, 184, 188, 190, 194-195, 199-201, 205, 209, 223-224, 226, 228-231, 236 und 244 als Lösung in DMSO hinzugefügt. Dabei sollte die Menge an DMSO 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Der Ansatz wurde 60-120 min bei RT gerührt und anschließend über in PBS equillibierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugation durchgeführt.

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. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt. Weiterhin wurde die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 163-165, 167-192, 194-198, 200-221, 223-228, 230-232, 242, 244-247, 249, 250, 254-257, 259-260, 269, 271-275, 371 und 385 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_{5A}$-$AK_{5G}$ die Bedeutung

$AK_{5A}$ = anti-C4.4a Antikörper M31-B01 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{5B}$ = anti-C4.4a Antikörper B01-3 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{5C}$ = anti-C4.4a Antikörper B01-10 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{5D}$ = anti-C4.4a Antikörper B01-7 (partiell reduziert)-S§[1]

$AK_{5E}$ = anti-C4.4a Antikörper D02-4 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{5F}$ = anti-C4.4a Antikörper D02-6 (partiell reduziert)- S§[1]

$AK_{5G}$ = anti-C4.4a Antikörper D02-7 (partiell reduziert)- S§[1]

wobei

§[1] die Verknüpfung mit der Succinimid-Gruppe bedeutet,

und

S für das Schwefelatom eines Cystein-Restes des partiell reduzierten Antikörpers steht.

**B-3.5** Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Lysin-Seitenketten:

In die Kupplungsreaktionen wurden folgende Antikörper eingesetzt:
anti-C4.4a Antikörper M31-B01
anti-C4.4a Antikörper B01-3
Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 5 Äquivalente der zu kuppelnden Vorläufer-Verbindung aus den Intermediaten 104, 110, 115, 116, 127, 130, 131, 147, 156, 158 ,162, 169, 178, 185, 190, 202, 206, 210-216, 218-219, 227, 233, 238, 240, 242, 245, 247a und 247b als Lösung in DMSO gegeben. Nach 30 min 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 Rühren bei RT wurde der Ansatz über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermlekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt.

Üblicherweise wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 mg des entsprechenden Antikörpers in PBS Puffer zur Kupplung eingesetzt. Nach Aufreinigung über die PD10 Säule wurden so jeweils Lösungen des entsprechenden ADCs in 3,5 ml PBS-Puffer erhalten. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt sowie die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 166, 193, 199, 222, 229, 243, 248, 251- 253, 258, 261-268, 270, 276, 370, 372-373 und 386-388 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_{6A}$ und $AK_{6B}$ die Bedeutung

$AK_{6A}$ = anti-C4.4a Antikörper M31-B01-NH§$^2$

$AK_{6B}$ = anti-C4.4a Antikörper B01-3-NH§$^2$

wobei

§$^2$ die Verknüpfung mit der Carbonylgruppe bedeutet,

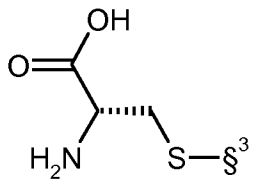
und

NH für die Seitenketten-Aminogruppe eines Lysin-Restes des Antikörpers steht.

**B-3.6** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Cystein-Addukten:

10 µmol der oben beschriebenen Maleinimid-Vorläuferverbindungen wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei Cys die Bedeutung




,

wobei

§$^3$ die Verknüpfung mit der Linker-Toxophor-Einheit bedeutet.

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-3.7** Bestimmung der Toxophorbeladung

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 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.

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 bestätigte.

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.

**B-3.8** 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).

**B4: Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC)**

Die oben beschriebenen Intermediate wurden beispielsweise an den anti-CA9-Antikörper (3ee9) geknüpft, wobei eine solche Verknüpfung nach den unten aufgeführten Verfahren wahlweise über Cystein- oder über Lysin-Seitenketten des Antikörperproteins erfolgen kann.

**B-4.1** Allgemeines Verfahren zur Generierung von anti-CA9 Antikörpern

Die Antikörper gegen CA9, z.B.der Antikörper 3ee9 wurden durch panning der HuCAL GOLD phage display library auf rekombinantem Antigen gewonnen. Die so isolierten Fab Antikörperfragmente wurden ins IgG-Format umkloniert (WO2007/070538A2).

**B-4.2** Allgemeines Verfahren zur Expression von anti-CA9 Antikörpern in Säugerzellen und zur Aufreinigung

Die anti-CA9 IgG-Antikörper, z.B. 3ee9, wurden mittels transienter Transfektion von HEK 293 exprimiert und aus deren Zellüberständen wie dem Fachmann bekannt aufgereinigt Die Methoden wurden in WO2007/070538A2 beschrieben.

**B-4.3** Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Cystein-Seitenketten

Zu einer Lösung des entsprechenden anti-CA9 Antikörpers, z.B. 3ee9, der beispielweise in PBS-Puffer oder in Tris-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml vorliegen kann, wurden 3 Äquivalente Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP), gelöst in PBS-Puffer, gegeben und 1h bei RT gerührt. Anschließend wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 10 Äquivalenten der zu kuppelnden Maleinimid-Vorläufer-Verbindung oder Halogenid-Vorläufer-Verbindung aus Intermediat 102, 103, 105-109, 111-114, 117-126, 128, 129, 132-146, 148-155, 157, 159-161, 166, 171, 175-177, 184, 189, 194-195, 199-201, 205, 209, 223-224, 226, 228-231, 236 und 244 als Lösung in DMSO hinzugefügt. Dabei sollte die Menge an DMSO 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Der Ansatz wurde 60-120 min bei RT gerührt und anschließend über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermlekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt.

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. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt. Weiterhin

wurde die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 280-289, 291-302, 304-305, 313, 315-318, 320-321, 324-325, 327-328 und 330-331 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_1$ die Bedeutung

$$AK_7 = 3ee9 \text{ (partiell reduziert)-S}\S^1 \quad ,$$

wobei

| | |
|---|---|
| $\S^1$ | die Verknüpfung mit der Succinimid-Gruppe bedeutet, |
| 3ee9 (partiell reduziert) | für den partiell reduzierten anti-CA9 3ee9 Antikörper steht, |
| und | |
| S | für das Schwefelatom eines Cystein-Restes des partiell reduzierten Antikörpers steht. |

**B-4.4** Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Lysin-Seitenketten

Zu einer Lösung des entsprechenden anti-CA9 Antikörpers 3ee9 in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 5 Äquivalente der zu kuppelnden Vorläufer-Verbindung aus den Intermediaten 104, 110, 115, 116, 127, 130, 131, 147, 156, 158, 162, 169, 178, 185, 190, 202, 206, 210-216, 218, 219, 227, 233, 238, 240, 242, 245, 247a und 247b als Lösung in DMSO gegeben. Nach 30 min 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 Rühren bei RT wurde der Ansatz über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Gegebenenfalls wurde noch eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration durchgeführt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermlekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt.

Üblicherweise wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 mg des entsprechenden Antikörpers in PBS Puffer zur Kupplung eingesetzt. Nach Aufreinigung über die PD10 Säule wurden so jeweils Lösungen des entsprechenden ADCs in 3.5 ml PBS-Puffer erhalten. Für diese Lösungen wurde dann die jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt sowie die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unten beschriebenen Methoden ermittelt.

Nach diesem Verfahren wurden die in den Beispielen 290, 303, 306, 314, 319, 322-323, 326, 329, 332-333 und 384 dargestellten Immunokonjugate hergestellt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei $AK_2$ die Bedeutung

$$AK_8 = \text{anti-CA9- NH}\S^2$$

wobei

$\S^2$ die Verknüpfung mit der Carbonylgruppe bedeutet,

anti-CA9 für den nicht reduzierten CA9 Antikörper 3ee9 steht,

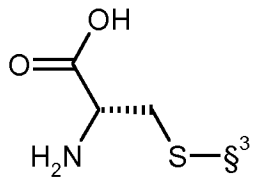
und

NH für die Seitenketten-Aminogruppe eines Lysin-Restes des Antikörpers steht.

**B-4.5a** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Cystein-Addukten

10 µmol der oben beschriebenen Maleinimid-Vorläuferverbindungen wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei Cys die Bedeutung




,

wobei

$\S^3$ die Verknüpfung mit der Linker-Toxophor-Einheit bedeutet.

**B-4.5b** Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Lysin-Addukten:

10 µmol der oben beschriebenen Aktivester-Vorläuferverbindungen wurden in 5 ml DMF aufgenommen und in Gegenwart von 30 µmol N,N-Diisopropylethylamin mit α-Amino-geschütztem L-Lysin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h 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-4.6** Bestimmung der Toxophorbeladung

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 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.

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 bestätigte.

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.

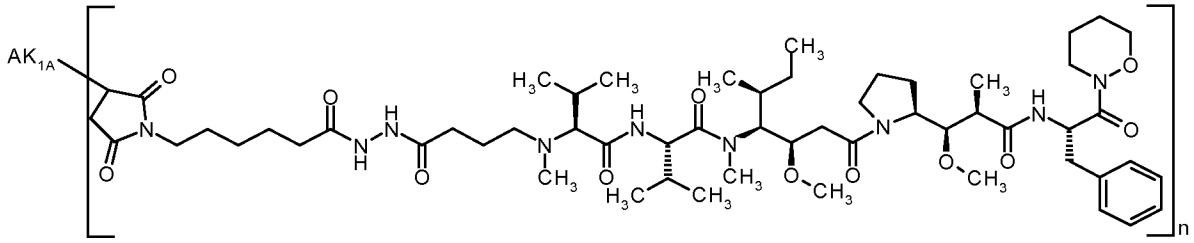
Die durchschnittliche Beladung des Antikörpers mit Toxophoren wurde aus den durch Integration bestimmten Peakflächen als die zweifache Summe der Toxophor-Anzahl gewichteten Integrationsergebnisse aller Peaks geteilt durch die Summe der einfach gewichteten Integrationsergebnisse aller Peaks berechnet. In vereinzelten Fällen kann es vorkommen, dass die Bestimmung der Toxophorbeladung aufgrund von Ko-Elutionen einiger Peaks nicht exakt möglich ist.

**B-4.7** 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**

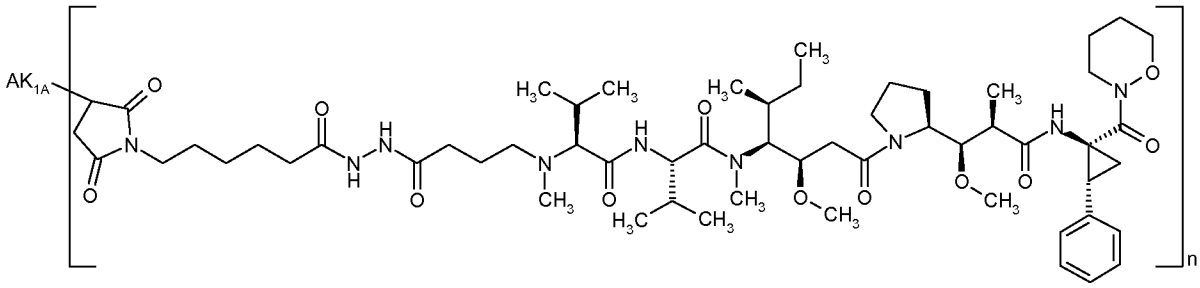
**Beispiel 1**



Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.5

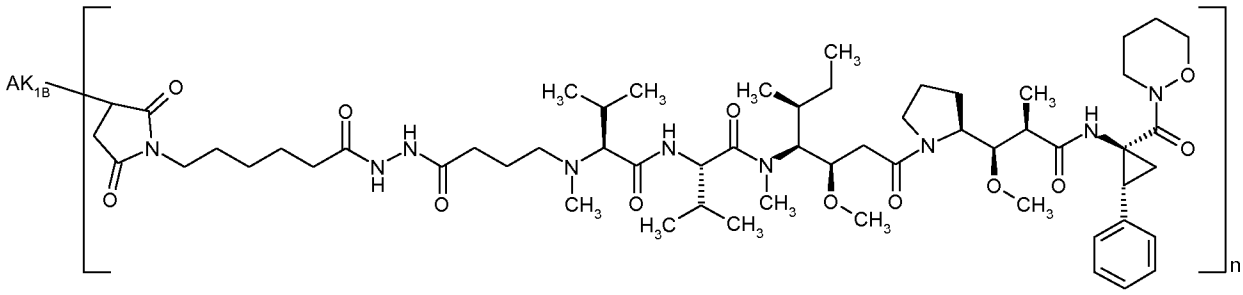
**Beispiel 2**



Protein Konzentration: 0.64 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

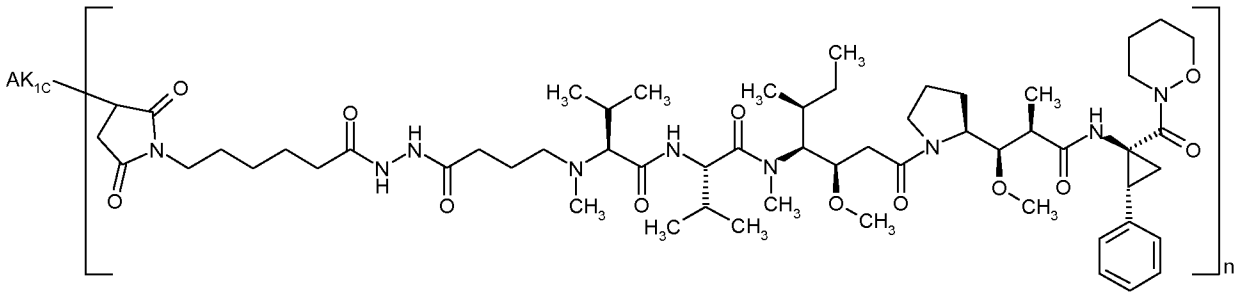
**Beispiel 3**



Protein Konzentration: 0.61 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.1

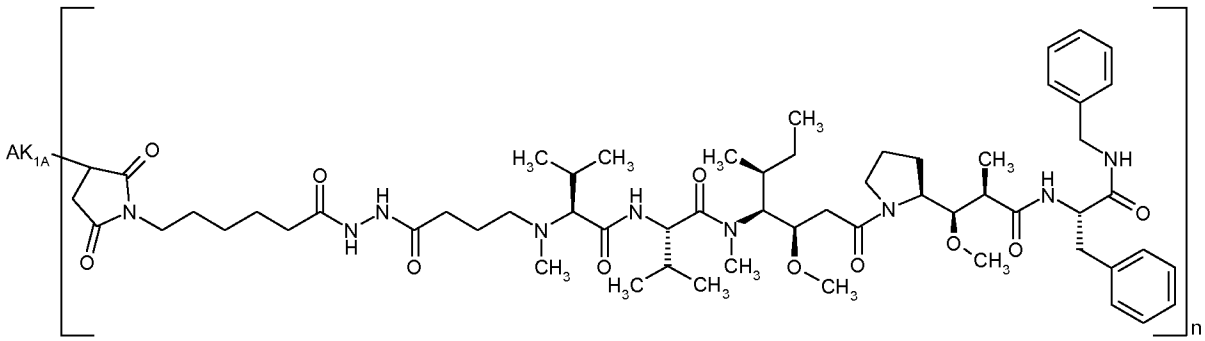
**Beispiel 4**



Protein Konzentration: 0.61 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

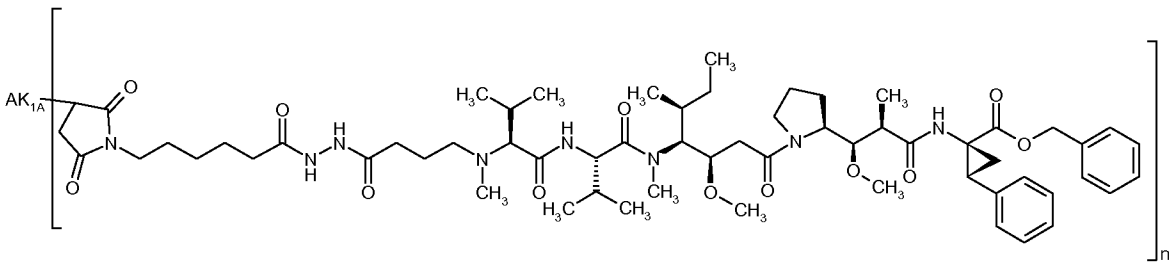
**Beispiel 5**



Protein Konzentration: 1.37 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

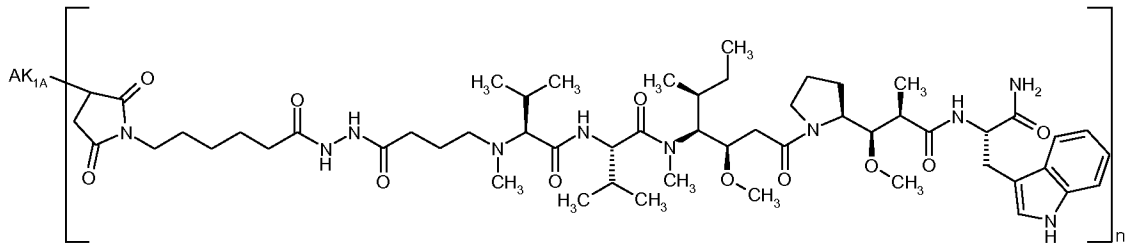
**Beispiel 6**



Protein Konzentration: 1.12 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.3

**Beispiel 7**

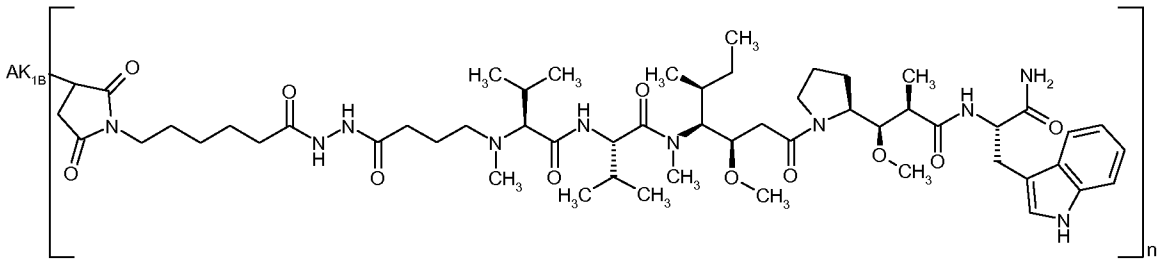


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 270 mg Cetuximab und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.46 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

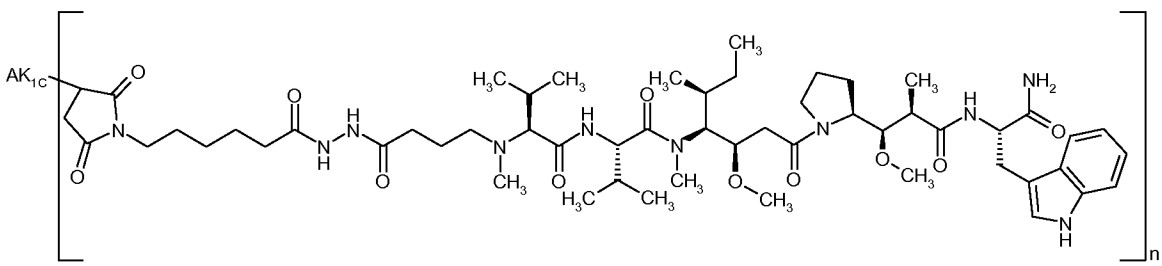
**Beispiel 8**



Protein Konzentration: 1.86 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

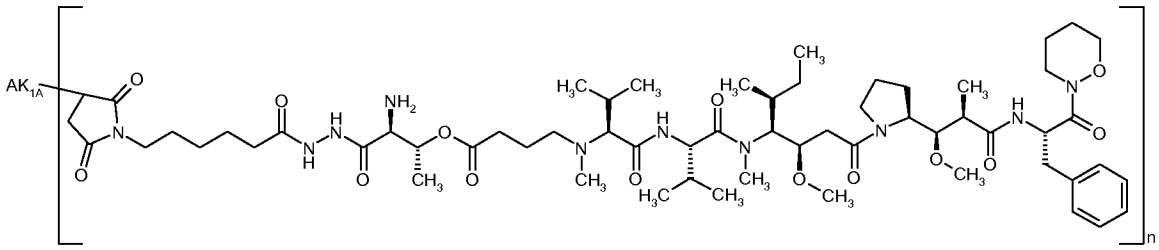
**Beispiel 9**



Protein Konzentration: 1.39 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

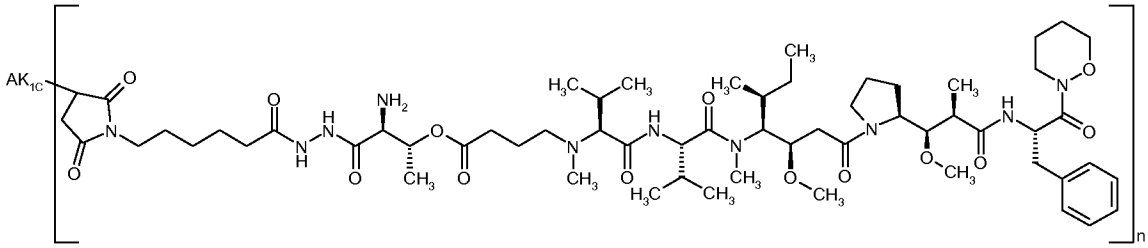
**Beispiel 10**



Protein Konzentration: 0.66 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

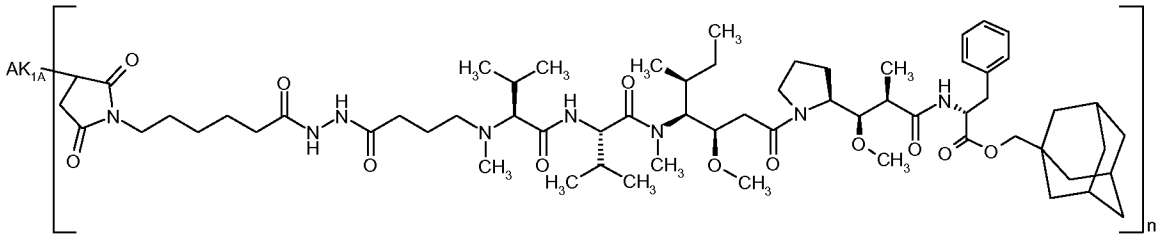
**Beispiel 11**



Protein Konzentration: 0.66 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

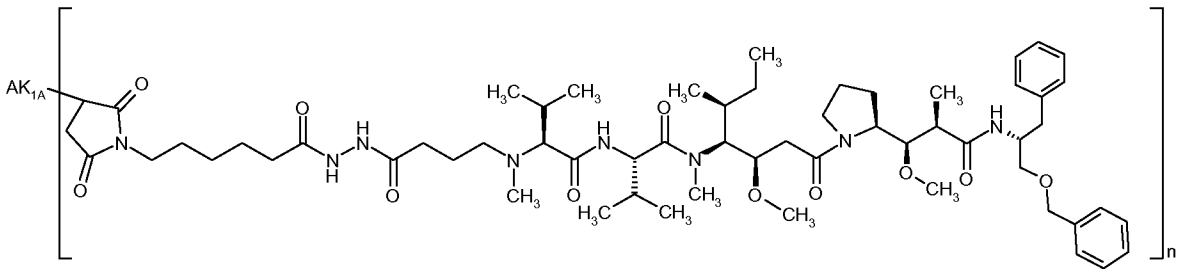
**Beispiel 12**



Protein Konzentration: 0.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.1

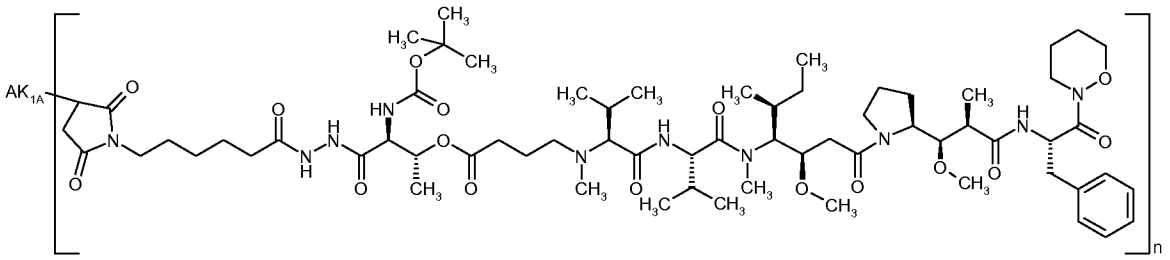
**Beispiel 13**



Protein Konzentration: 1.52 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

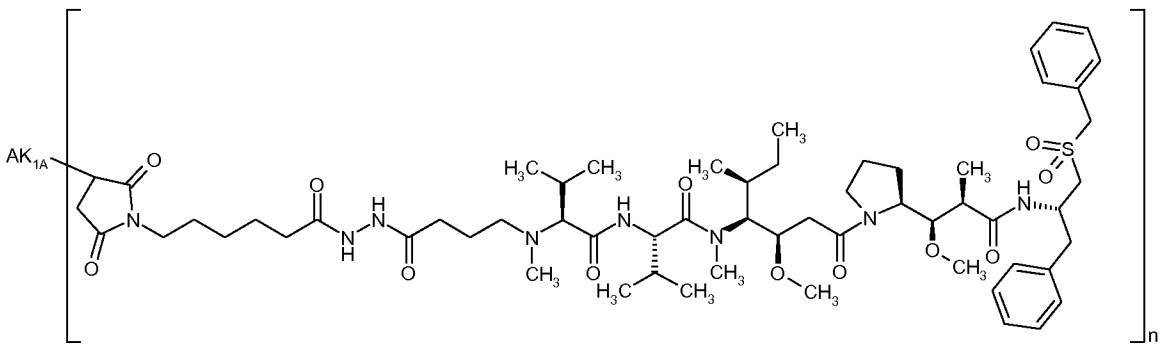
**Beispiel 14**



Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

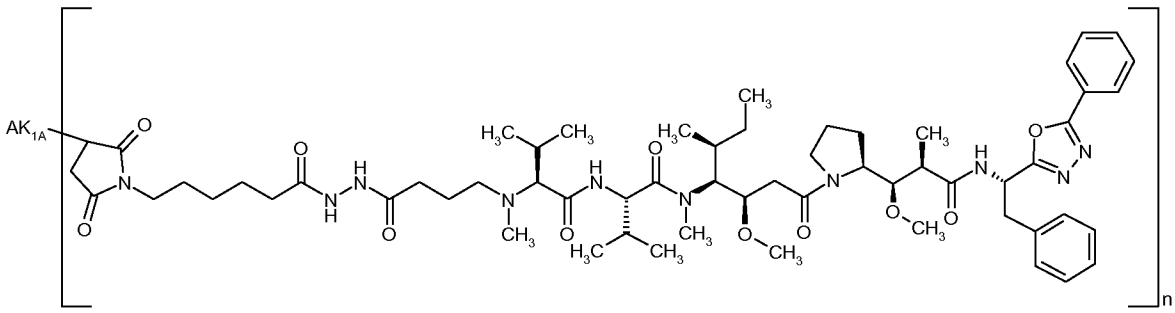
**Beispiel 15**



Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.7

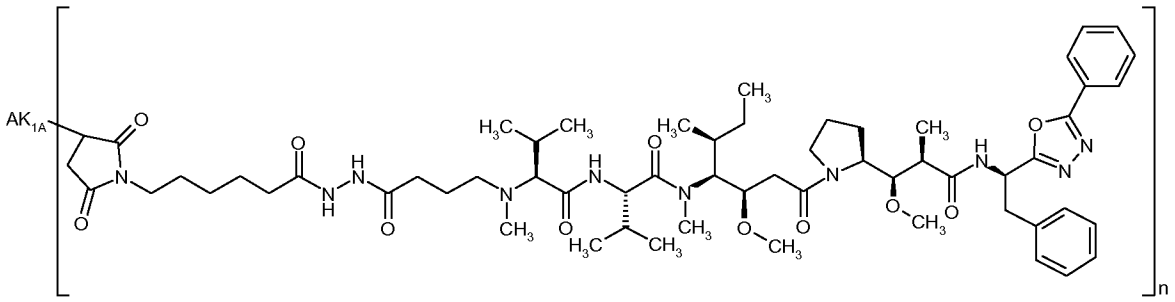
**Beispiel 16**



Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.3

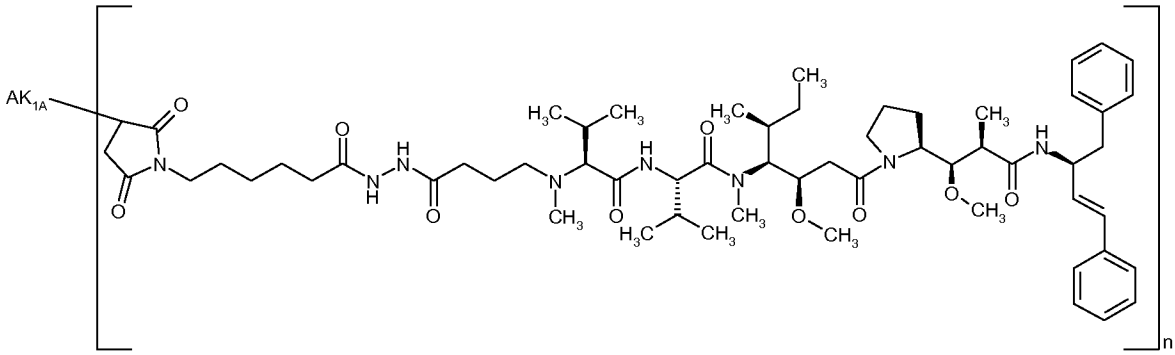
**Beispiel 17**



Protein Konzentration: 1.61 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.7

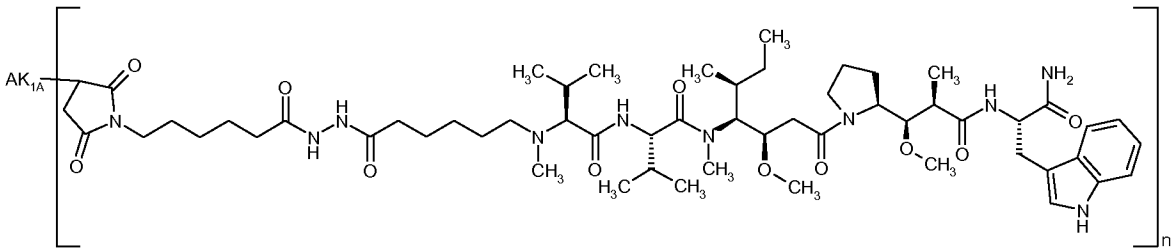
**Beispiel 18**



Protein Konzentration: 1.24 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

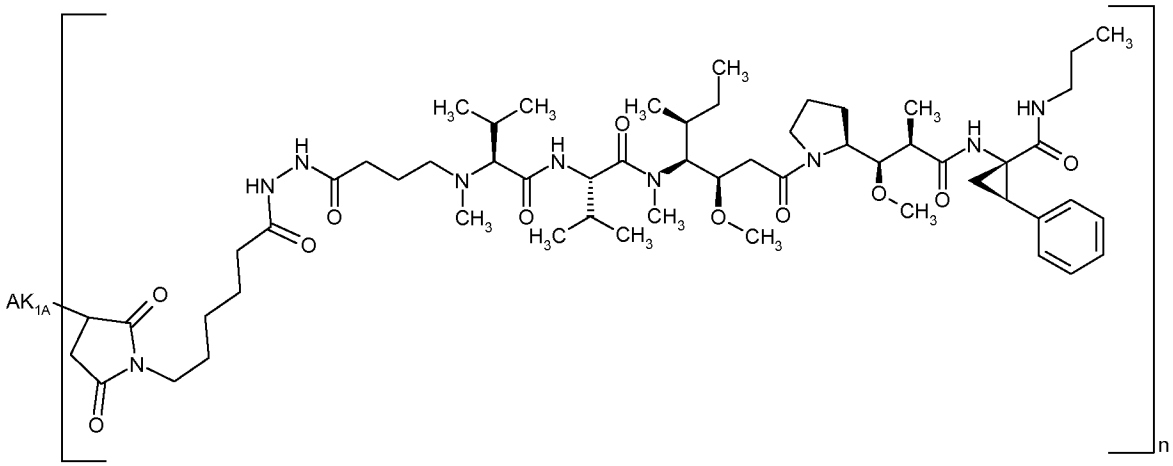
**Beispiel 19**



Protein Konzentration: 1.49 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

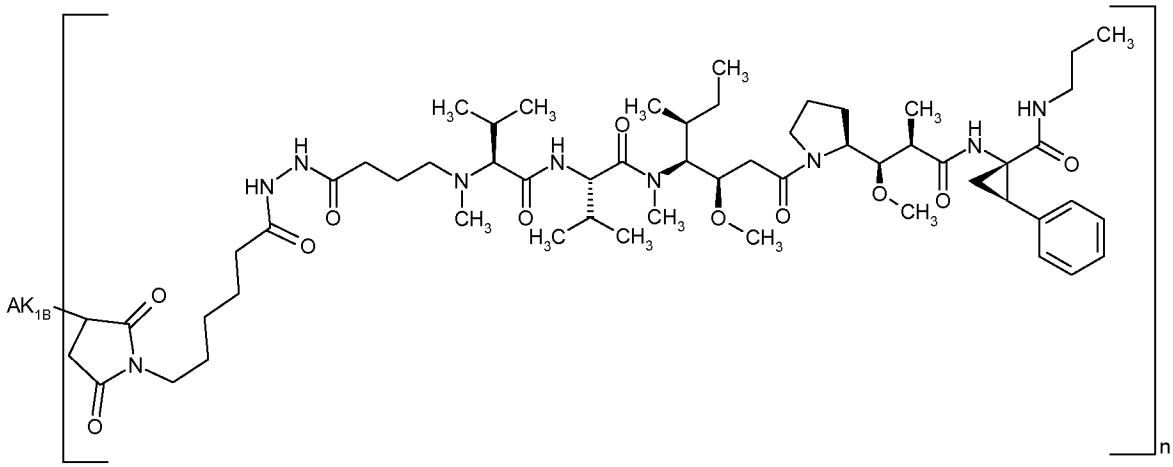
**Beispiel 20**



Protein Konzentration: 1.49 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.0

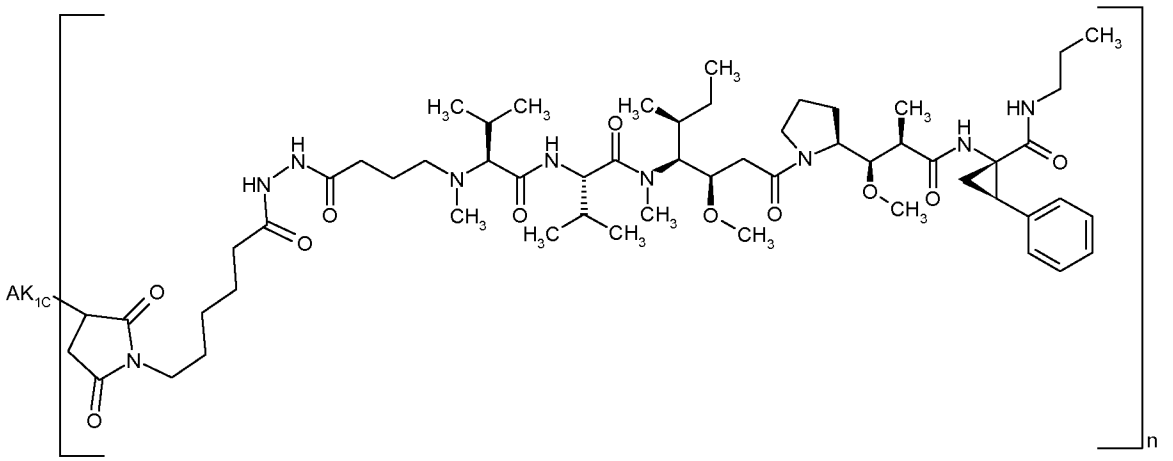
**Beispiel 21**



Protein Konzentration: 1.46 mg/ml

Drug/mAb Ratio: >0.9

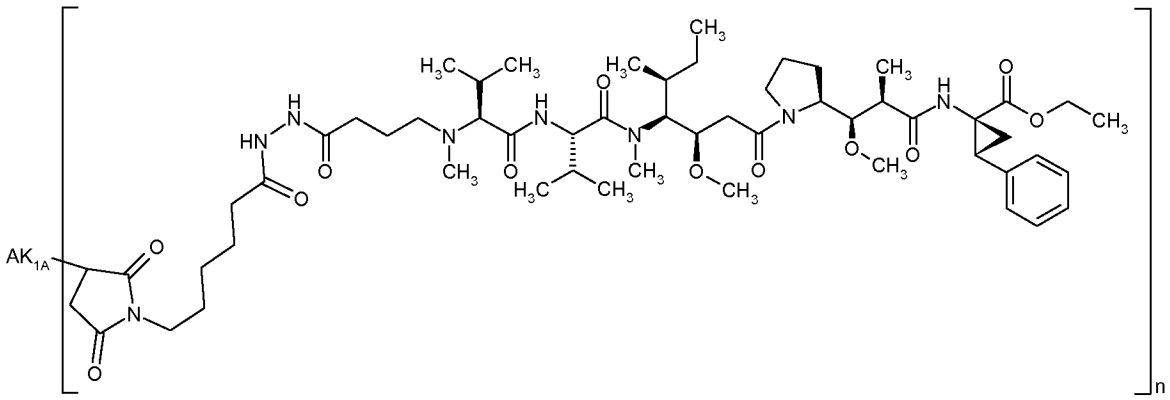
**Beispiel 22**



Protein Konzentration: 1.28 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

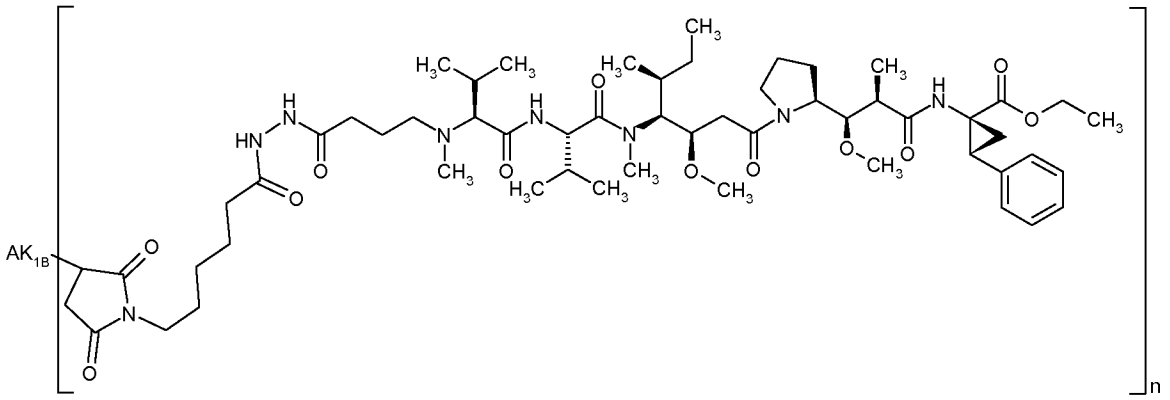
**Beispiel 23**



Protein Konzentration: 1.33 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

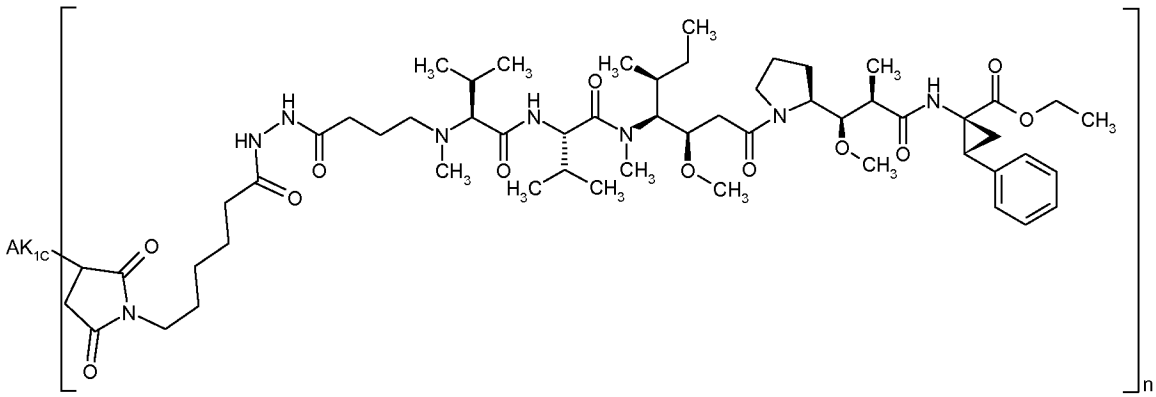
**Beispiel 24**



Protein Konzentration: 1.39 mg/ml

Drug/mAb Ratio: >0.8

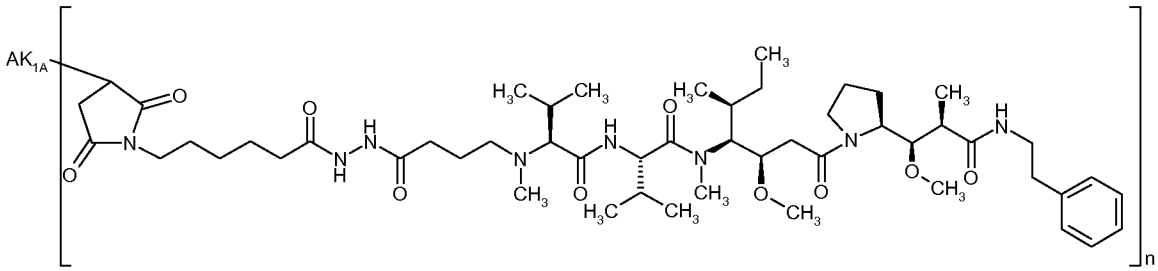
**Beispiel 25**



Protein Konzentration: 1.26 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

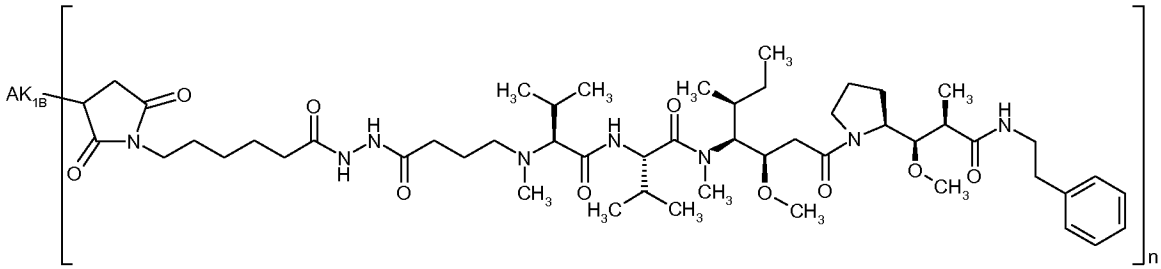
**Beispiel 26**



Protein Konzentration: 1.51 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

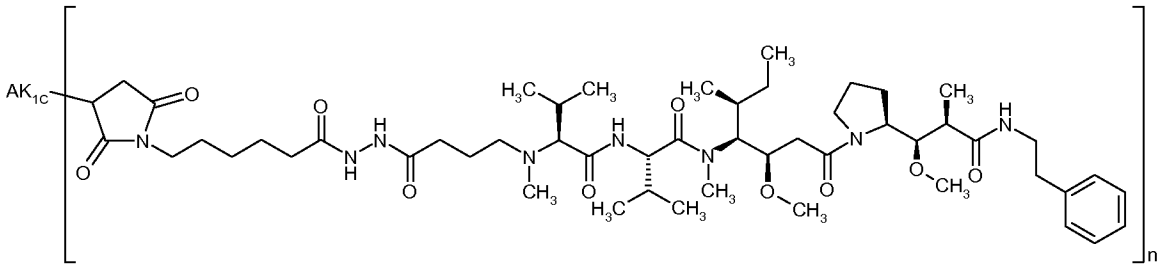
**Beispiel 27**



Protein Konzentration: 1.6 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

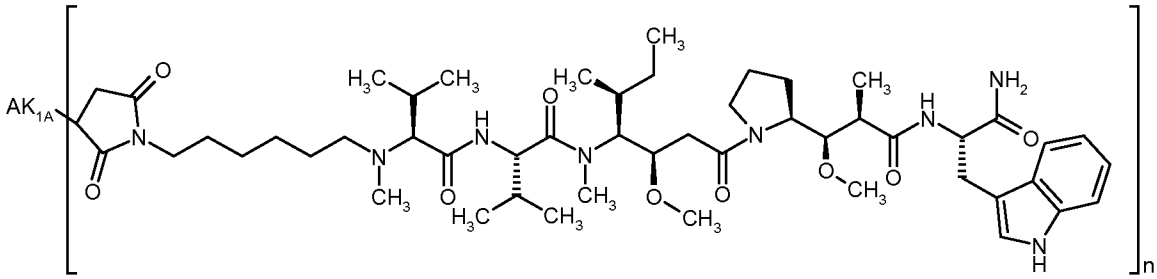
**Beispiel 28**



Protein Konzentration: 1.21 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

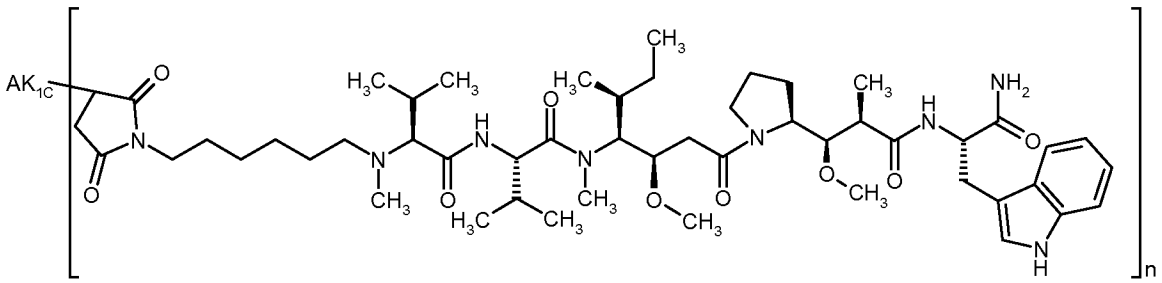
**Beispiel 29**



Protein Konzentration: 1.53 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.7

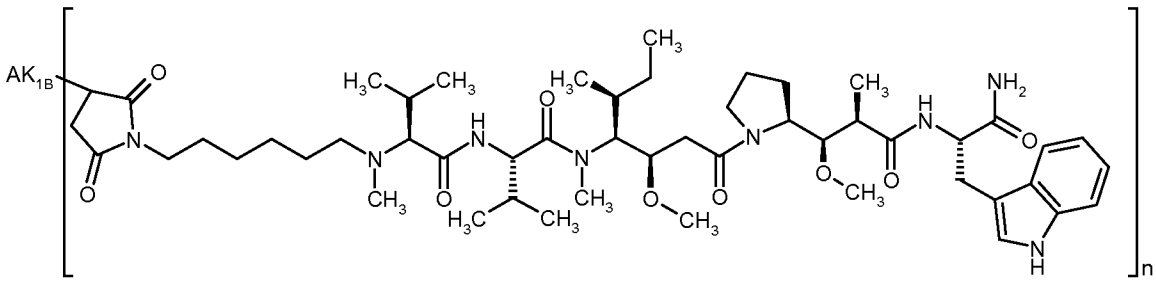
**Beispiel 30**



Protein Konzentration: 1.4 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

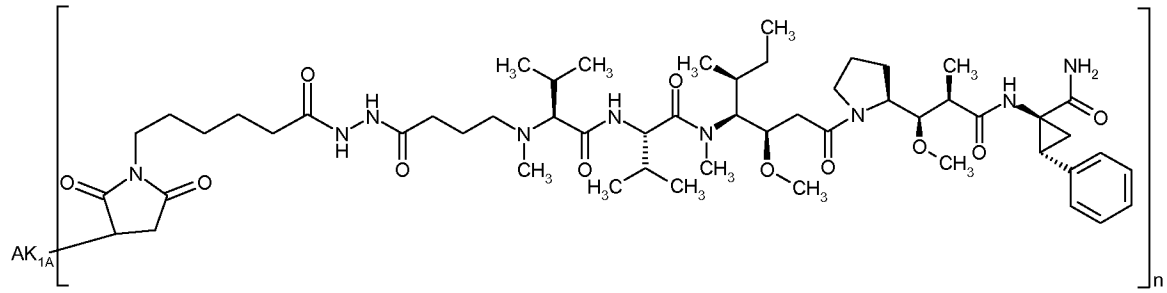
**Beispiel 31**



Protein Konzentration: 1.66 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.2

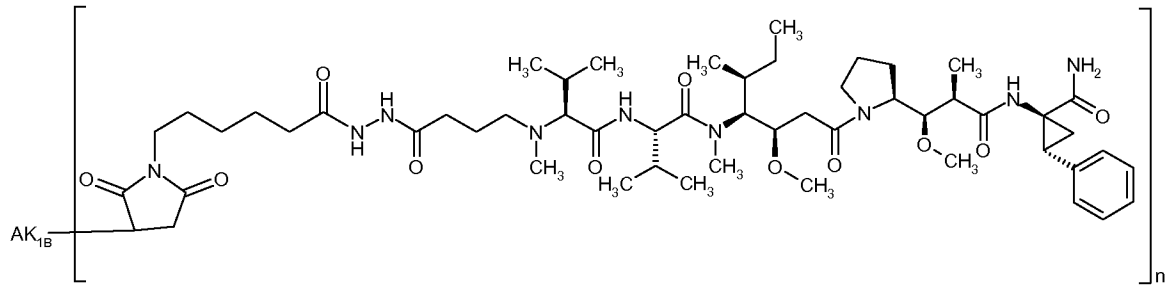
**Beispiel 32**



Protein Konzentration: 1.21 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.2

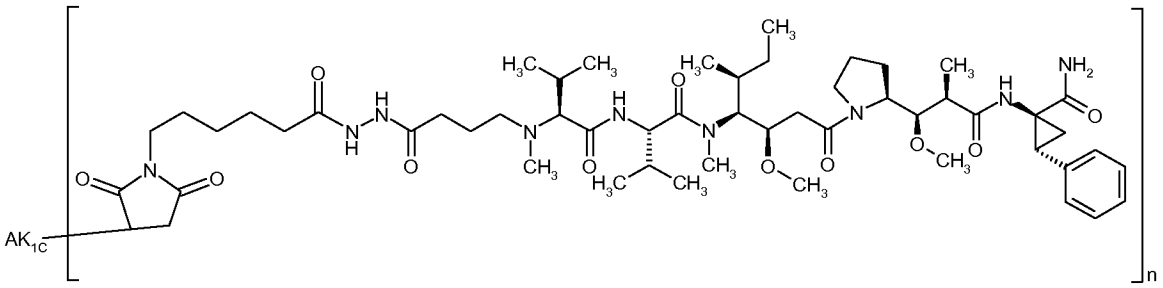
**Beispiel 33**



Protein Konzentration: 1.46 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2

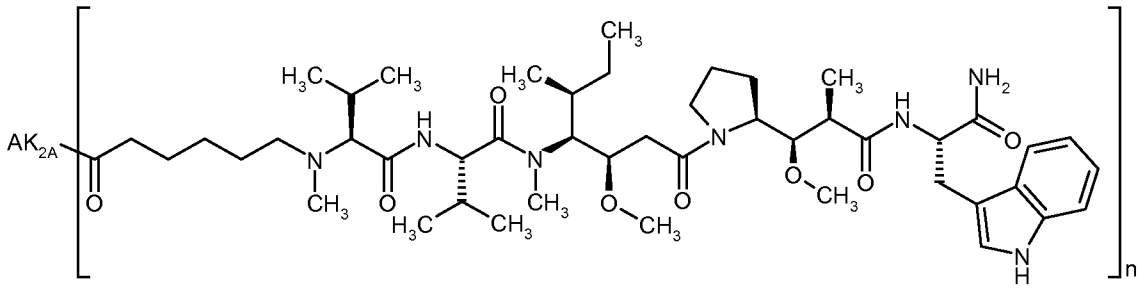
**Beispiel 34**



Protein Konzentration: 1.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

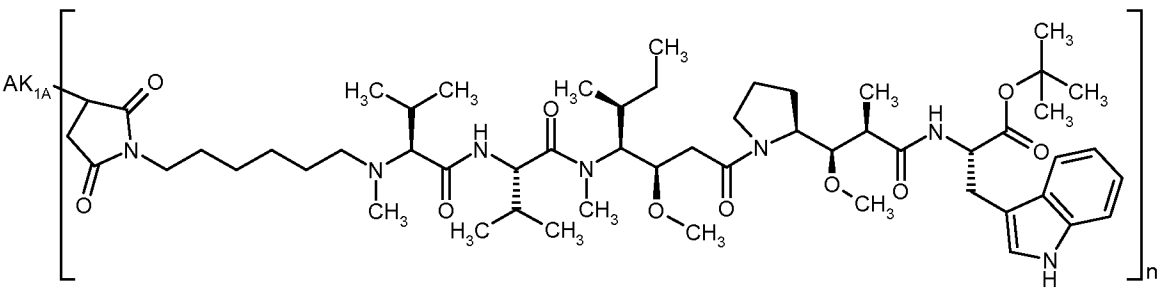
**Beispiel 35**



Protein Konzentration: 1.66 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

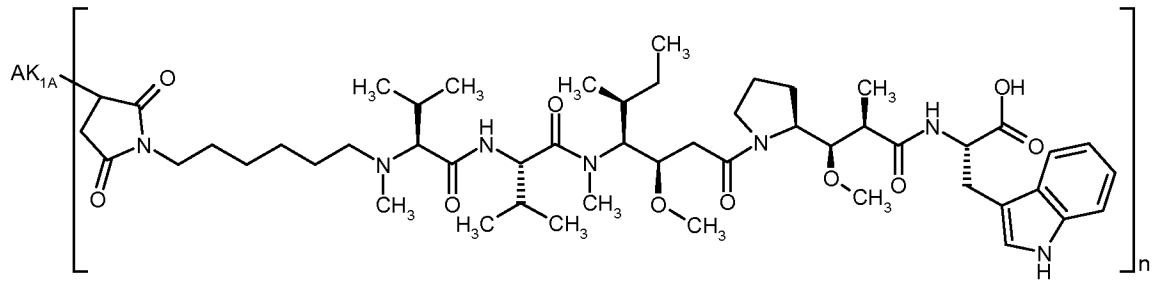
**Beispiel 36**



Protein Konzentration: 1.48 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.2

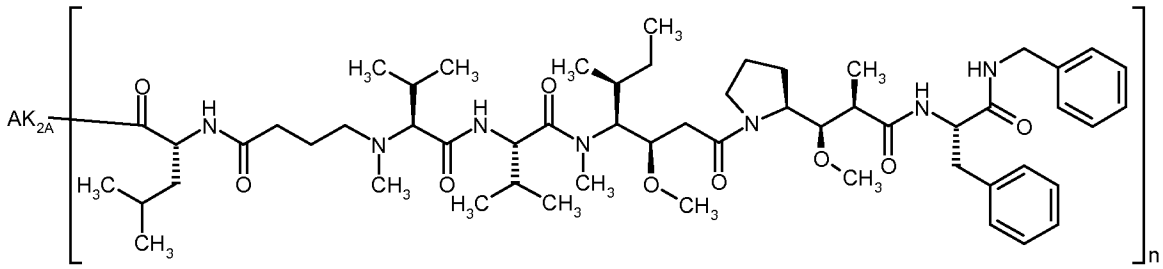
**Beispiel 37**



Protein Konzentration: 1.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.7

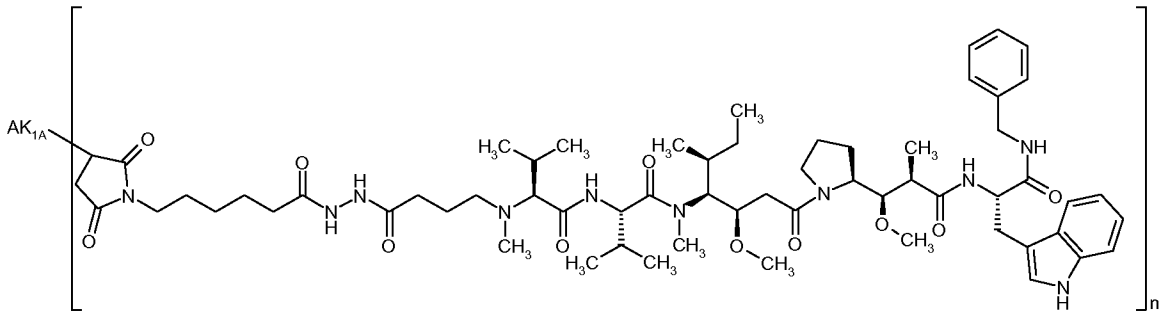
**Beispiel 38**



Protein Konzentration: 1.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.15

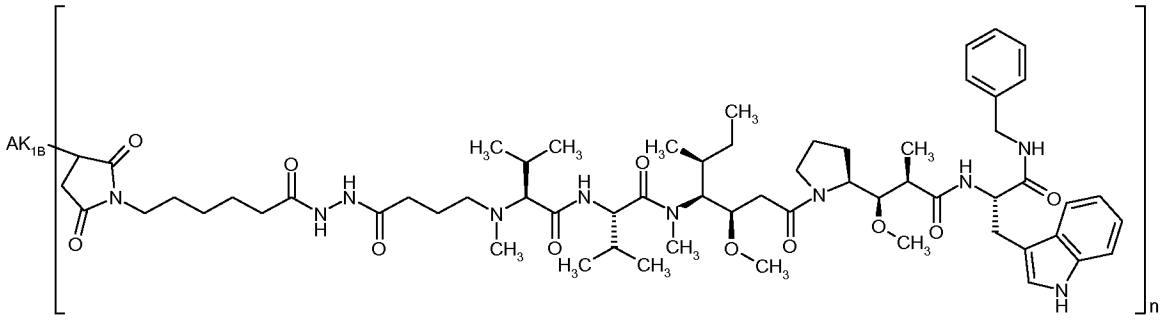
**Beispiel 39**



Protein Konzentration: 1.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.1

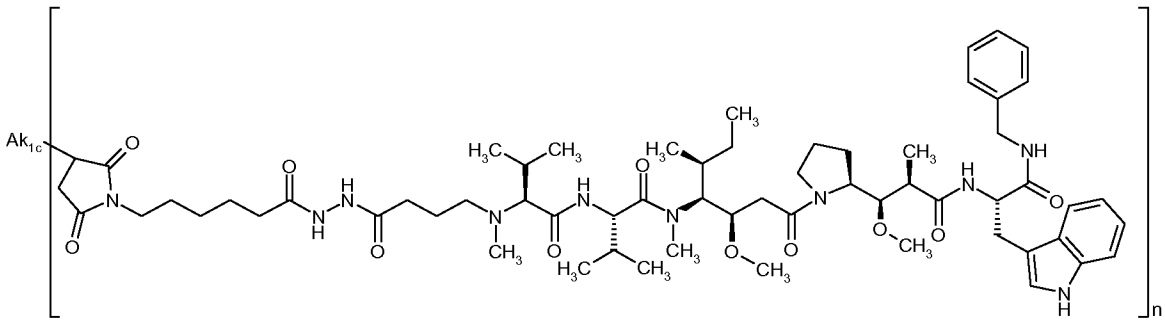
**Beispiel 40**



Protein Konzentration: 1.54 mg/ml

Drug/mAb Ratio: >0.9

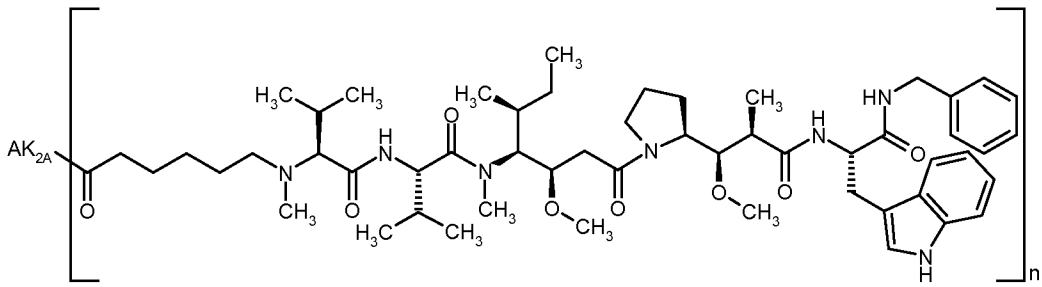
**Beispiel 41**



Protein Konzentration: 1.39mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

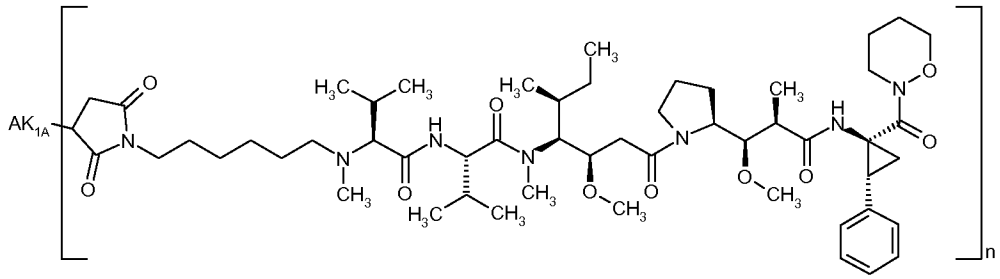
**Beispiel 42**



Protein Konzentration: 1.52 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.5

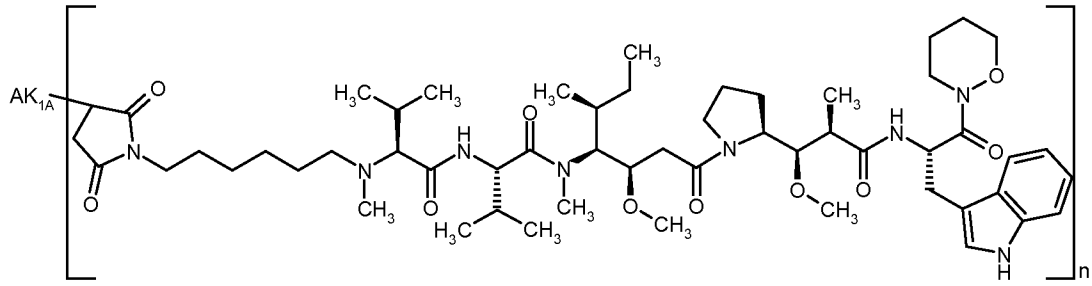
**Beispiel 43**



Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.6

**Beispiel 44**



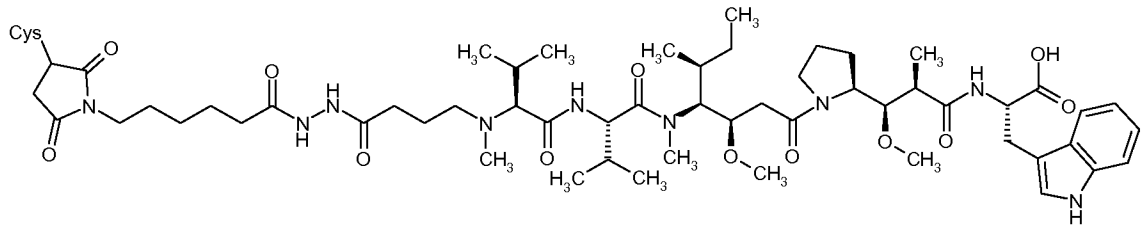
Protein Konzentration: 1.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

**Beispiele Cystein-Addukte**

**Beispiel 45**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



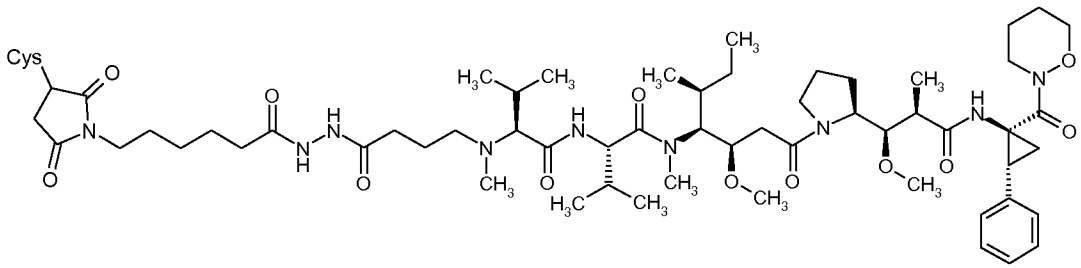
10 mg (10µmol) von Intermediat 113 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6 mg (54% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 1185 $(M+H)^+$.

**Beispiel 46**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



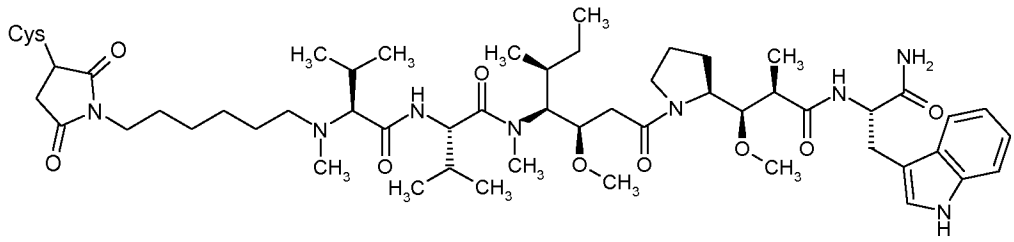
9 mg (8.3 µmol) von Intermediat 132 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 3 mg (24.4 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6.8 mg (68% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 1227 $(M+H)^+$.

**Beispiel 47**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



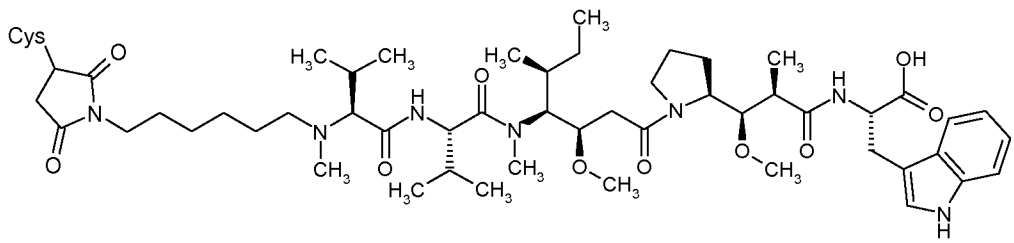
10 mg (10 µmol) von Intermediat 106 wurden in 5.8 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.2 mg (46% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.71 min; MS (ESIpos): m/z = 1070 $(M+H)^+$.

**Beispiel 48**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



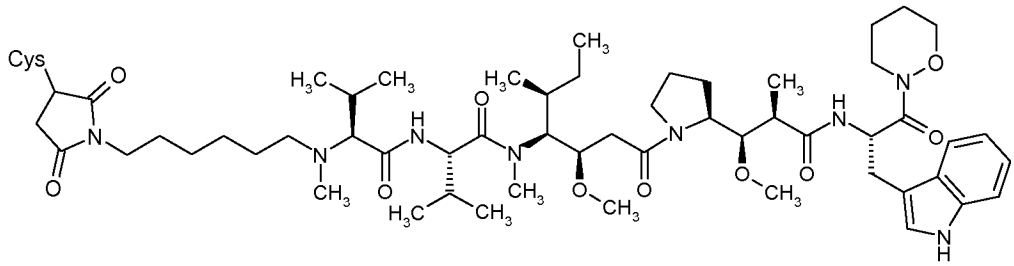
10 mg (10 µmol) von Intermediat 124 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.2 mg (64% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 $(M+H)^+$.

**Beispiel 49**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



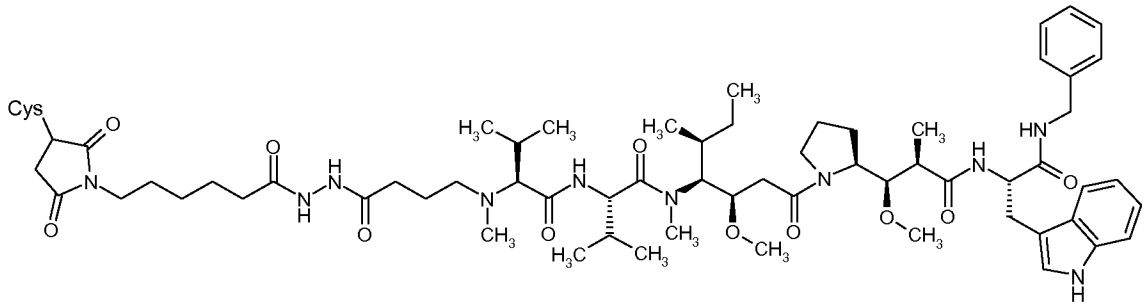
10 mg (10 µmol) von Intermediat 125 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.4 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.7 mg (69% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1140 $(M+H)^+$.

**Beispiel 50**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzylamino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



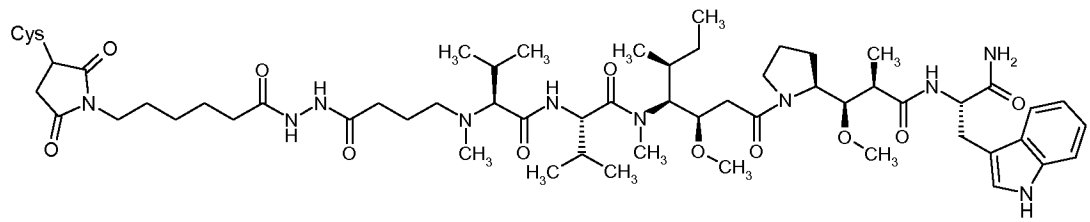
10 mg (10 µmol) von Intermediat 160 wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 8.1 mg (73% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1274 $(M+H)^+$.

**Beispiel 51**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

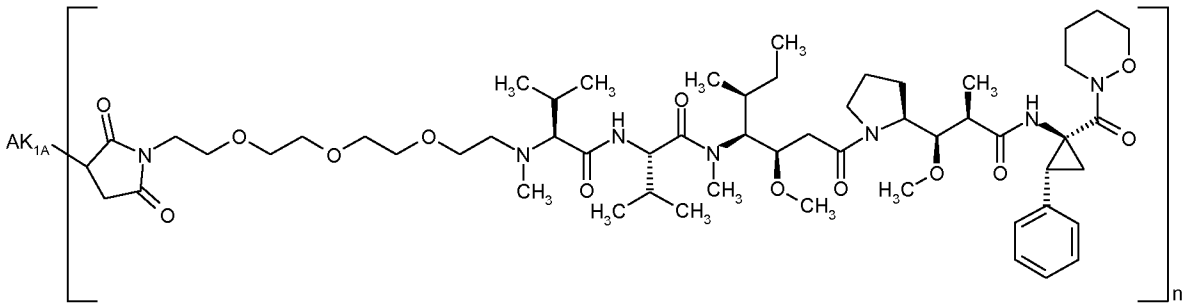



10 mg (10µmol) von Intermediat 157 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.8 mg (48% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.45 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 1184 $(M+H)^+$.

**Beispiel 52**

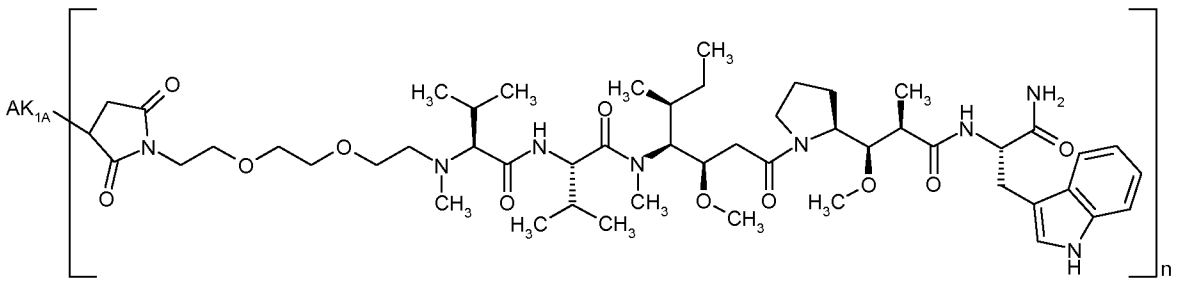


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.73 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

**Beispiel 53**

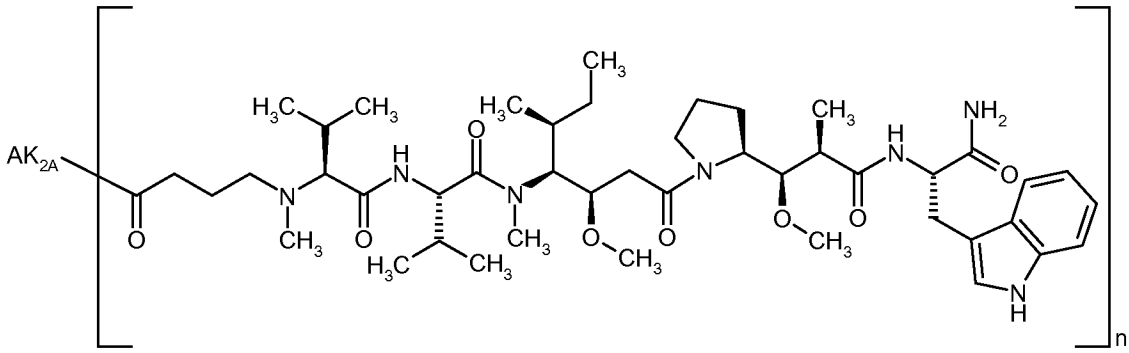


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.86 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.9

**Beispiel 54**

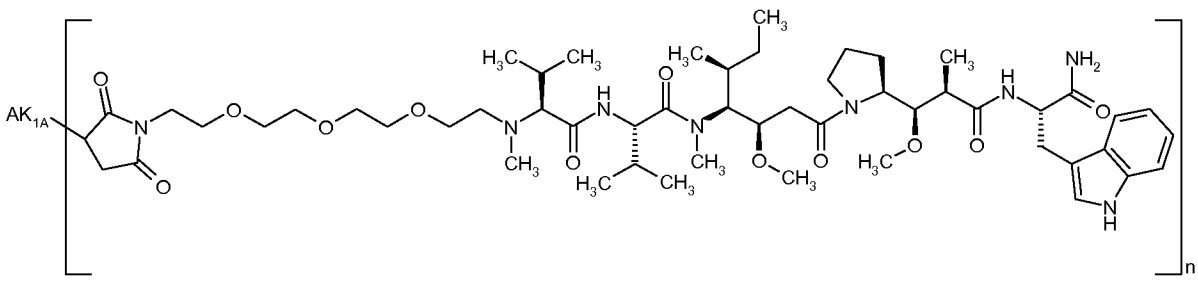


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.64 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.7

**Beispiel 55**

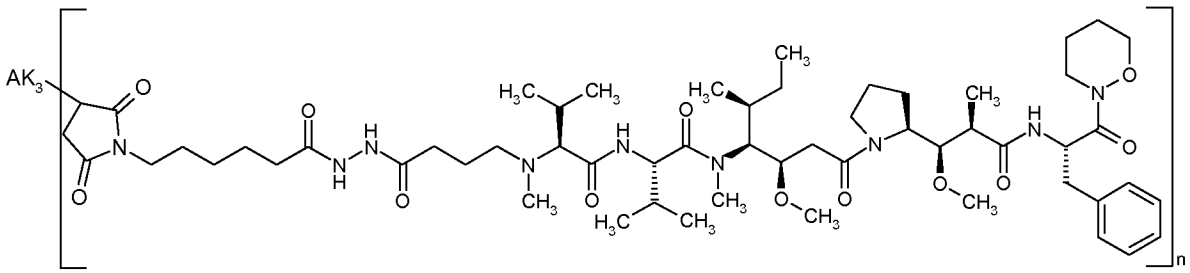


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.43 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

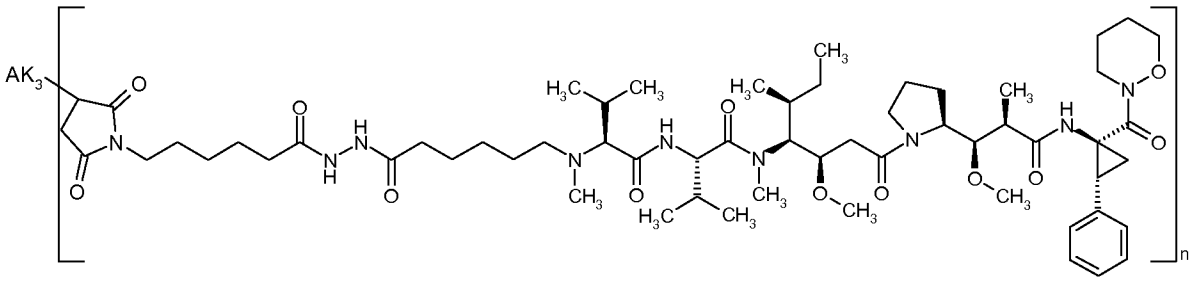
**Beispiel 56**



Protein Konzentration: 0.96 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

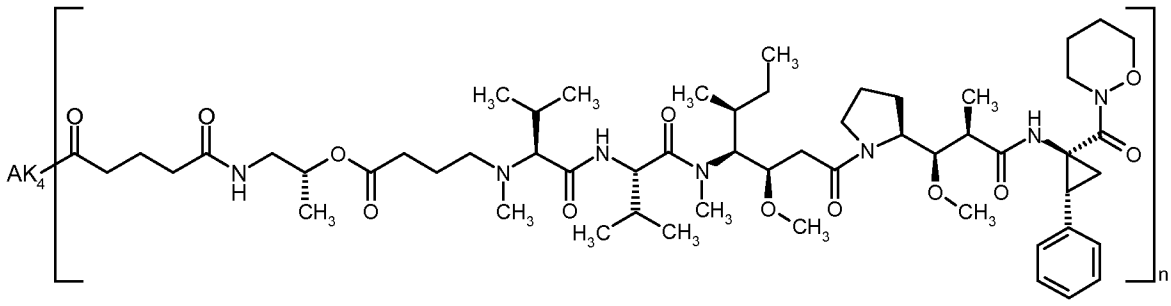
**Beispiel 57**



Protein Konzentration: 0.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

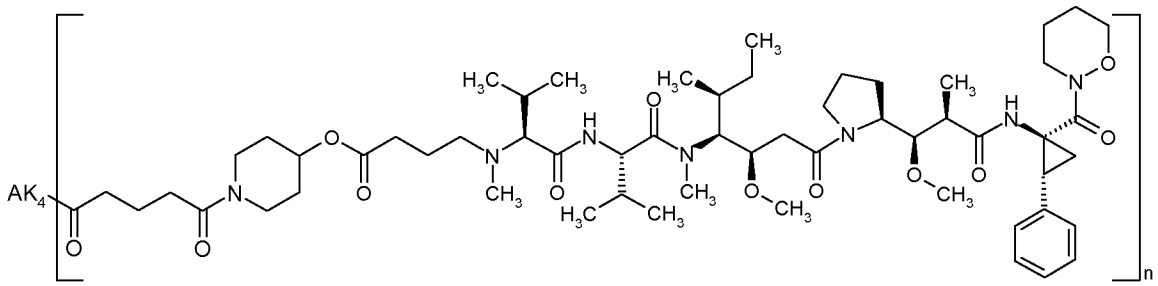
**Beispiel 58**



Protein Konzentration: 1.09 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.1

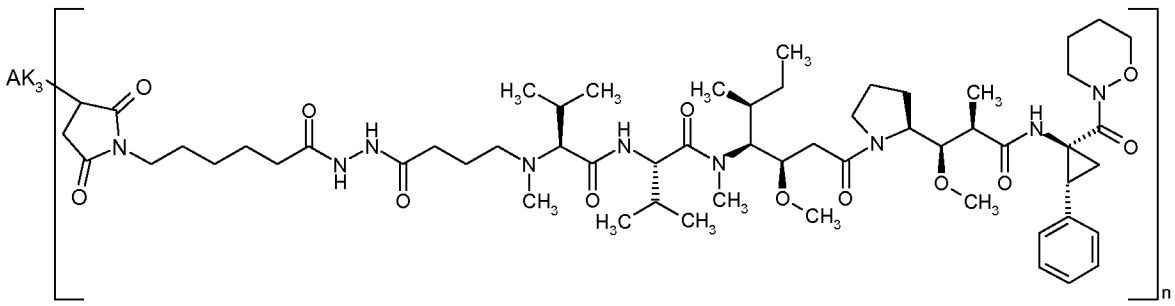
**Beispiel 59**



Protein Konzentration: 0.87 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

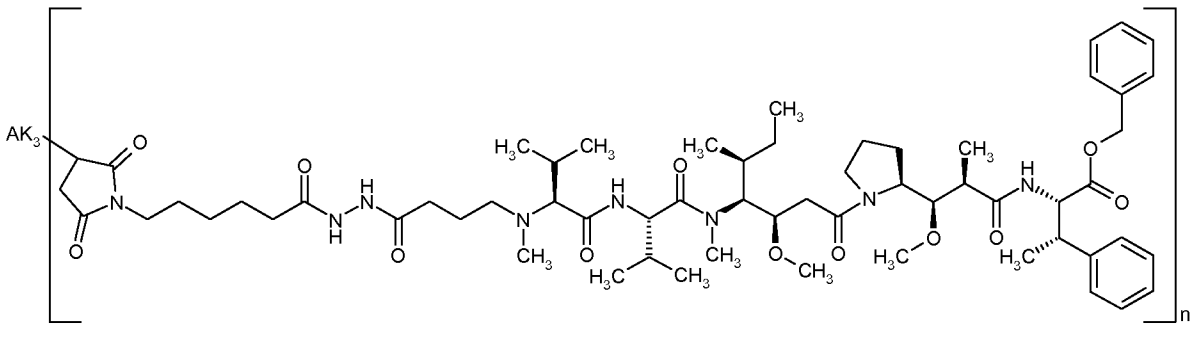
**Beispiel 60**



Protein Konzentration: 0.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.5

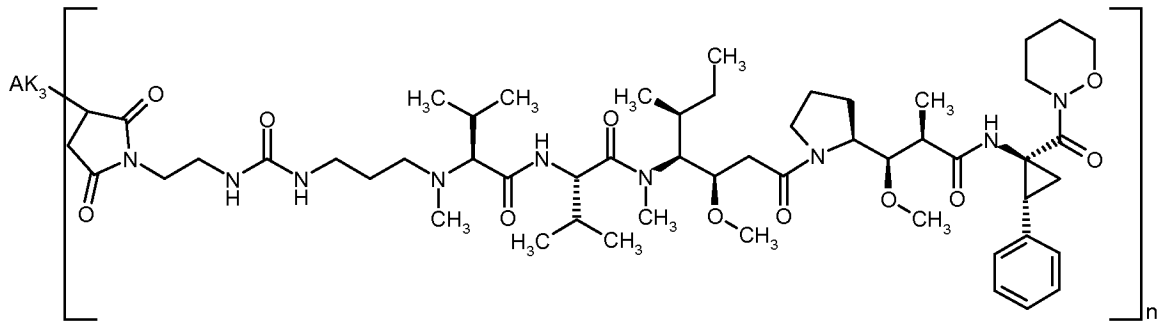
**Beispiel 61**



Protein Konzentration: 0.15 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

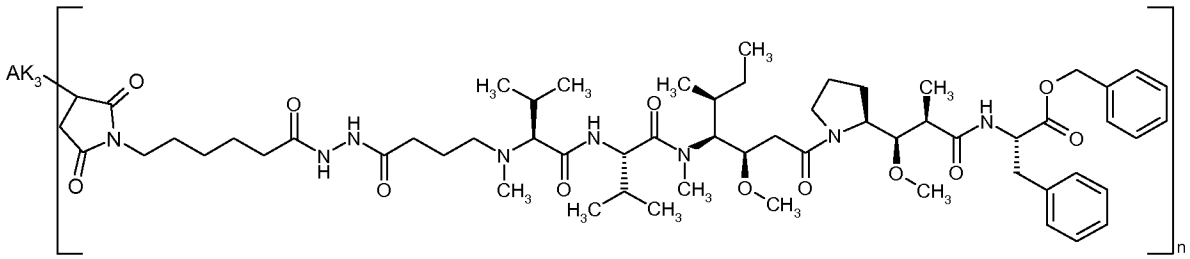
**Beispiel 62**



Protein Konzentration: 0.94 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

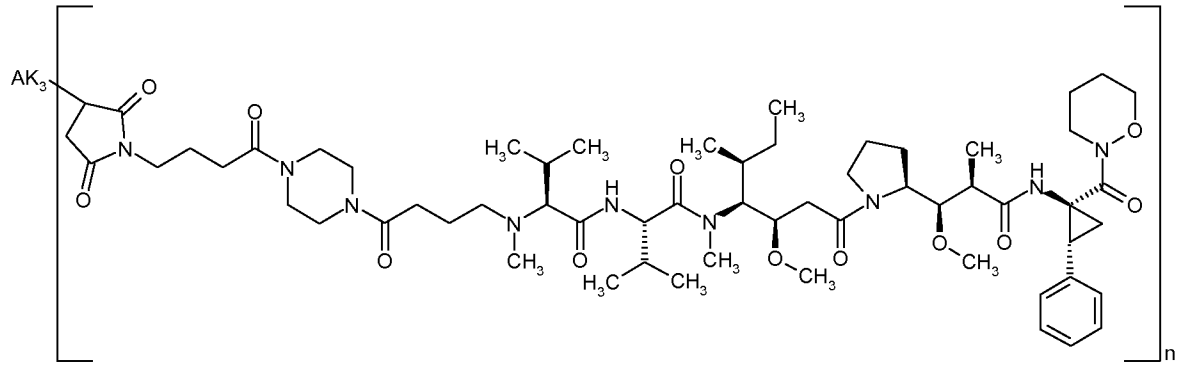
**Beispiel 63**



Protein Konzentration: 0.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.9

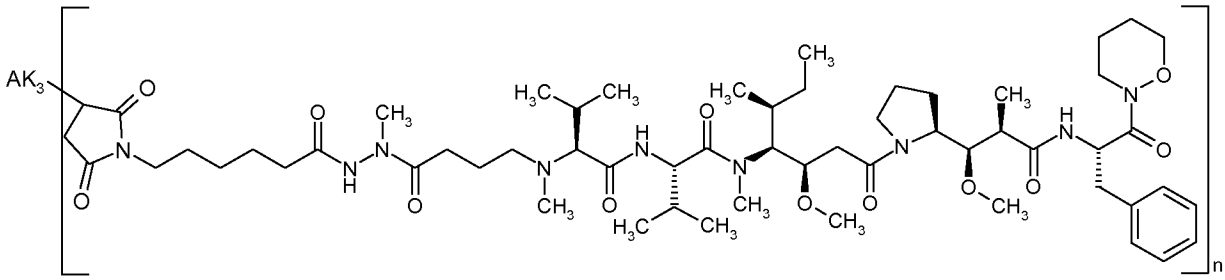
**Beispiel 64**



Protein Konzentration: 0.51 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.6

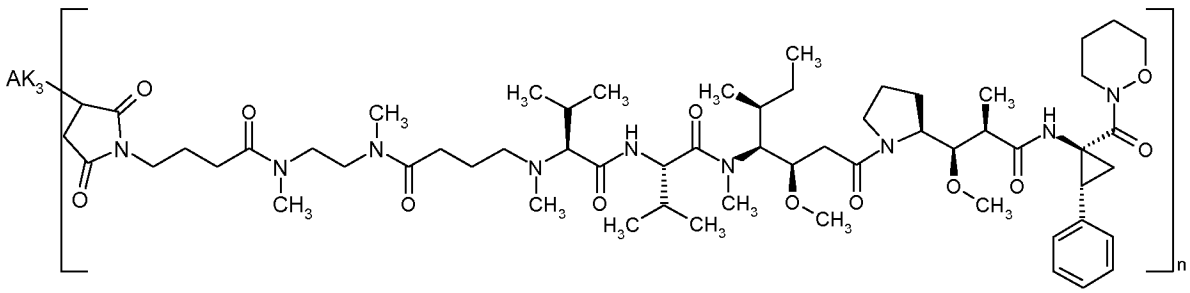
**Beispiel 65**



Protein Konzentration: 0.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.2

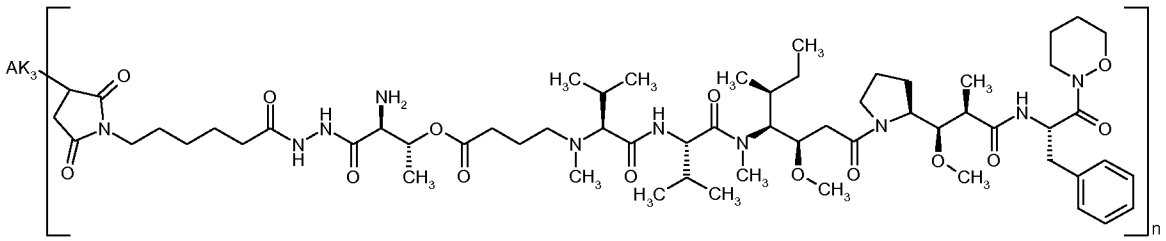
**Beispiel 66**



Protein Konzentration: 0.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.9

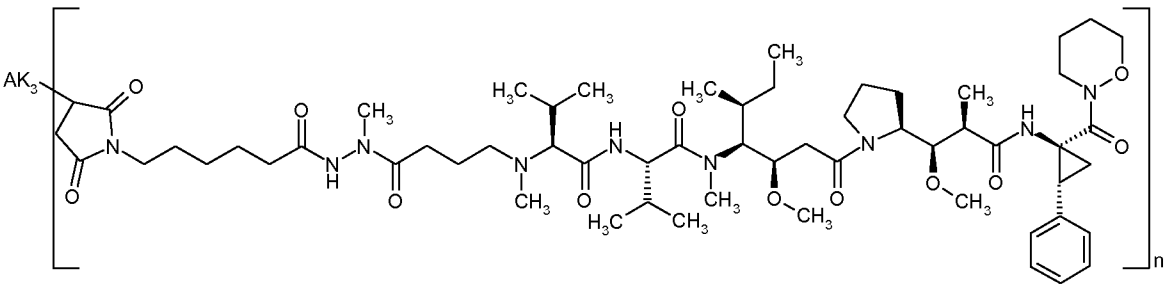
**Beispiel 67**



Protein Konzentration: 0.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

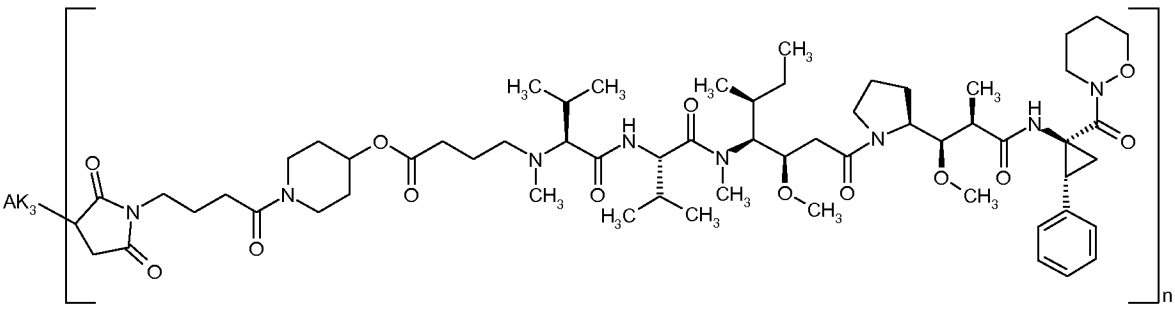
**Beispiel 68**



Protein Konzentration: 0.53 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

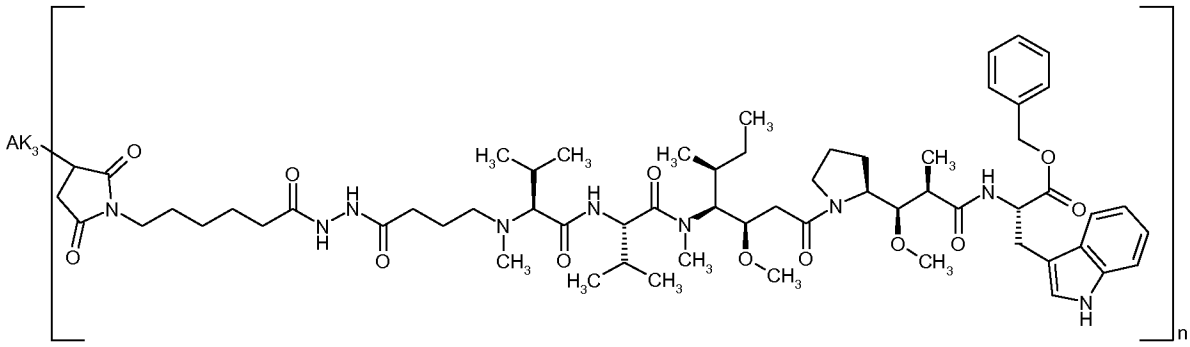
**Beispiel 69**



Protein Konzentration: 0.92 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

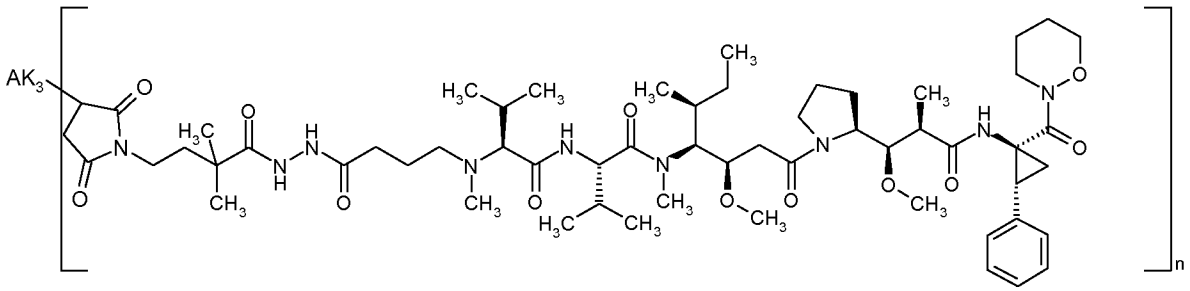
**Beispiel 70**



Protein Konzentration: 0.09 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nd

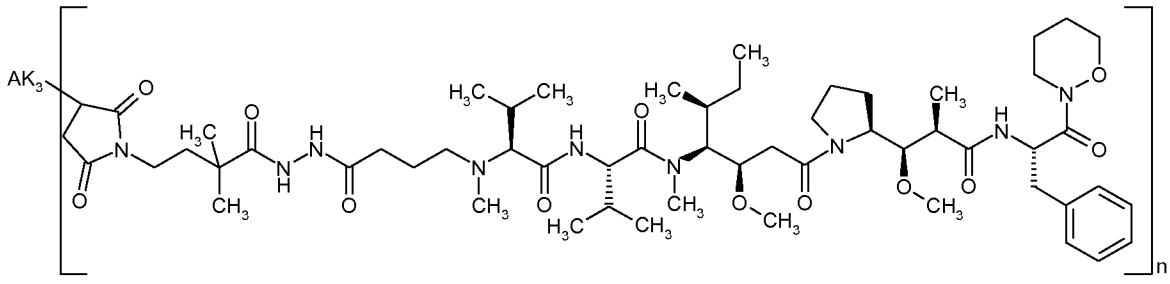
**Beispiel 71**



Protein Konzentration: 0.62 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

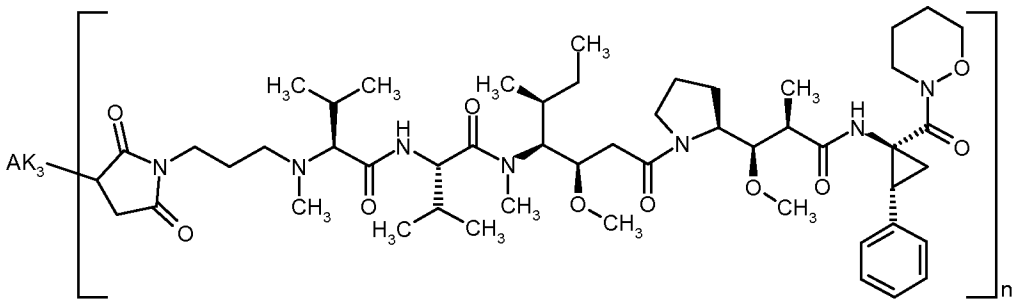
**Beispiel 72**



Protein Konzentration: 0.55 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

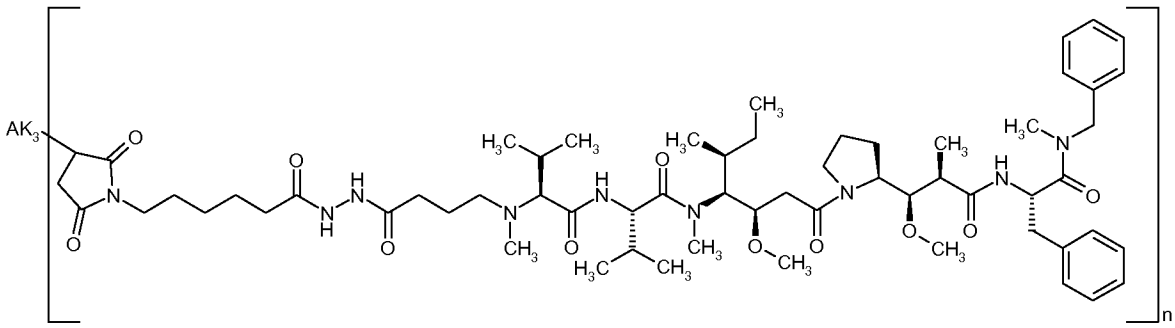
**Beispiel 73**



Protein Konzentration: 0.54 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.4

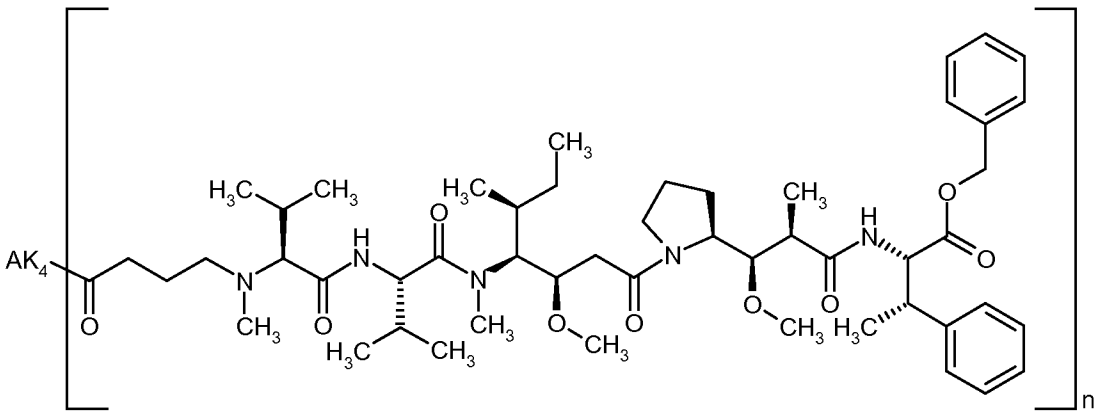
**Beispiel 74**



Protein Konzentration: 0.56 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

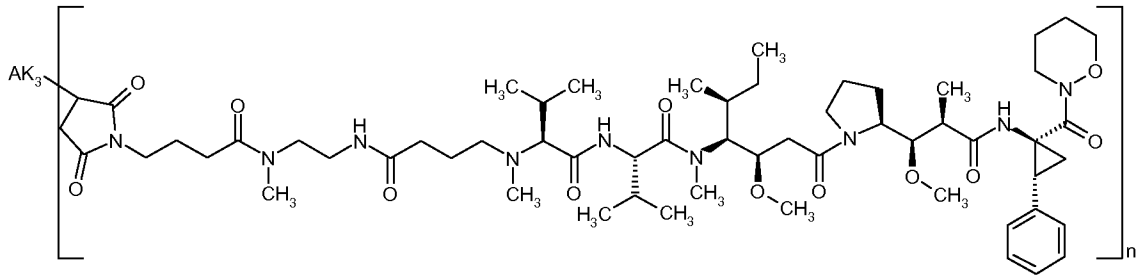
**Beispiel 75**



Protein Konzentration: 1.1 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.3

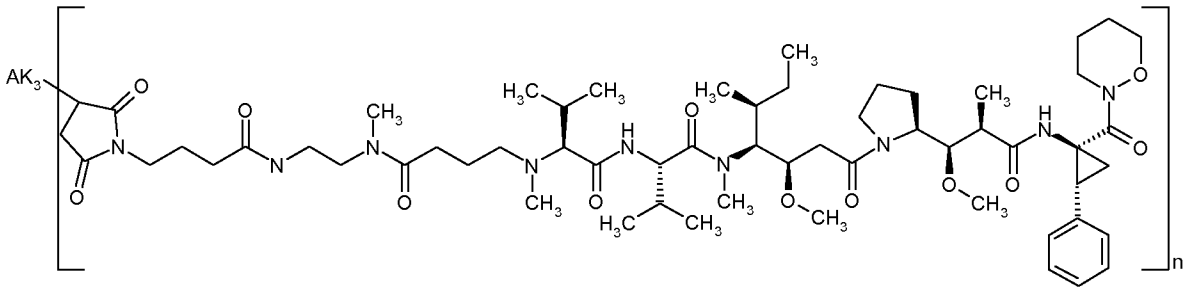
**Beispiel 76**



Protein Konzentration: 0.61 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.9

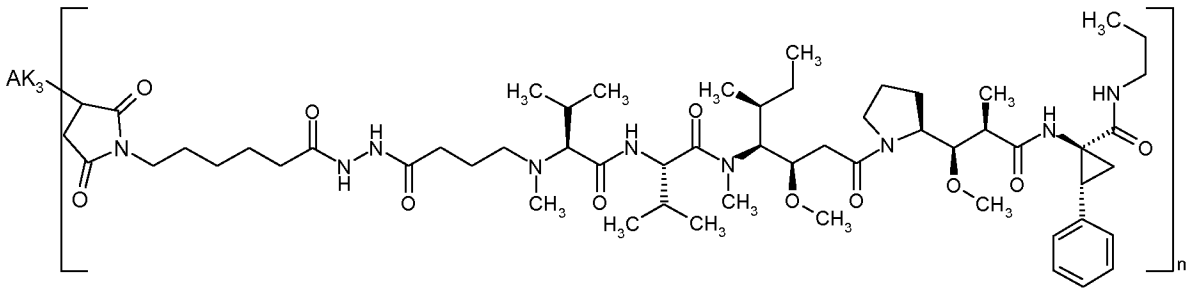
**Beispiel 77**



Protein Konzentration: 0.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.2

**Beispiel 78**

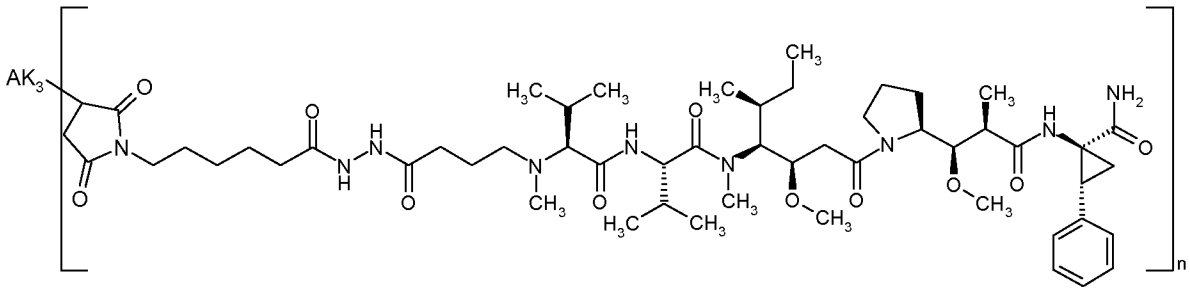


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

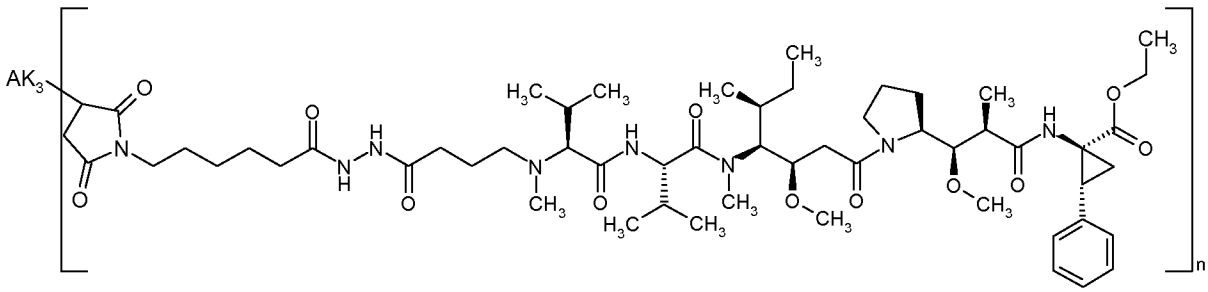
**Beispiel 79**



Protein Konzentration: 1.56 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

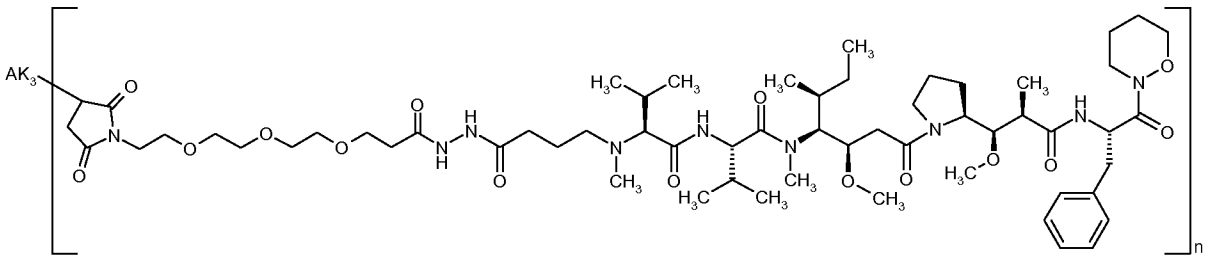
**Beispiel 80**



Protein Konzentration: 0.60 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

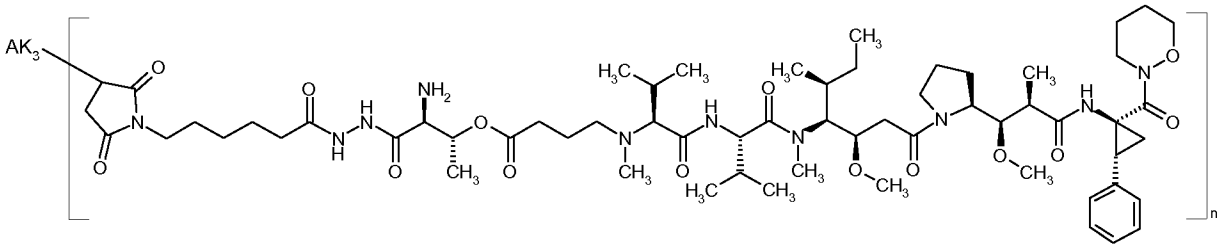
**Beispiel 81**



Proteinkonzentration: 0.584 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.6

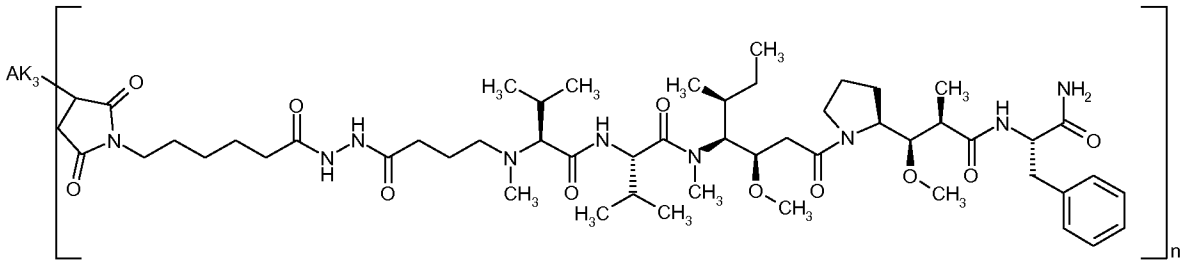
**Beispiel 82**



Proteinkonzentration: 0.39 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 0.8

**Beispiel 83**

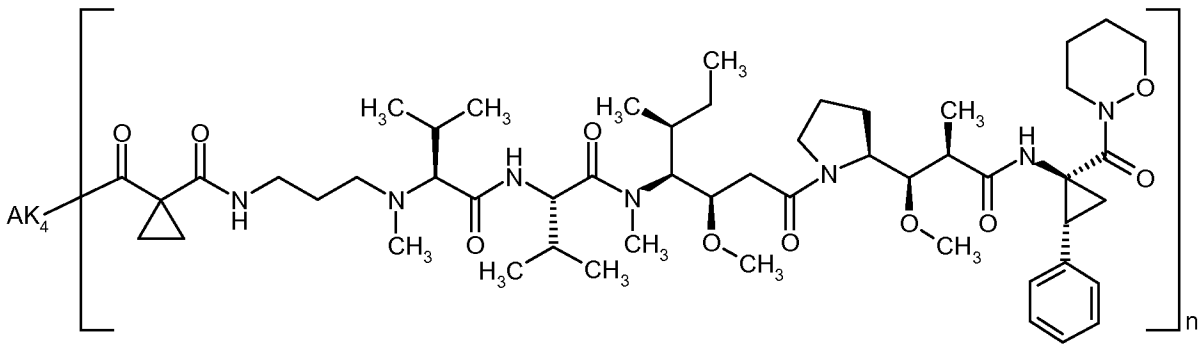


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 13.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

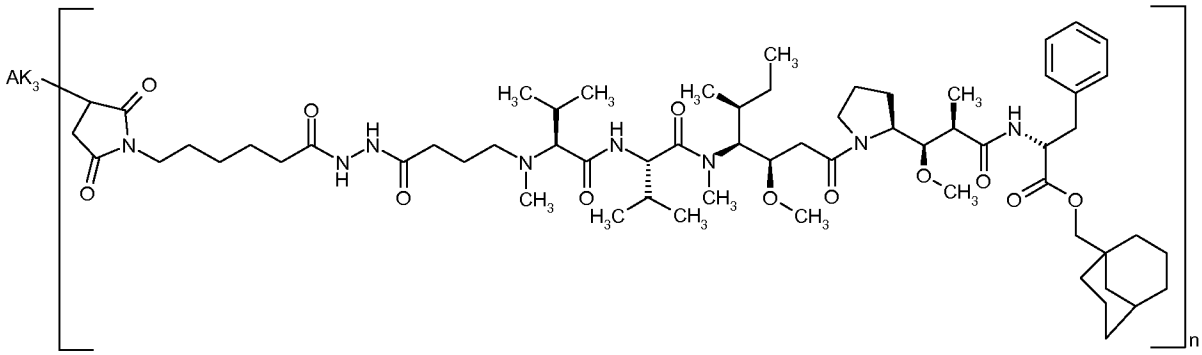
**Beispiel 84**



Protein Konzentration: 0.98ml

Drug/mAb Ratio: 1.1

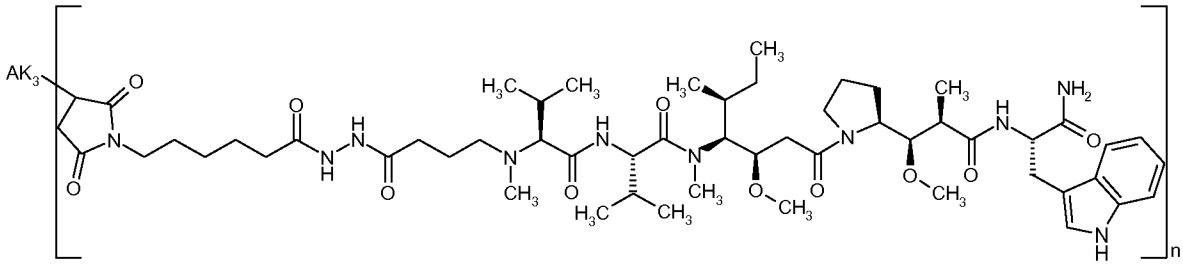
**Beispiel 85**



Protein Konzentration: 0.55 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

**Beispiel 86**

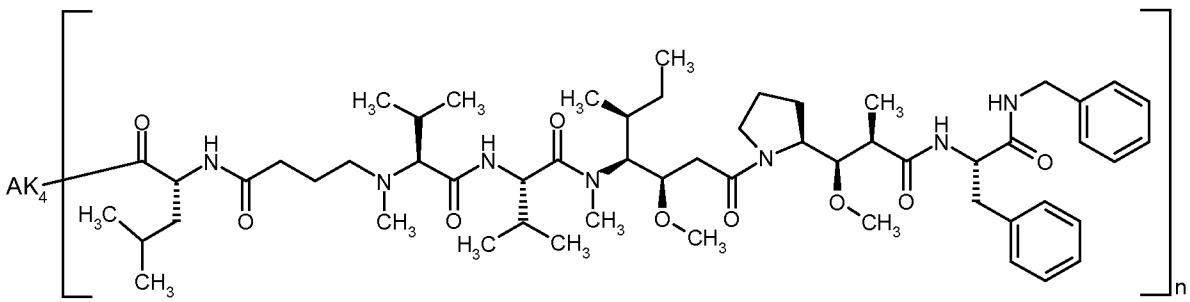


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 40 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.6 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.1

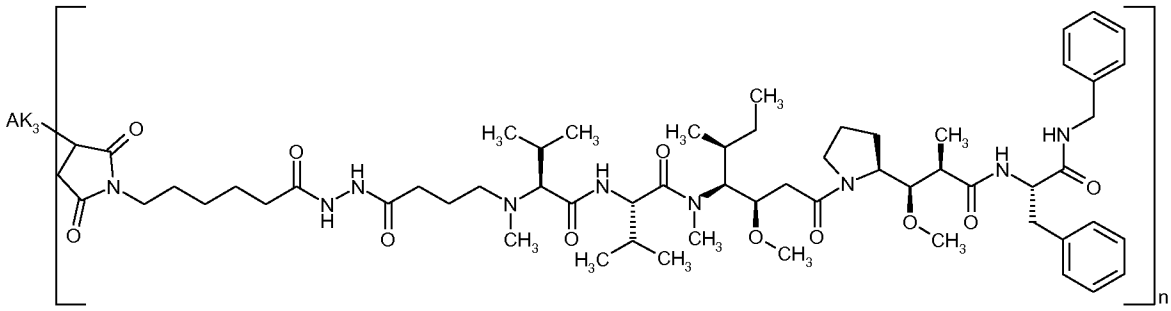
**Beispiel 87**



Protein Konzentration: 0.96 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.4

**Beispiel 88**

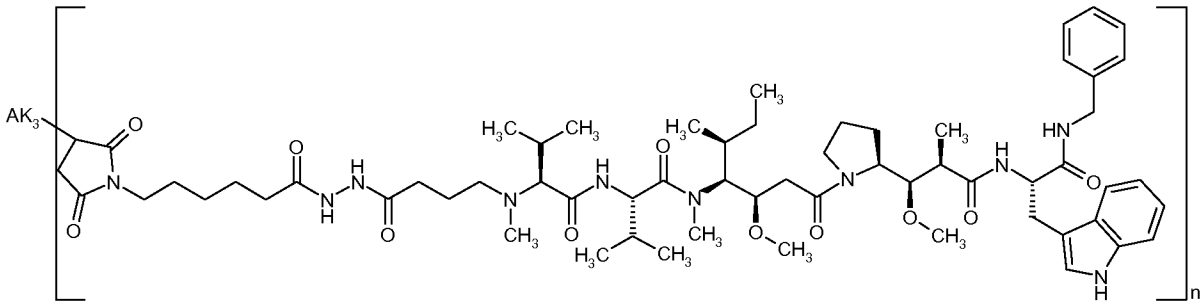


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.7 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.6

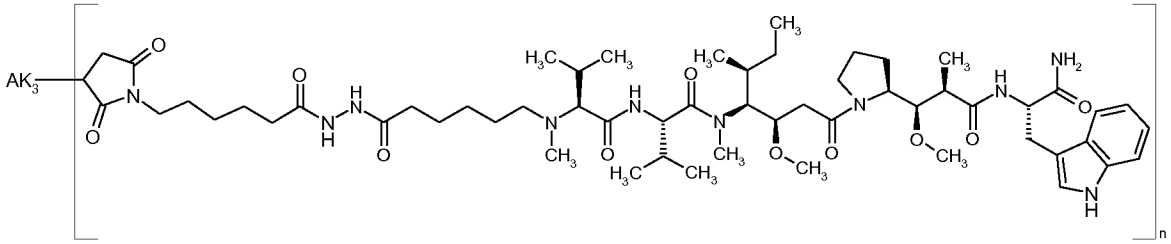
**Beispiel 89**



Protein Konzentration: 1.1 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.7

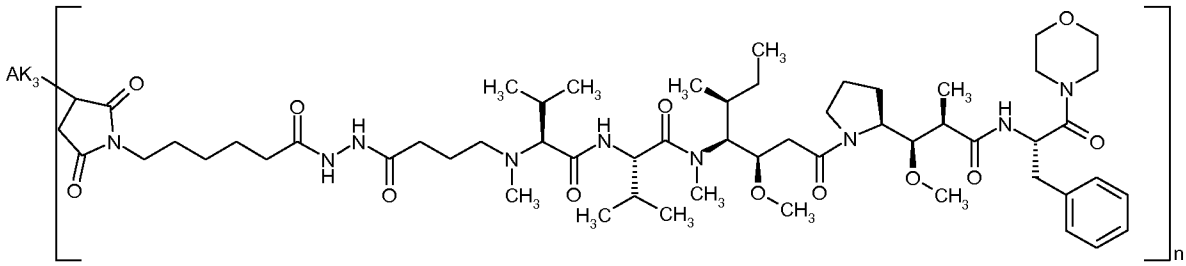
**Beispiel 90**



Protein Konzentration: 1.24 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.6

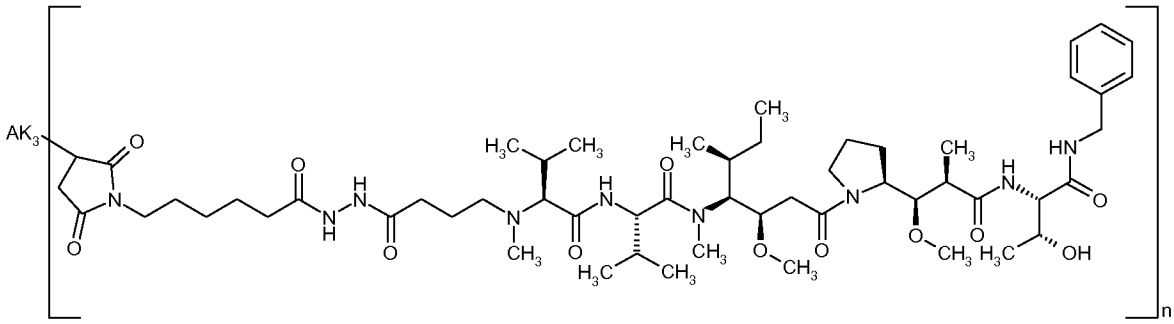
**Beispiel 91**



Protein Konzentration: 0.99 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.3

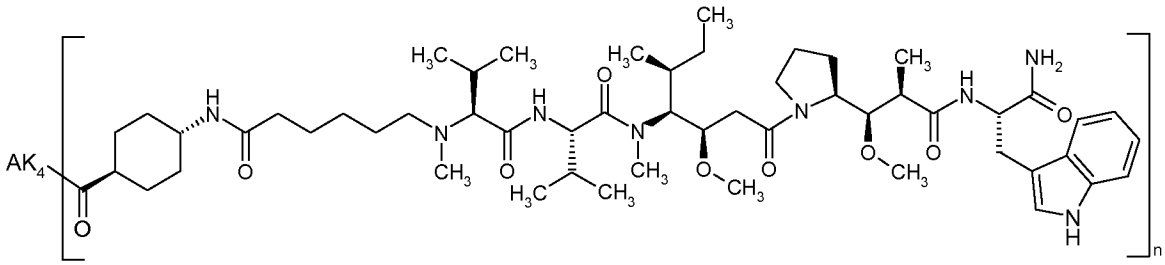
**Beispiel 92**



Protein Konzentration: 1.22 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

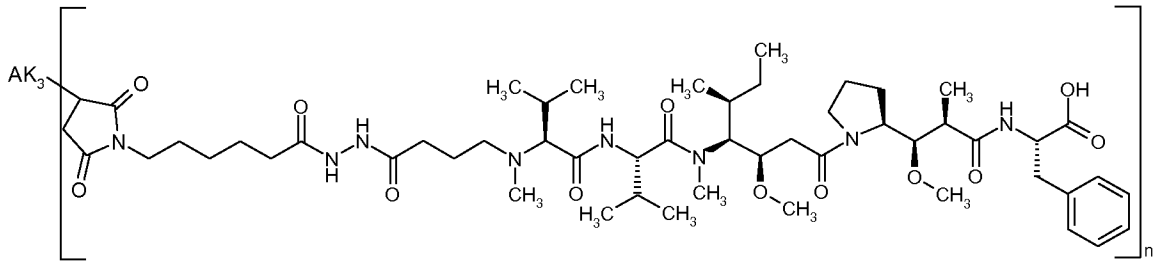
**Beispiel 93**



Protein Konzentration: 1.34 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.2

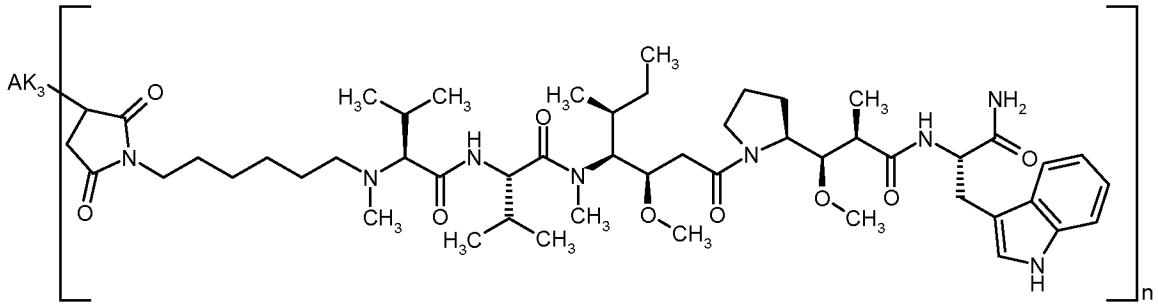
**Beispiel 94**



Protein Konzentration: 1.28 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

**Beispiel 95**

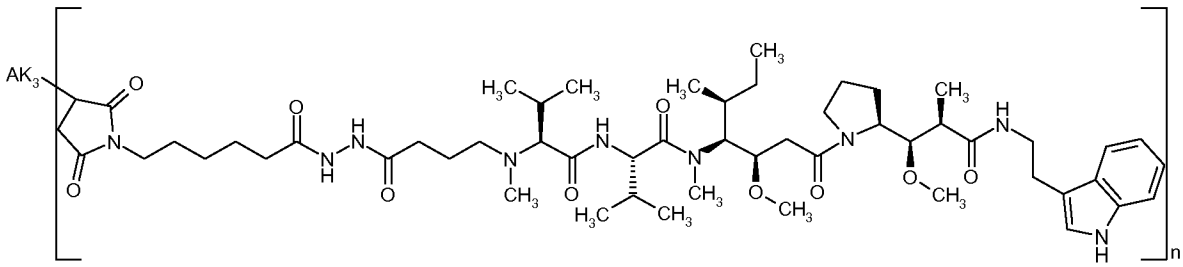


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.1

**Beispiel 96**

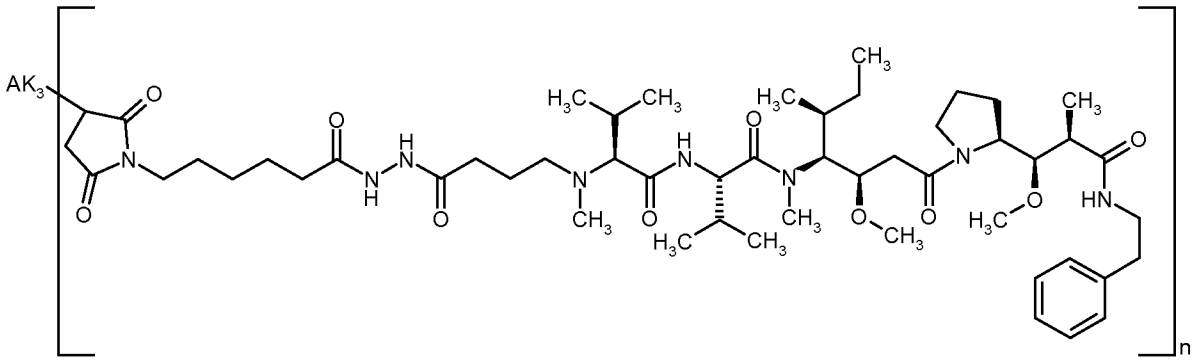


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.3

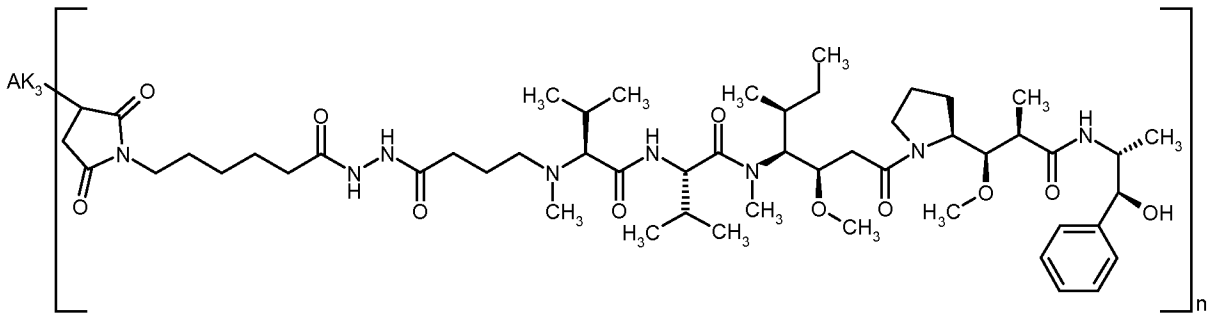
**Beispiel 97**



Protein Konzentration: 1.08 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

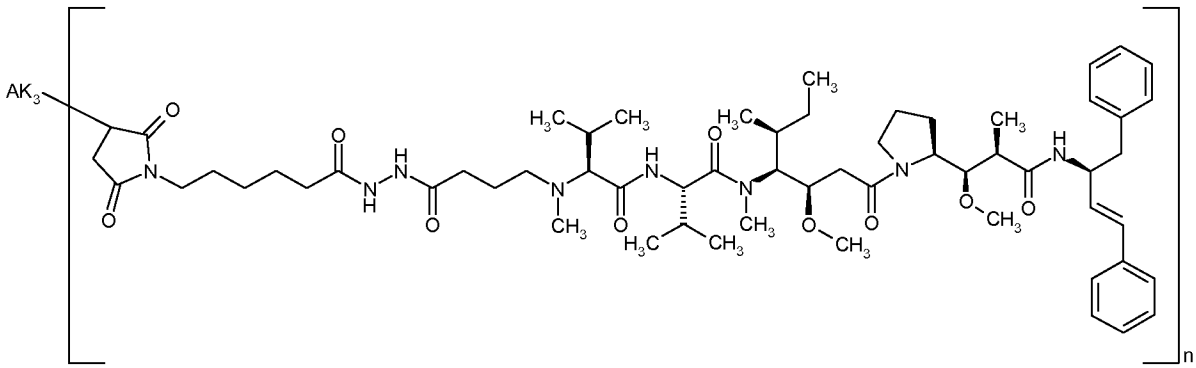
**Beispiel 98**



Protein Konzentration: 1.24 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

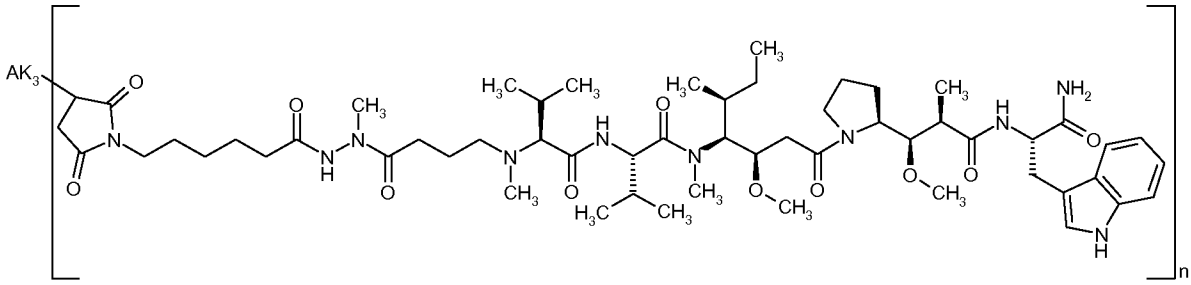
**Beispiel 99**



Protein Konzentration: 1.28 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

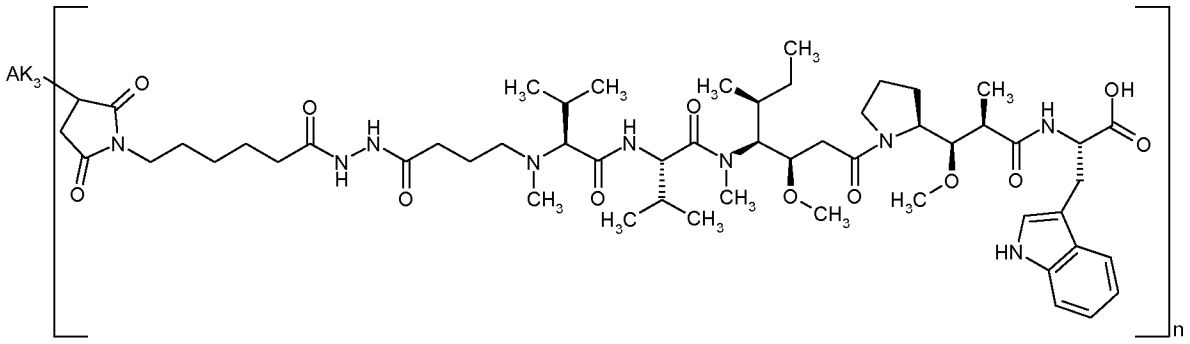
**Beispiel 100**



Protein Konzentration: 1.07 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

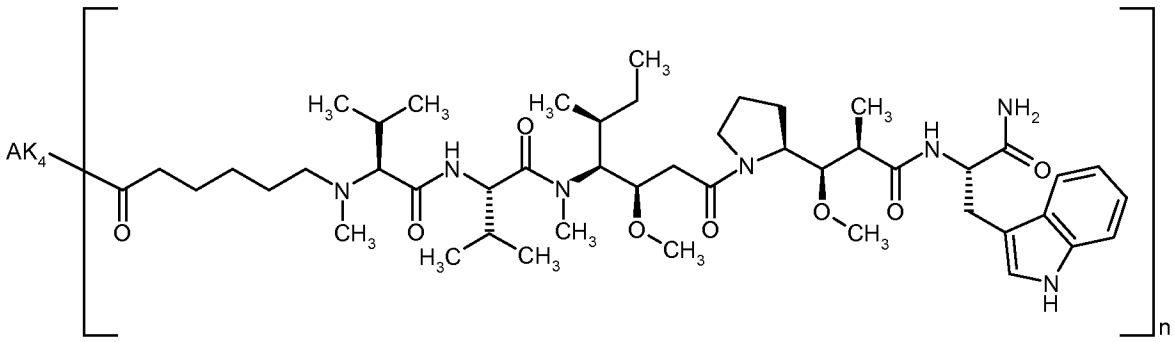
**Beispiel 101**



Protein Konzentration: 1.35 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 102**

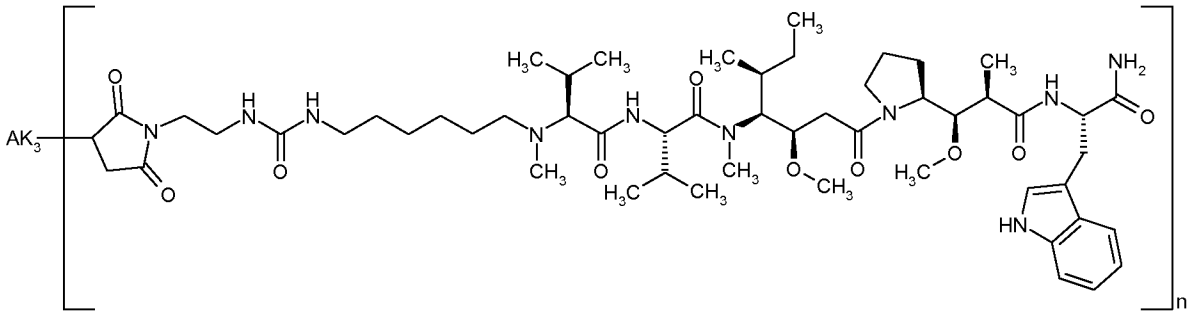


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.6

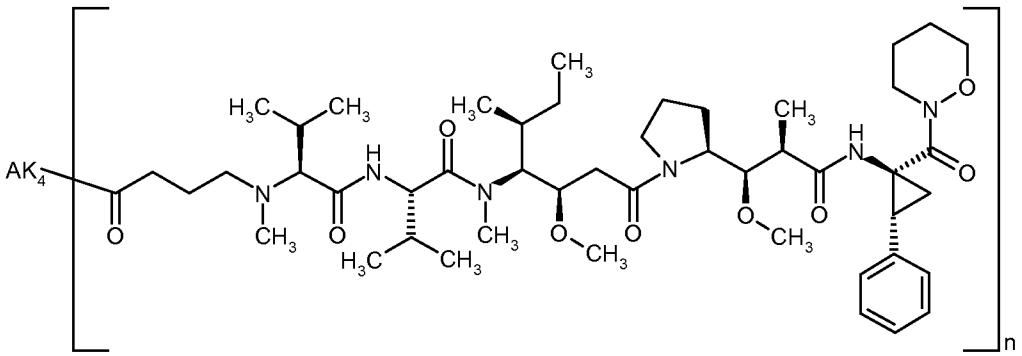
**Beispiel 103**



Protein Konzentration: 1.32 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

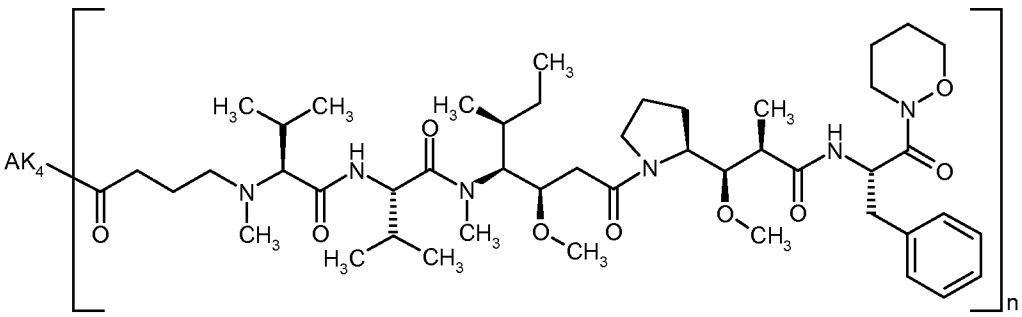
**Beispiel 104**



Protein Konzentration: 1.01 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.9

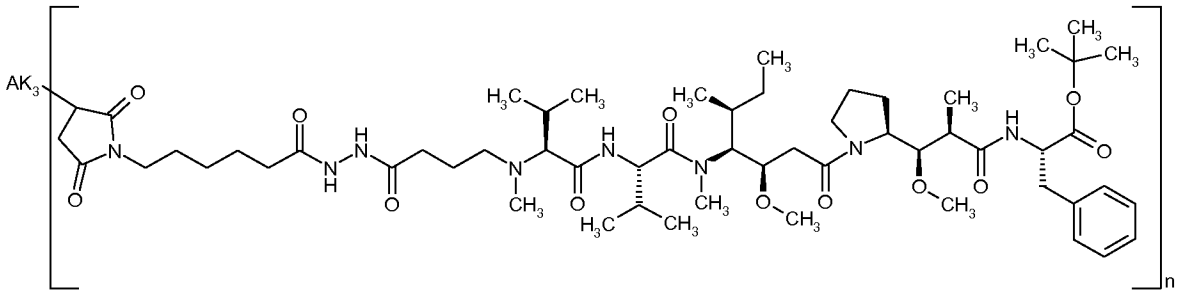
**Beispiel 105**



Protein Konzentration: 1.03 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.3

**Beispiel 106**

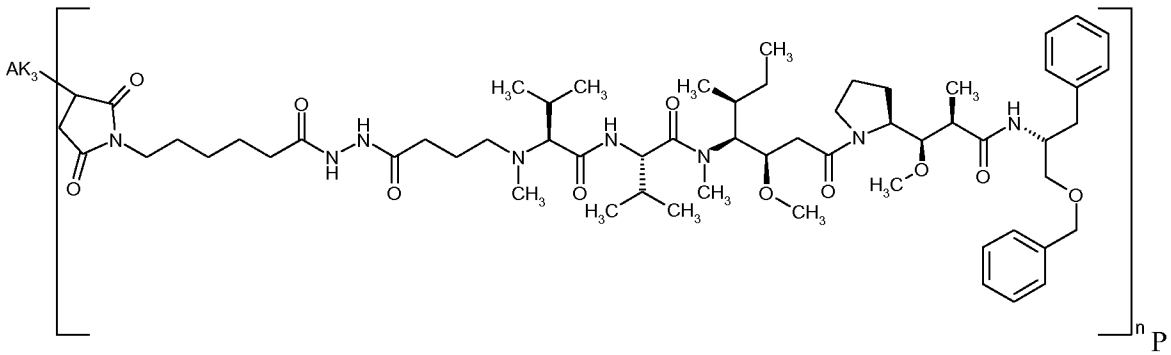


Protein Konzentration: 0.62 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

Dieses ADC wurde mittels vivaspin Zentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt und erneut aufkonzentriert und rückverdünnt.

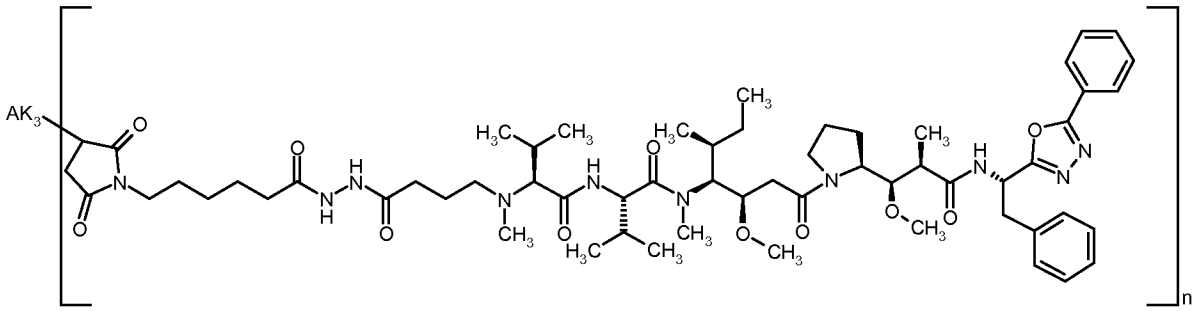
**Beispiel 107**



roteinkonzentration: 1.26 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

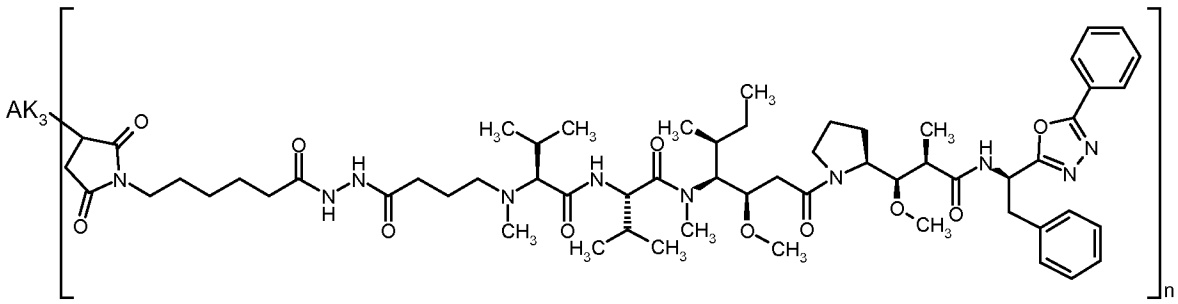
**Beispiel 108**



Proteinkonzentration: 1.55 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

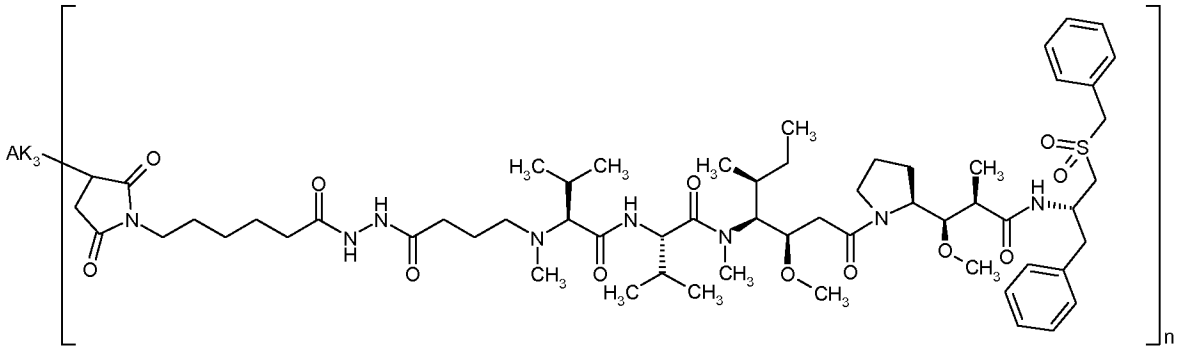
**Beispiel 109**



Proteinkonzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

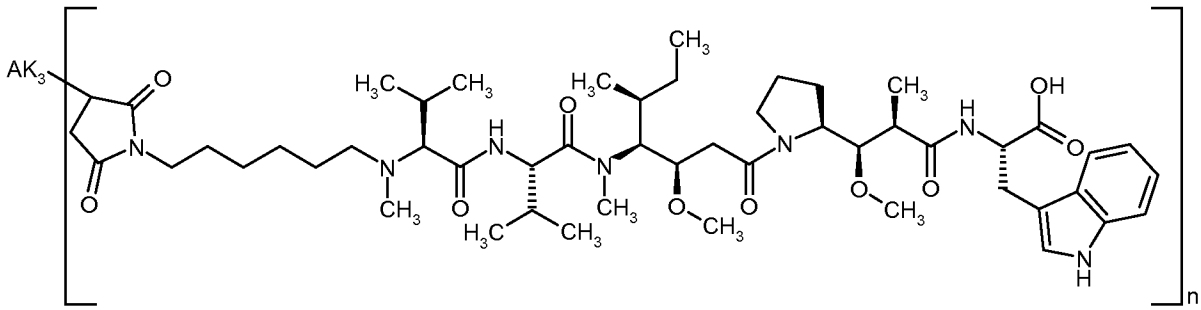
**Beispiel 110**



Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.1

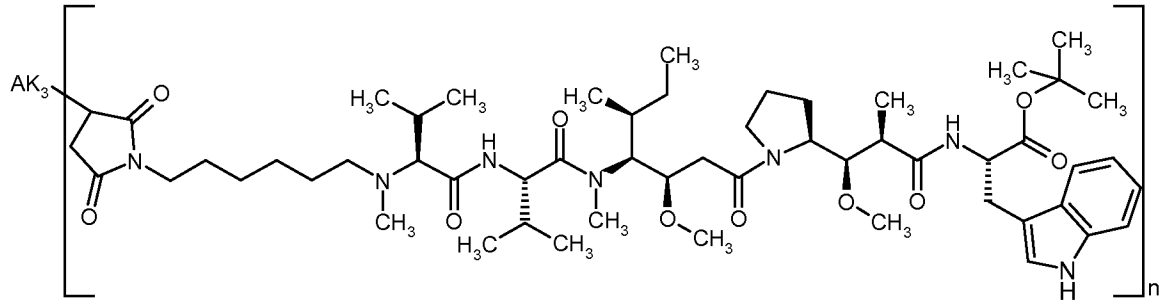
**Beispiel 111**



Protein Konzentration: 0.92 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

**Beispiel 112**

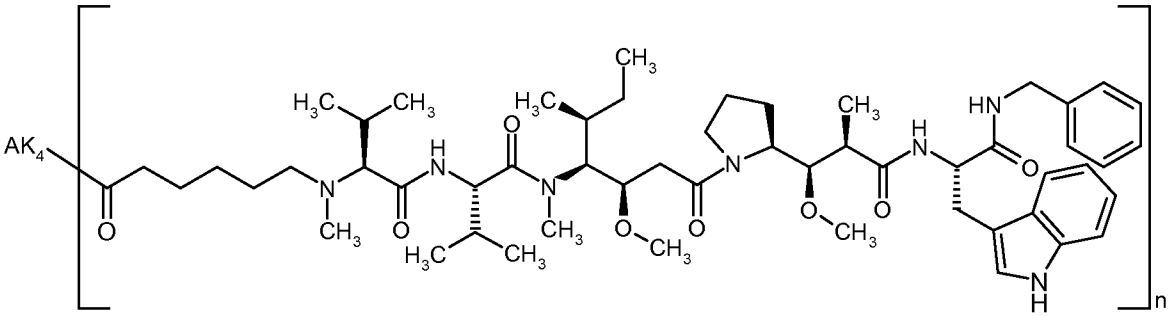


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-T in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.77 mg/ml

Drug/mAb Ratio: >1.5 (nicht exakt bestimmbar)

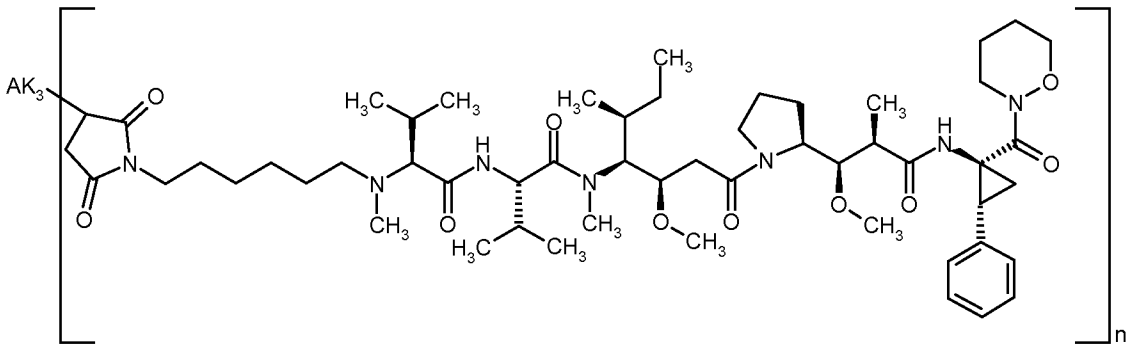
**Beispiel 113**



Protein Konzentration: 1.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.0

**Beispiel 114**

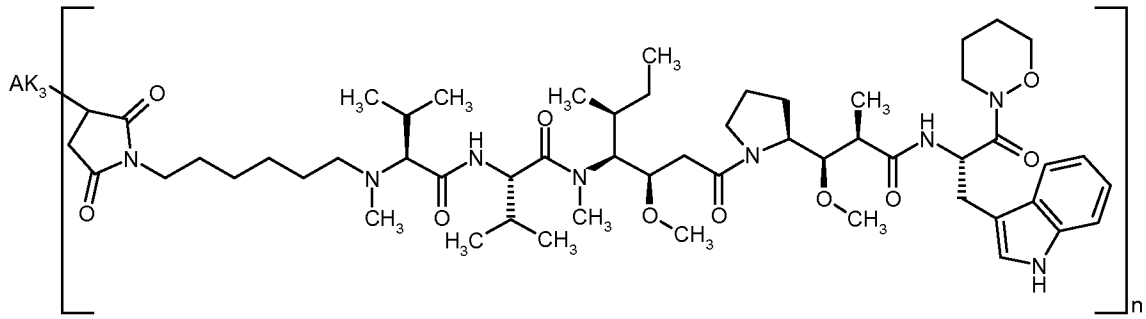


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 150 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.7

**Beispiel 115**

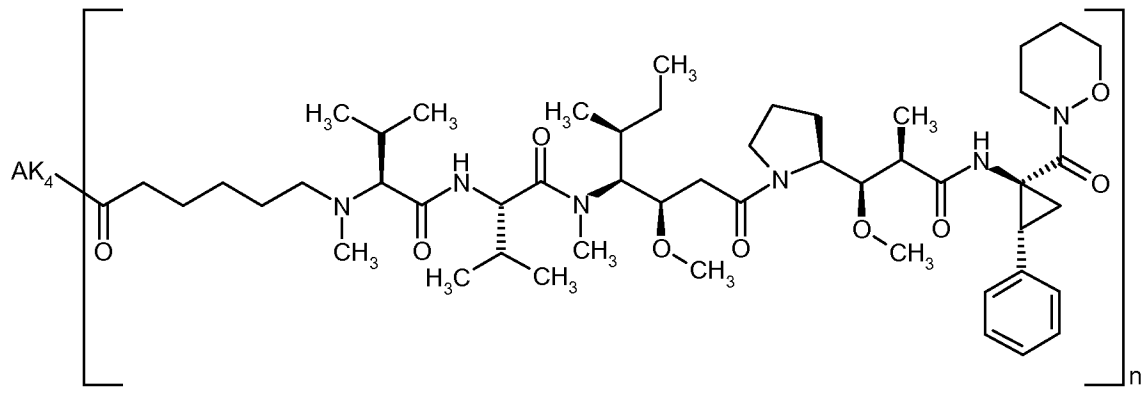


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.4 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 116**



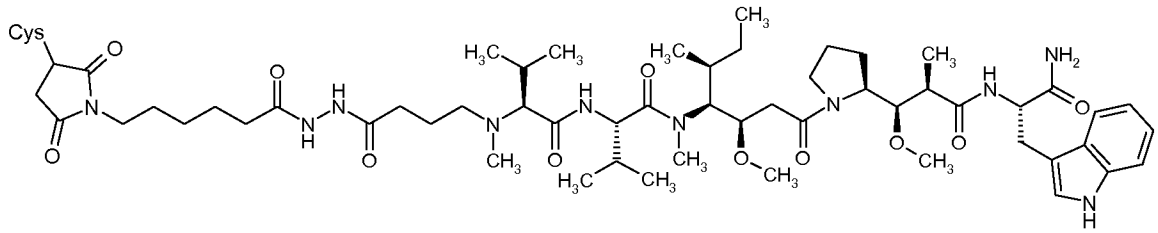
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 60 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.4

**Beispiel 117**

*N*-(4-{2-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



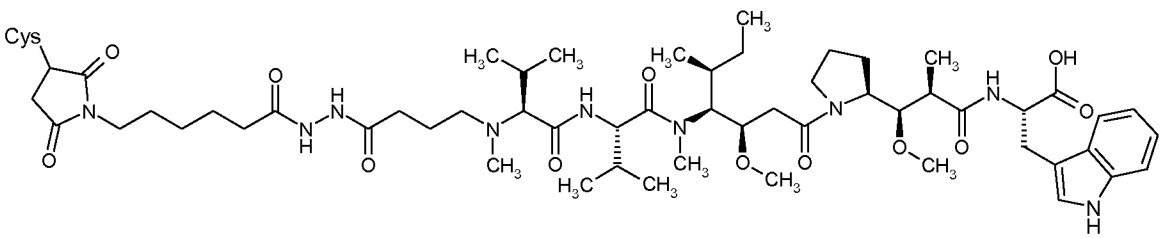
10 mg (10µmol) von Intermediat 157 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.8 mg (48% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.45 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 1184 $(M+H)^+$.

**Beispiel 118**

*N*-(4-{2-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



10 mg (10µmol) von Intermediat 113 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im

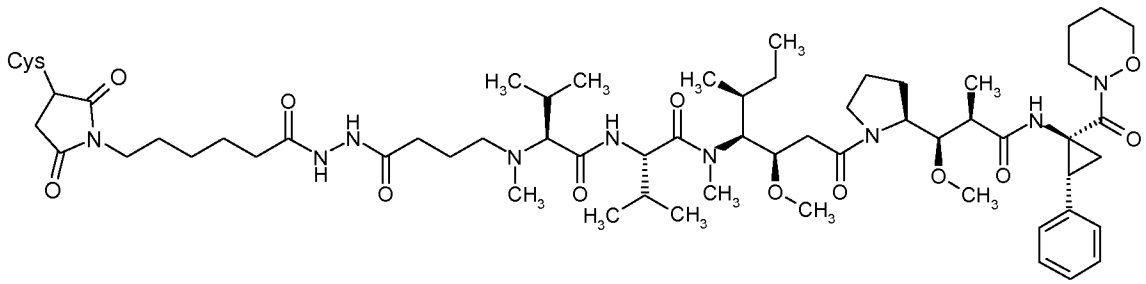
Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6 mg (54% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 1185 $(M+H)^+$.

**Beispiel 119**

*N*-(4-{2-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



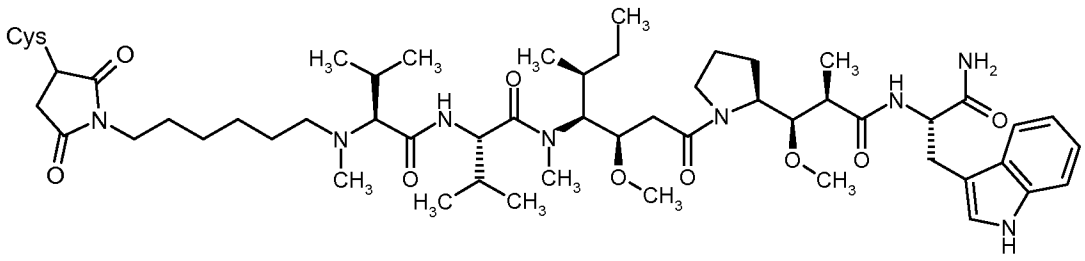
9 mg (8.3 µmol) von Intermediat 132 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 3 mg (24.4 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6.8 mg (68% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 1227 $(M+H)^+$.

**Beispiel 120**

*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-N-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl] amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



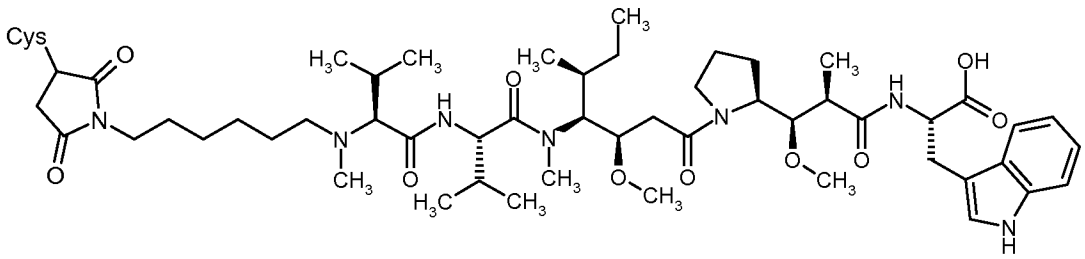
10 mg (10 µmol) von Intermediat 106 wurden in 5.8 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.2 mg (46% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.71 min; MS (ESIpos): m/z = 1070 $(M+H)^+$.

**Beispiel 121**

*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



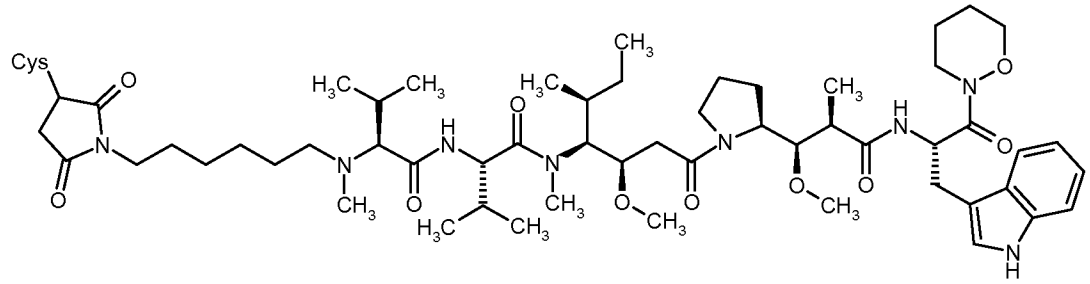
10 mg (10 µmol) von Intermediat 124 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.2 mg (64% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 $(M+H)^+$.

**Beispiel 122**

*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



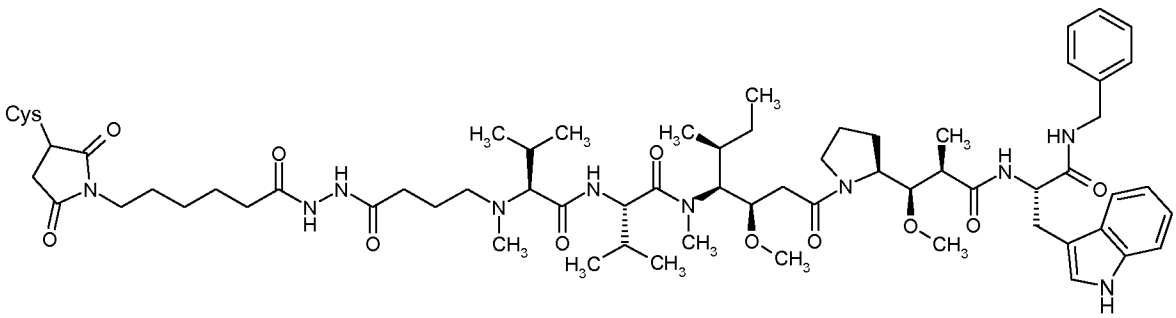
10 mg (10 µmol) von Intermediat 125 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.4 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.7 mg (69% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1140 $(M+H)^+$.

**Beispiel 123**

*N*-(4-{2-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



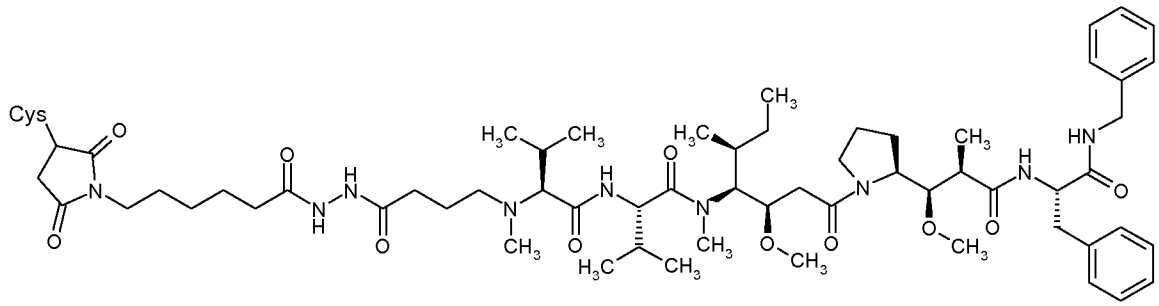
10 mg (10 µmol) von Intermediat 160 wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 8.1 mg (73% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1274 $(M+H)^+$.

**Beispiel 124**

*N*-(4-{2-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid



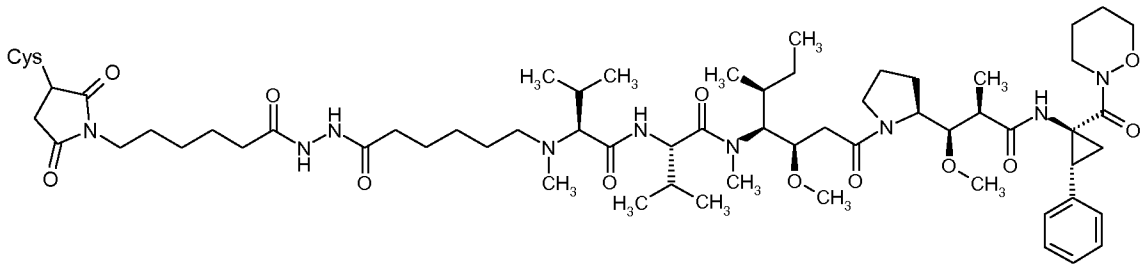
3.5 mg (3 µmol) von Intermediat 159 wurden in 1 ml DMF aufgenommen und mit 0.76 mg (6 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 2.6 mg (65% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.75 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1235 $(M+H)^+$.

**Beispiel 125**

*N*-(6-{2-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-6-oxohexyl)-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1*S*,2*R*)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid

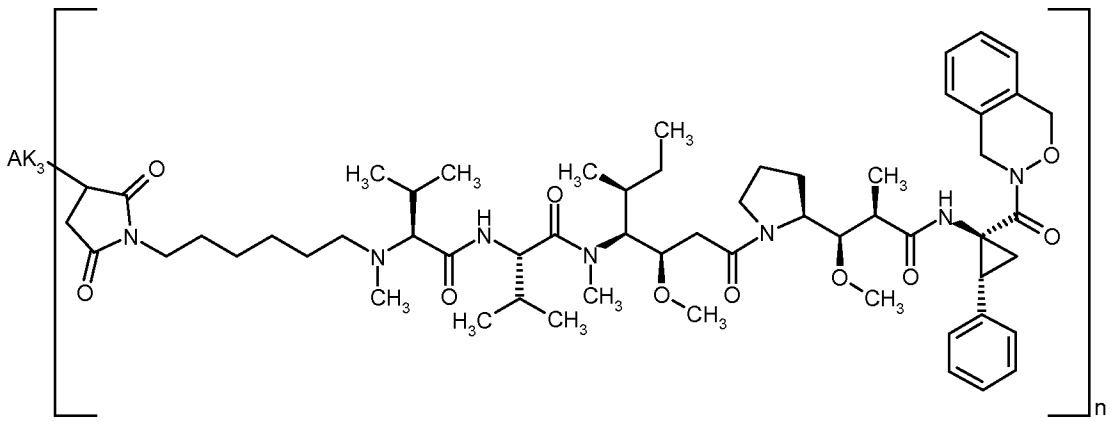


3.6 mg (3 µmol) von Intermediat 129 wurden in 1 ml DMF aufgenommen und mit 0.77 mg (6 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 1.55 mg (39% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1255 $(M+H)^+$.

**Beispiel 126**

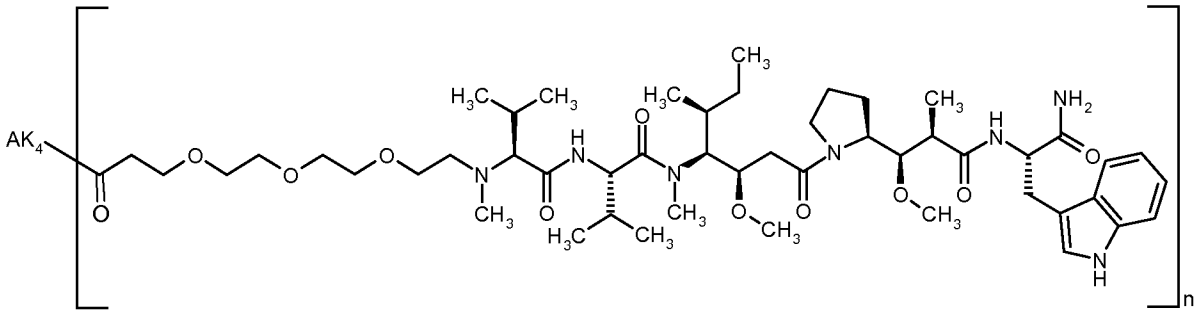


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-T in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1

**Beispiel 127**

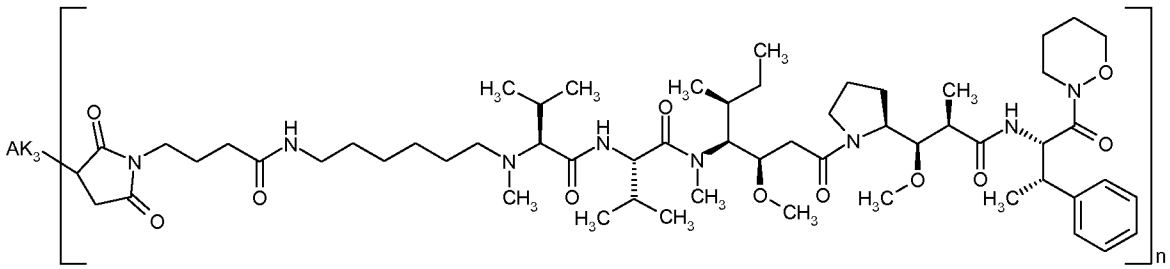


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.86 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 128**

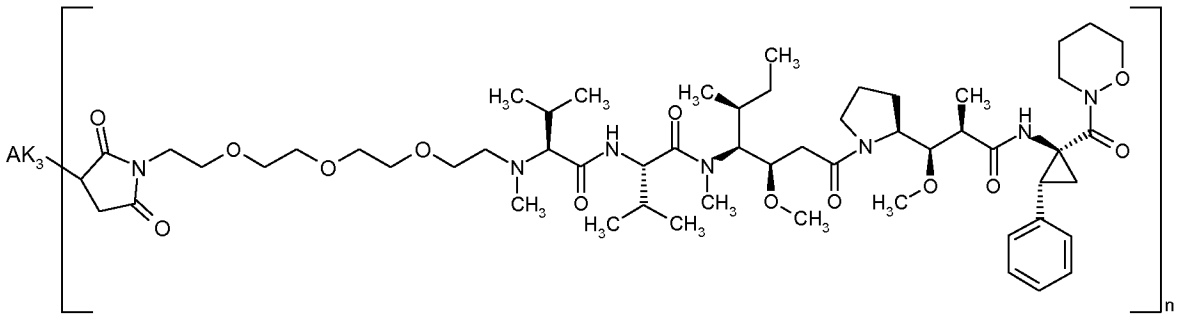


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.05 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.4

**Beispiel 129**

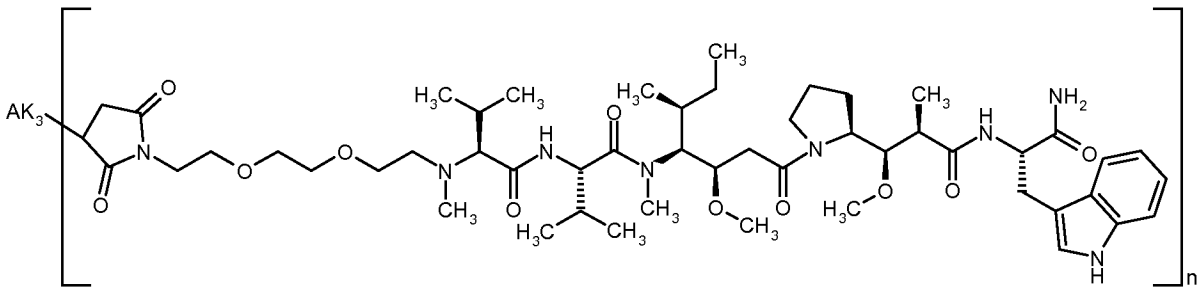


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.13 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

**Beispiel 130**

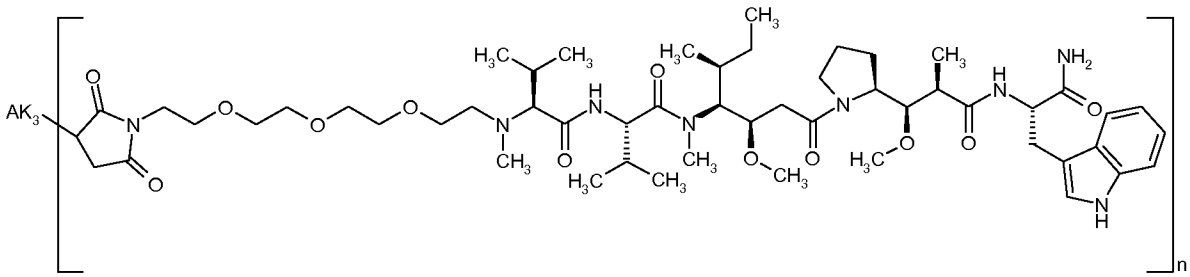


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.41 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 131**

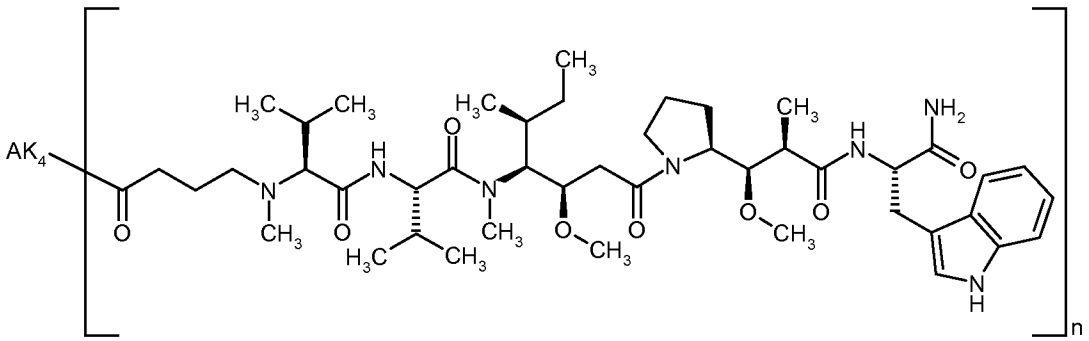


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.38 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.3

**Beispiel 132**

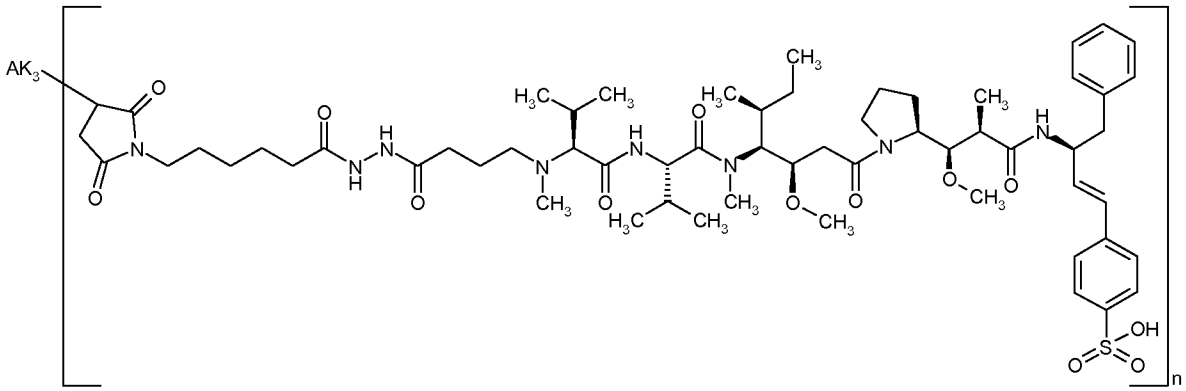


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.32 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1

**Beispiel 133**

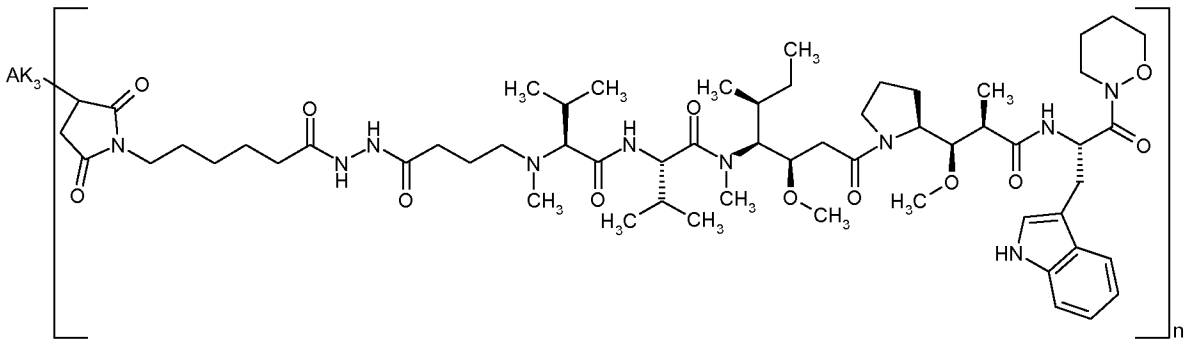


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.14 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.3

**Beispiel 134**

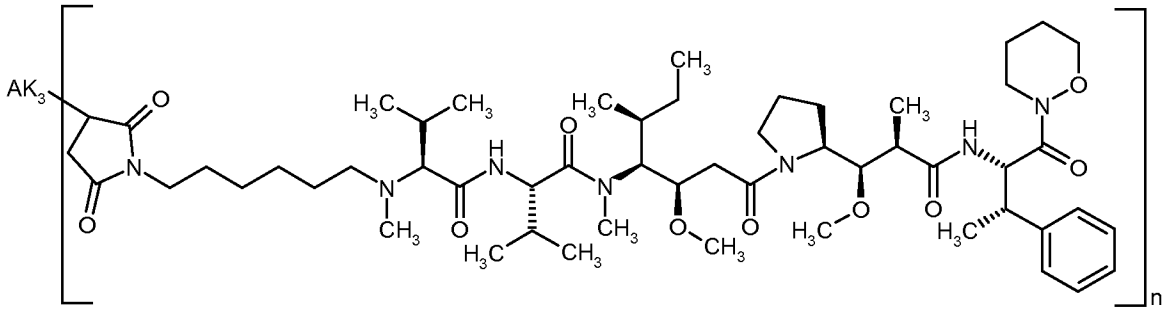


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.25 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.8

**Beispiel 135**

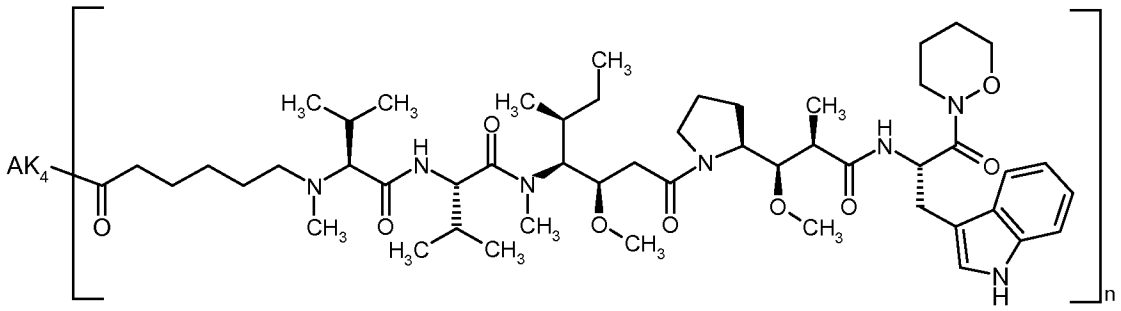


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.12 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.7

**Beispiel 136**

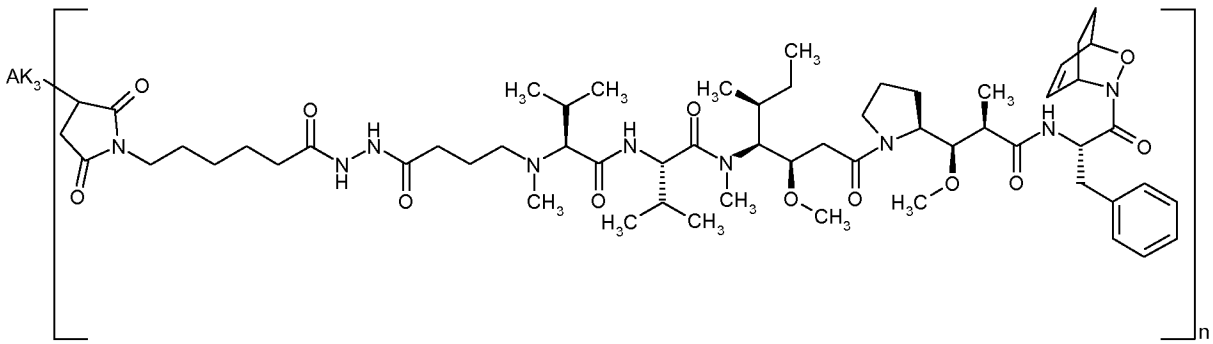


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 150 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.1

**Beispiel 137**

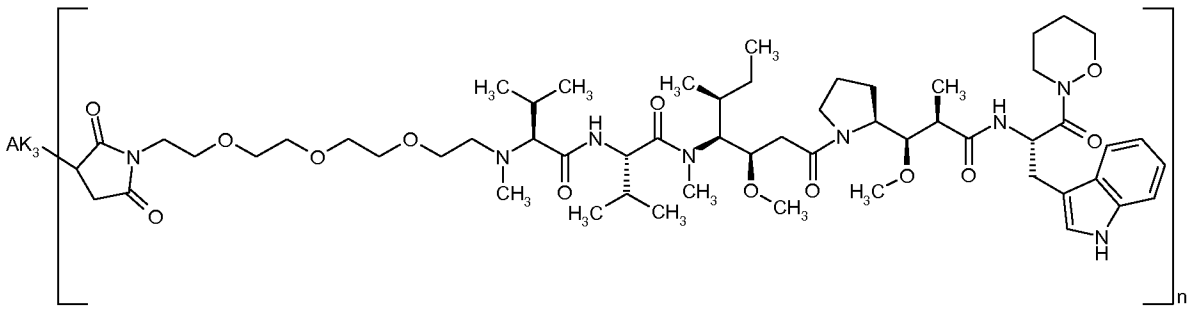


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.86 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

**Beispiel 138**

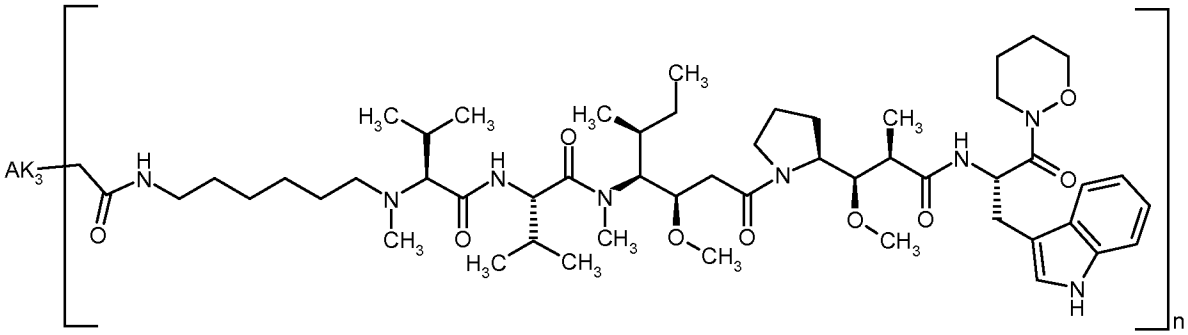


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.43 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.7

**Beispiel 139**

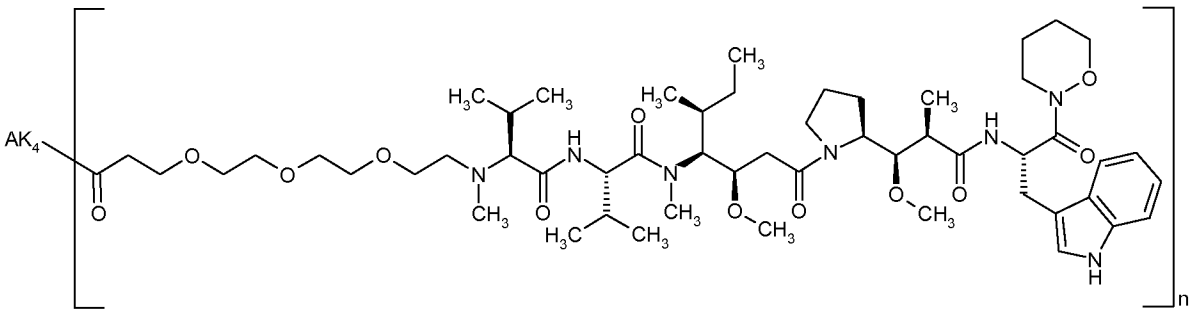


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.8 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.7

**Beispiel 140**

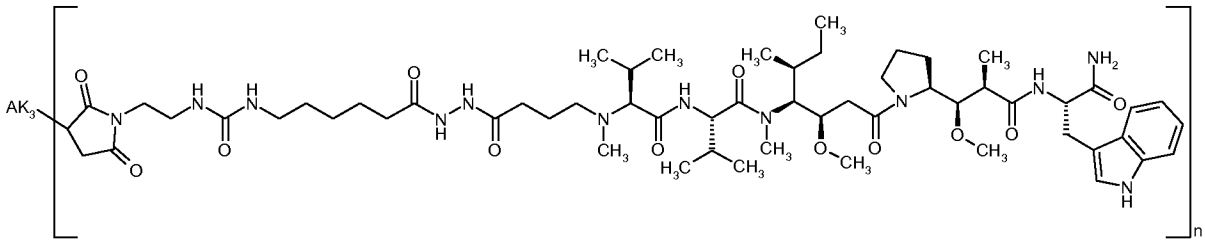


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 50 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 9.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 141**

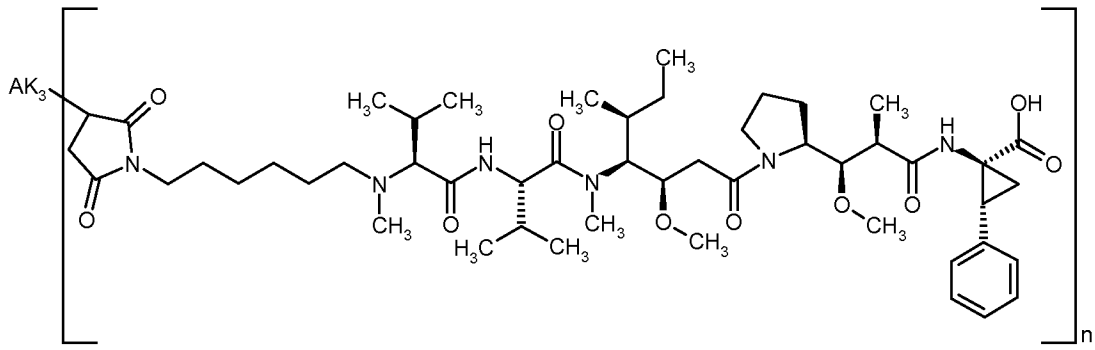


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.52 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

**Beispiel 142**

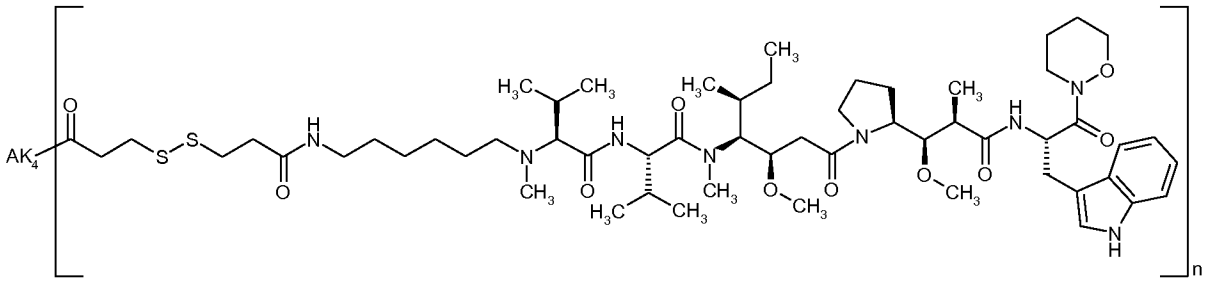


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.25 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 143**

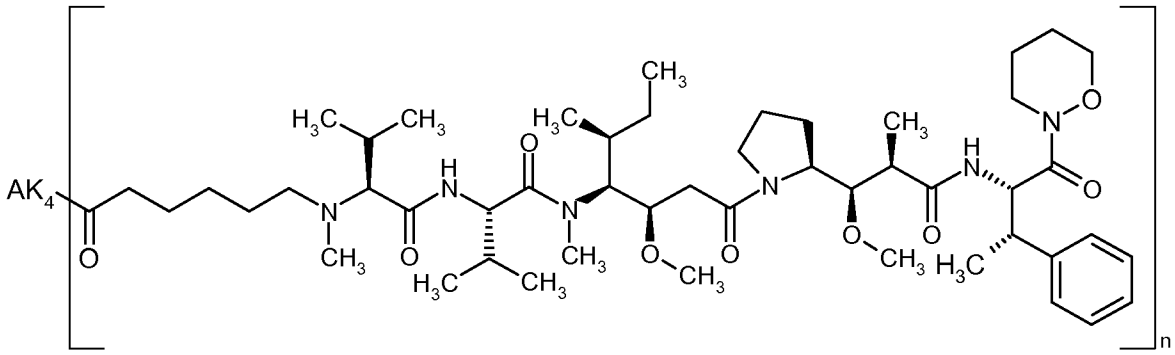


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

**Beispiel 144**

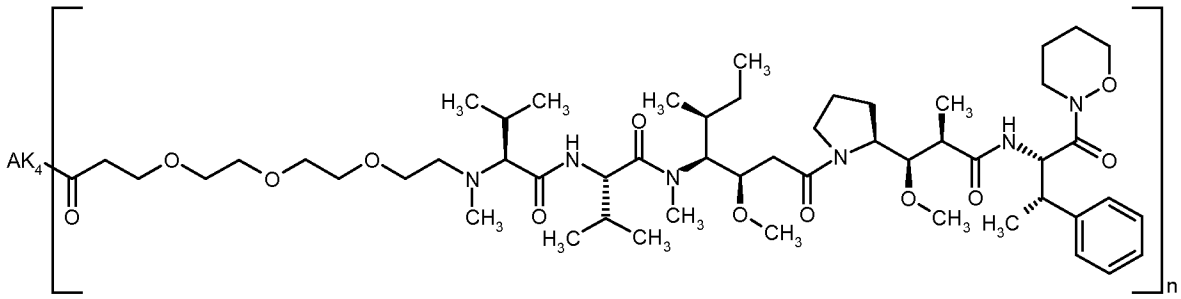


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.99 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.5

**Beispiel 145**

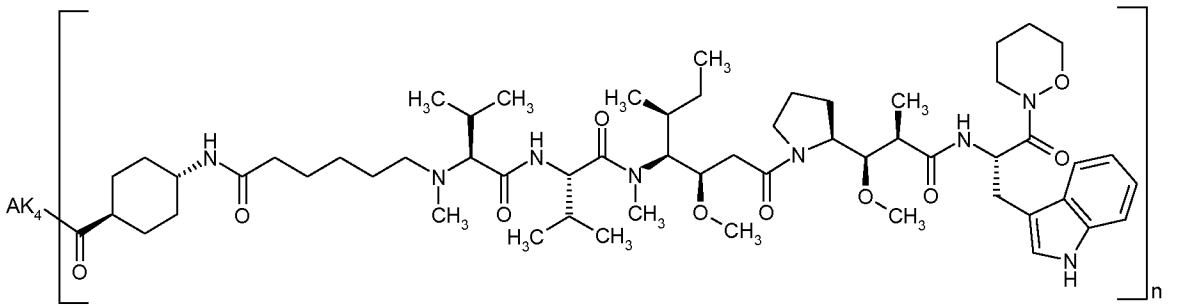


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.02 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 146**

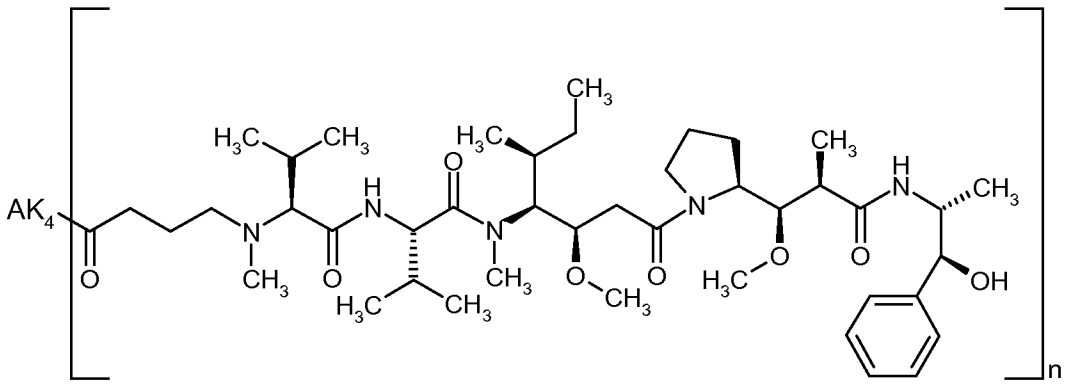


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.63 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

**Beispiel 147**

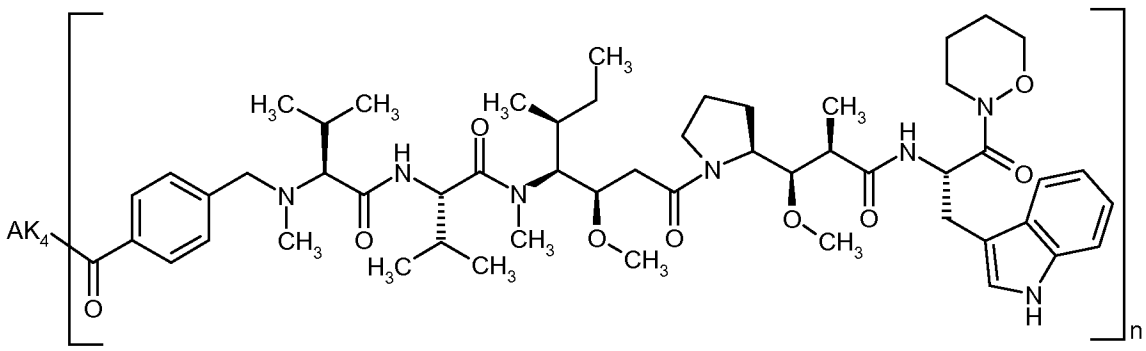


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

**Beispiel 148**

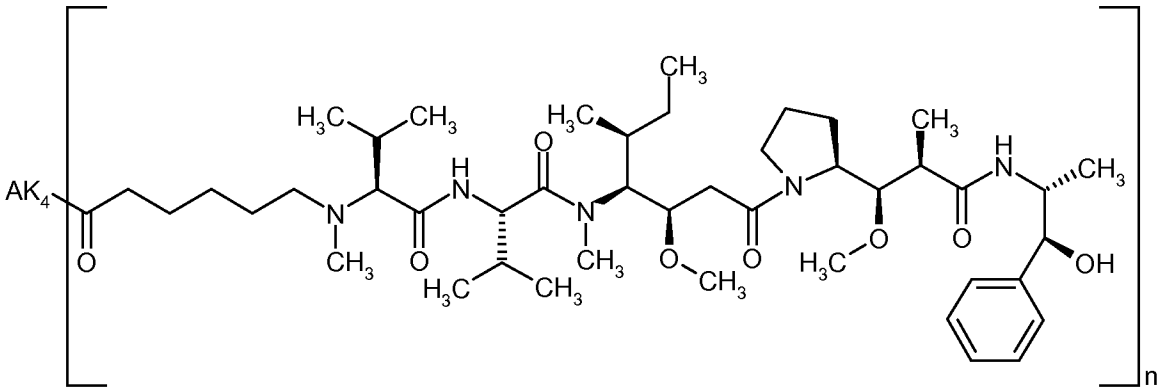


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.58 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.6

**Beispiel 149**

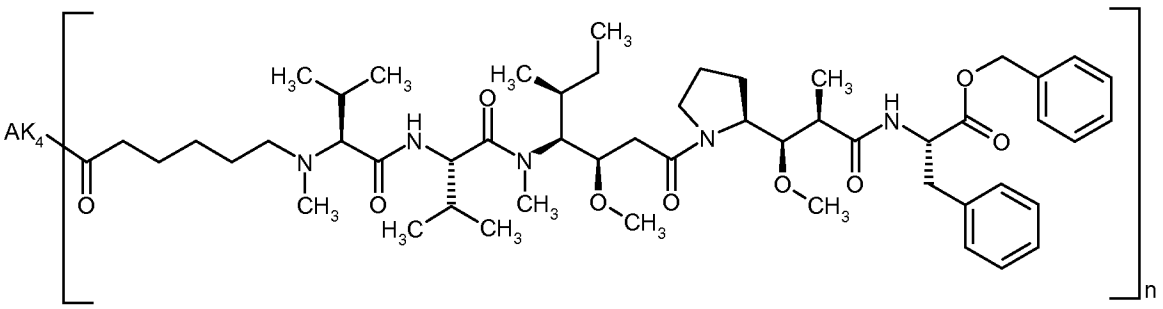


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.31 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.6

**Beispiel 150**

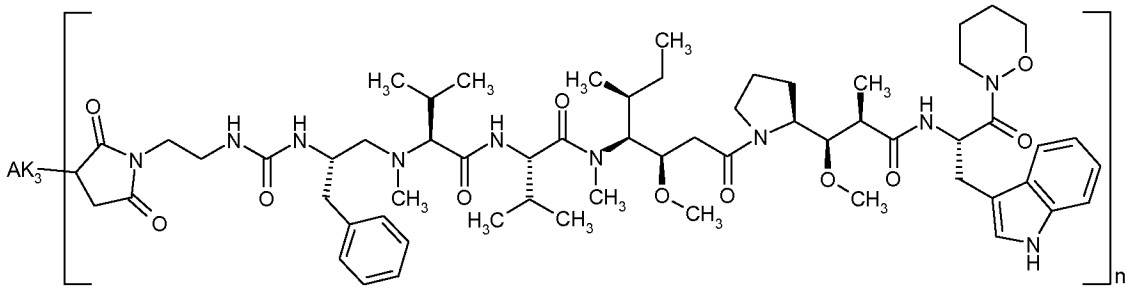


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.75 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

**Beispiel 151**

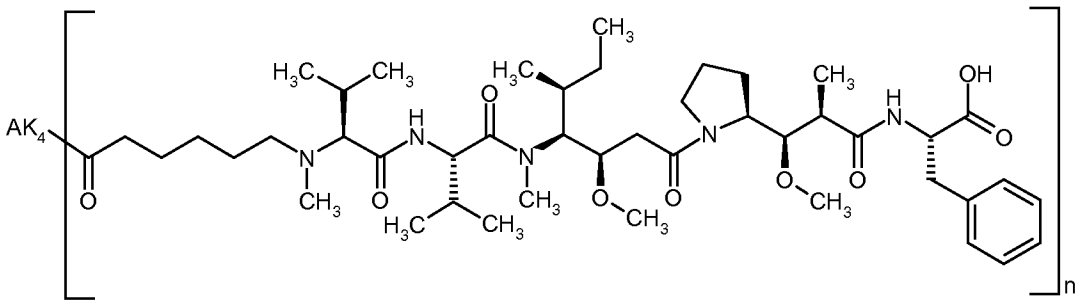


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

**Beispiel 152**

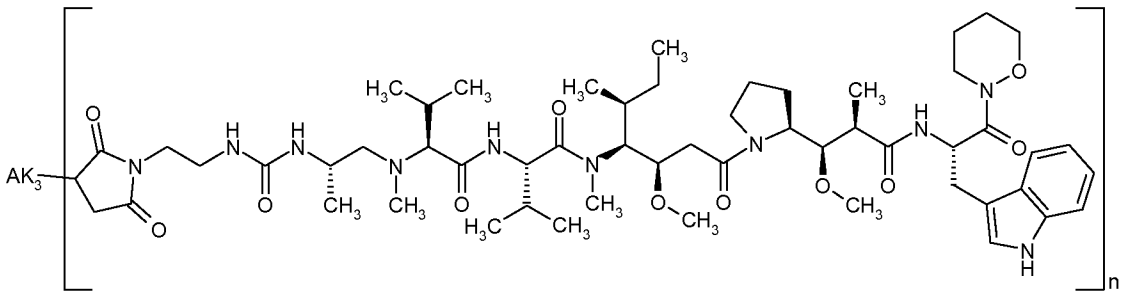


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.96 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.6

**Beispiel 153**

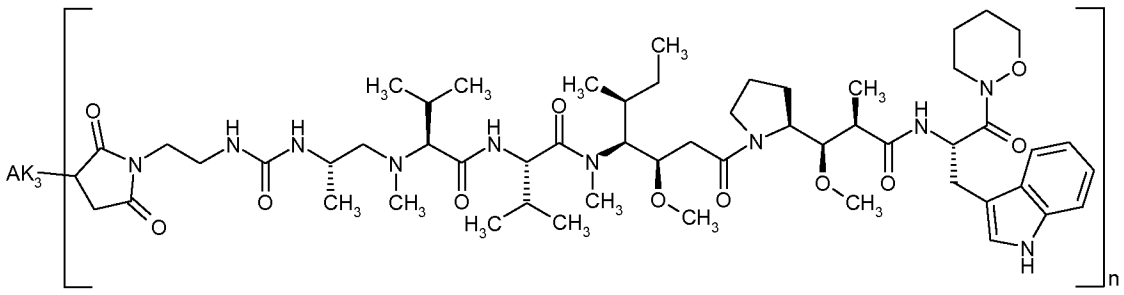


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.58 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.2

**Beispiel 154**

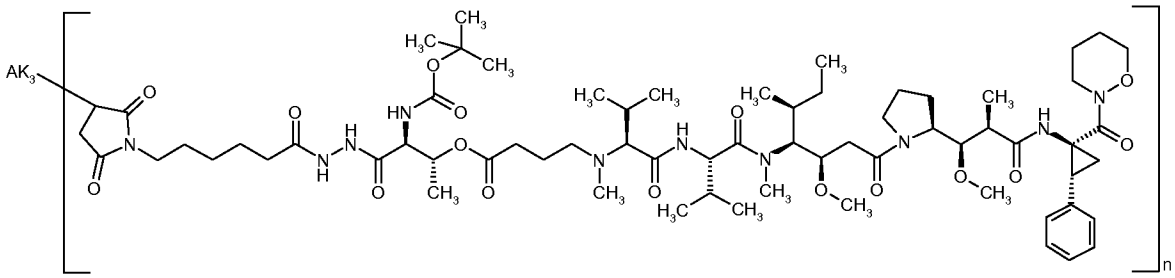


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.48 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 155**

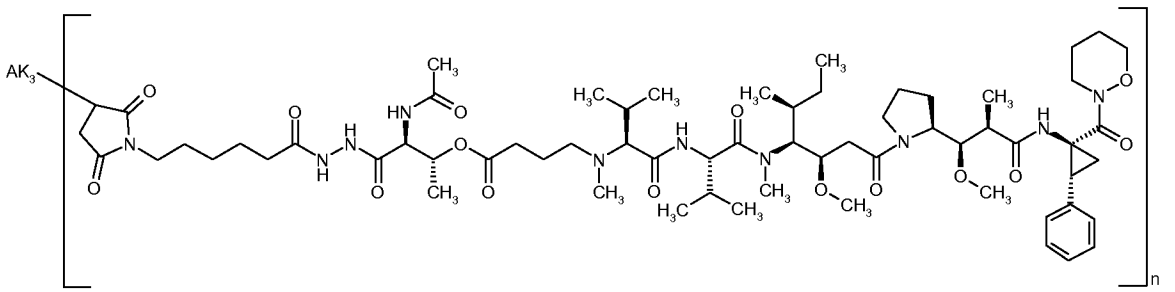


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.5 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 3.1

**Beispiel 156**

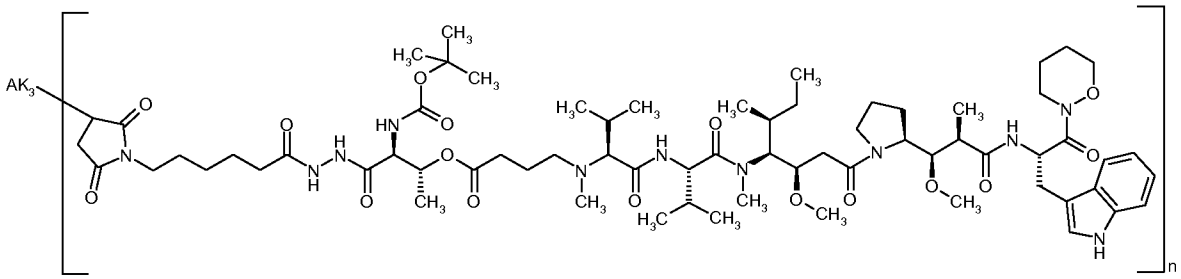


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: mg/ml

Drug/mAb-Ratio:

**Beispiel 157**

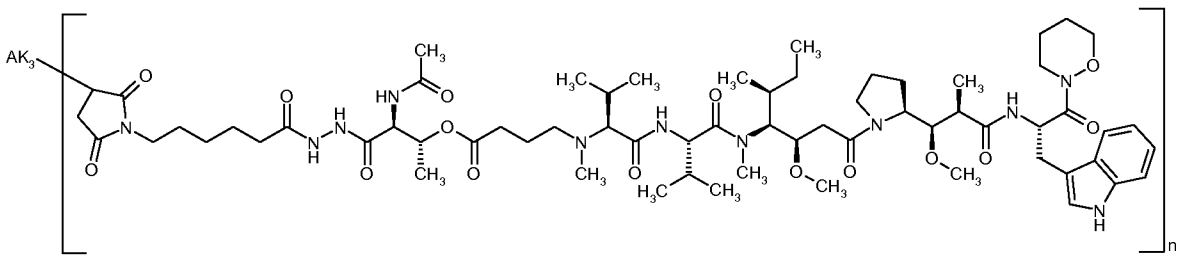


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.62 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.2

**Beispiel 158**

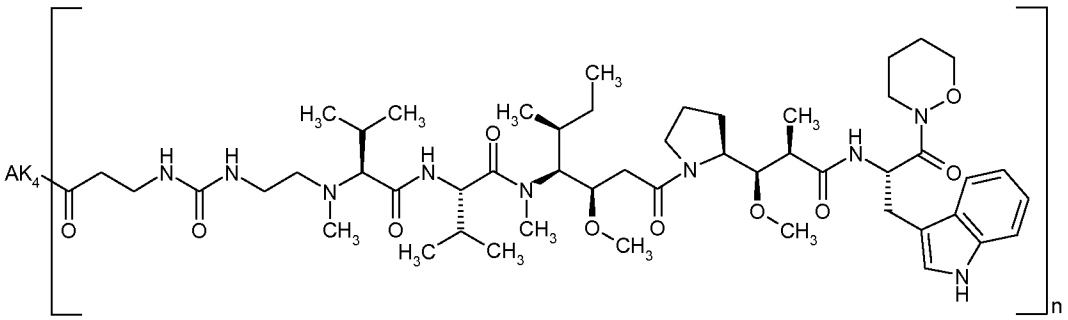


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.37 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.8

**Beispiel 159**



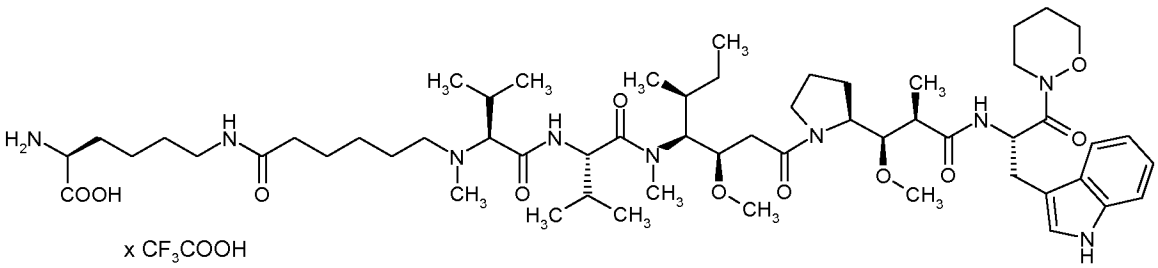
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.43 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 160**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



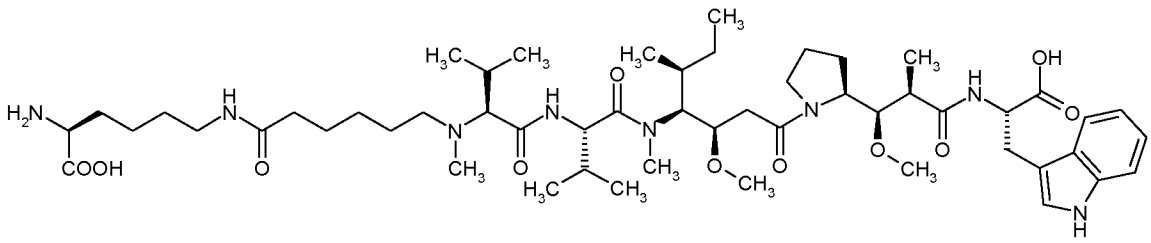
15.5 mg (15 µmol) von Intermediat 210 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 4.4 mg (18 µmol) $N^2$-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 7.7 µL (44 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 14 mg (81% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml Trifluoressigsäure entschützt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser 1:1 wurden 15 mg (97% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.79 min; MS (ESIpos): m/z = 1083 $(M+H)^+$.

**Beispiel 161**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



40 mg (40 µmol) von Intermediat 226 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 11.5 mg (40 µmol) $N^2$-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-lysin sowie 13 µL (80 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 32.5 mg (70% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten.

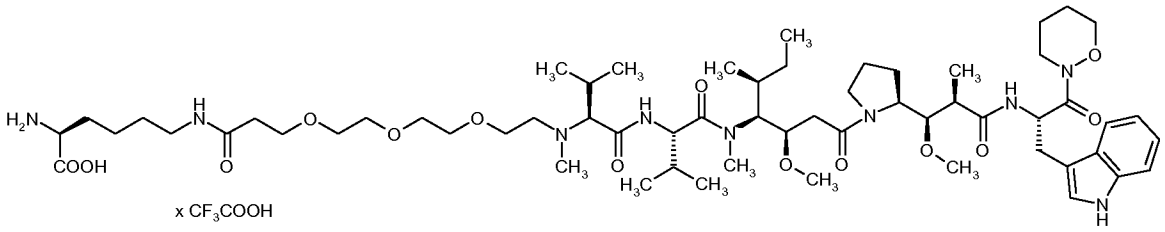
Diese 32.5 mg des Intermediats wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 30 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation des Rückstandes aus Dioxan/Wasser 1:1 wurden 26 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1014 $(M+H)^+$.

**Beispiel 162**

N-[(18S)-18-Amino-18-carboxy-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azaoctadec-1-yl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat

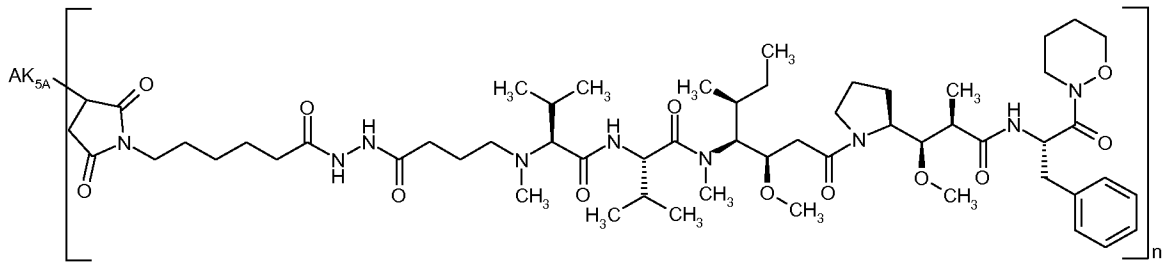


3.5 mg (3 µmol) von Intermediat 202 wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 0.8 mg (3 µmol) $N^2$-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 1.6 µL (10 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurde 1 mg (25% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 500µl Dichlormethan aufgenommen und mit 500µl Trifluoressigsäure entschützt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser 1:1 wurde 1 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1173 $(M+H)^+$.

**Beispiel 163**

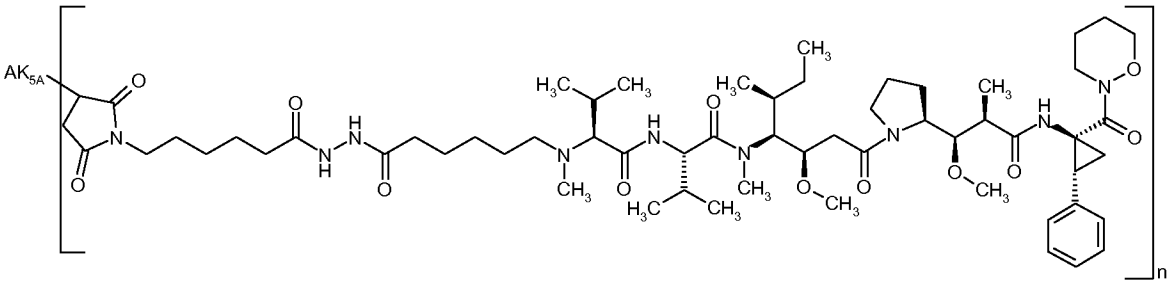


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg anti-C4.4a M31-B01 in DPBS pH 7.4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.5

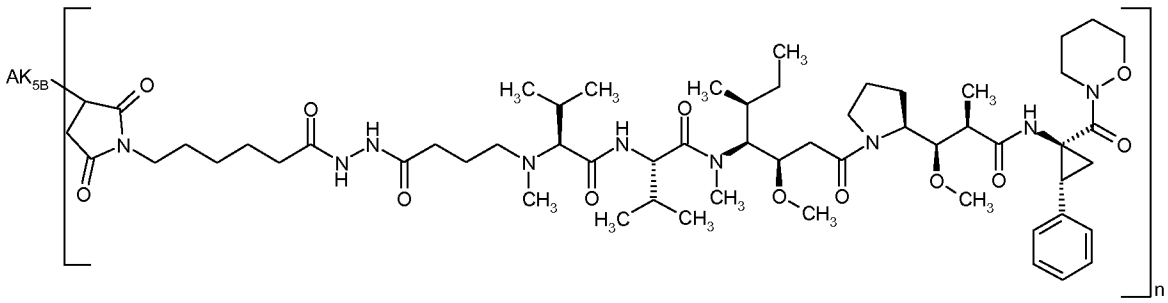
**Beispiel 164**



Protein Konzentration: 0.87 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.8

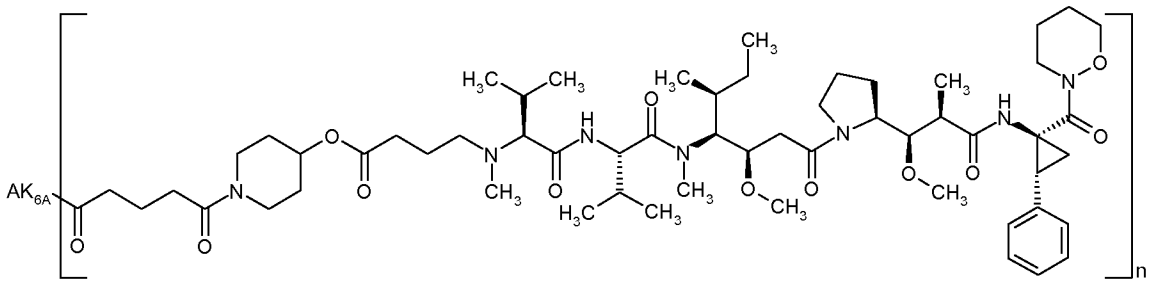
**Beispiel 165**



Protein Konzentration: 1.16 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

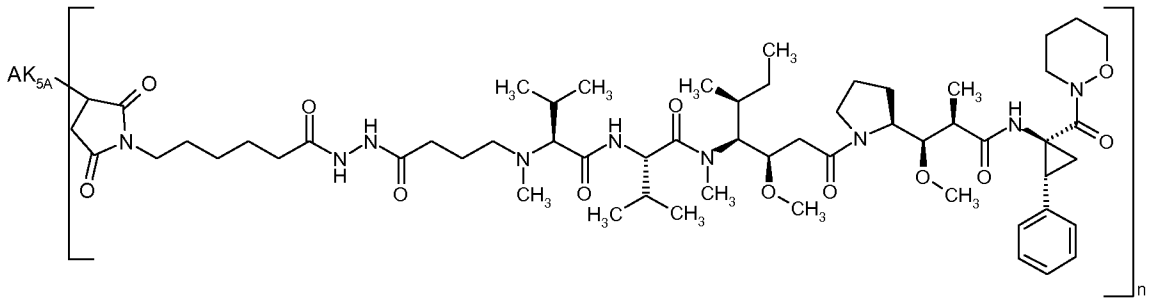
**Beispiel 166**



Protein Konzentration: 1.24 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

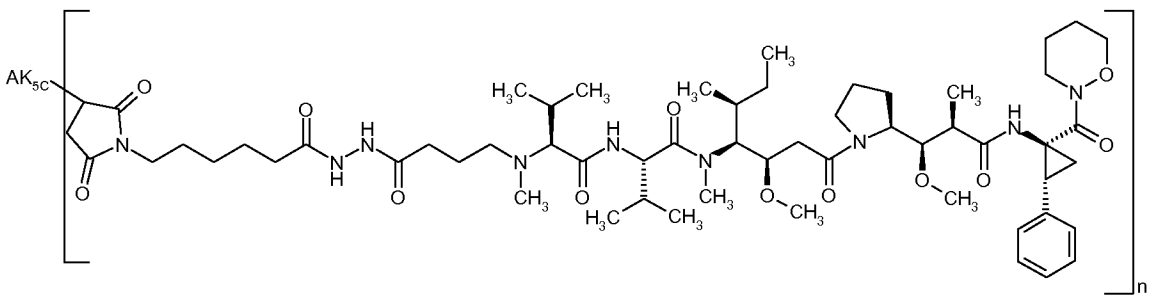
**Beispiel 167**



Protein Konzentration: 0.88 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.9

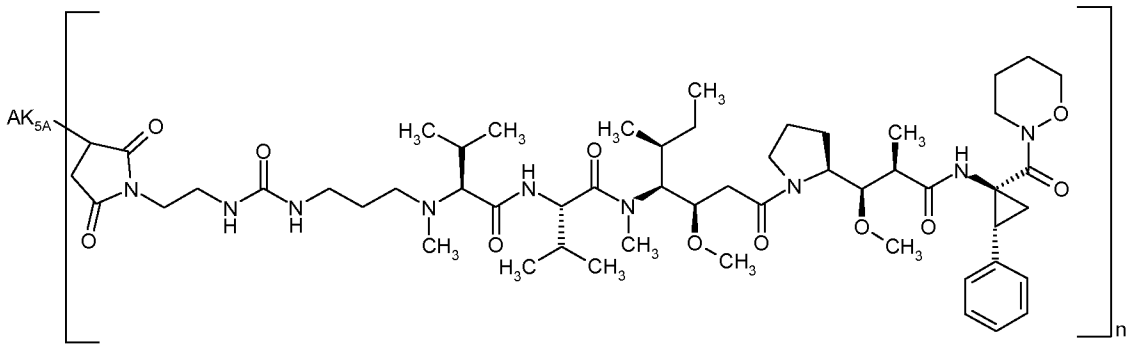
**Beispiel 168**



Protein Konzentration: 1.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

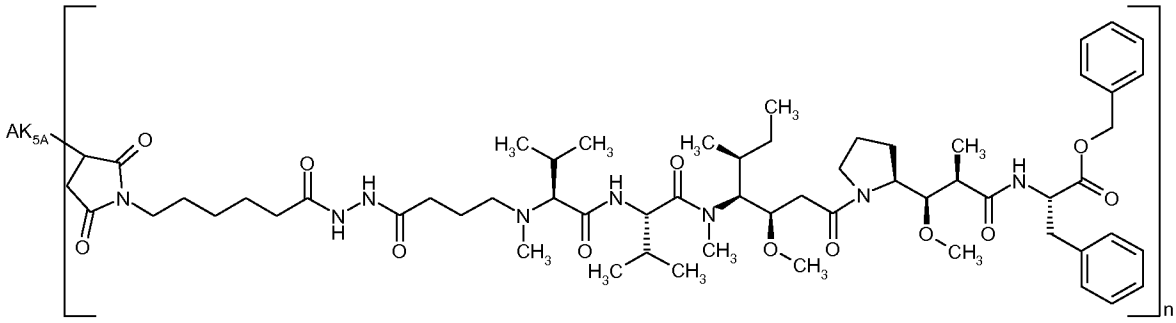
**Beispiel 169**



Protein Konzentration: 0.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

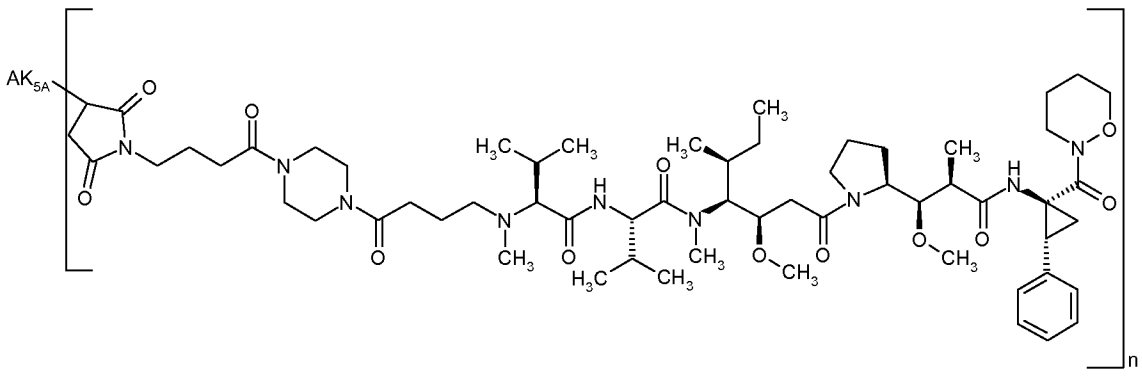
**Beispiel 170**



Protein Konzentration: 0.52 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

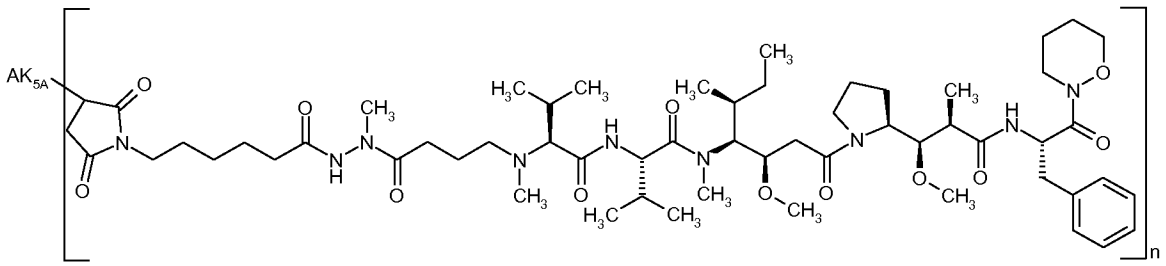
**Beispiel 171**



Protein Konzentration: 0.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.6

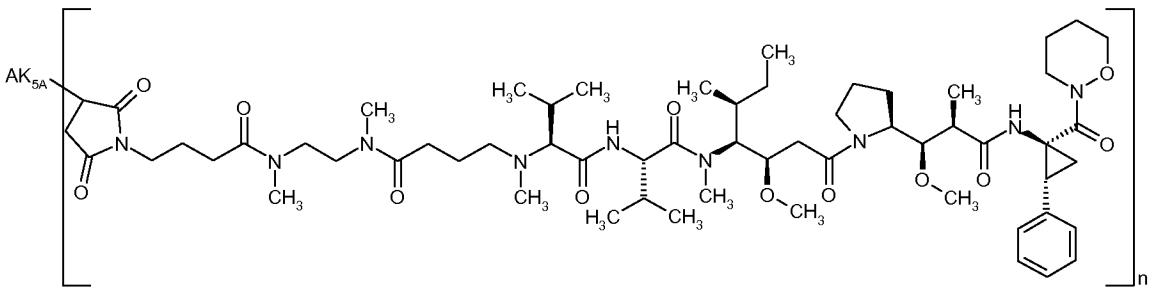
**Beispiel 172**



Protein Konzentration: 0.77 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.9

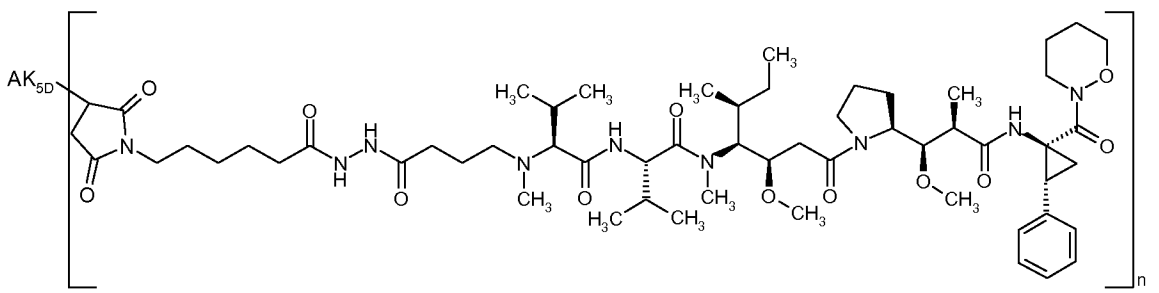
**Beispiel 173**



Protein Konzentration: 0.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

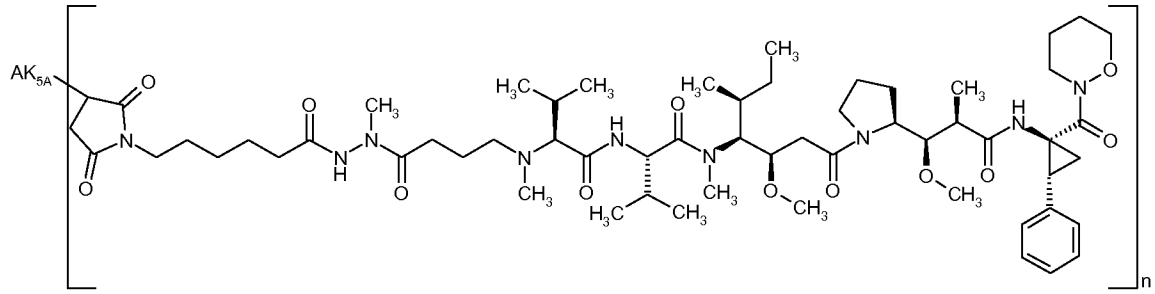
**Beispiel 174**



Protein Konzentration: 1.46 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

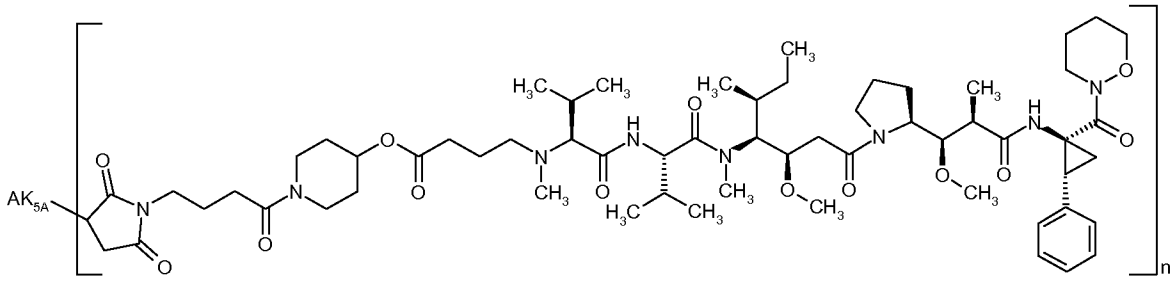
**Beispiel 175**



Protein Konzentration: 0.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

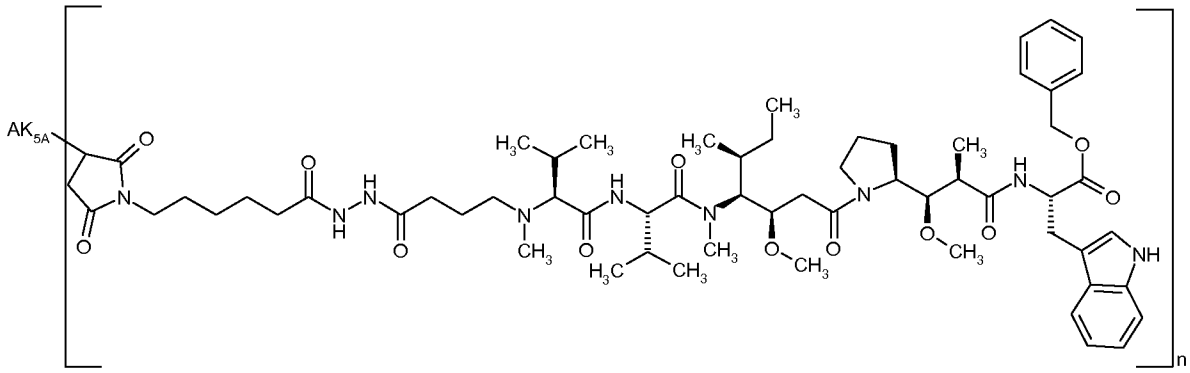
**Beispiel 176**



Protein Konzentration: 0.98 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.6

**Beispiel 177**

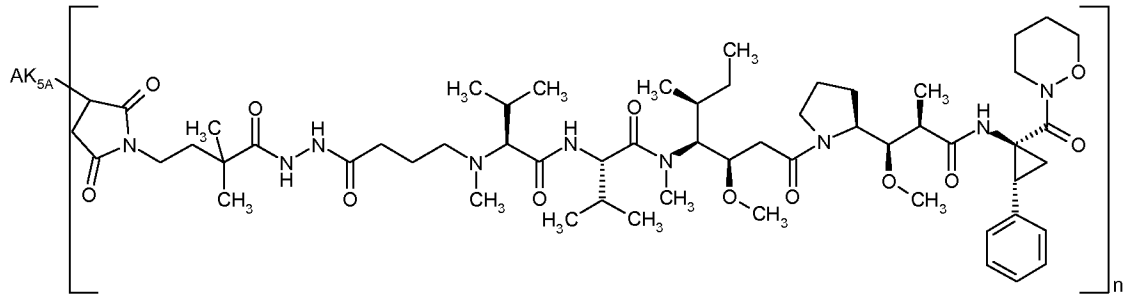


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg anti-C4.4a M31-B01 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 9.42 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.1

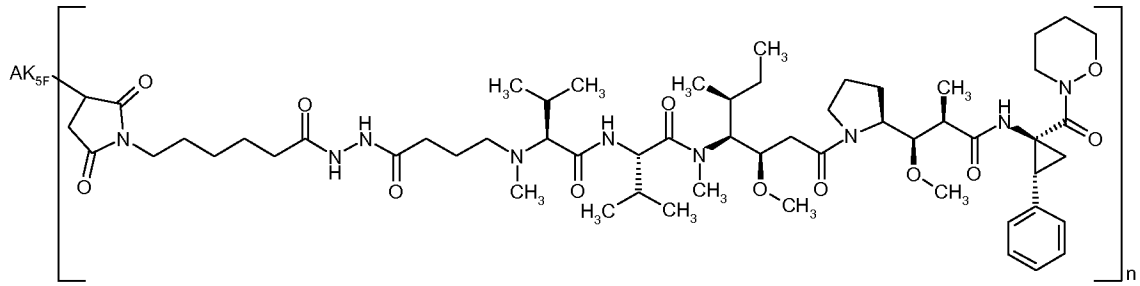
**Beispiel 178**



Protein Konzentration: 0.65 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

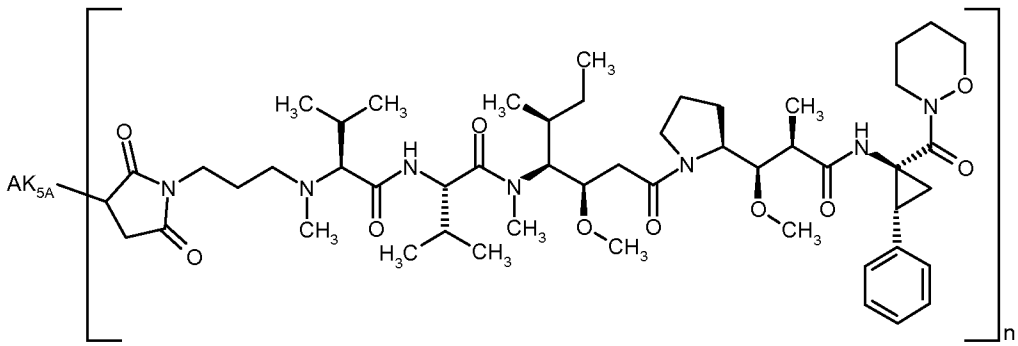
**Beispiel 179**



Protein Konzentration: 1.07 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

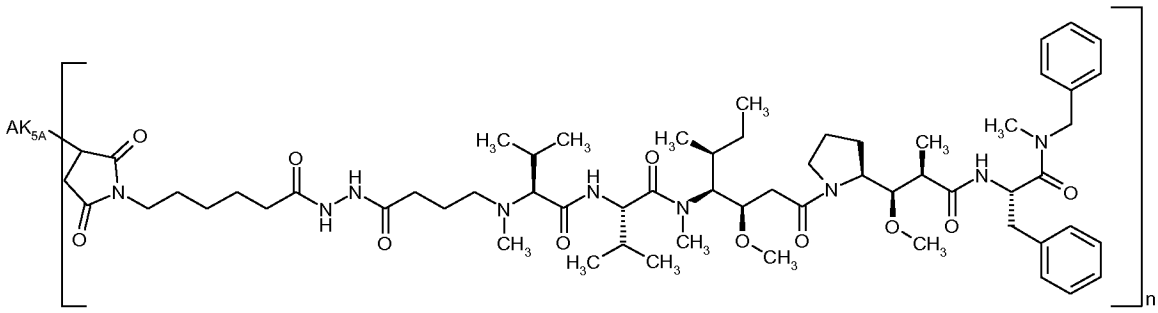
**Beispiel 180**



Protein Konzentration: 0.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.4

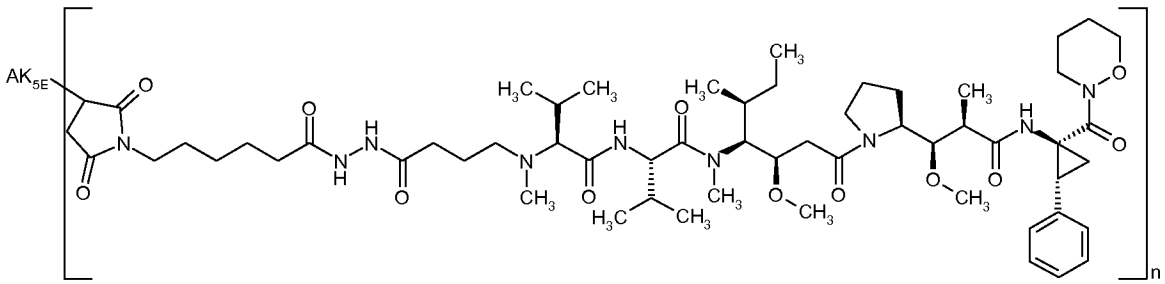
**Beispiel 181**



Protein Konzentration: 0.43 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.8

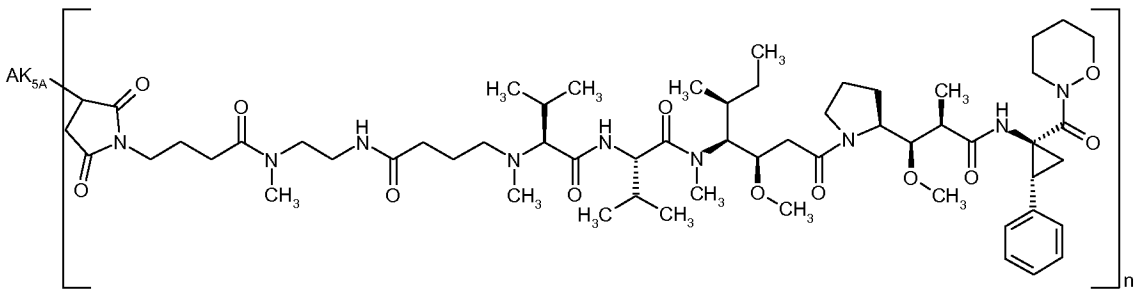
**Beispiel 182**



Protein Konzentration: 1.01 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.6

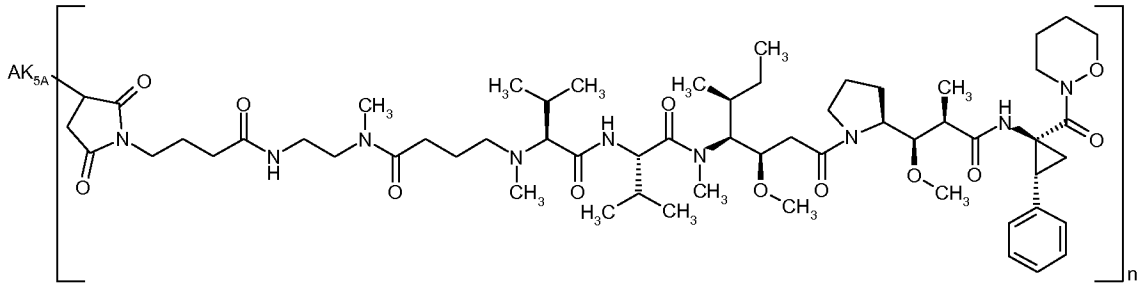
**Beispiel 183**



Protein Konzentration: 0.53 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.6

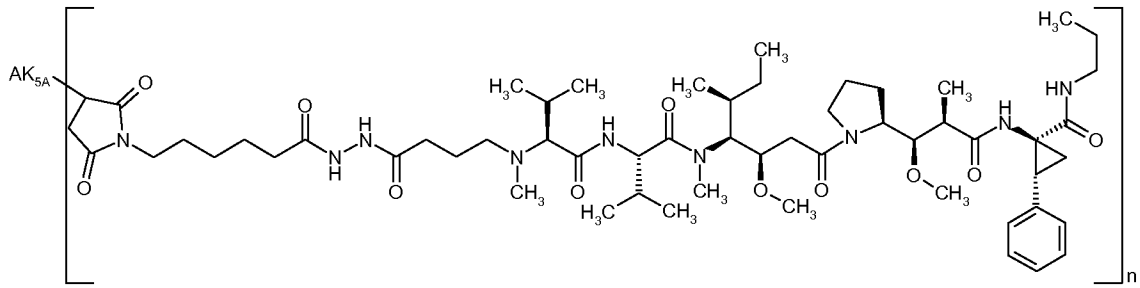
**Beispiel 184**



Protein Konzentration: 0.55 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.3

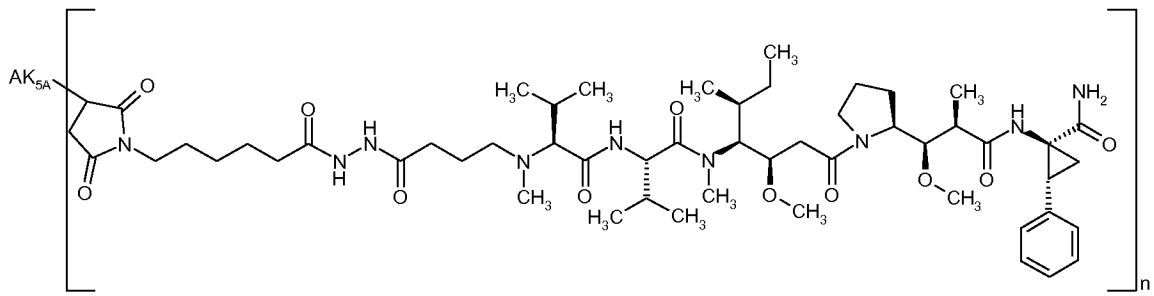
**Beispiel 185**



Protein Konzentration: 0.65 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.1

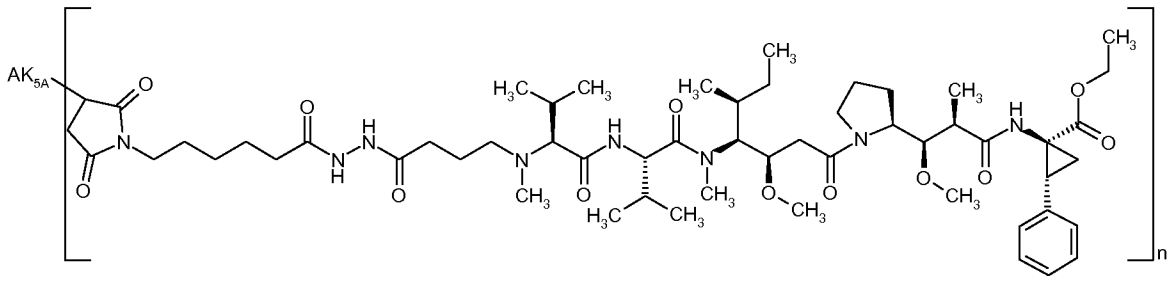
**Beispiel 186**



Protein Konzentration: 1.04

Drug/mAb Ratio: 3.5

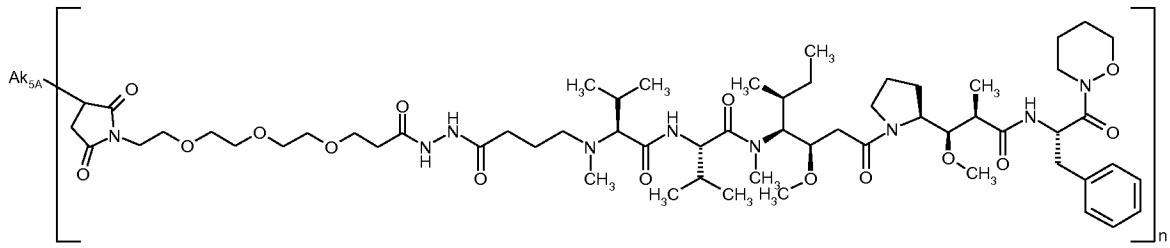
**Beispiel 187**



Protein Konzentration: 0.62 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

**Beispiel 188**

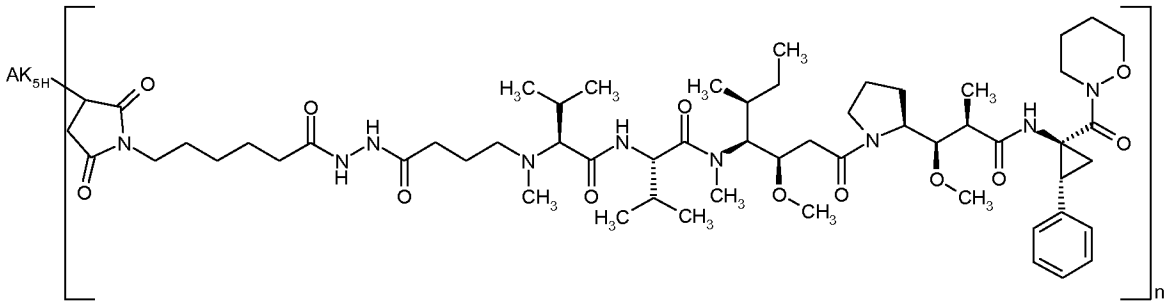


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 90 mg anti-C4.4a M31-B01 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Proteinkonzentration: 11.2 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.3

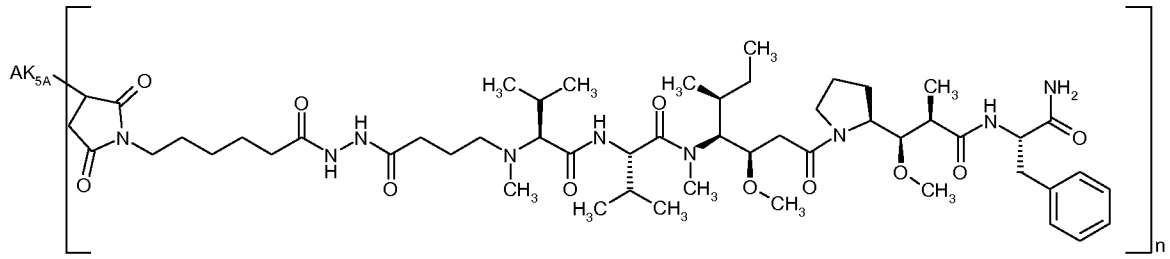
**Beispiel 189**



Proteinkonzentration: 1.11 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.4

**Beispiel 190**

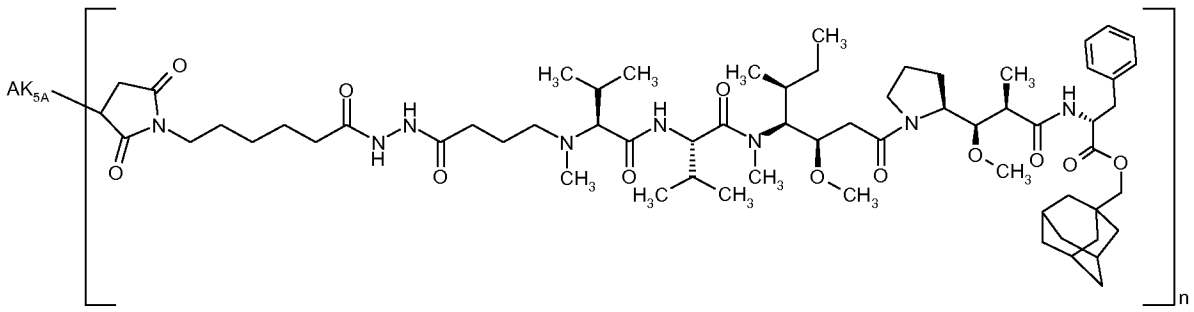


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg anti-C4.4a M31-B01 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.7 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.2

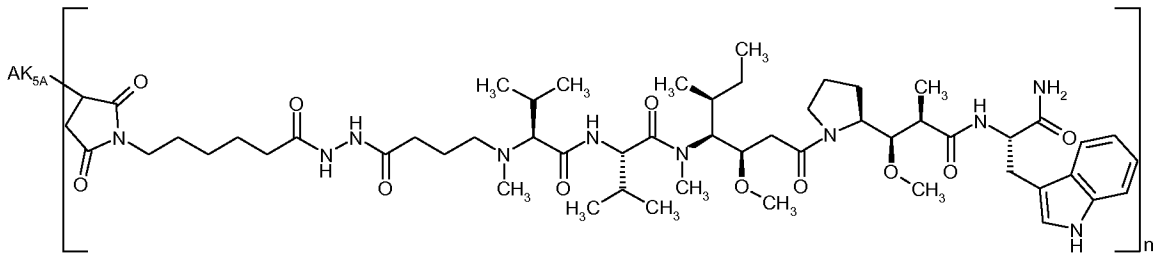
**Beispiel 191**



Protein Konzentration: 0.87 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

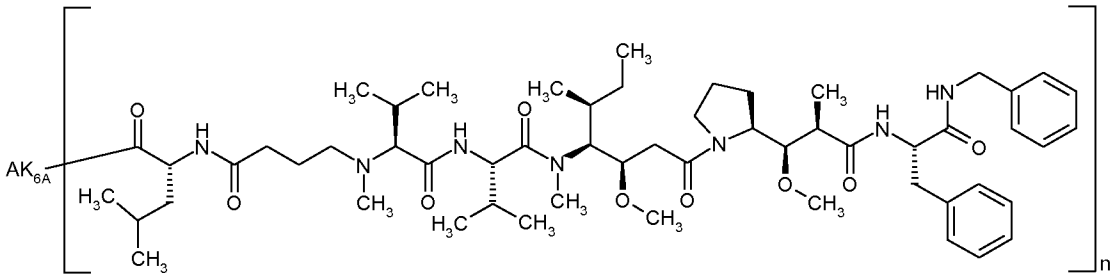
**Beispiel 192**



Protein Konzentration: 1.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.1

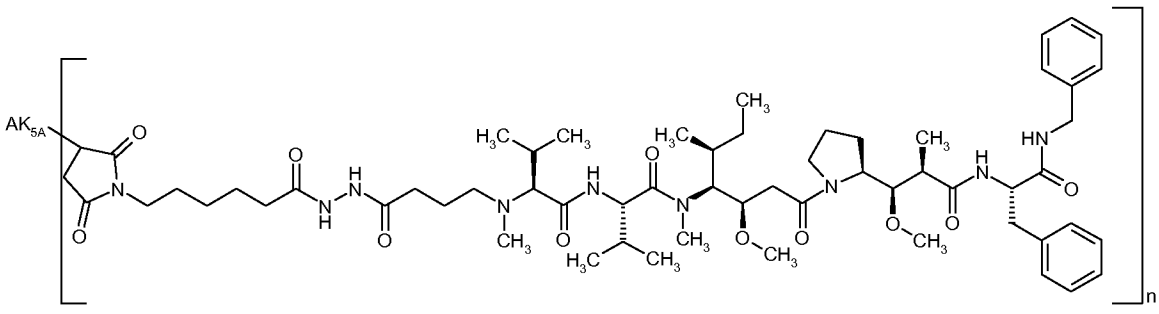
**Beispiel 193**



Protein Konzentration: 1.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.3

**Beispiel 194**

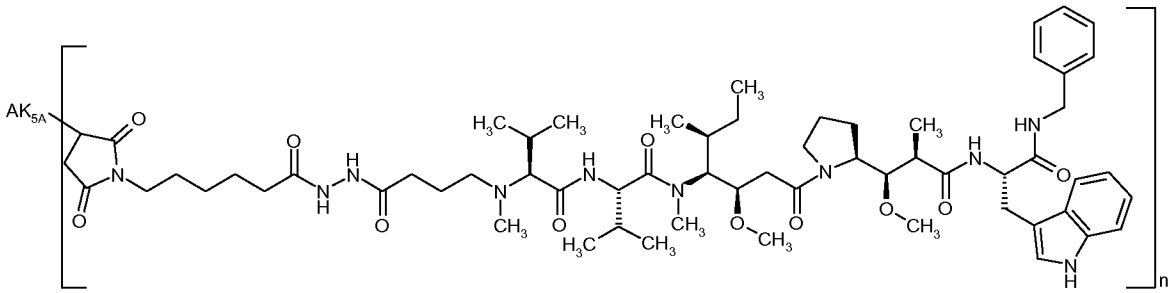


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg anti-C4.4a M31-B01 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.0 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

**Beispiel 195**

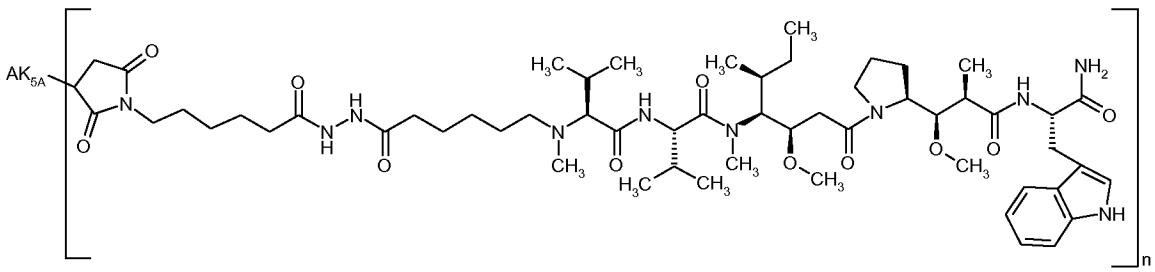


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 90 mg anti-C4.4a M31-B01 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.3

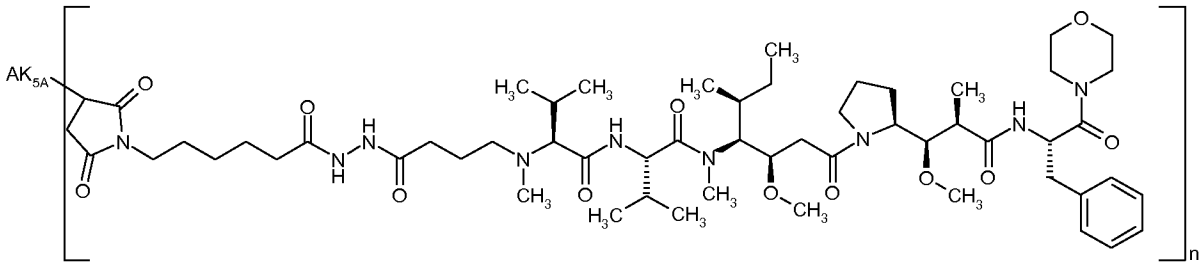
**Beispiel 196**



Protein Konzentration: 1.37 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.6

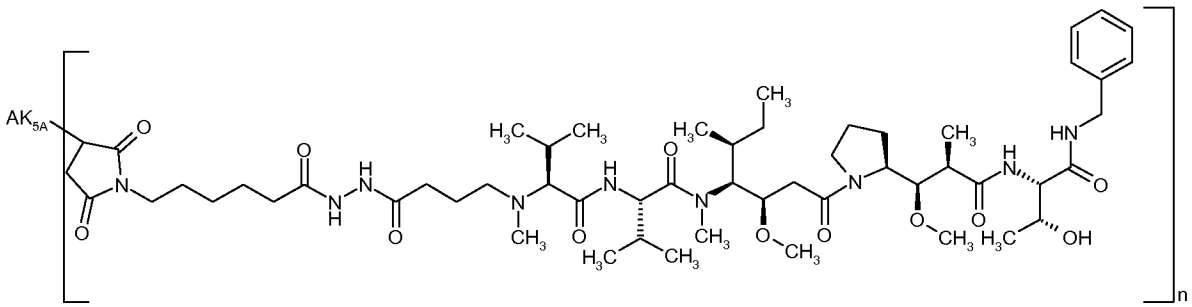
**Beispiel 197**



Protein Konzentration: 1.14 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.0

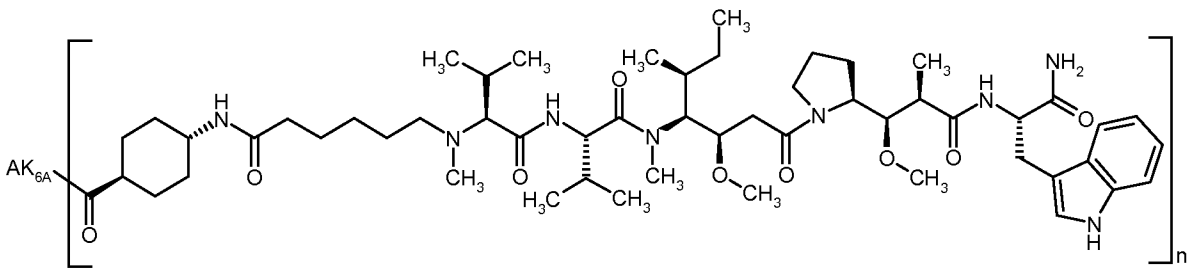
**Beispiel 198**



Protein Konzentration: 1.07 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

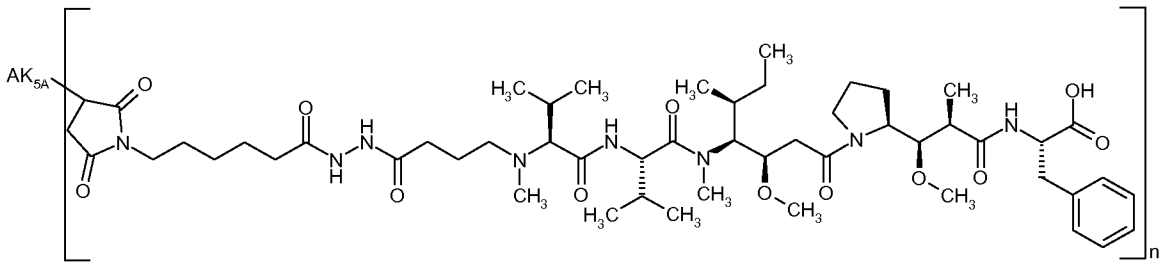
**Beispiel 199**



Protein Konzentration: 1.14 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

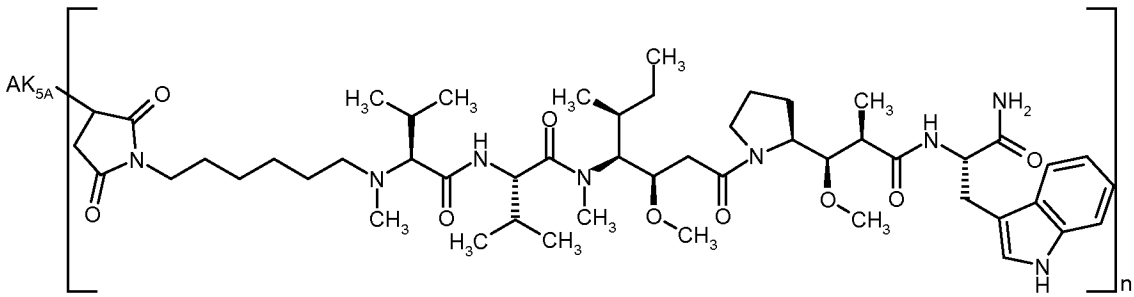
**Beispiel 200**



Protein Konzentration: 1.22 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

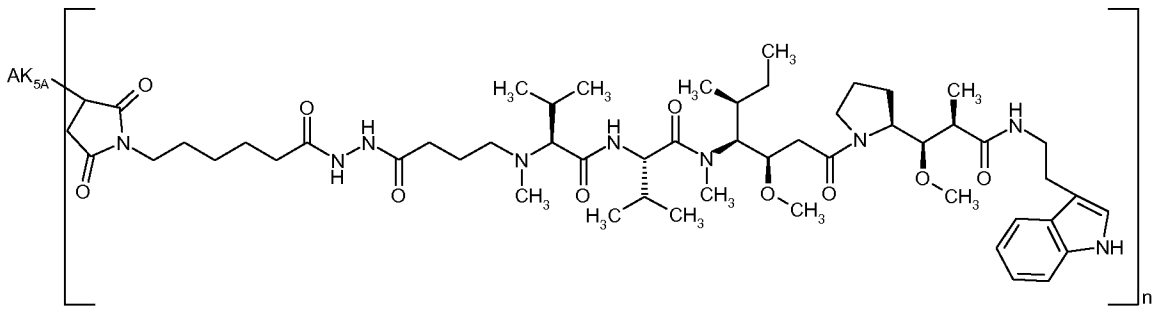
**Beispiel 201**



Protein Konzentration: 1.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

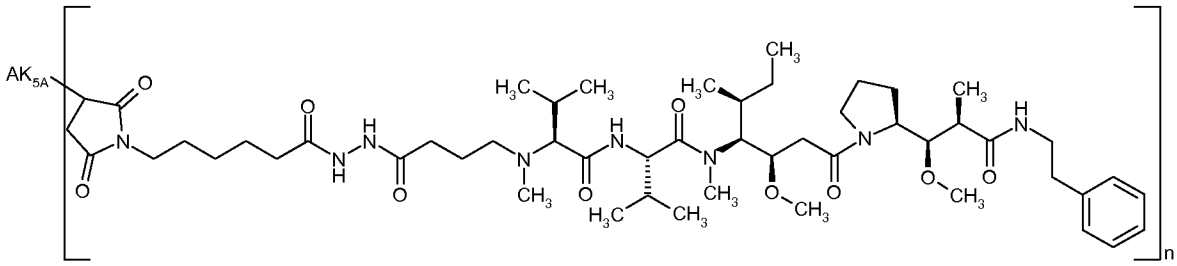
**Beispiel 202**



Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

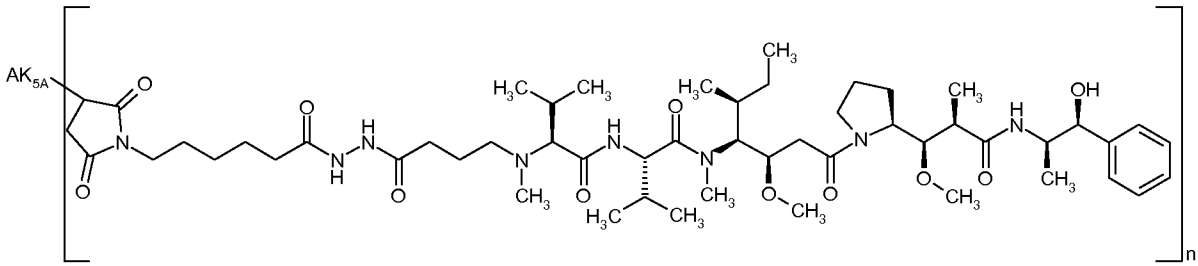
**Beispiel 203**



Protein Konzentration: 1.64 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

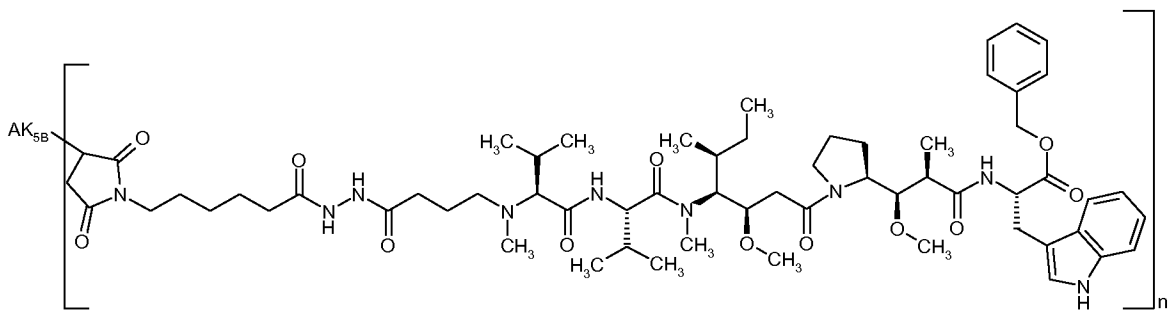
**Beispiel 204**



Protein Konzentration: 1.07 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

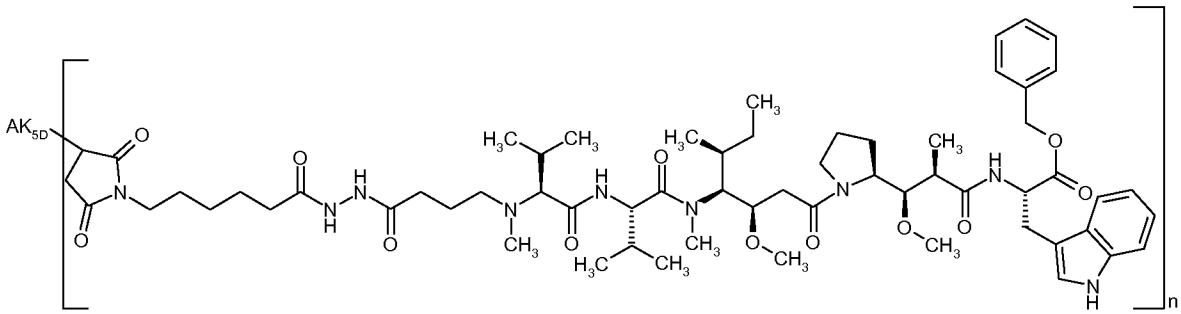
**Beispiel 205**



Protein Konzentration: 1.14 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.3

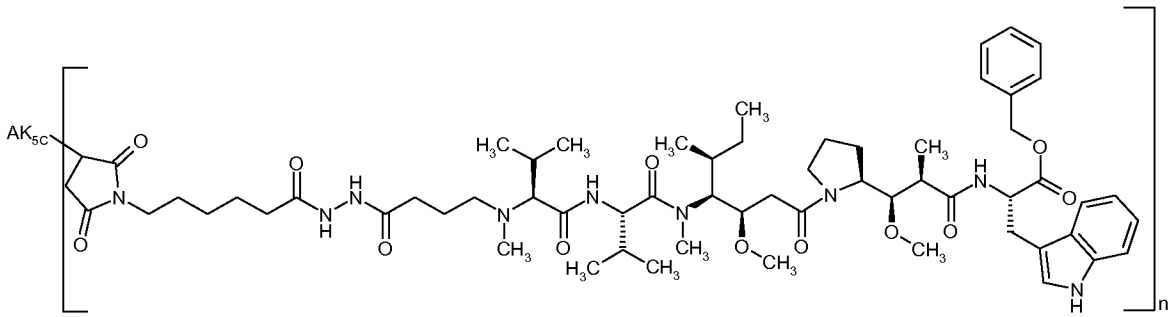
**Beispiel 206**



Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

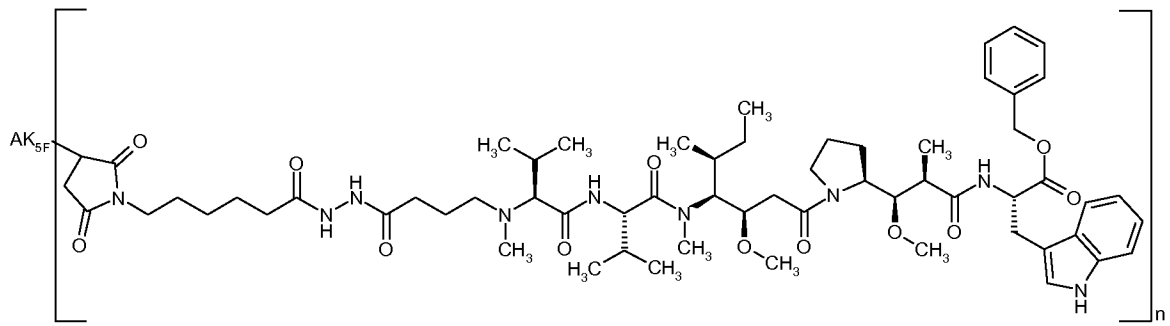
**Beispiel 207**



Protein Konzentration: 1.22 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

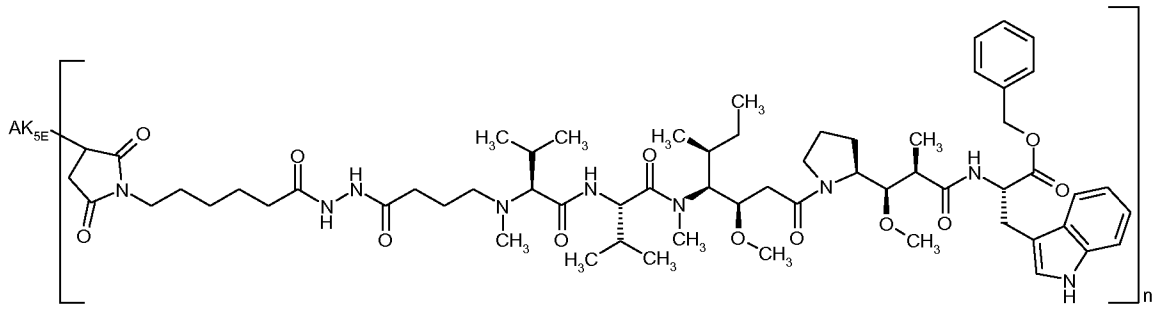
**Beispiel 208**



Protein Konzentration: 1.22 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

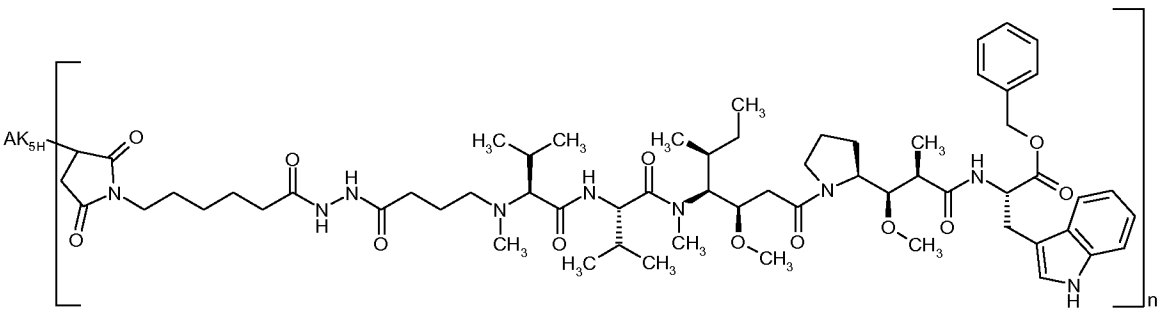
**Beispiel 209**



Protein Konzentration: 1.32 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

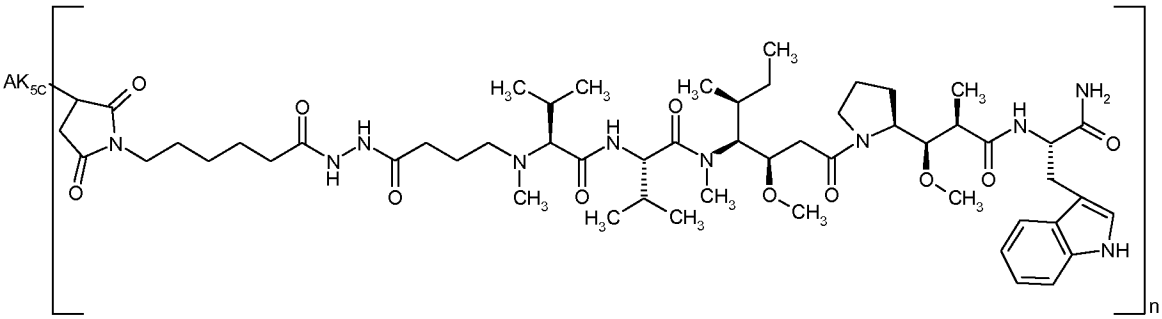
**Beispiel 210**



Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.3

**Beispiel 211**

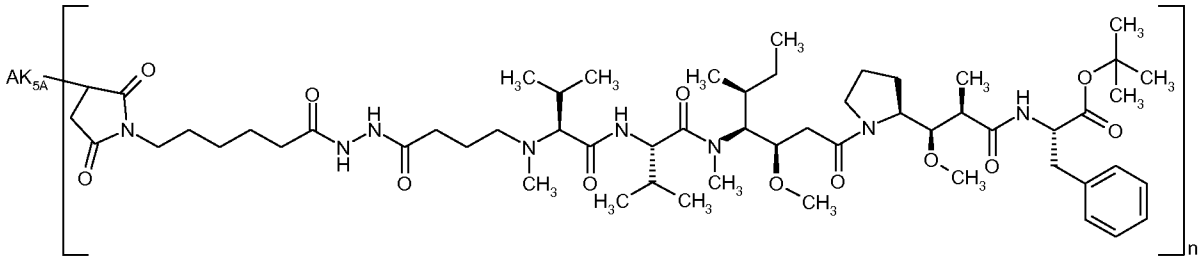


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 250 mg anti-C4.4a B01-10 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.8 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.2

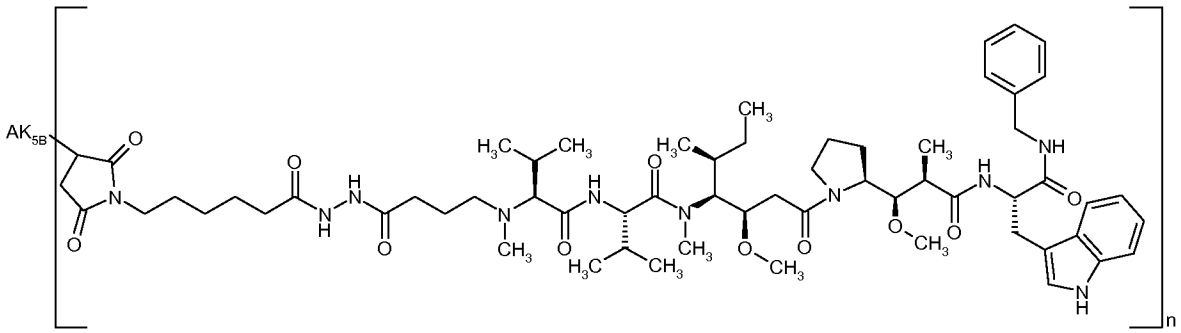
**Beispiel 212**



Protein Konzentration: 0.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2

**Beispiel 213**

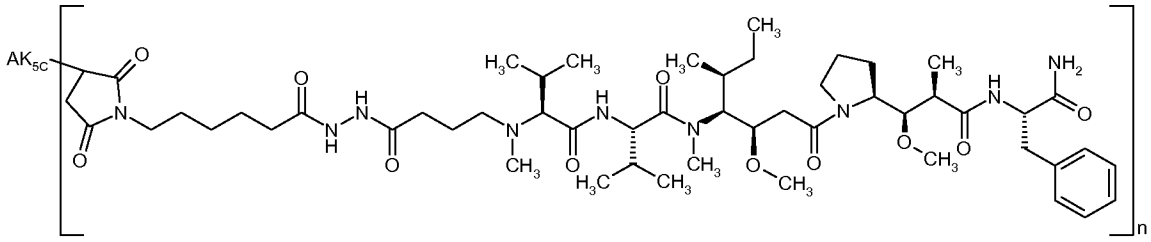


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 250 mg anti-C4.4a B01-3 in DPBS PH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 8.0 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.5

**Beispiel 214**

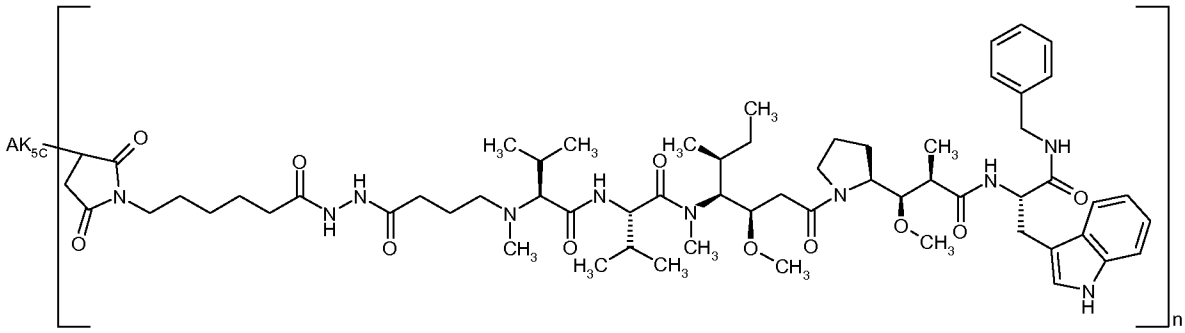


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 250 mg anti-C4.4a B01-10 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.2

**Beispiel 215**

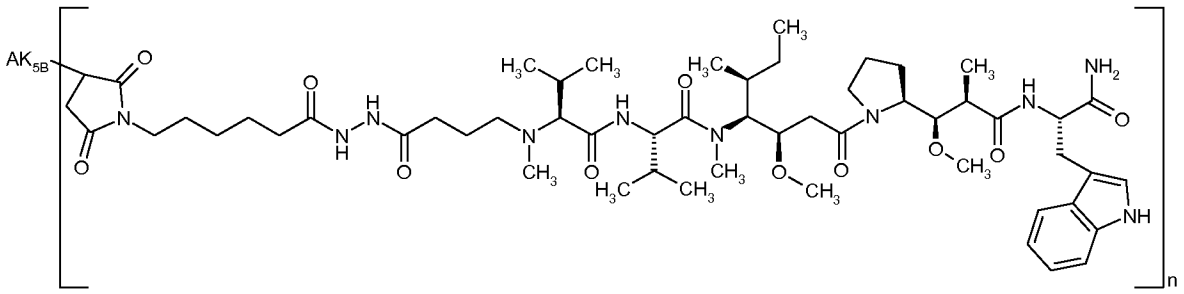


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 250 mg anti-C4.4a B01-10 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.4

**Beispiel 216**

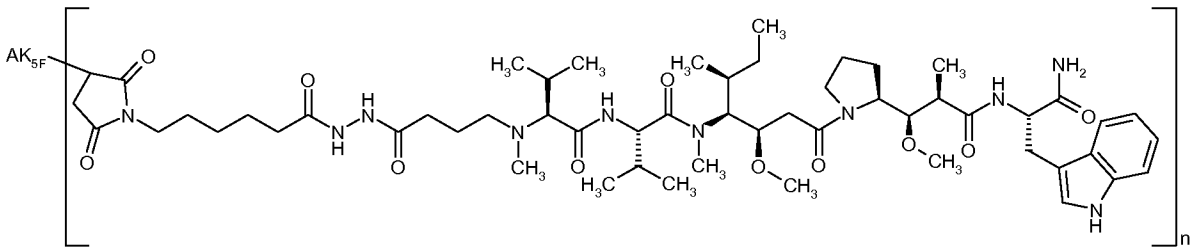


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 50 mg anti-C4.4a B01-3 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.2

**Beispiel 217**

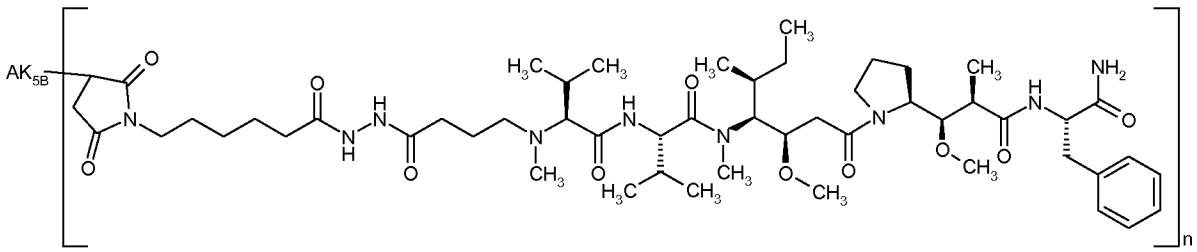


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 250 mg anti-C4.4a D02-6 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 13 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.2

**Beispiel 218**

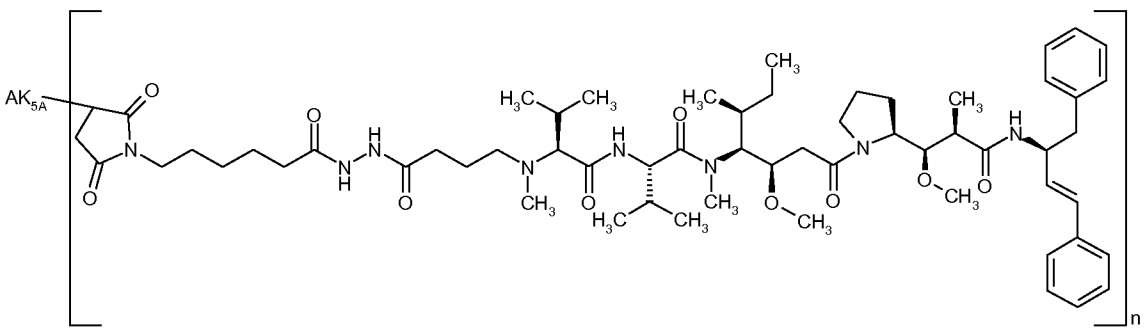


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 250 mg anti-C4.4a B01-3 in DPBS pH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.9

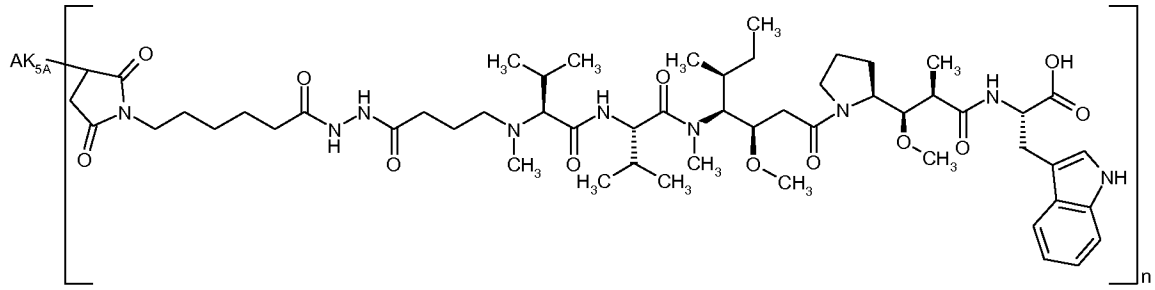
**Beispiel 219**



Protein Konzentration: 0.88 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

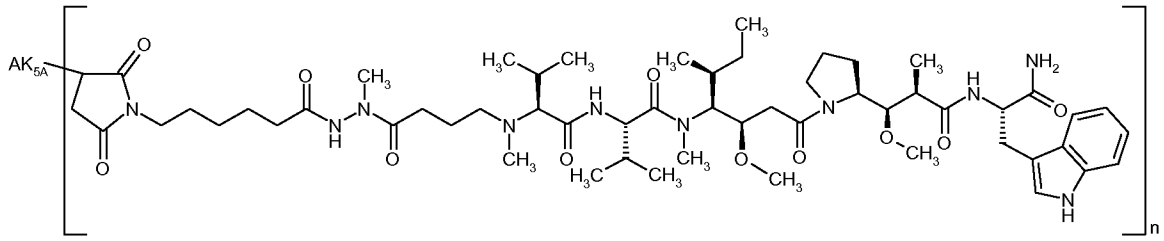
**Beispiel 220**



Protein Konzentration: 1.18 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

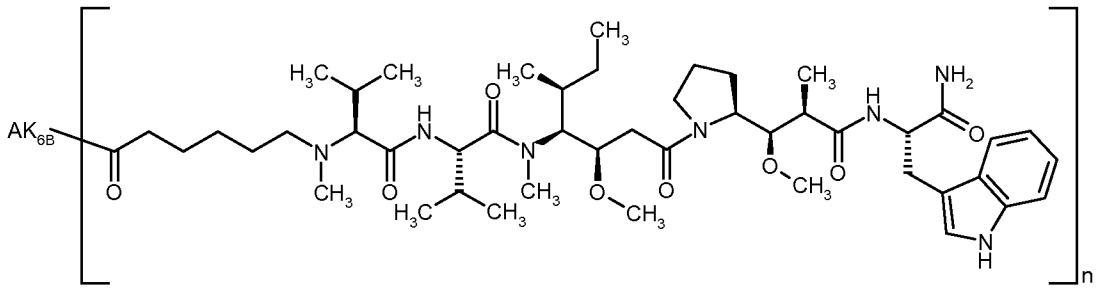
**Beispiel 221**



Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

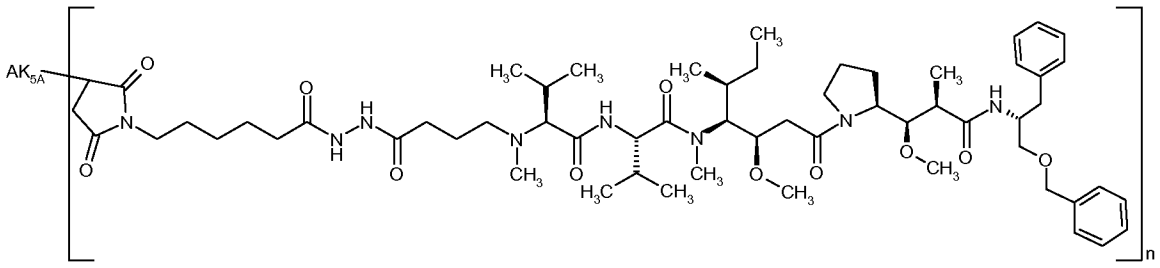
**Beispiel 222**



Protein Konzentration: 1.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

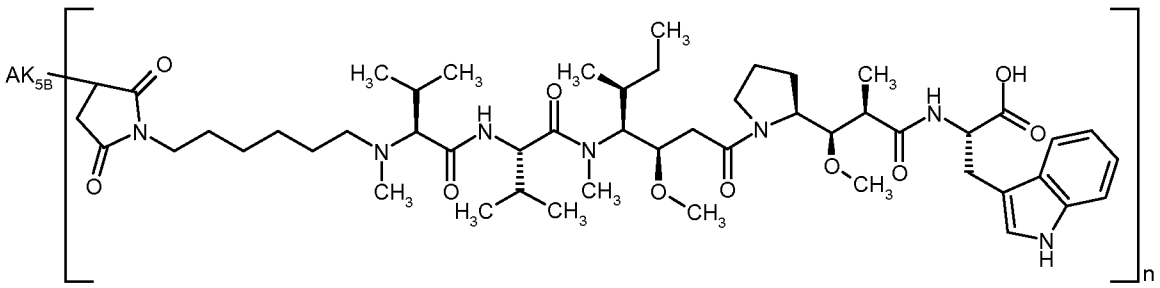
**Beispiel 223**



Protein Konzentration: 1.11 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

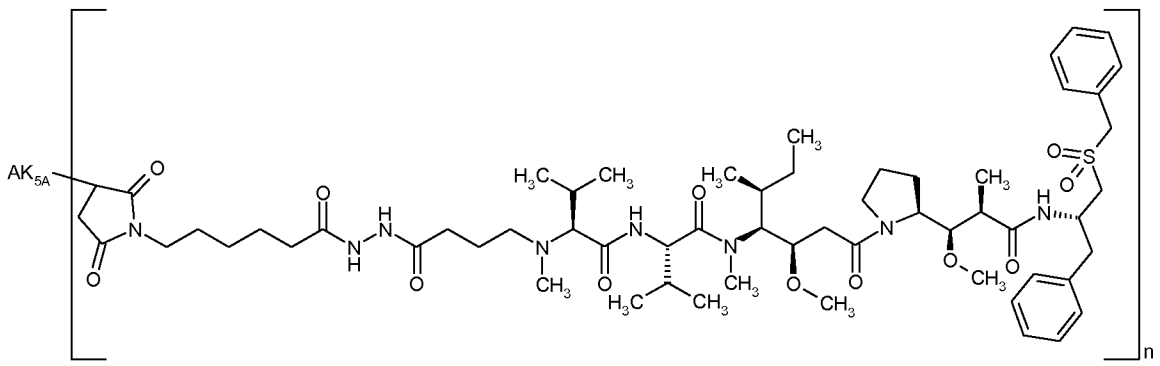
**Beispiel 224**



Protein Konzentration: 1.25 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

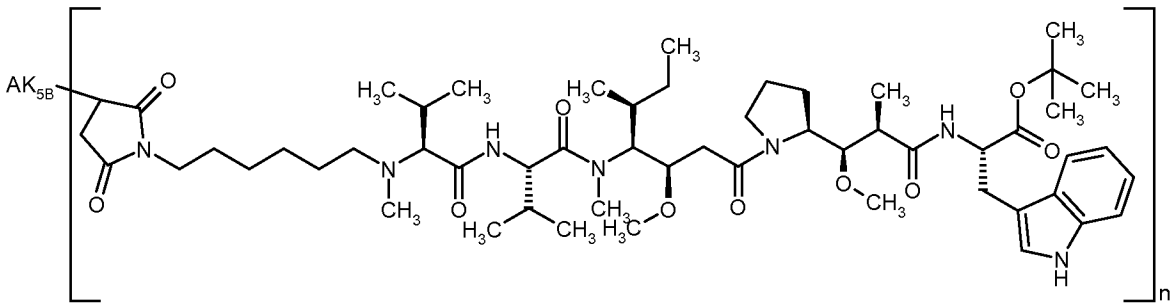
**Beispiel 225**



Protein Konzentration: 0.88 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.0

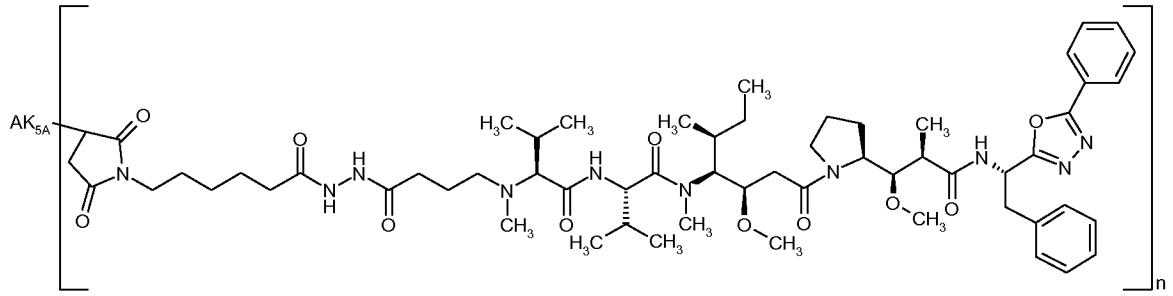
**Beispiel 226**



Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

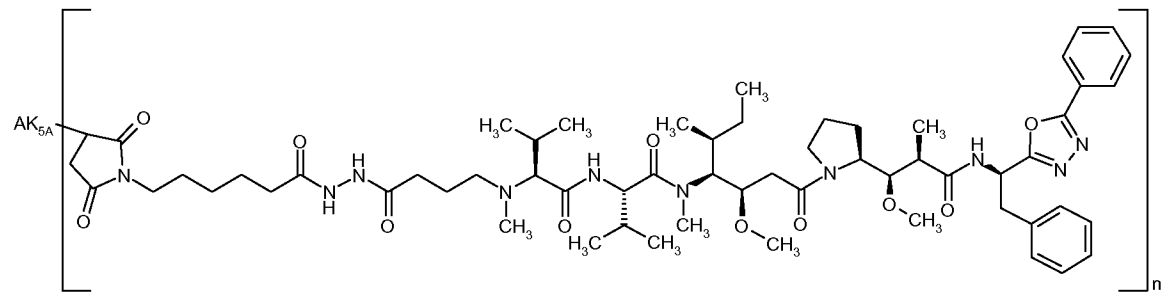
**Beispiel 227**



Protein Konzentration: 0.93 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

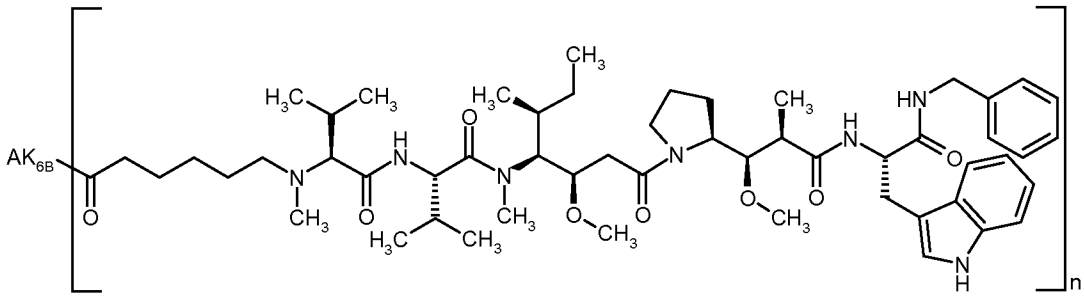
**Beispiel 228**



Protein Konzentration: 0.85 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.3

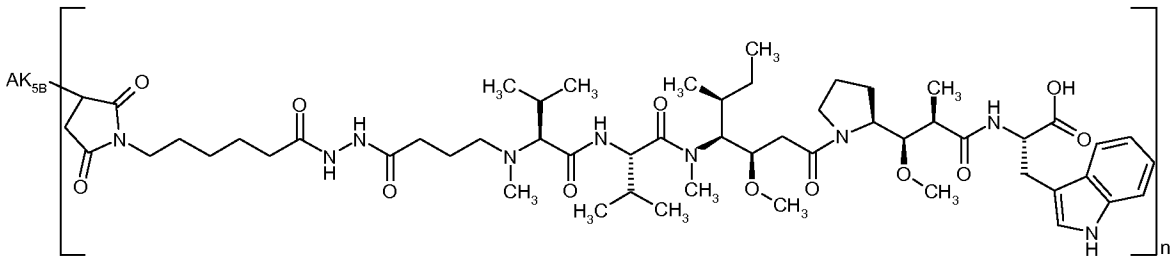
**Beispiel 229**



Protein Konzentration: 1.51 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.4

**Beispiel 230**

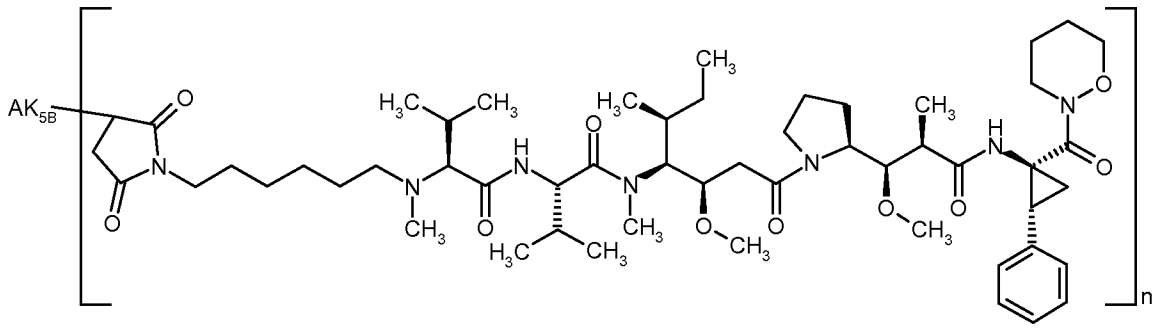


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 150 mg anti-C4.4a B01-3 in DPBS PH 7,4 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.0 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.5

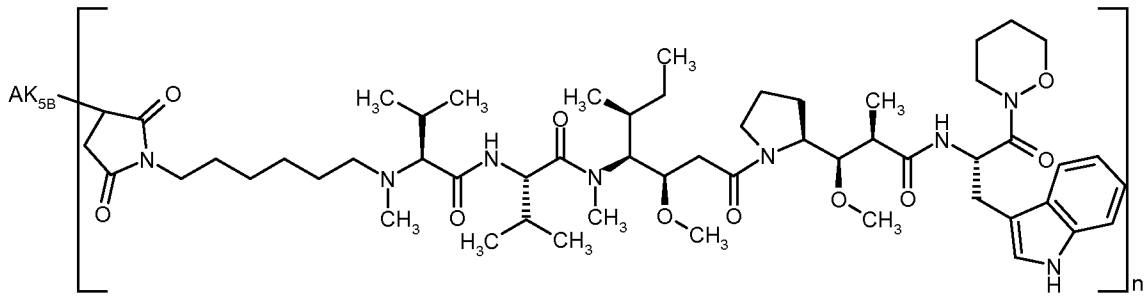
**Beispiel 231**



Protein Konzentration: 1.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

**Beispiel 232**

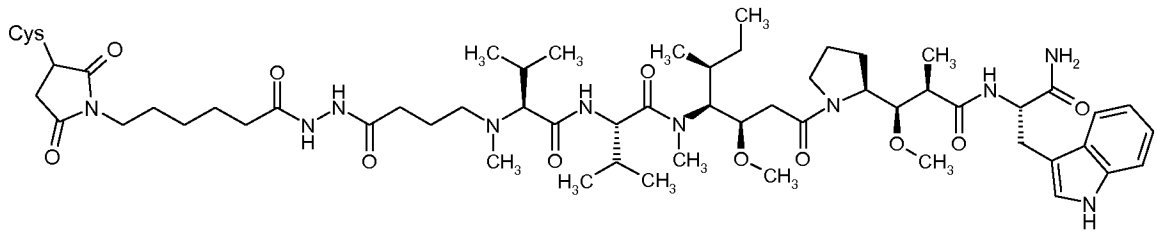


Protein Konzentration: 1.25 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

**Beispiel 233**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



10 mg (10µmol) von Intermediat 157 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.8 mg (48% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

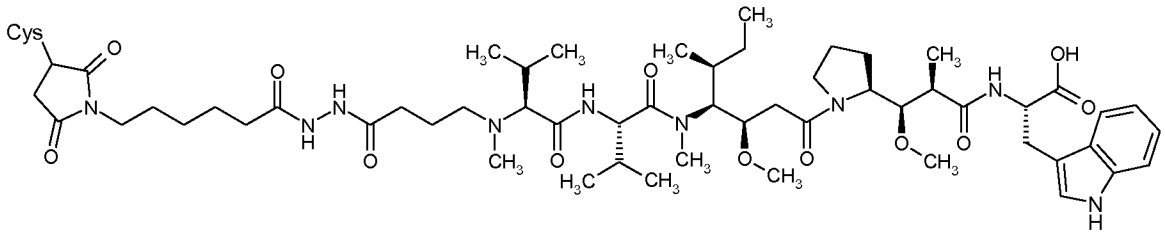
HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.45 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 1184 $(M+H)^+$.

**Beispiel 234**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-

1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



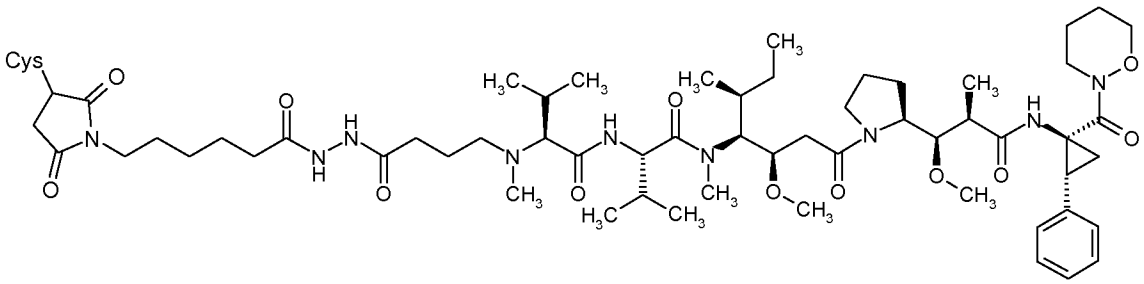
10 mg (10µmol) von Intermediat 113 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6 mg (54% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 1185 $(M+H)^+$.

**Beispiel 235**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



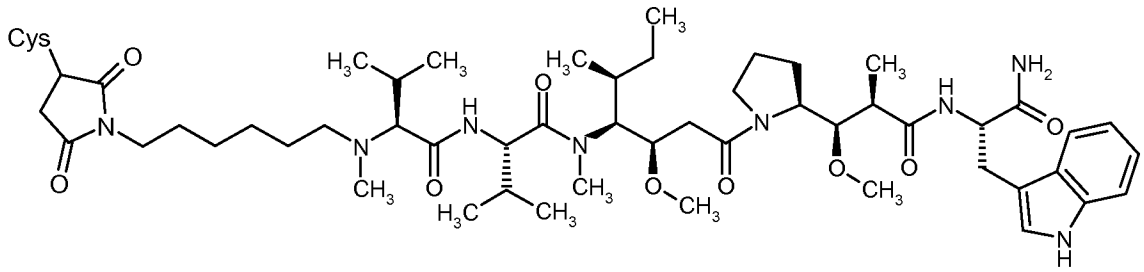
9 mg (8.3 µmol) von Intermediat 132 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 3 mg (24.4 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6.8 mg (68% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 1227 $(M+H)^+$.

**Beispiel 236**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



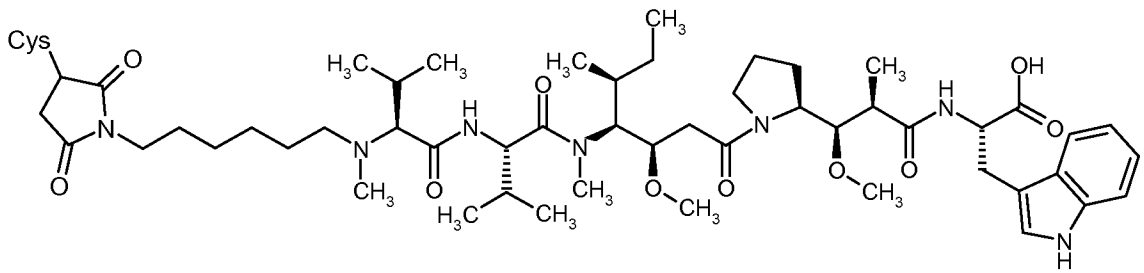
10 mg (10 µmol) von Intermediat 106 wurden in 5.8 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.2 mg (46% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.71 min; MS (ESIpos): m/z = 1070 $(M+H)^+$.

**Beispiel 237**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



10 mg (10 µmol) von Intermediat 124 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum

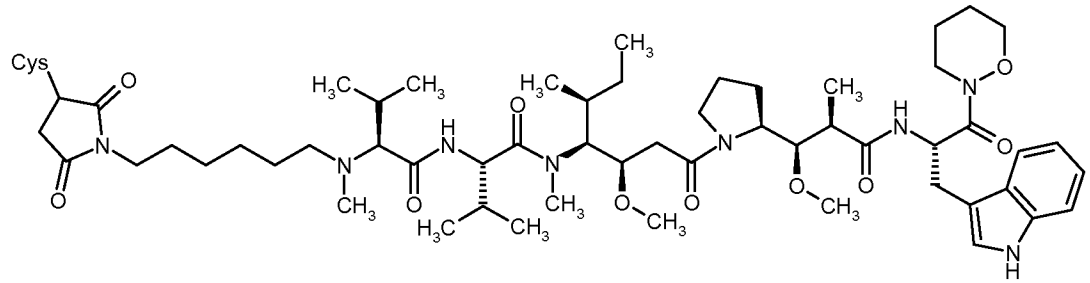
eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.2 mg (64% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 $(M+H)^+$.

**Beispiel 238**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



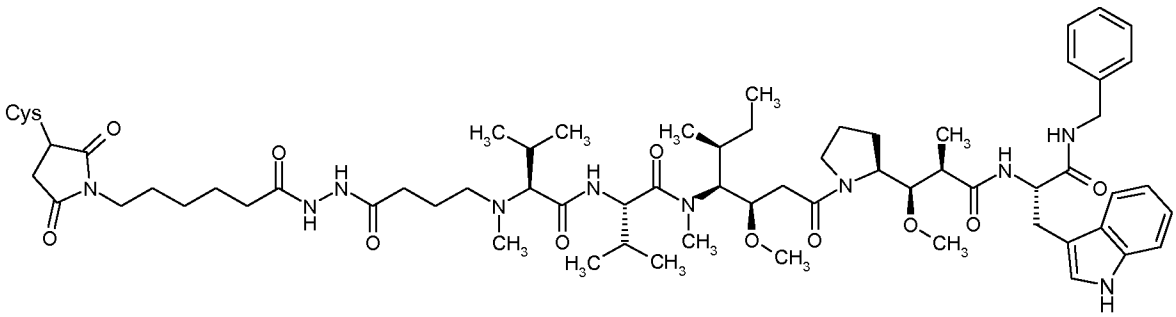
10 mg (10 µmol) von Intermediat 125 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.4 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.7 mg (69% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1140 $(M+H)^+$.

**Beispiel 239**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzylamino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl] pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



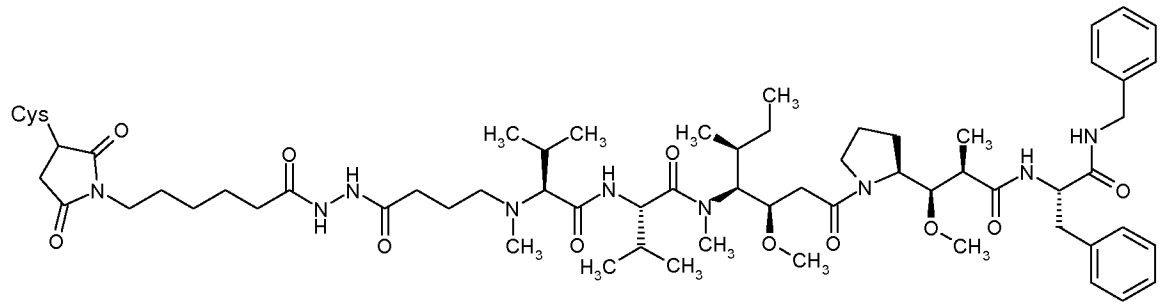
10 mg (10 µmol) von Intermediat 160 wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 8.1 mg (73% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1274 $(M+H)^+$.

**Beispiel 240**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



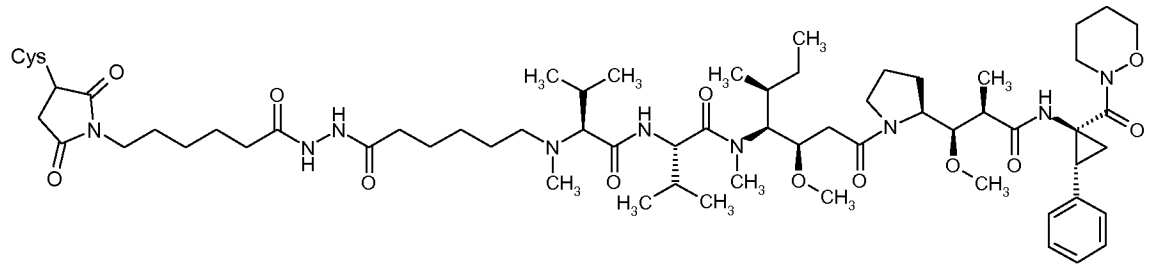
3.5 mg (3 µmol) von Intermediat 159 wurden in 1 ml DMF aufgenommen und mit 0.76 mg (6 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 2.6 mg (65% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.75 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1235 $(M+H)^+$.

**Beispiel 241**

N-(6-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

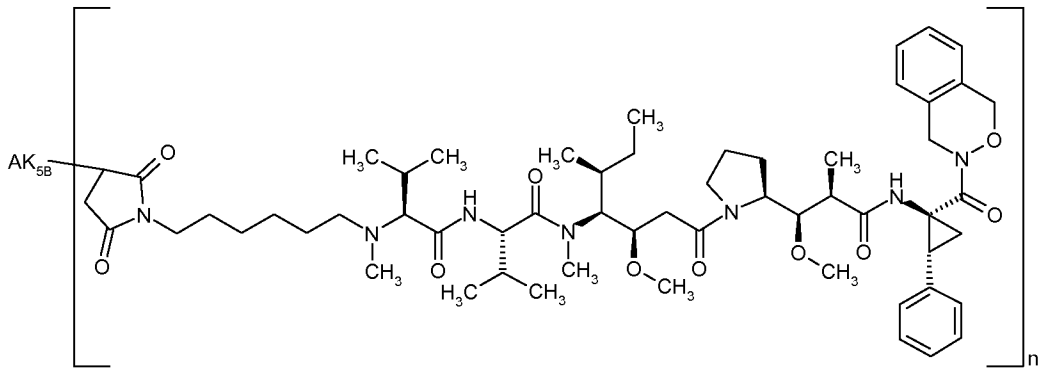


3.6 mg (3 µmol) von Intermediat 129 wurden in 1 ml DMF aufgenommen und mit 0.77 mg (6 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 1.55 mg (39% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1255 $(M+H)^+$.

**Beispiel 242**

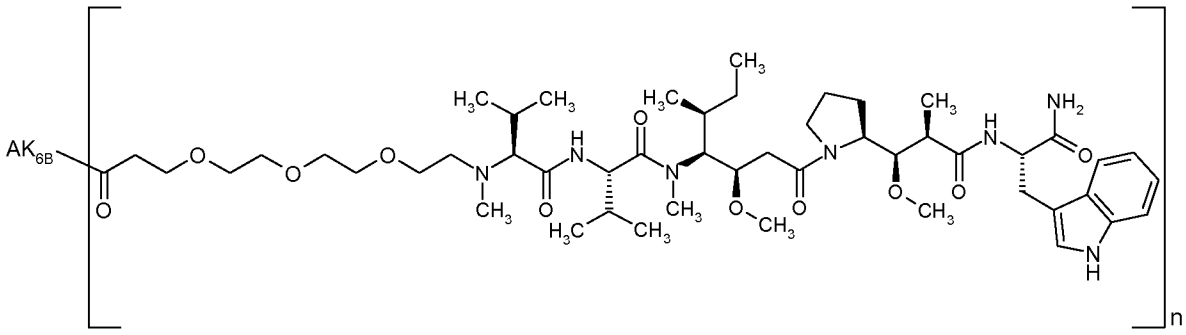


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 0.83 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

**Beispiel 243**



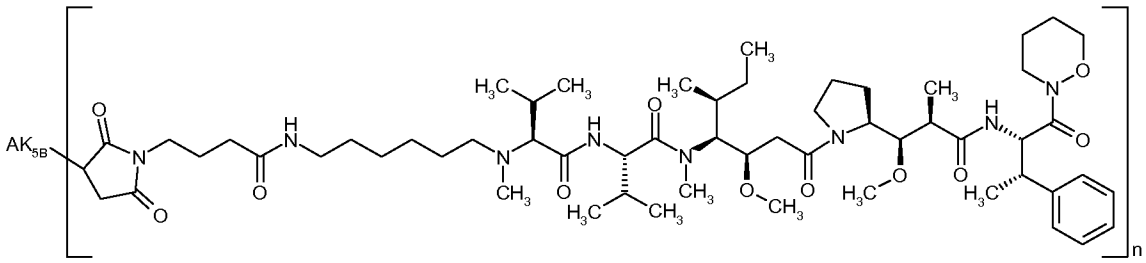
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.59 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 244**

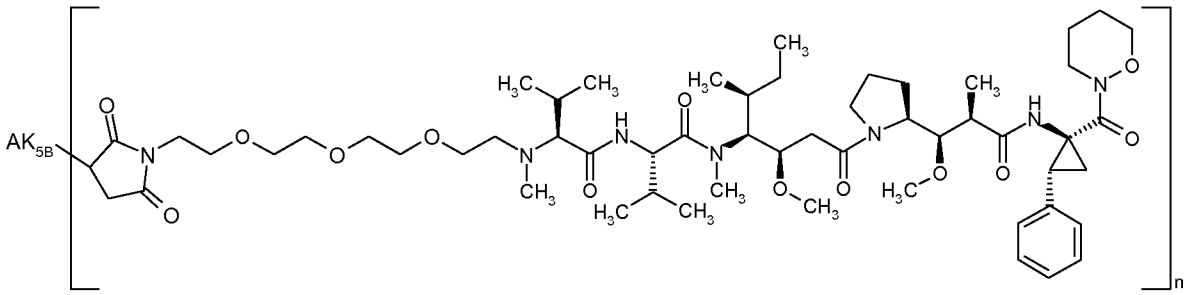


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.25 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 245**

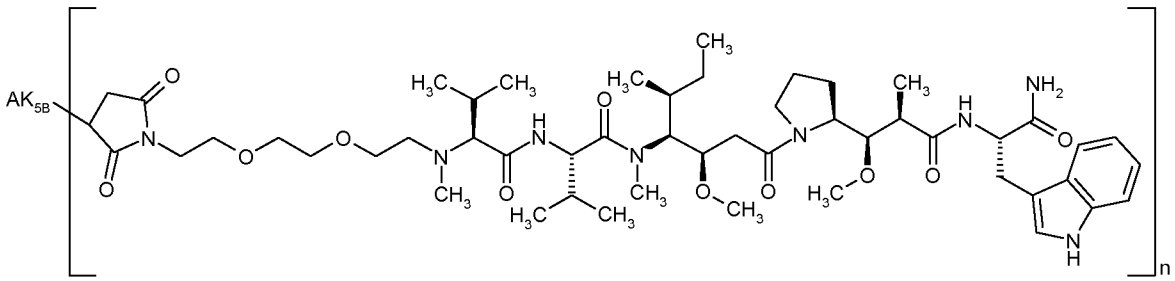


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.6

**Beispiel 246**

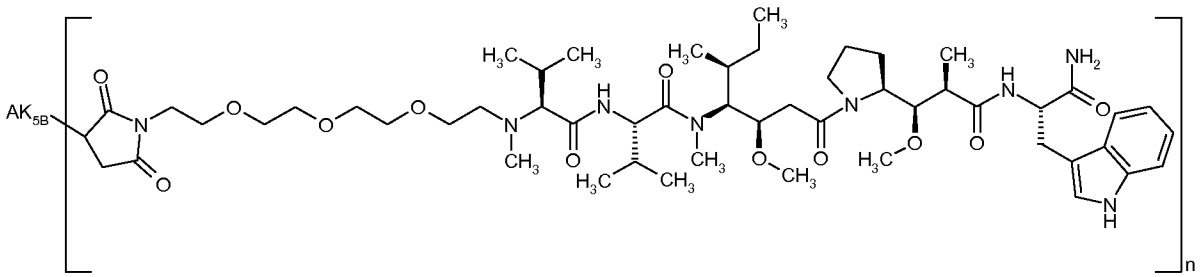


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.54 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.7

**Beispiel 247**

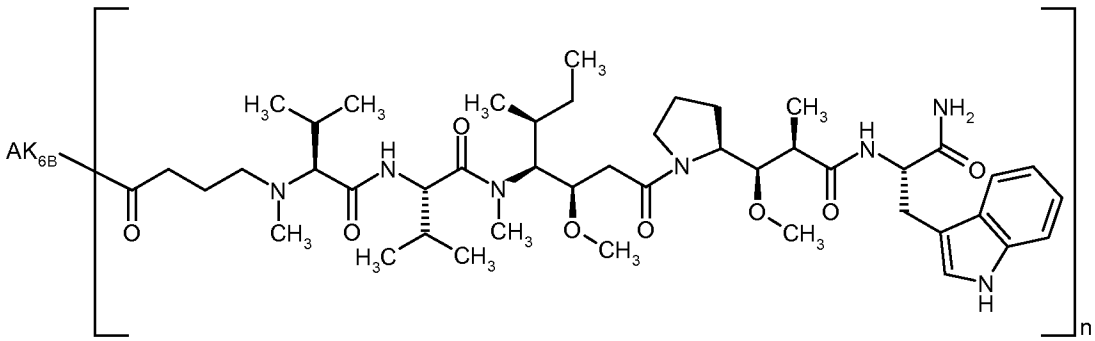


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.73 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.7

**Beispiel 248**

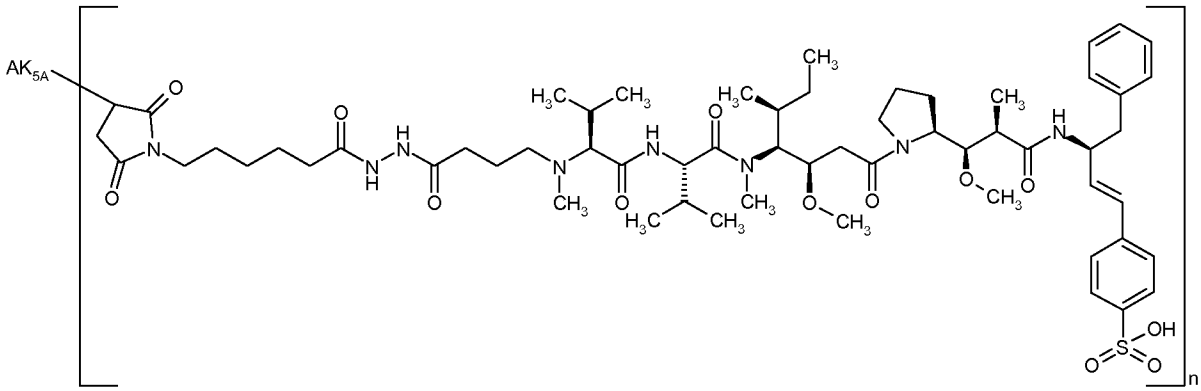


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.66 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.3

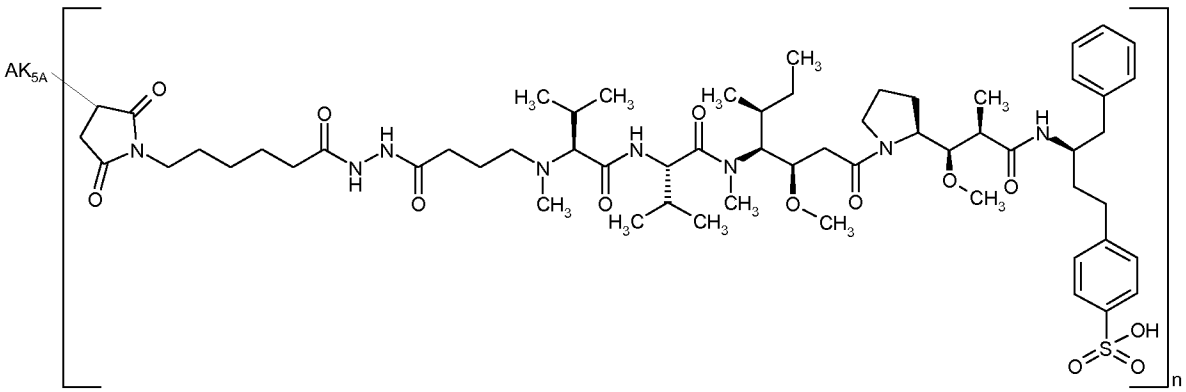
**Beispiel 249**



Protein Konzentration: 2.11 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.5

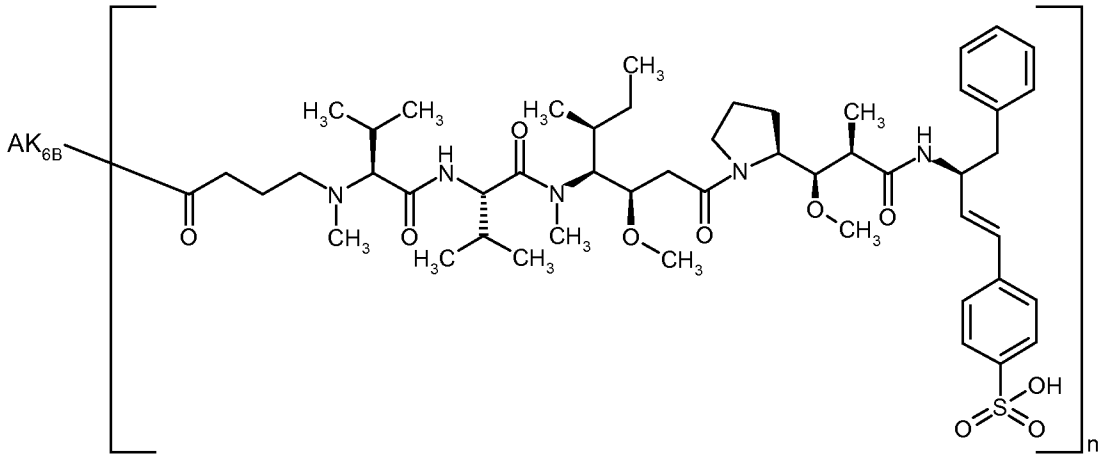
**Beispiel 250**



Protein Konzentration: 1.53 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

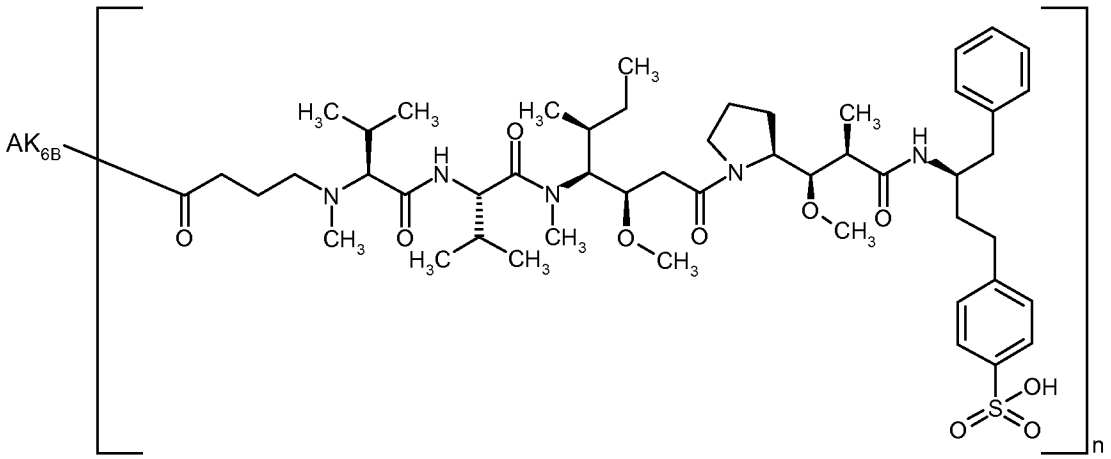
**Beispiel 251**



Protein Konzentration: 1.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.2

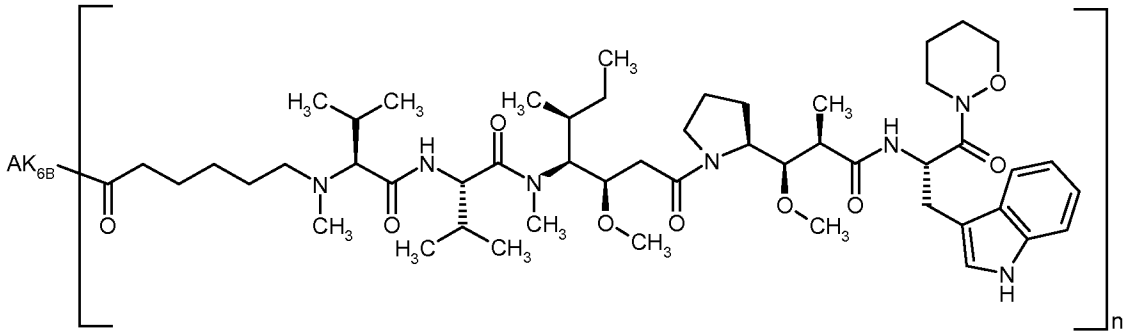
**Beispiel 252**



Protein Konzentration: 1.32 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.1

**Beispiel 253**

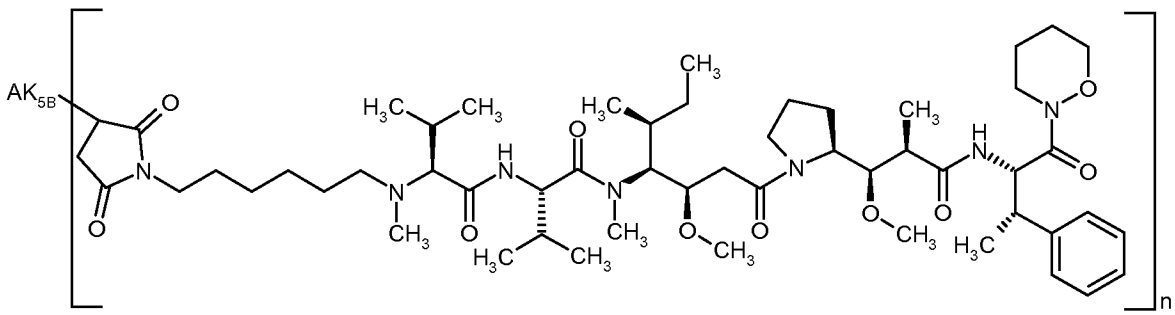


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 80 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

**Beispiel 254**

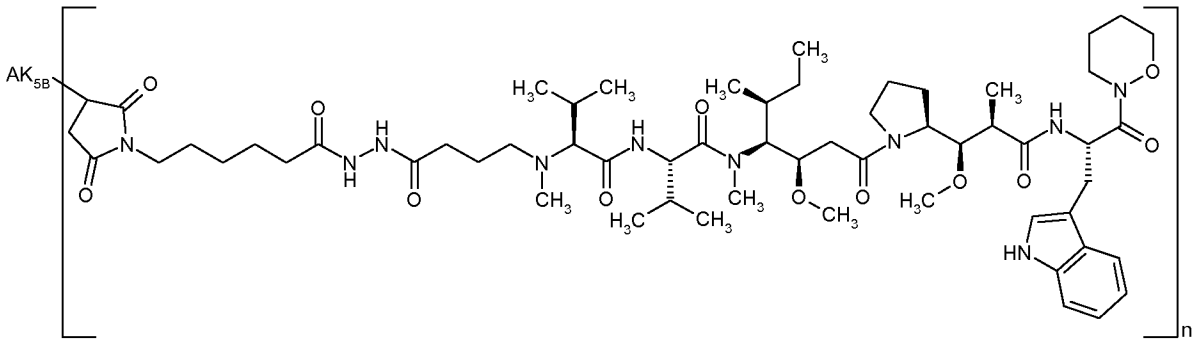


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.09 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

**Beispiel 255**

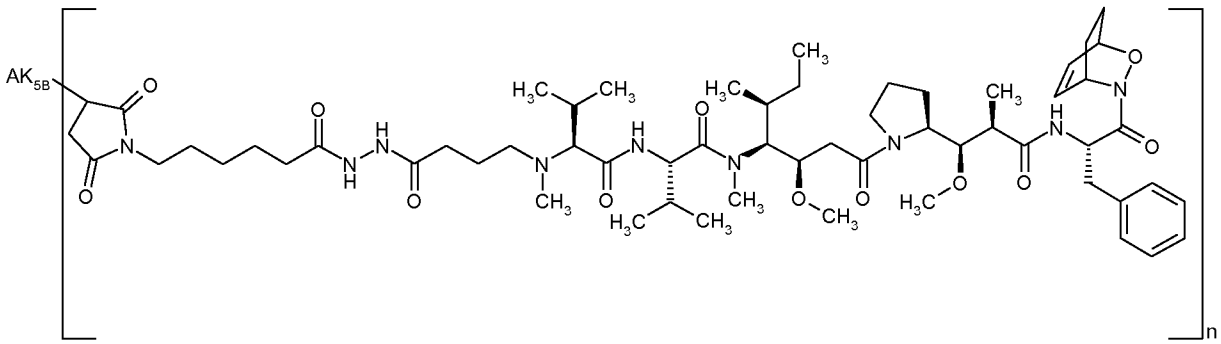


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.52 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.2

**Beispiel 256**

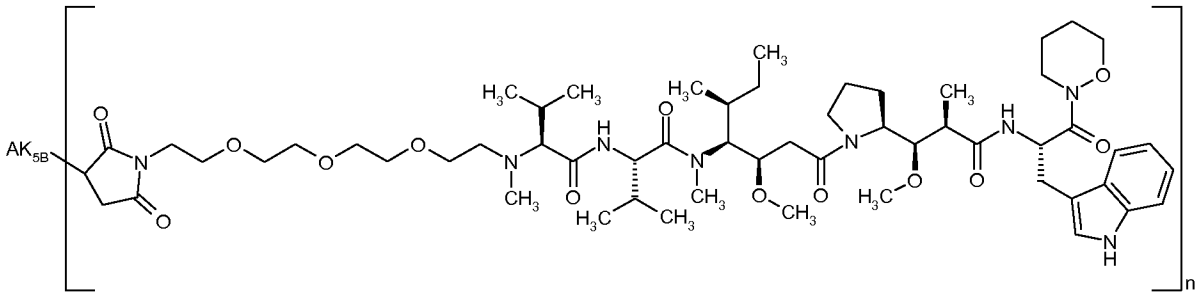


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.1 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

**Beispiel 257**

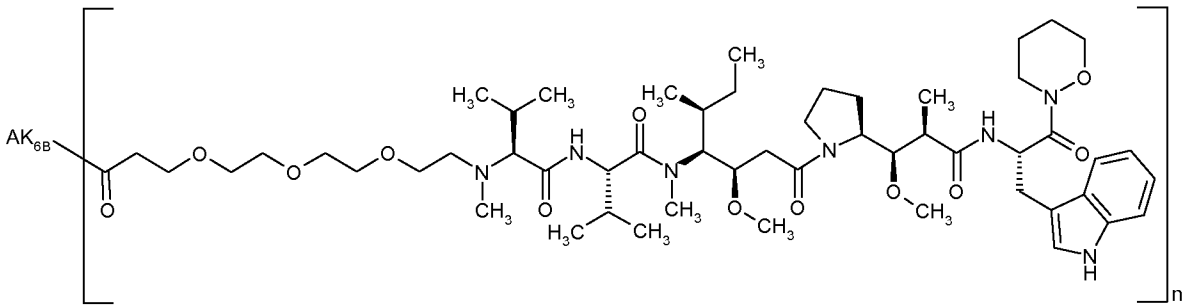


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.43 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.8

**Beispiel 258**

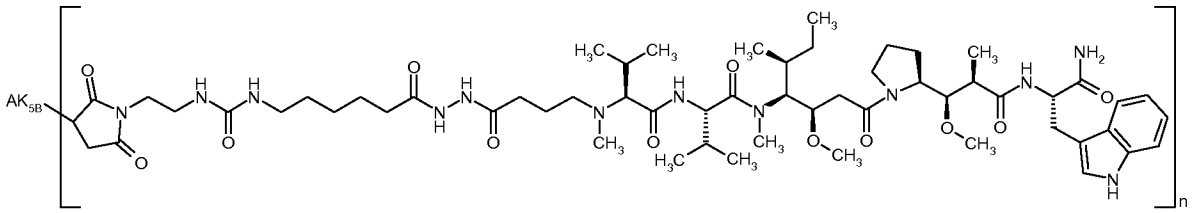


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 1.36 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 259**

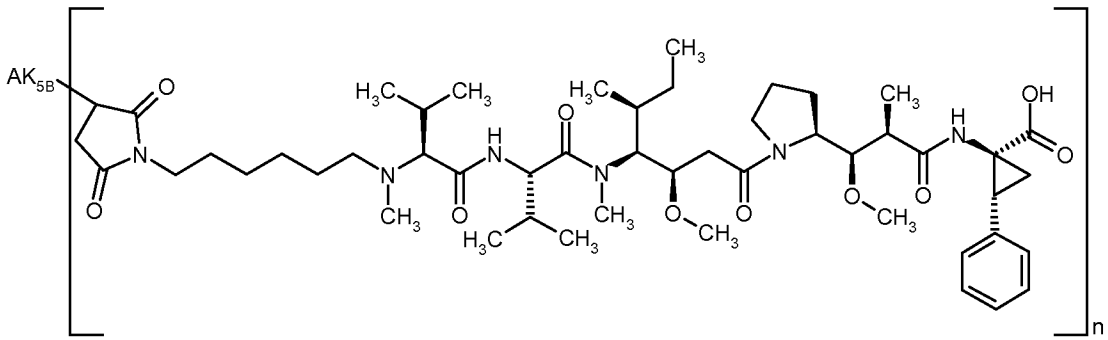


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.33 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 260**

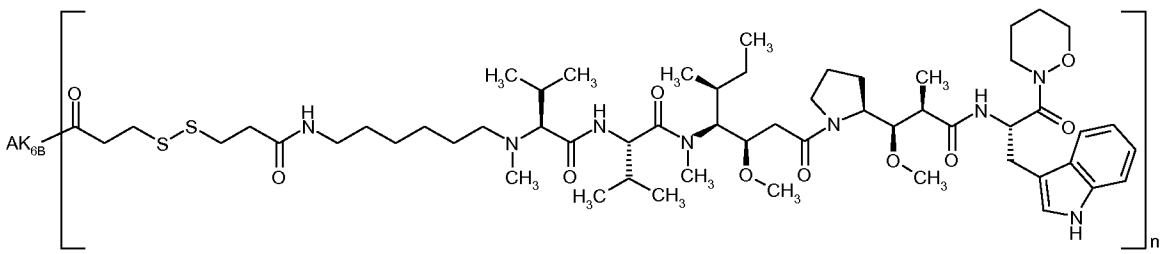


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.33 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 261**

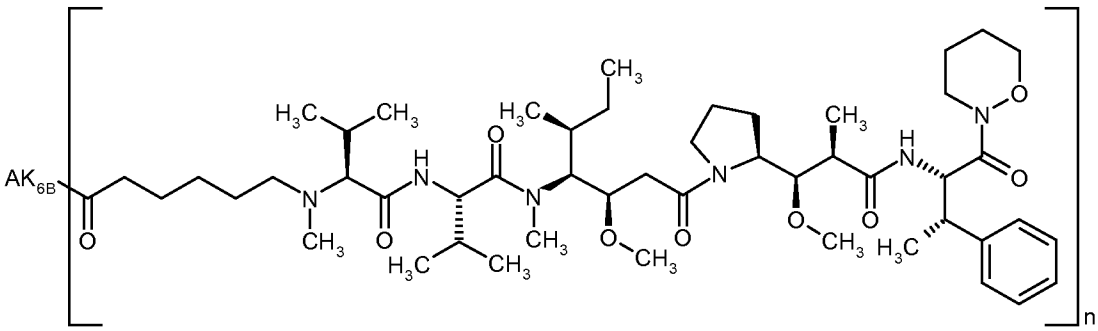


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

**Beispiel 262**

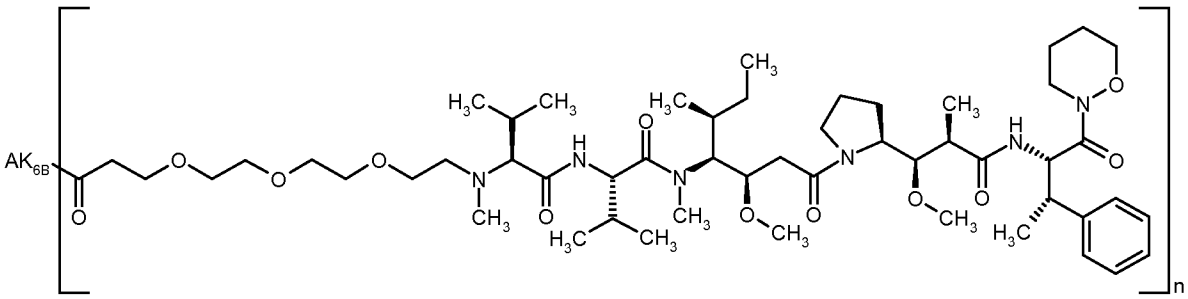


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.49 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.5

**Beispiel 263**

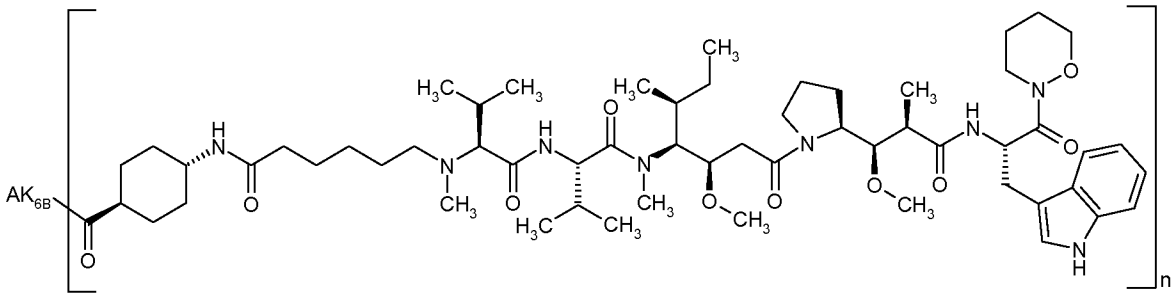


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.29 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

**Beispiel 264**

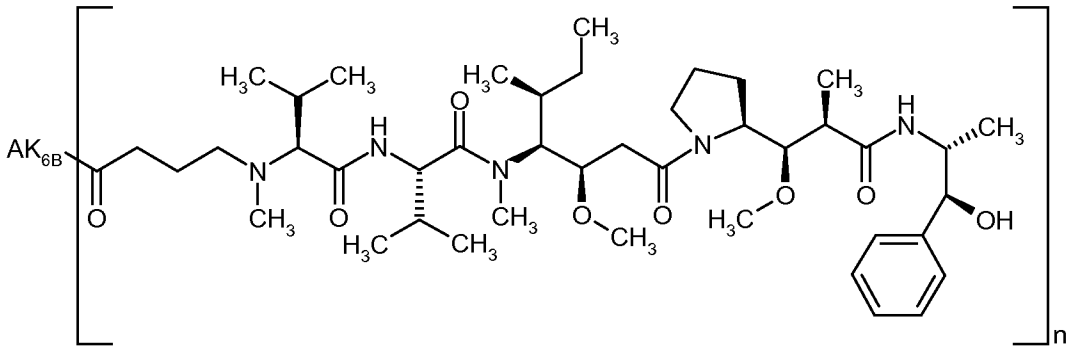


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.74 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

**Beispiel 265**

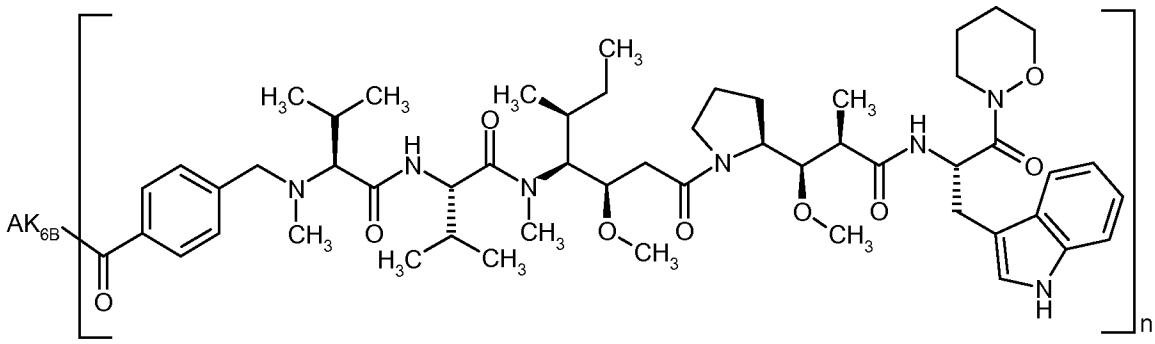


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.09 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

**Beispiel 266**

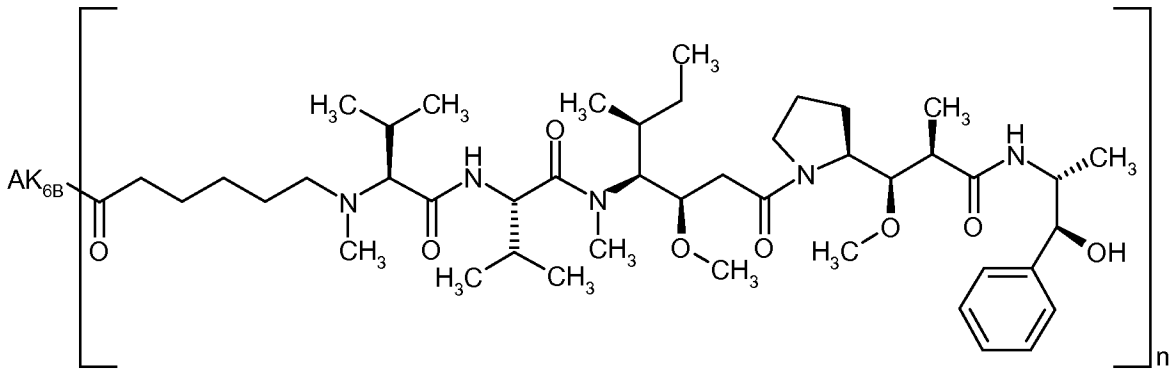


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.63 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 0.2

**Beispiel 267**

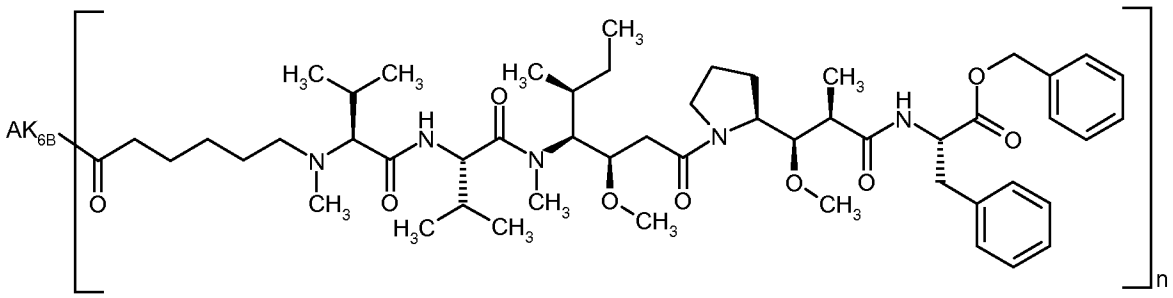


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.41 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 7.6

**Beispiel 268**

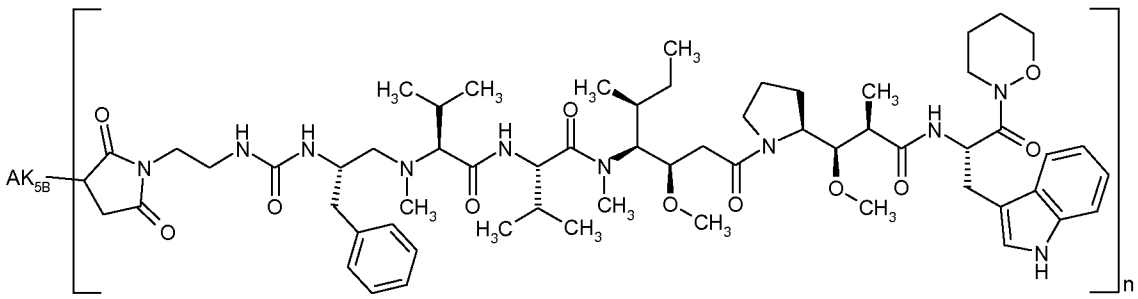


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 2.0 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

**Beispiel 269**

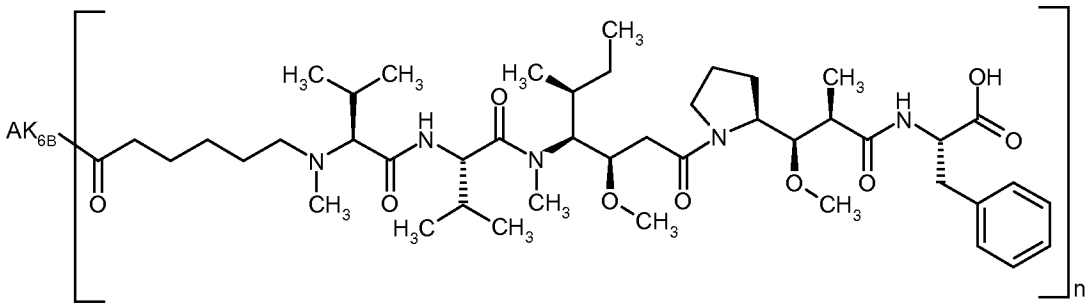


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.67 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

**Beispiel 270**

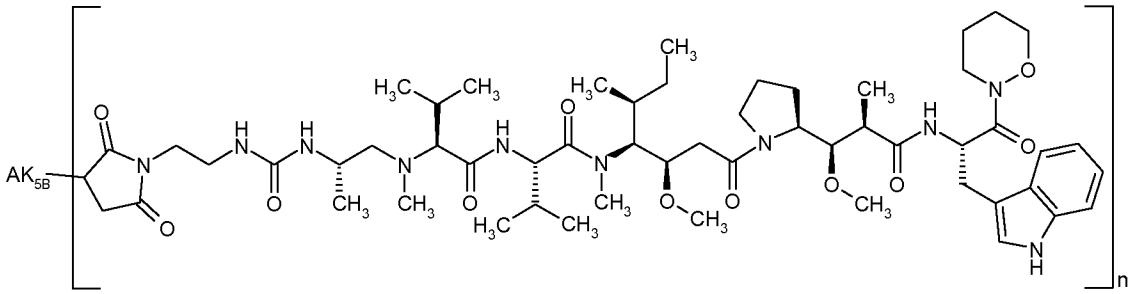


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.91 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.3

**Beispiel 271**

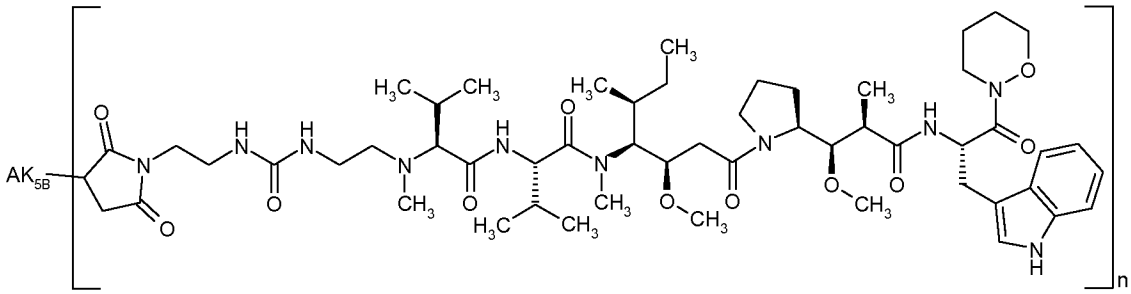


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.82 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 272**

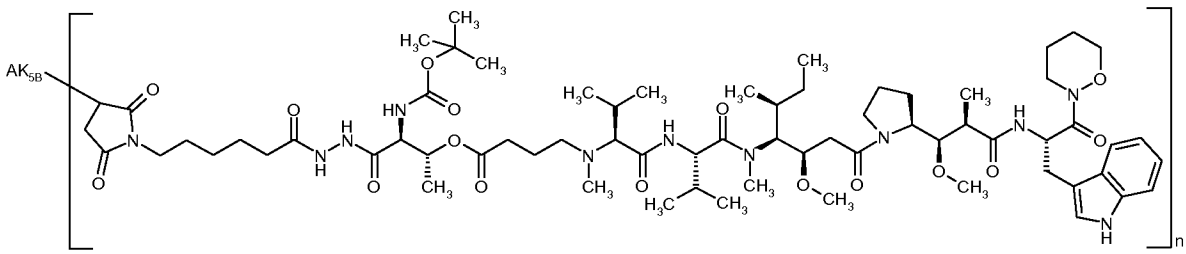


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.2

**Beispiel 273**

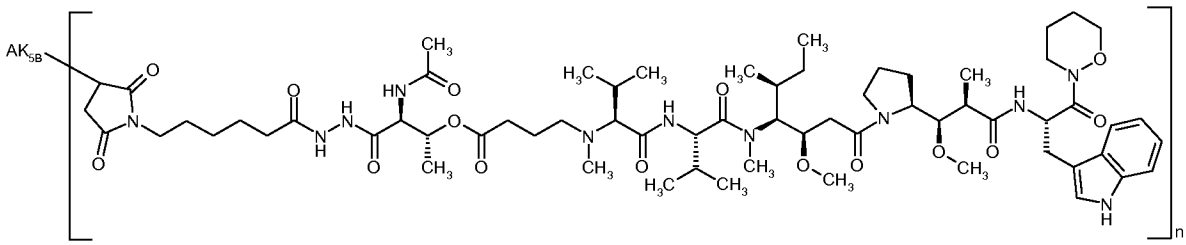


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.89 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.7

**Beispiel 274**

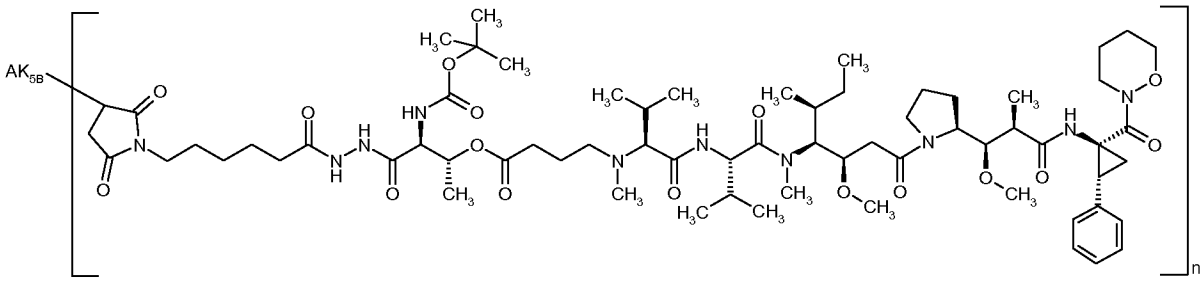


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.73 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 2.3

**Beispiel 275**

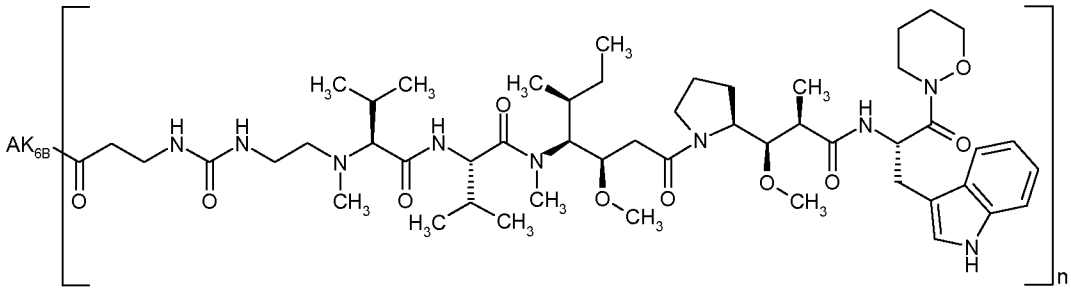


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.71 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 3.3

**Beispiel 276**



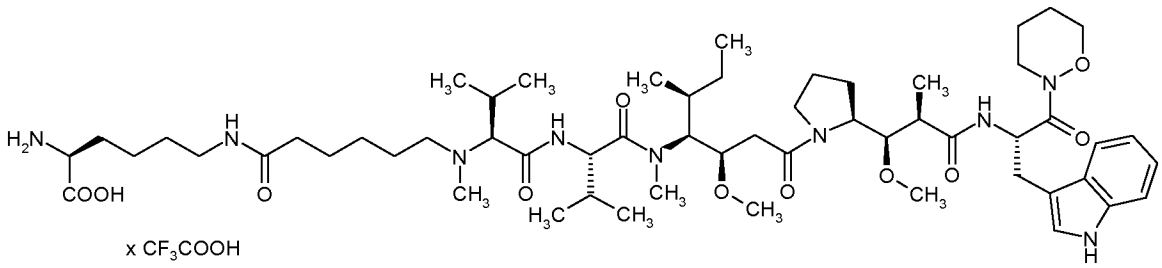
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.47 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 277**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



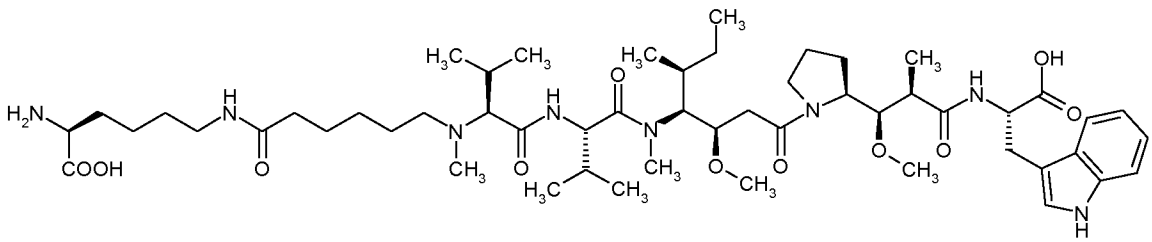
15.5 mg (15 µmol) von Intermediat 210 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 4.4 mg (18 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 7.7 µL (44 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 14 mg (81% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml Trifluoressigsäure entschützt wurde. Der Ansatz wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser (1:1) wurden 15 mg (97% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.79 min; MS (ESIpos): m/z = 1083 $(M+H)^+$.

**Beispiel 278**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



40 mg (40 µmol) von Intermediat 227 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 11.5 mg (40 µmol) $N^2$-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-lysin sowie 13 µL (80 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 32.5 mg (70% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten.

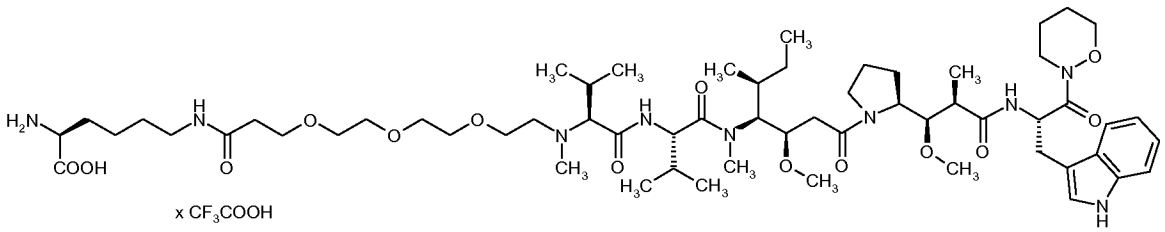
32.5 mg dieses Intermediats wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 30 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation des Rückstandes aus Dioxan/Wasser 1:1 wurden 26 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1014 $(M+H)^+$.

**Beispiel 279**

N-[(18S)-18-Amino-18-carboxy-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azaoctadec-1-yl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat

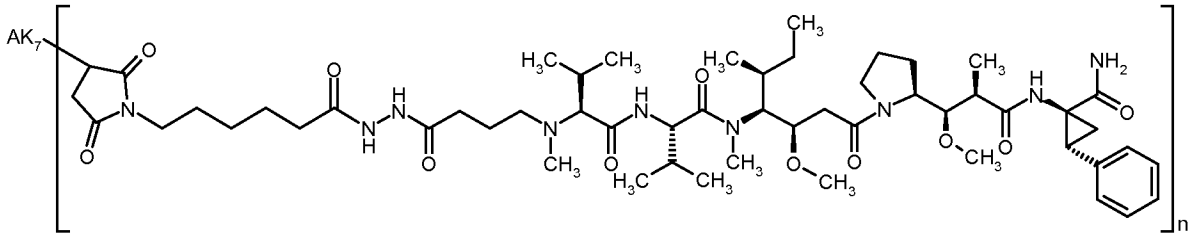



3.5 mg (3 µmol) von Intermediat 202 wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 0.8 mg (3 µmol) $N^2$-(tert.Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 1.6 µL (10 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen, mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurde 1 mg (25% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 500µl Dichlormethan aufgenommen und mit 500µl Trifluoressigsäure entschützt wurde. Der Ansatz wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser (1:1) wurde 1 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1173 $(M+H)^+$.

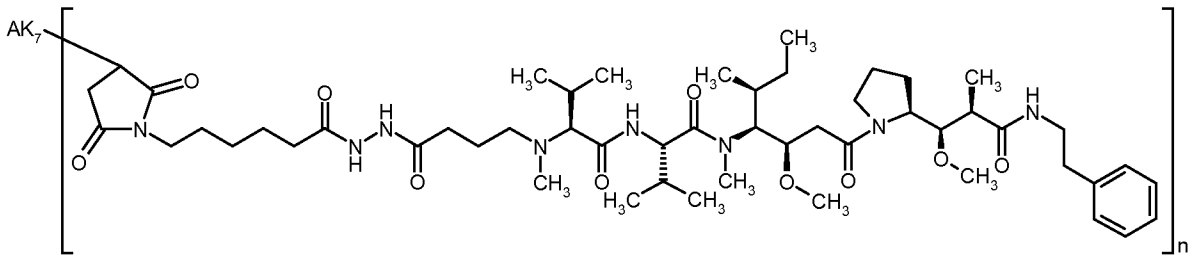
**Beispiel 280**



Protein Konzentration: 0.9 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

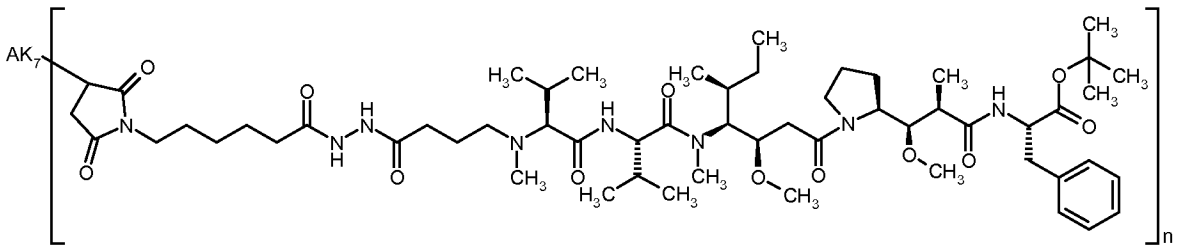
**Beispiel 281**



Protein Konzentration: 1.08 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.1

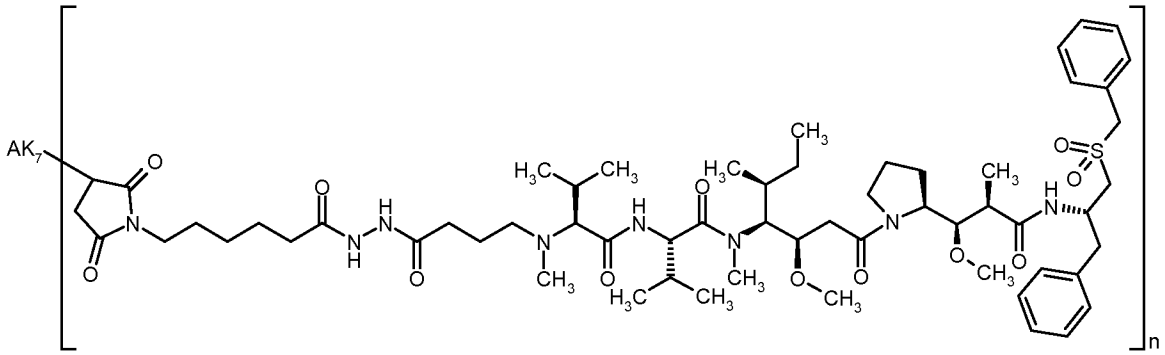
**Beispiel 282**



Protein Konzentration: 0.98 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

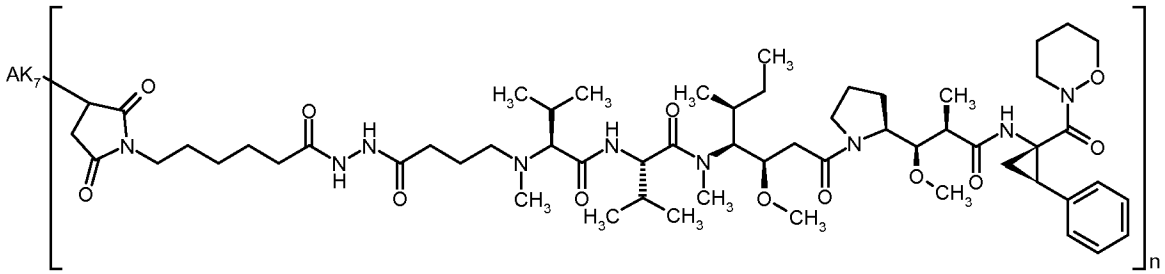
**Beispiel 283**



Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 284**

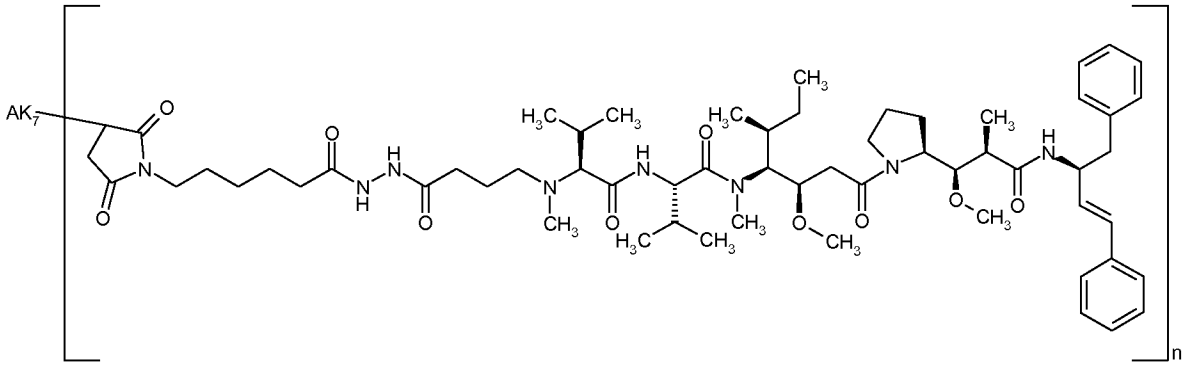


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert Anschließend wurde die Lösung rückverdünnt und erneut aufkonzentriert und der Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt.

Protein Konzentration: 9.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

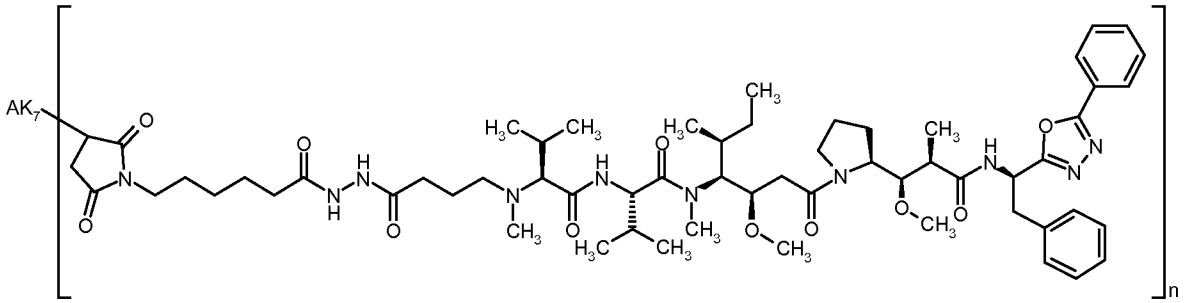
**Beispiel 285**



Protein Konzentration: 1.21 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

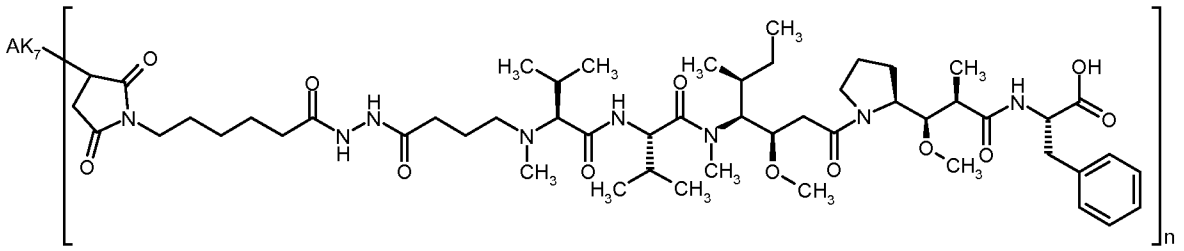
**Beispiel 286**



Protein Konzentration: 1.26 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.2

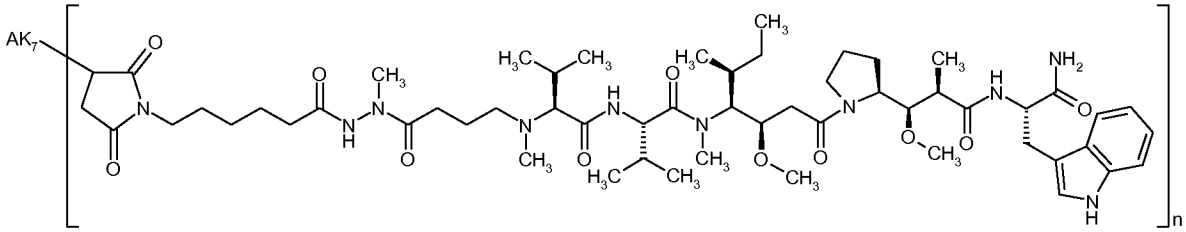
**Beispiel 287**



Protein Konzentration: 1.01 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

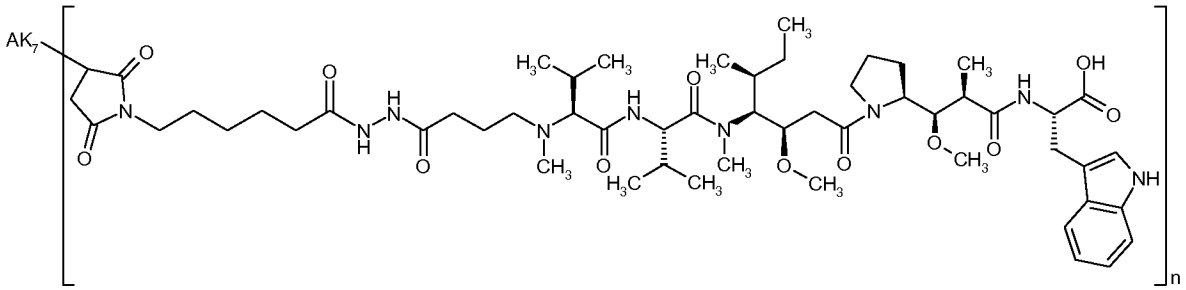
**Beispiel 288**



Protein Konzentration: 1.28 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.3

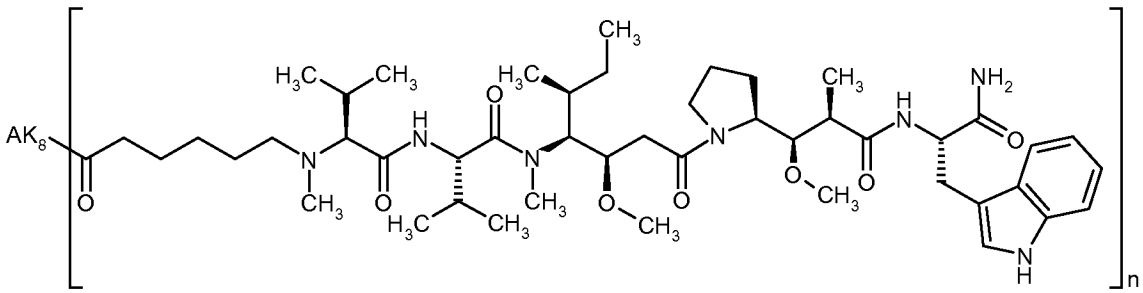
**Beispiel 289**



Protein Konzentration: 1.12 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.6

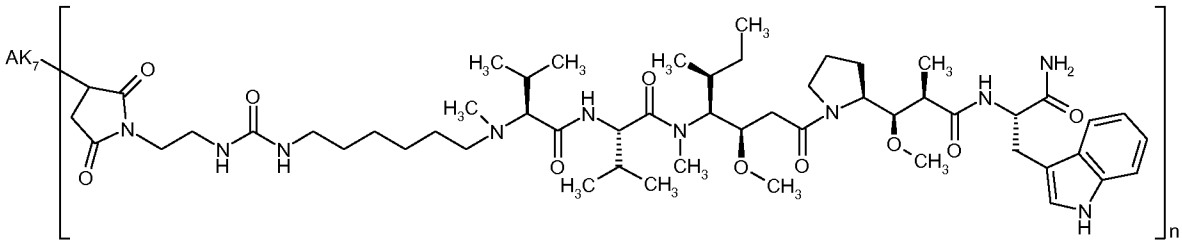
**Beispiel 290**



Protein Konzentration: 1.4 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

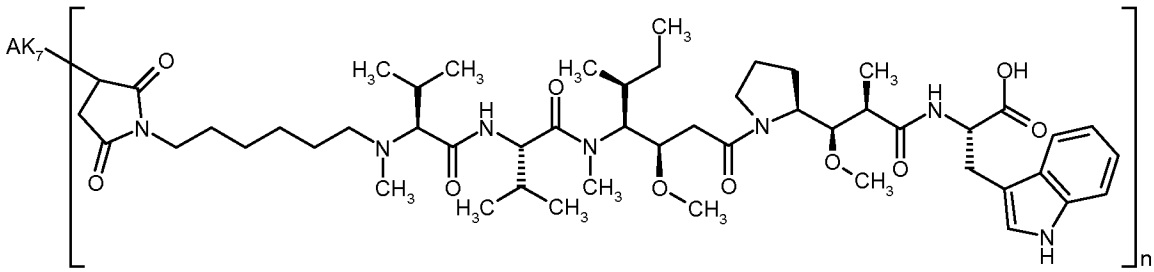
**Beispiel 291**



Protein Konzentration: 1.3 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

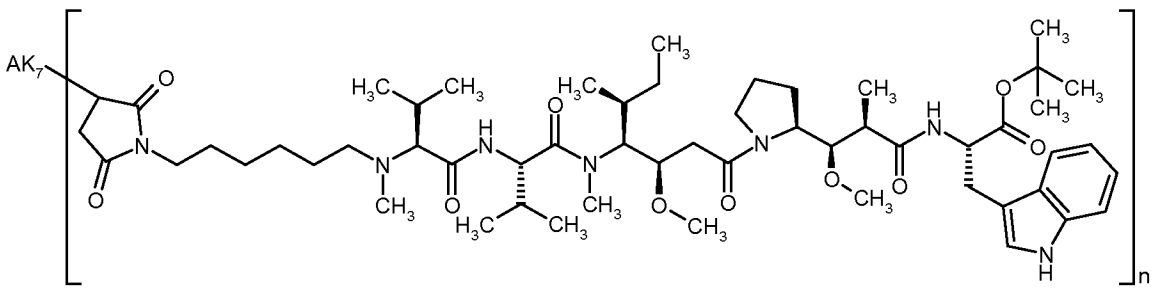
**Beispiel 292**



Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.6

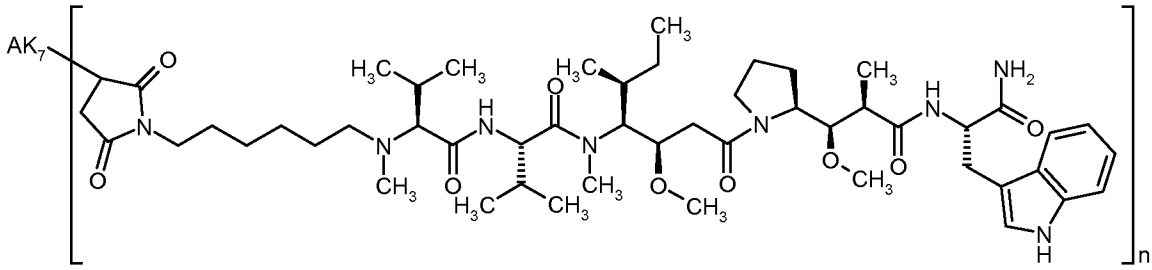
**Beispiel 293**



Protein Konzentration: 1.55 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

**Beispiel 294**

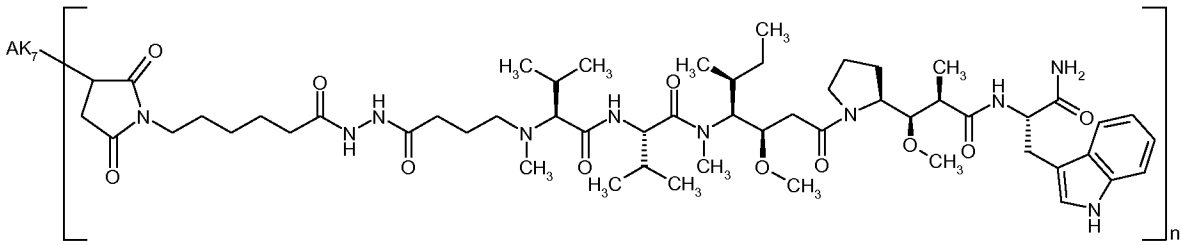


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.8 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.4

**Beispiel 295**

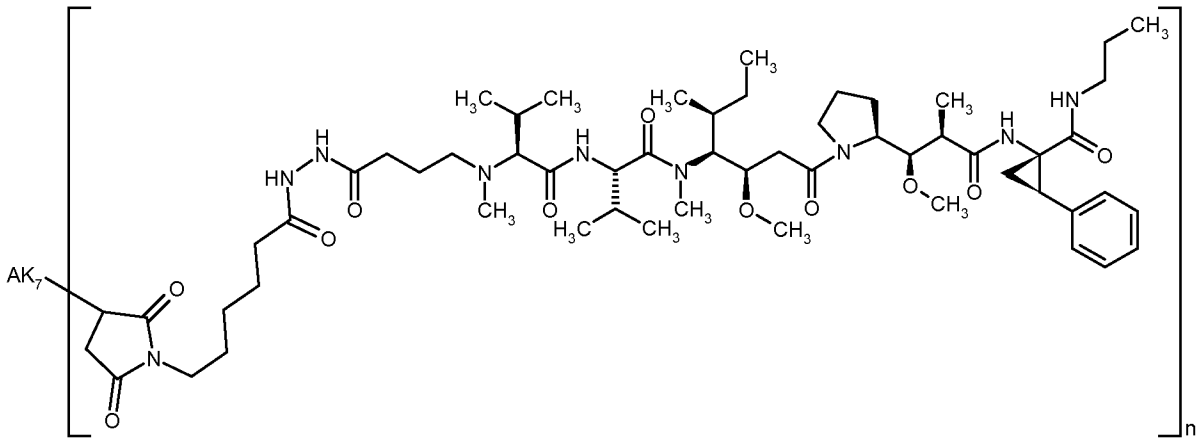


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.29 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

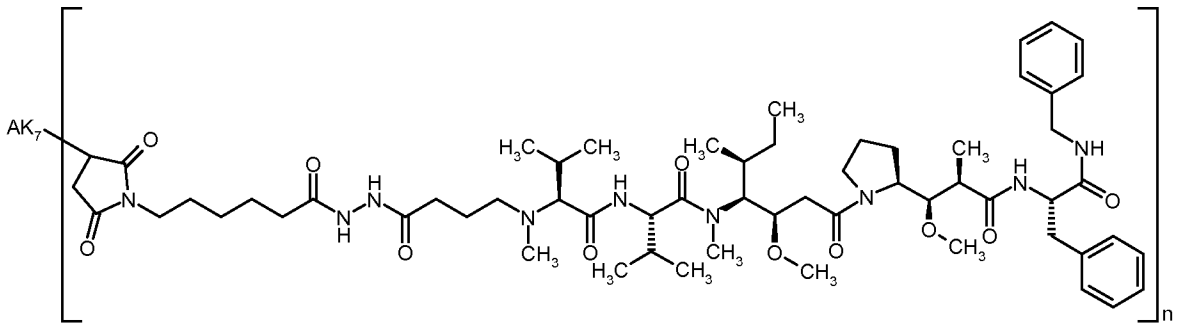
**Beispiel 296**



Protein Konzentration: 1.1 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.6

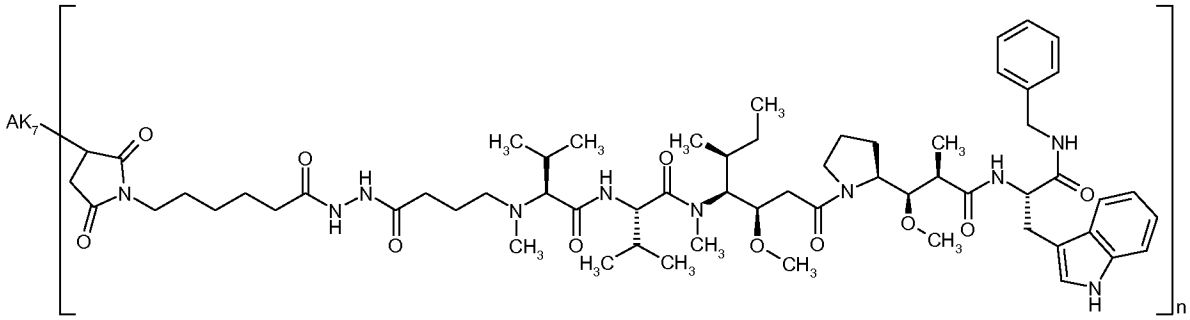
**Beispiel 297**



Protein Konzentration: 1.00 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

**Beispiel 298**

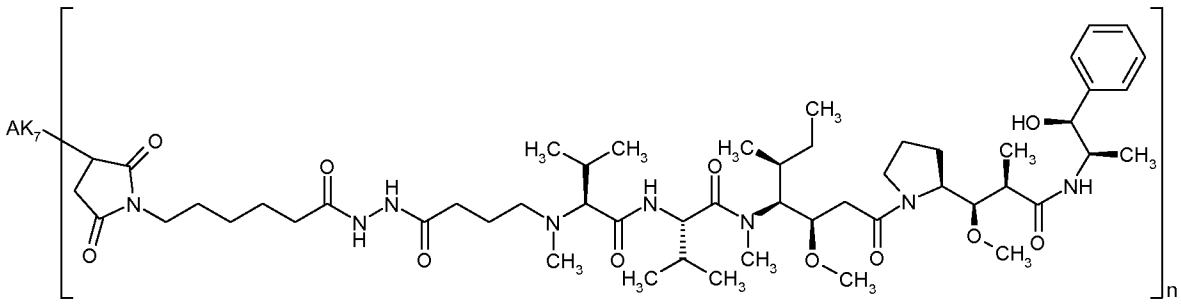


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.9

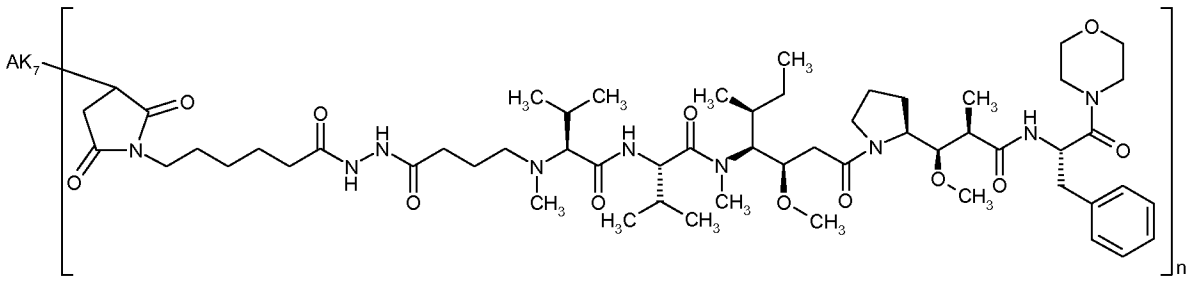
**Beispiel 299**



Protein Konzentration: 0.98 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

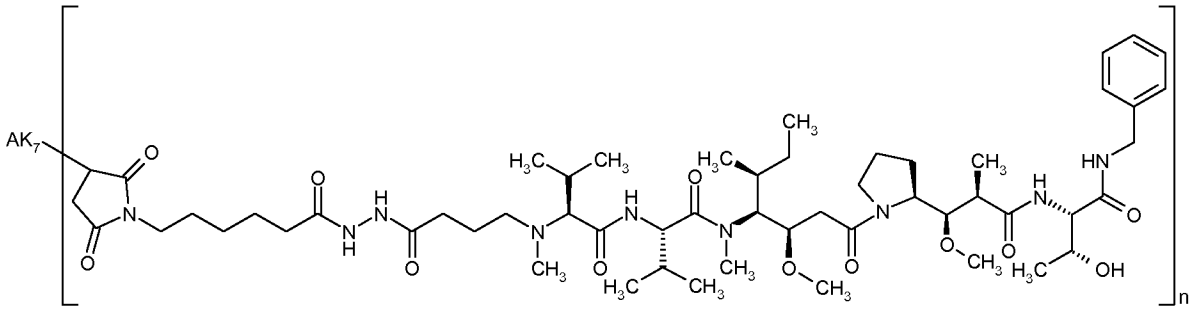
**Beispiel 300**



Protein Konzentration: 0.99 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.0

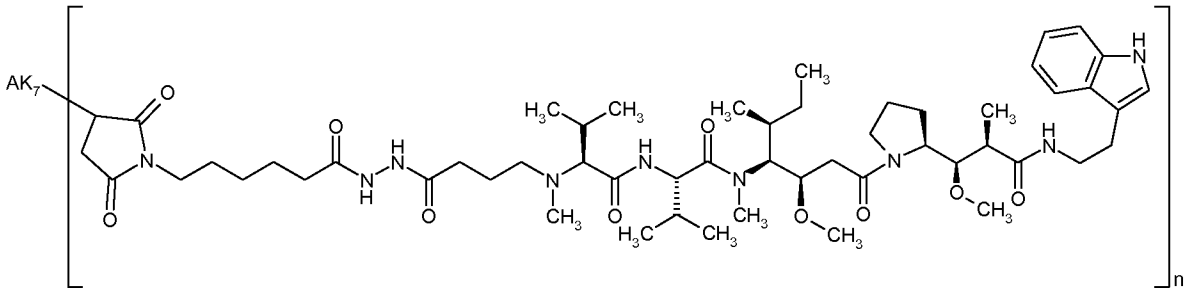
**Beispiel 301**



Protein Konzentration: 0.87 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.1

**Beispiel 302**

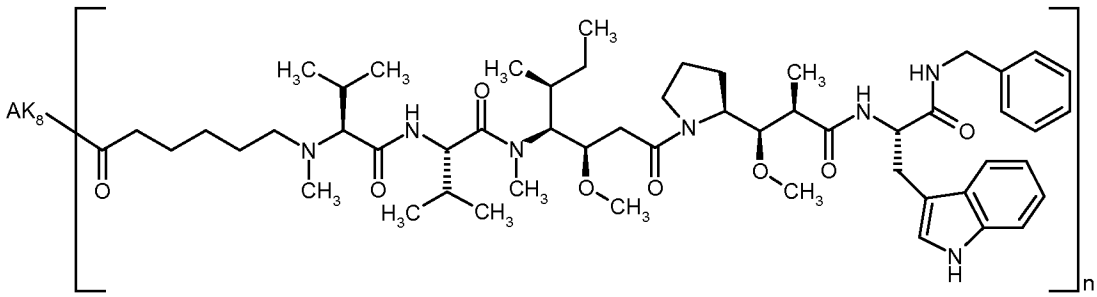


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 100mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

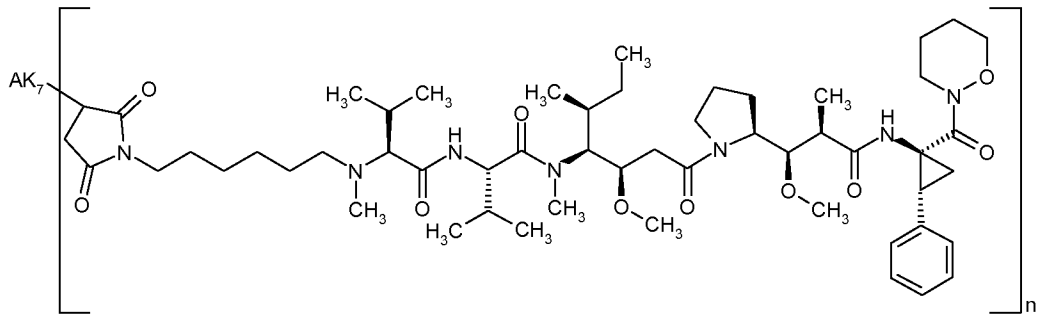
**Beispiel 303**



Protein Konzentration: 1.58 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

**Beispiel 304**

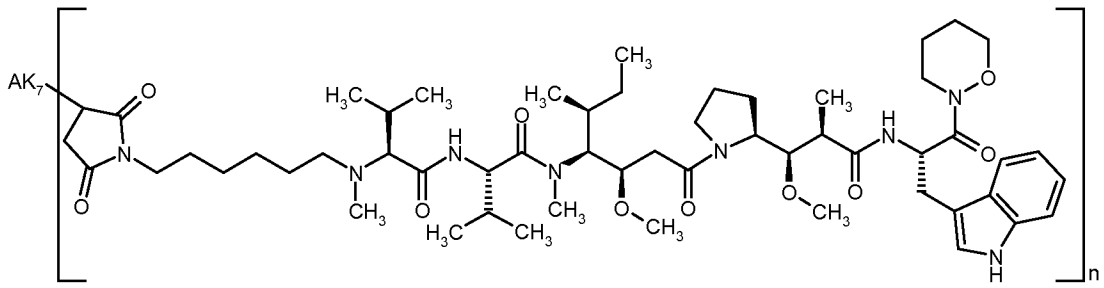


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 70 mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.5 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 305**

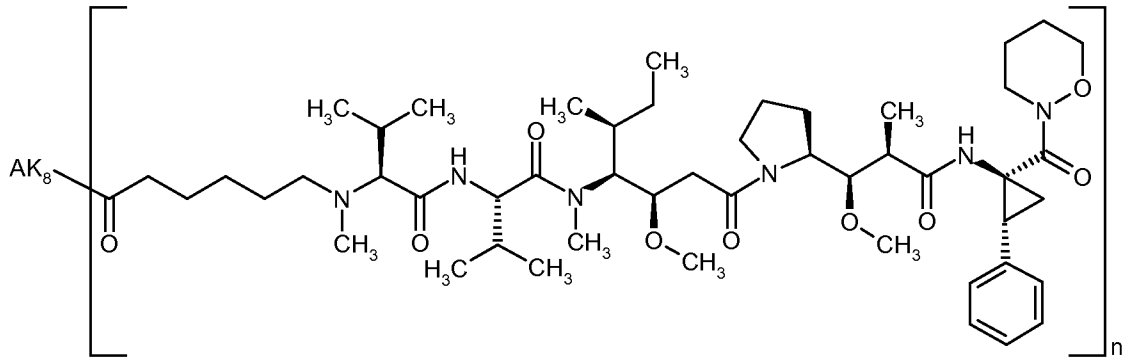


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 60 mg anti-CA9 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.6 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 306**

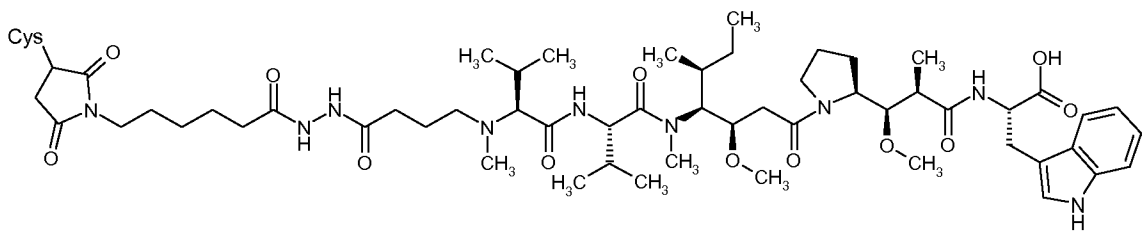


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 60 mg anti-CA9 in PBS Puffer und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10 mg/ml

**Beispiel 307**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



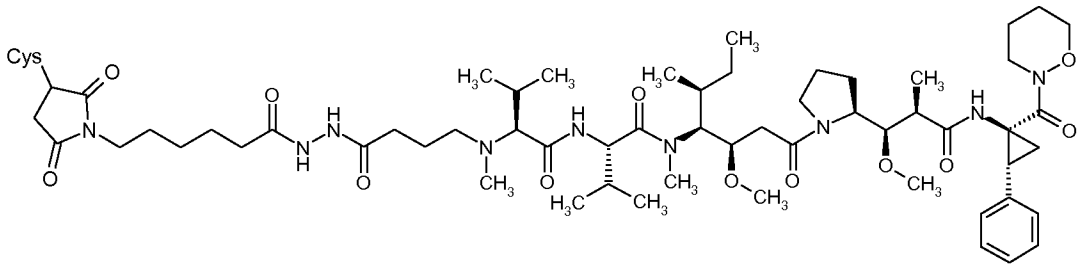
10 mg (10µmol) von Intermediat 113 wurden in 5.2 ml DMF aufgenommen und mit 2.28 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt.Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6 mg (54% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 1185 $(M+H)^+$.

**Beispiel 308**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-{[(1S,2R)-1-(1,2-oxazinan-2-ylcarbonyl)-2-phenylcyclopropyl]amino}-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



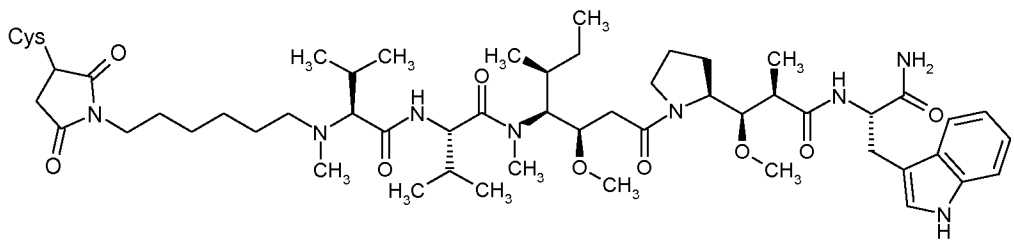
9 mg (8.3 µmol) von Intermediat 132 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 3 mg (24.4 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 6.8 mg (68% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 1227 $(M+H)^+$.

**Beispiel 309**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-amino-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl] amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



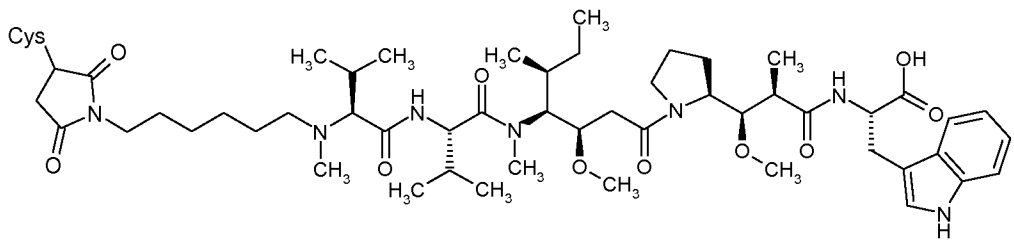
10 mg (10 µmol) von Intermediat 106 wurden in 5.8 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 5.2 mg (46% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 11): $R_t$ = 0.71 min; MS (ESIpos): m/z = 1070 $(M+H)^+$.

**Beispiel 310**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



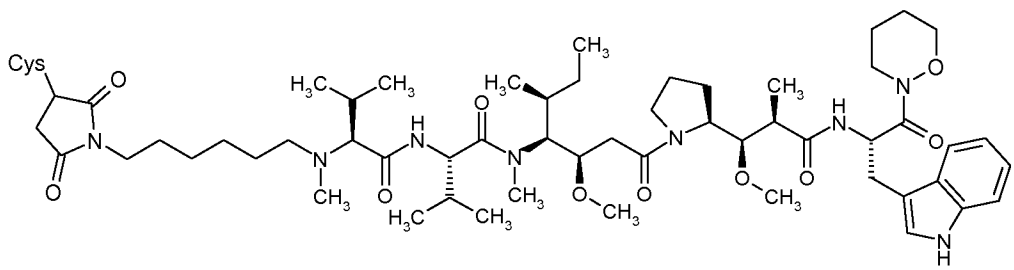
10 mg (10 µmol) von Intermediat 124 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.5 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.2 mg (64% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 $(M+H)^+$.

**Beispiel 311**

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



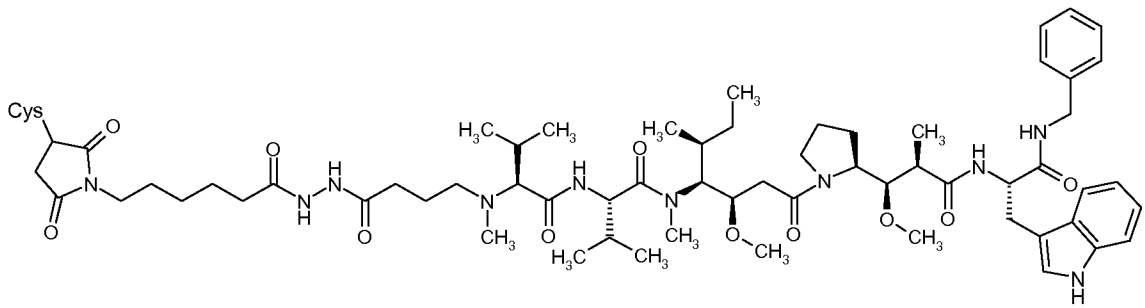
10 mg (10 µmol) von Intermediat 125 wurden in 4 ml DMF aufgenommen und mit 2.4 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7.7 mg (69% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 2): $R_t$ = 1.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1140 $(M+H)^+$.

**Beispiel 312**

N-(4-{2-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl] hydrazino}-4-oxobutyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-(benzylamino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl] pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid

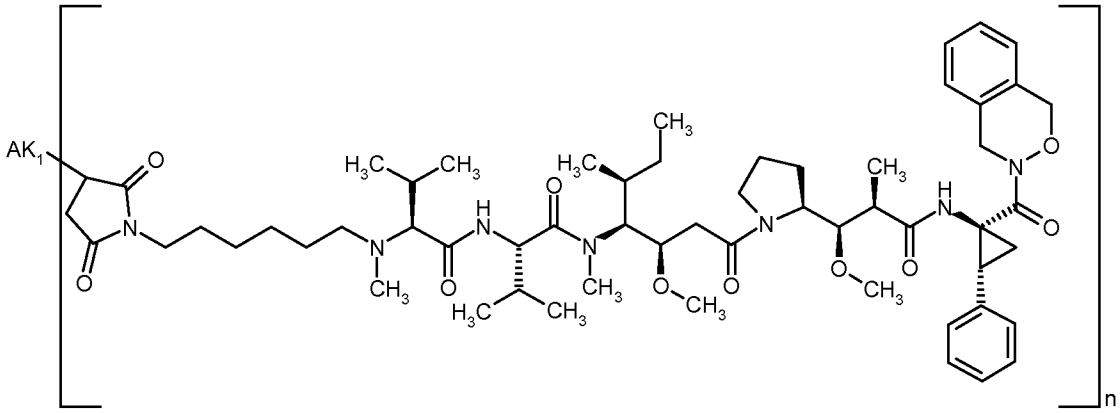



10 mg (10 µmol) von Intermediat 160 wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Der Ansatz wurde 2h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 8.1 mg (73% d.Th. der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1274 $(M+H)^+$.

**Beispiel 313**

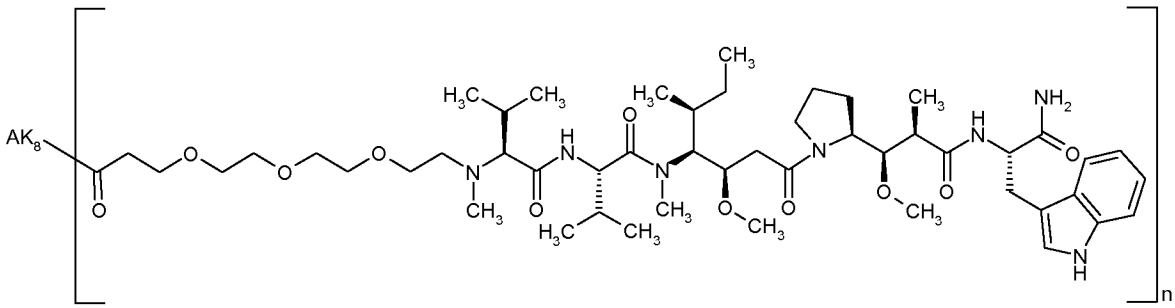


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.23 mg/ml

Drug/mAb Ratio: ~1-1.5

**Beispiel 314**

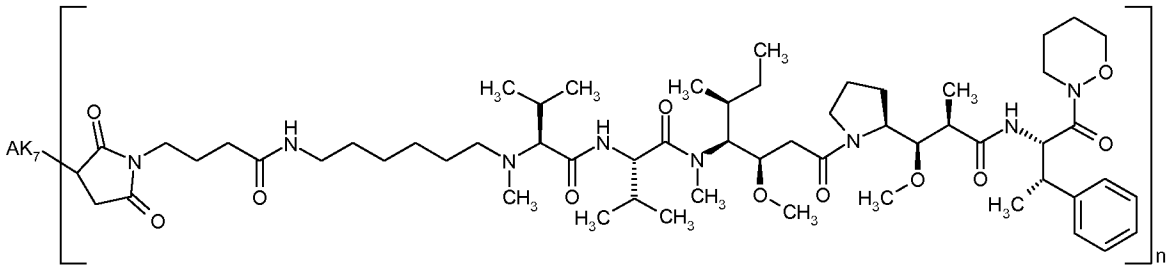


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.98 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.8

**Beispiel 315**

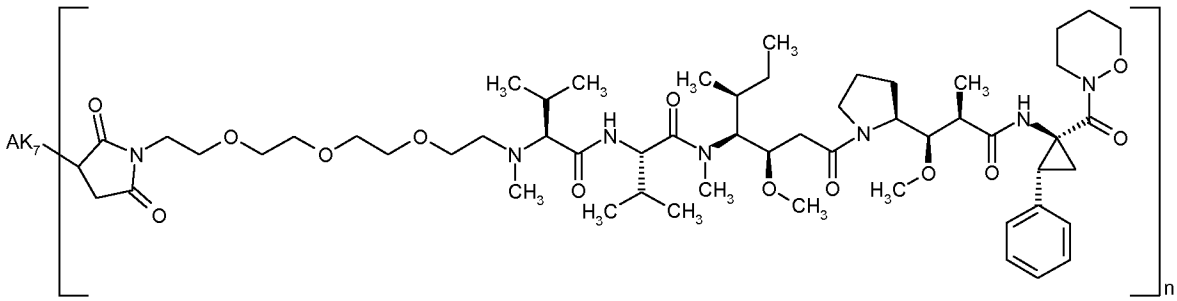


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.0 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3

**Beispiel 316**

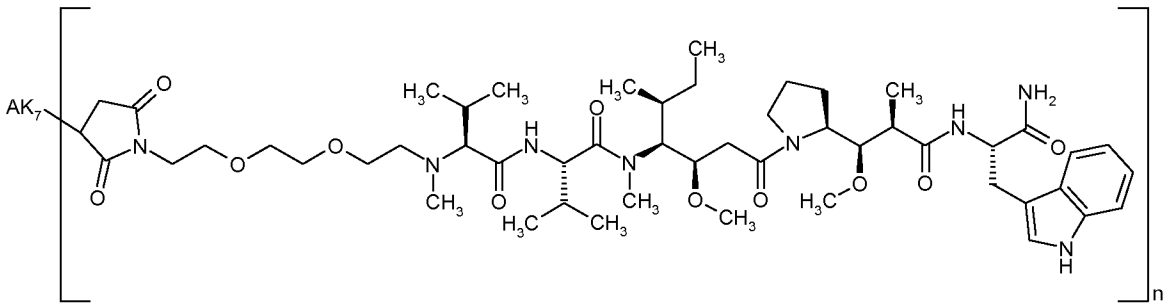


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.59 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

**Beispiel 317**

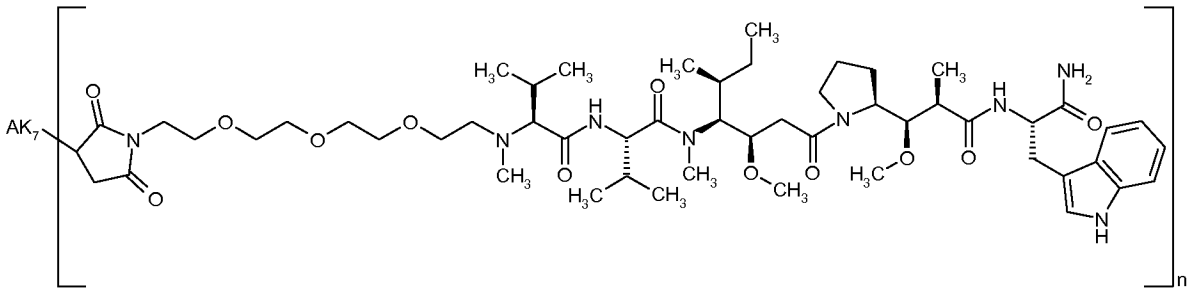


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.75 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.3

**Beispiel 318**

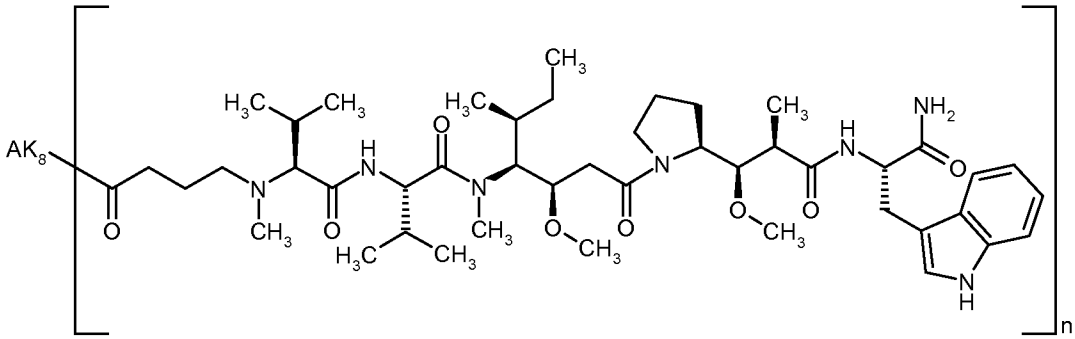


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.54 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

**Beispiel 319**

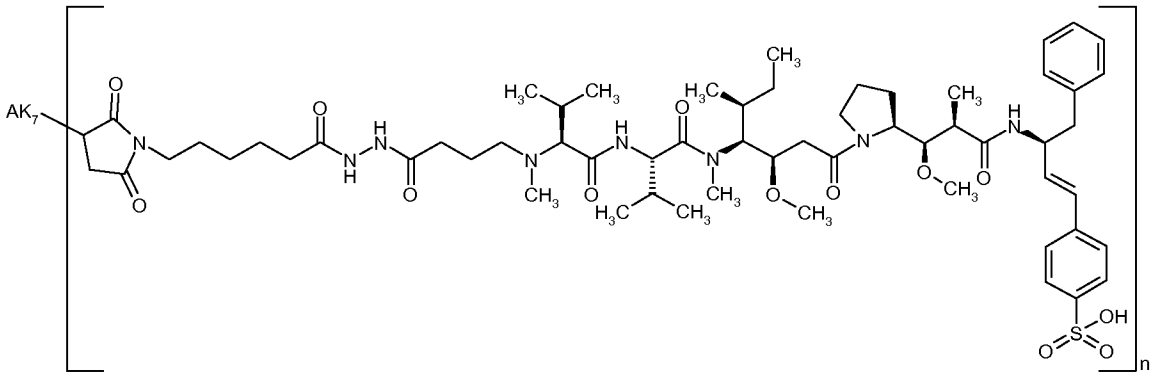


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 2 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.1

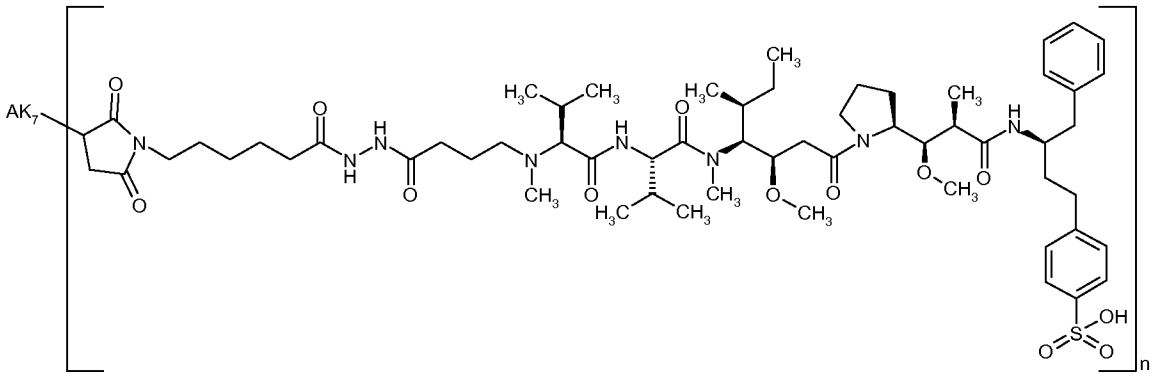
**Beispiel 320**



Protein Konzentration: 1.66 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.9

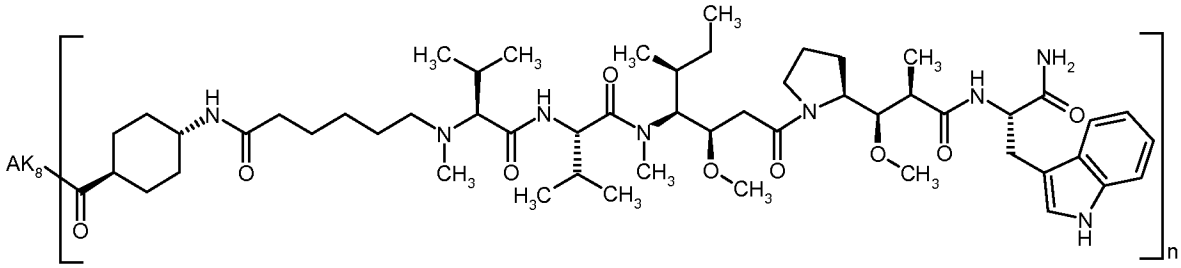
**Beispiel 321**



Protein Konzentration: 1.7 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

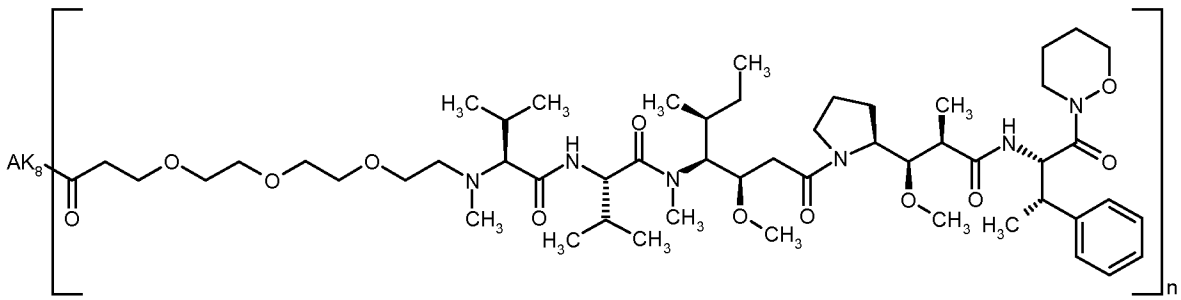
**Beispiel 322**



Protein Konzentration: 1.08 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

**Beispiel 323**

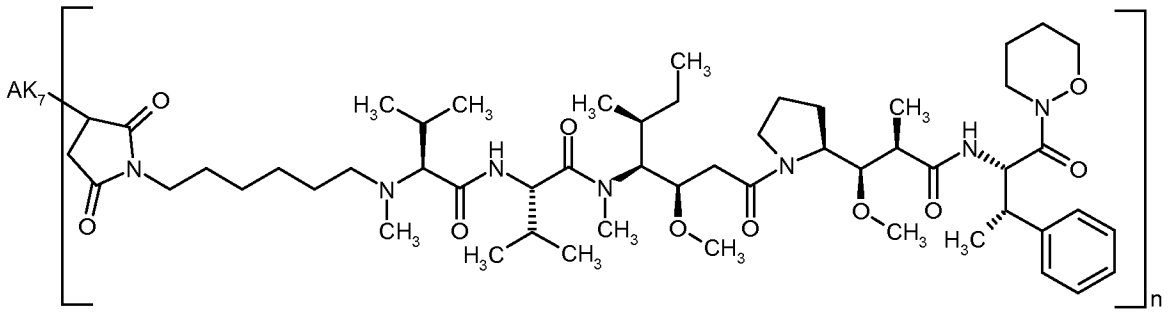


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 324**

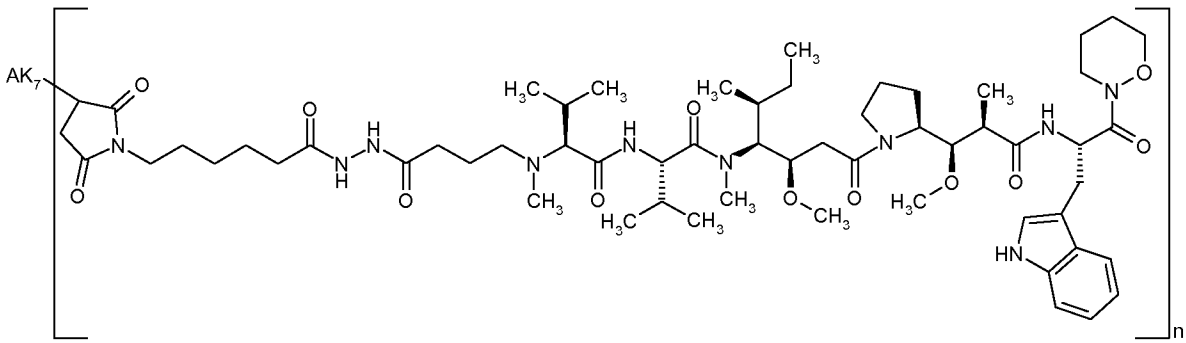


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.7 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.4

**Beispiel 325**

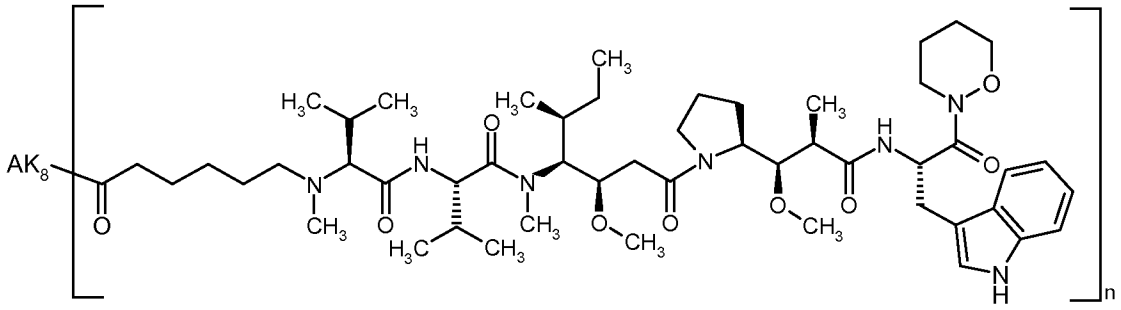


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.53 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.6

**Beispiel 326**

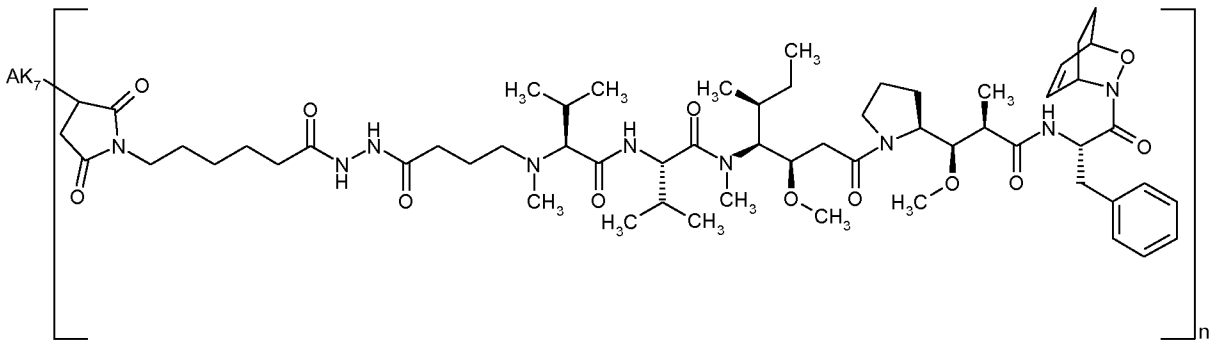


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.77 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 6.1

**Beispiel 327**

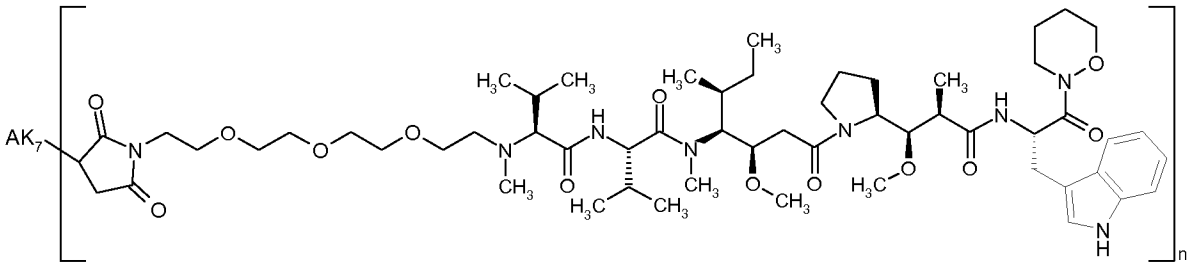


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.14 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

**Beispiel 328**

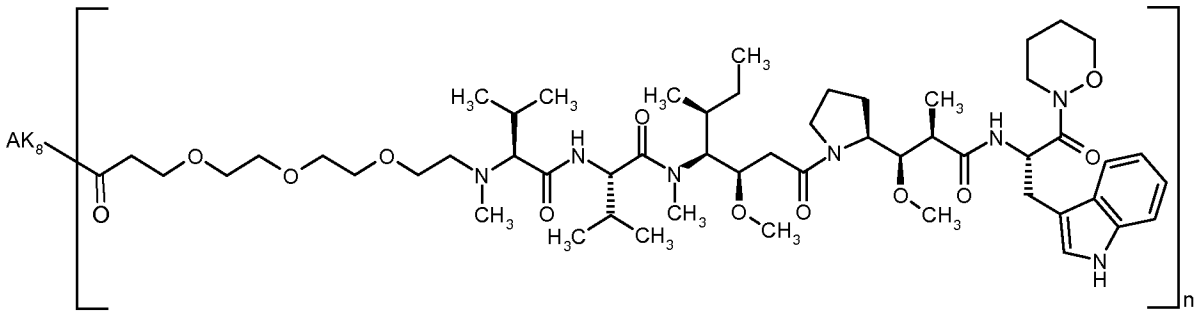


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

**Beispiel 329**

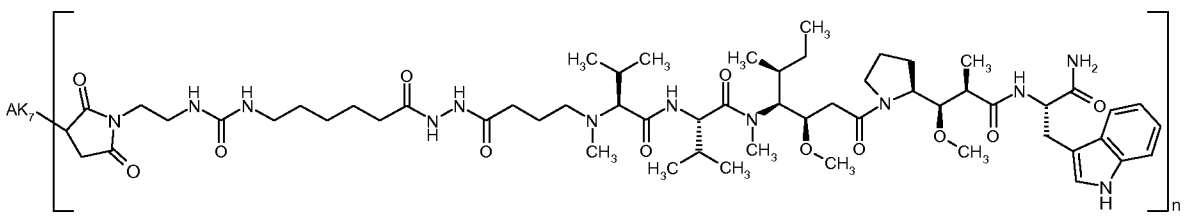


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.72 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 330**

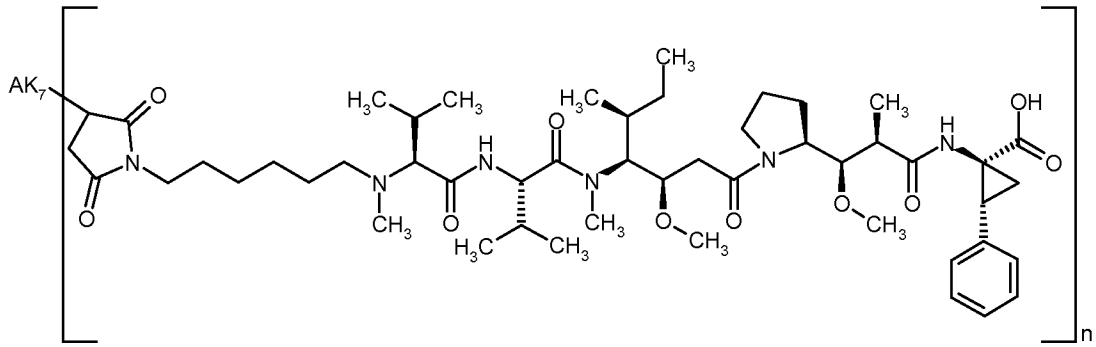


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.56 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 331**

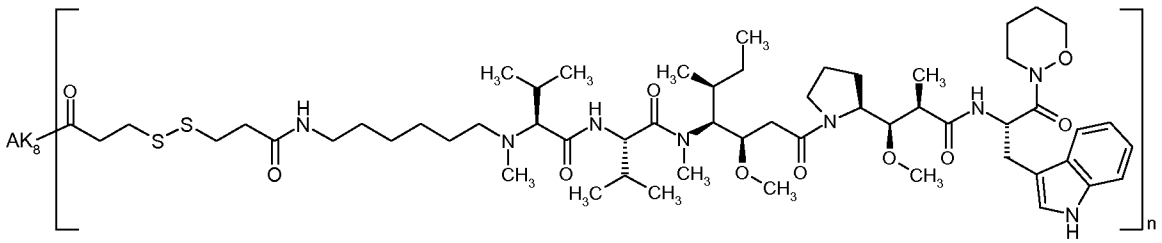


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.81 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

**Beispiel 332**

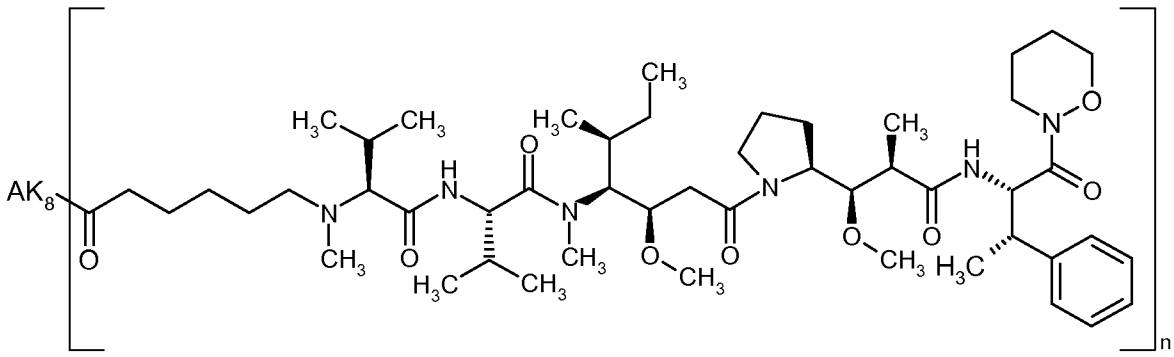


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.54 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.3

**Beispiel 333**



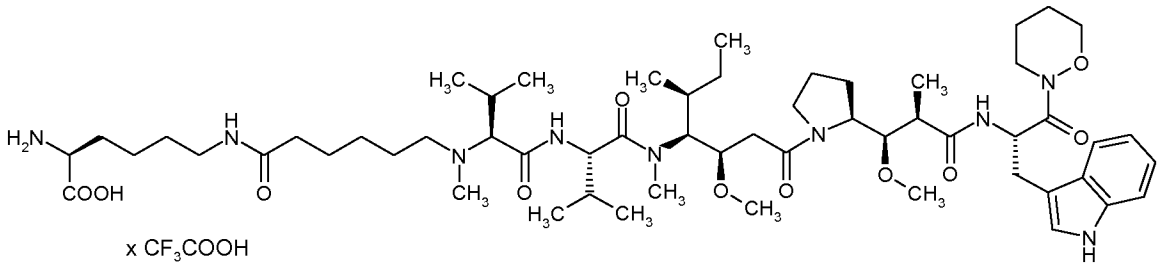
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.72 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 334**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



15.5 mg (15 µmol) von Intermediat 210 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 4.4 mg (18 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 7.7 µL (44 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 14 mg (81% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml Trifluoressigsäure entschützt wurde. Das

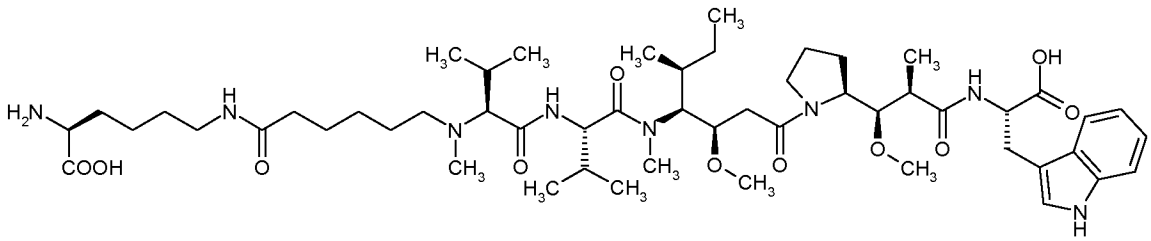
Reaktionsgemisch wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser (1:1) wurden 15 mg (97% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.79 min; MS (ESIpos): m/z = 1083 $(M+H)^+$.

**Beispiel 335**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



40 mg (40 µmol) von Intermediat 227 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 11.5 mg (40 µmol) $N^2$-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-lysin sowie 13 µL (80 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 32.5 mg (70% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten.

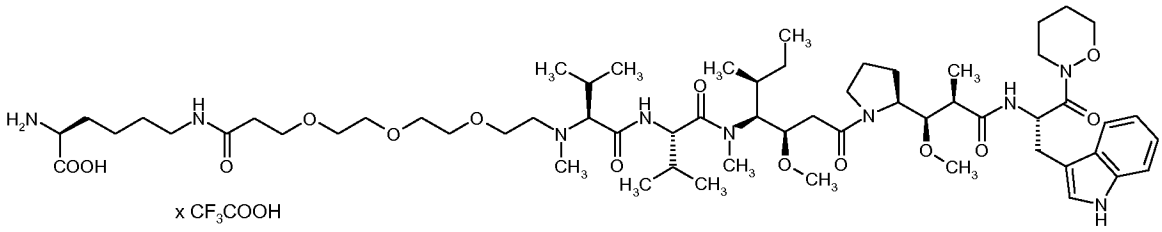
32.5 mg dieses Intermediats wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 30 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation des Rückstandes aus Dioxan/Wasser (1:1) wurden 26 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1014 $(M+H)^+$.

**Beispiel 336**

N-[(18S)-18-Amino-18-carboxy-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azaoctadec-1-yl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat

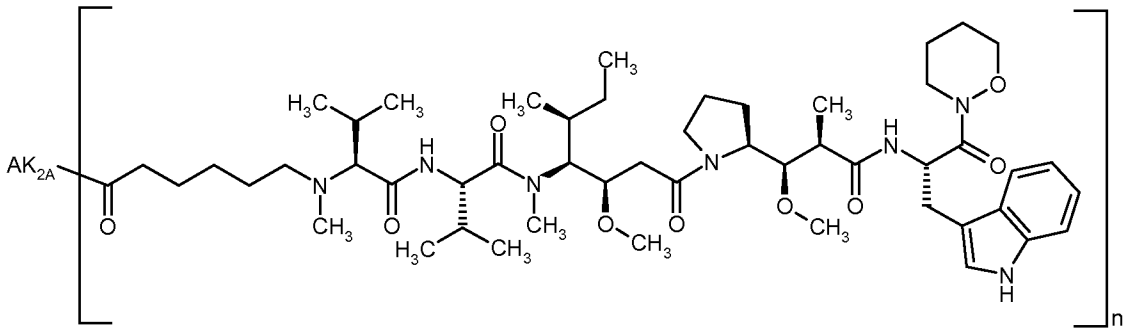



3.5 mg (3 µmol) von Intermediat 202 wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 0.8 mg (3 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 1.6 µL (10 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen, mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurde 1 mg (25% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 500µl Dichlormethan aufgenommen und mit 500µl Trifluoressigsäure entschützt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser (1:1) wurde 1 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1173 $(M+H)^+$.

**Beispiel 337**

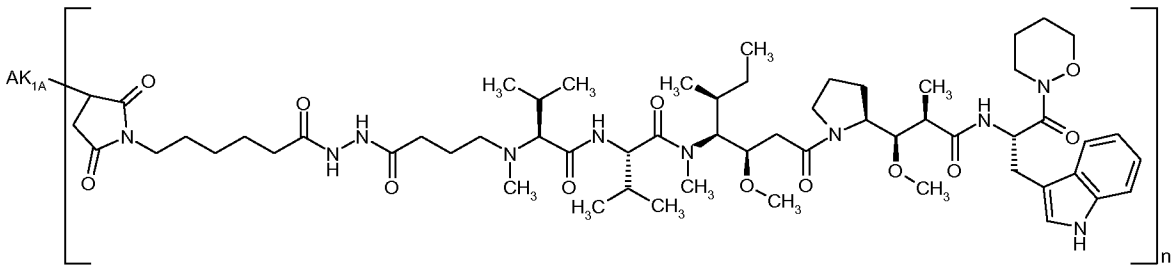


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.6

**Beispiel 338**

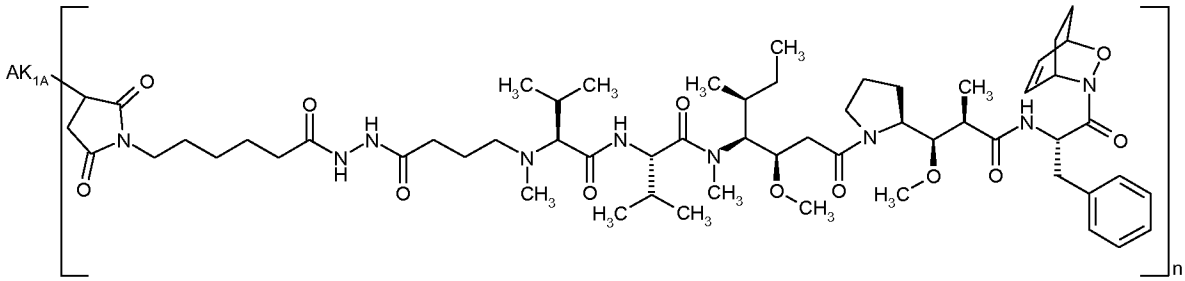


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.48 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

**Beispiel 339**

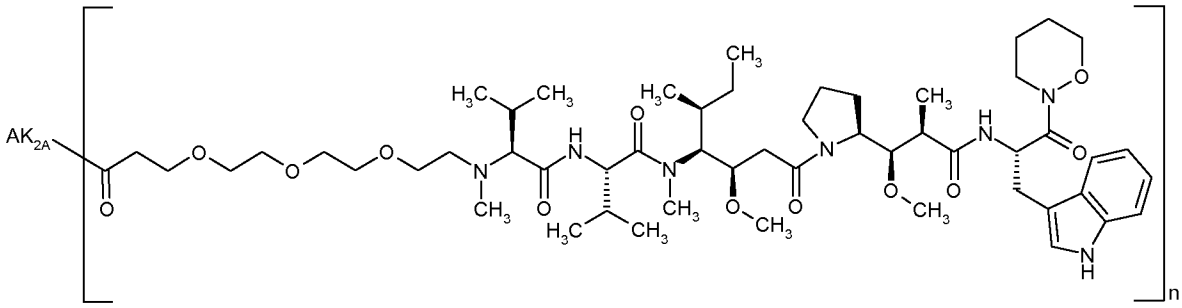


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.21 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

**Beispiel 340**

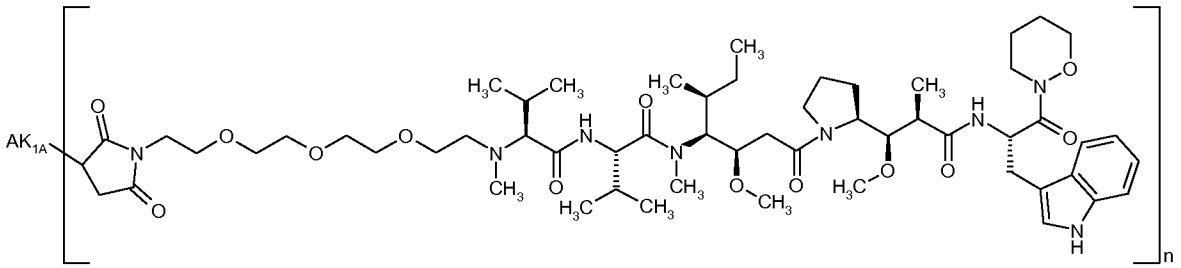


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.75 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.4

**Beispiel 341**

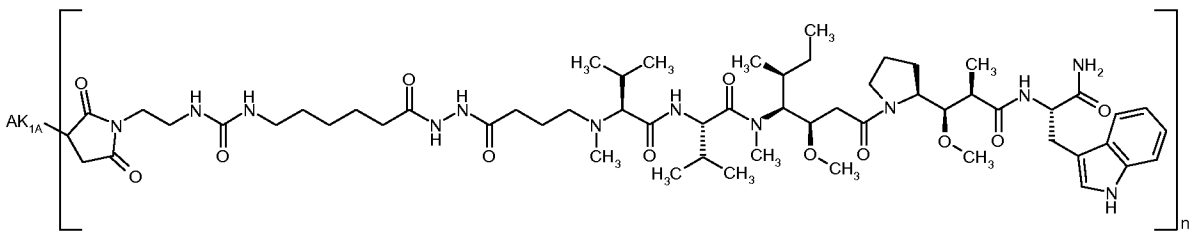


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.69 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 342**

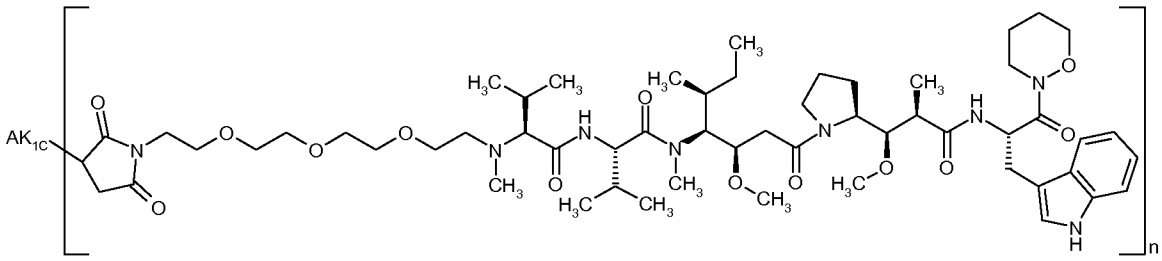


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 343**

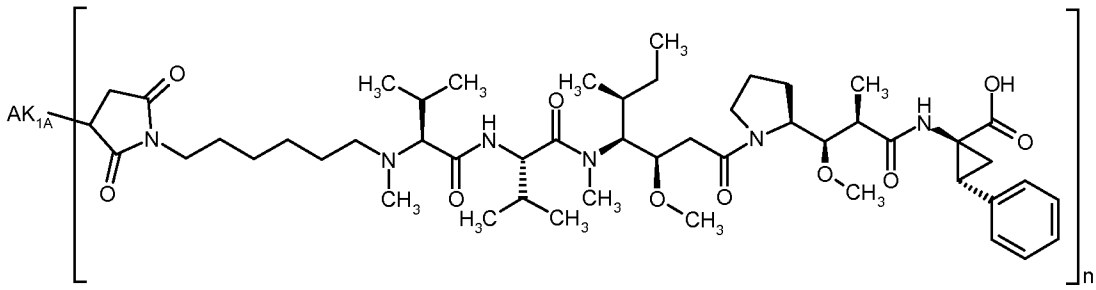


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Panitumumab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.27 mg/ml

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

**Beispiel 344**

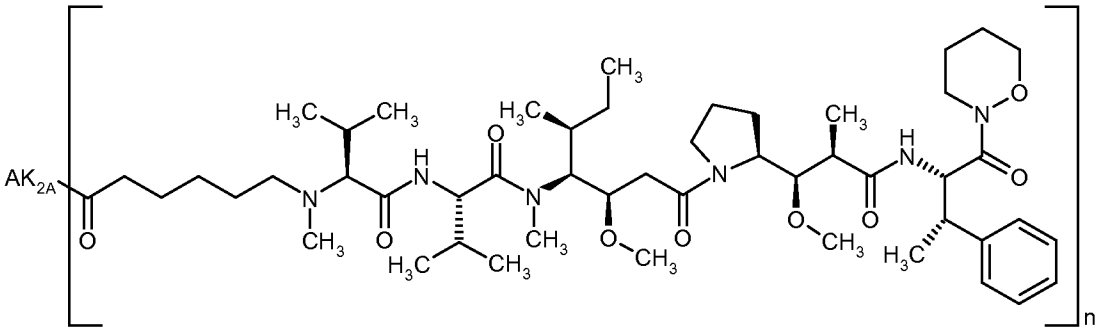


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.55 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

**Beispiel 345**

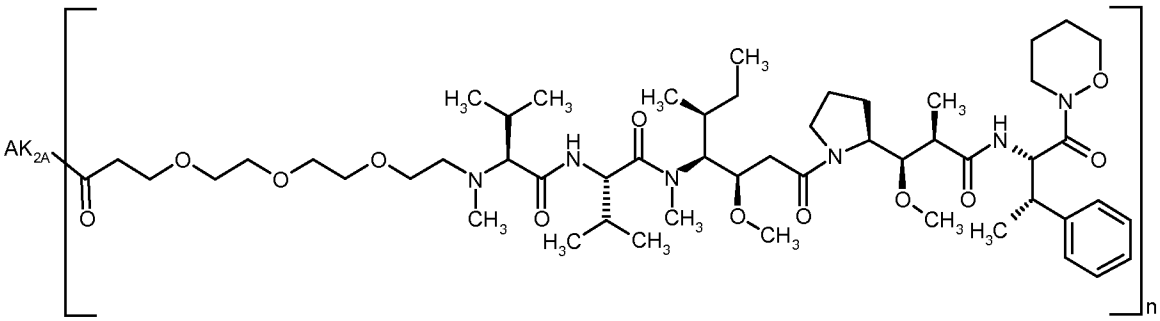


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.67 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.5

**Beispiel 346**

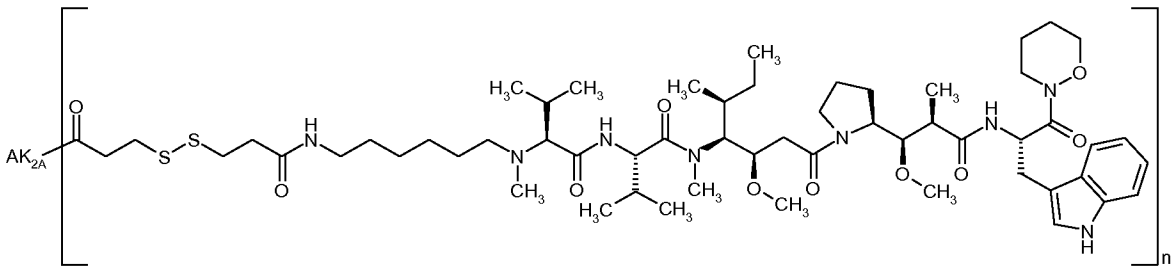


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

**Beispiel 347**

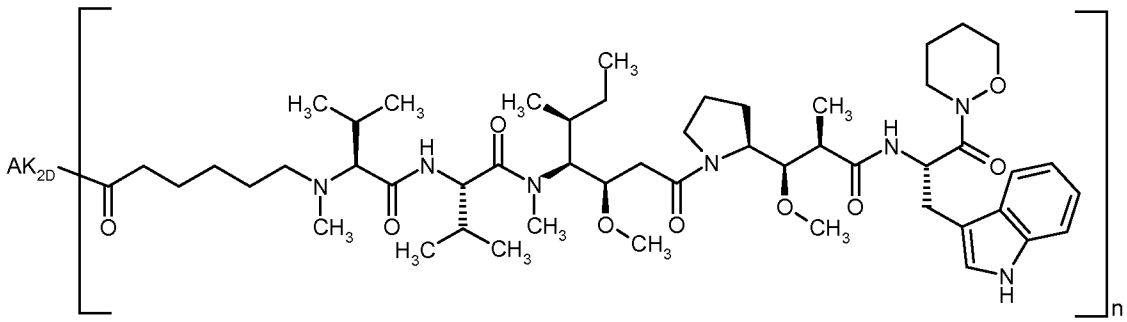


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.73 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.2

**Beispiel 348**

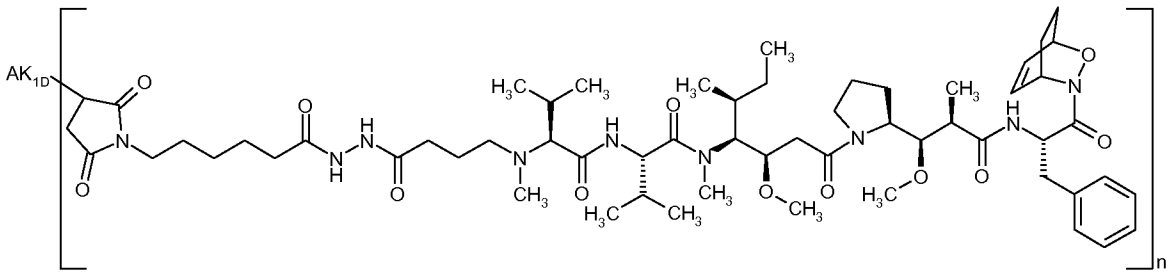


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 2 mg anti-PDL1 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.04 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.8

**Beispiel 349**

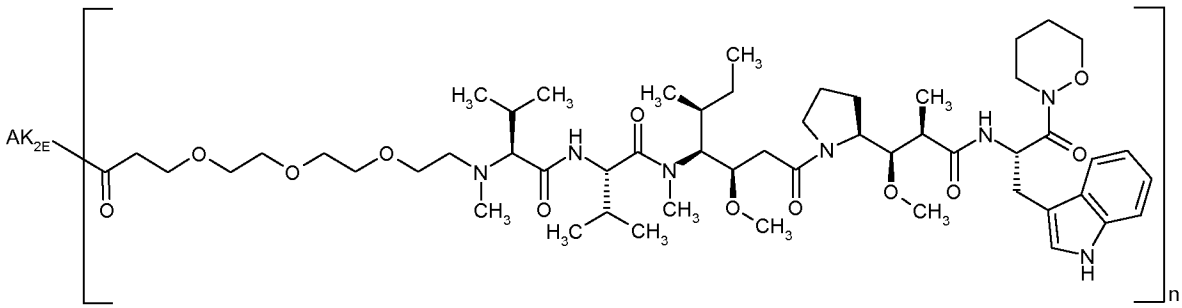


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 3 mg anti-PDL1 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.7 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.3

**Beispiel 350**

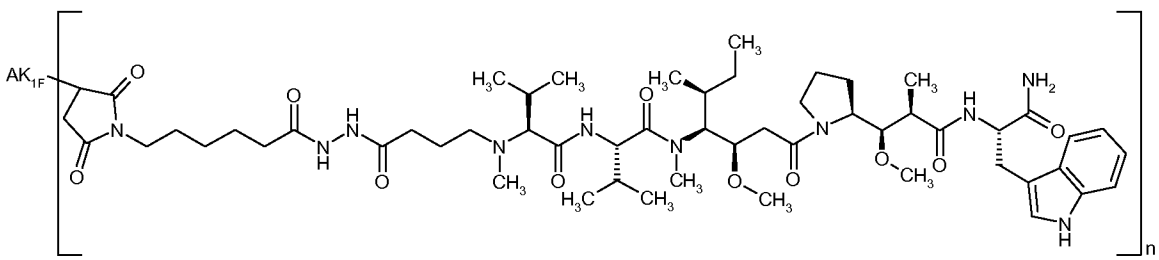


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 2 mg anti-ICOSLG in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.77 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.7

**Beispiel 351**

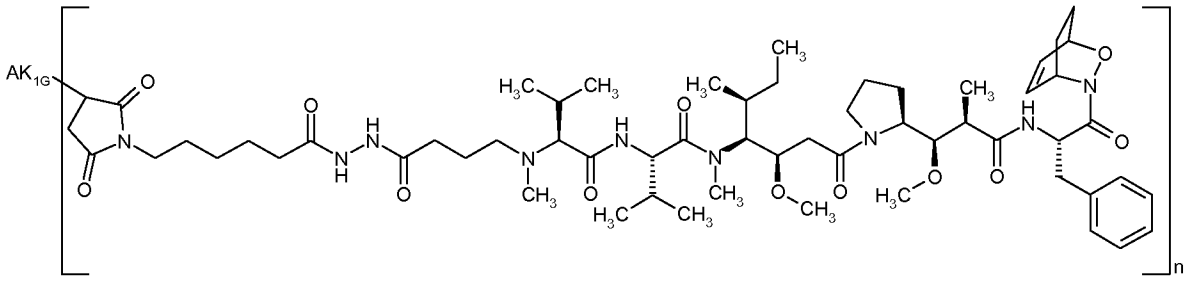


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 4 mg anti-FGFR3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.41 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

**Beispiel 352**

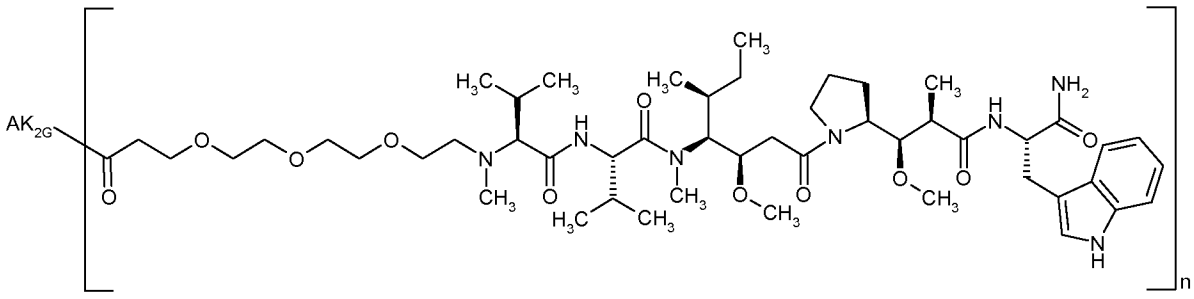


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 3 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.49 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.3

**Beispiel 353**

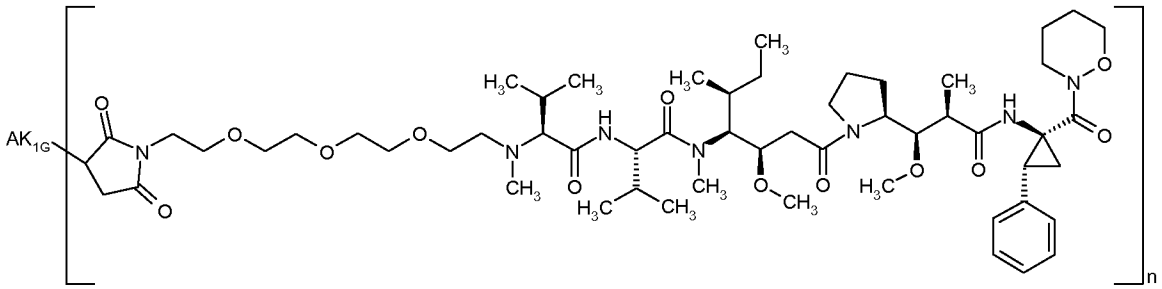


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.62 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 5.0

**Beispiel 354**

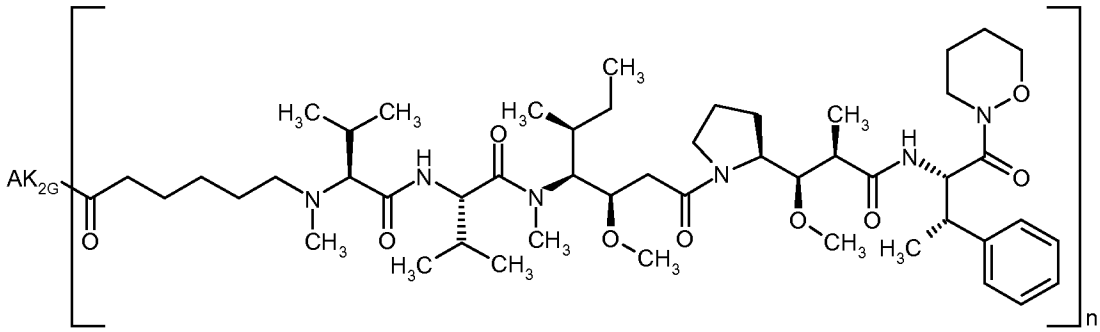


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.63 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

**Beispiel 355**

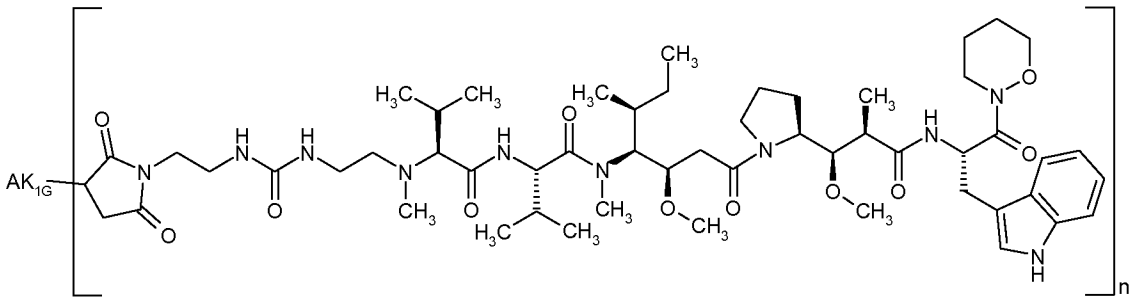


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.65 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.9

**Beispiel 356**

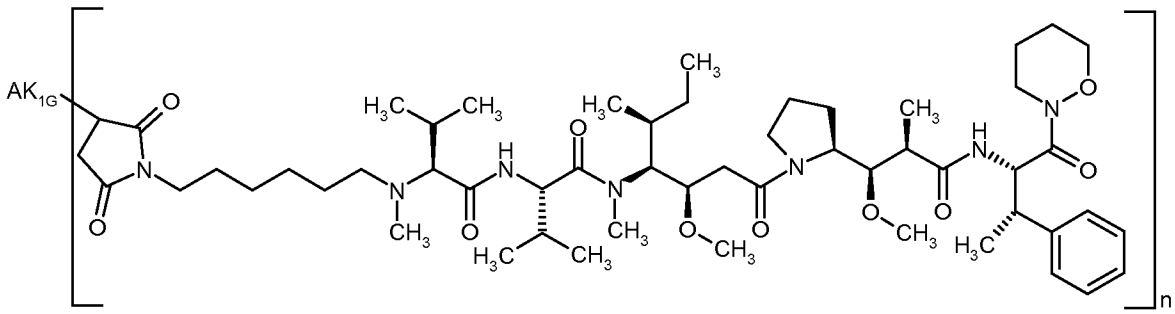


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.78 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.1

**Beispiel 357**

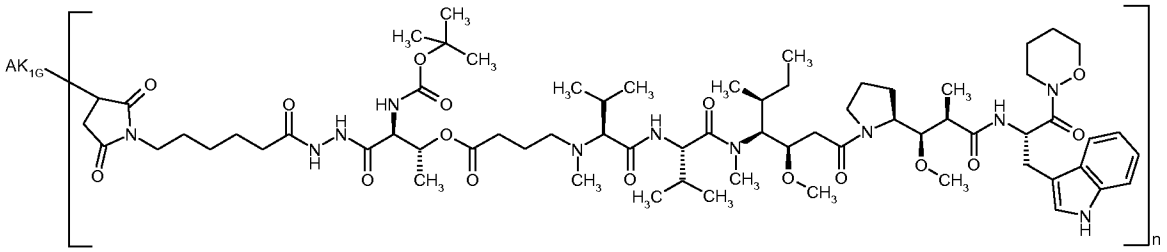


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.72 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.2

**Beispiel 358**

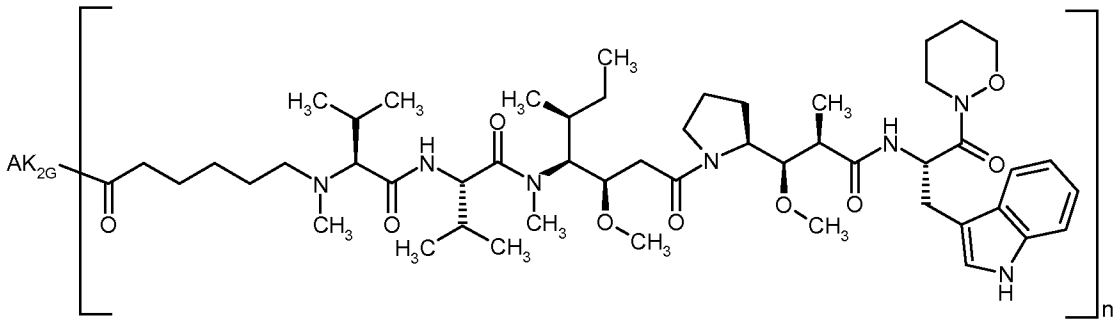


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.95 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: ~3.7

**Beispiel 359**



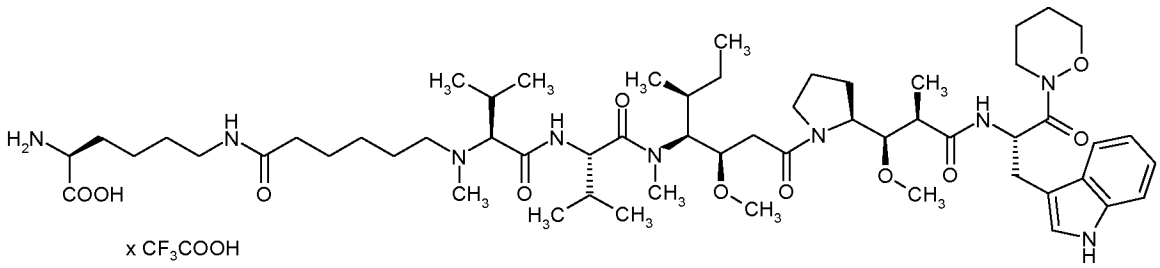
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Herceptin in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.79 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 9.1

**Beispiel 360**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



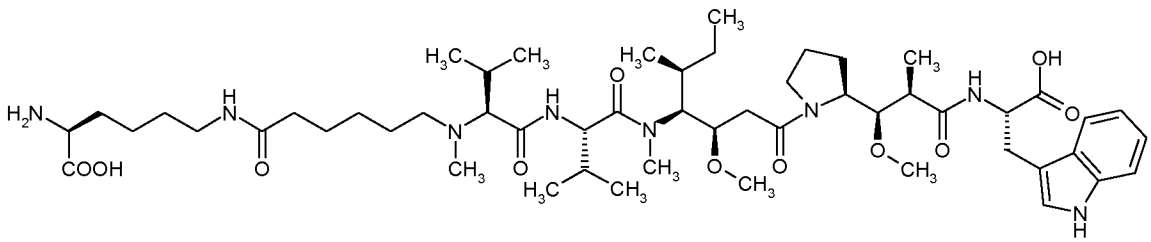
15.5 mg (15 µmol) von Intermediat 210 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 4.4 mg (18 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 7.7 µL (44 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 14 mg (81% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml Trifluoressigsäure entschützt wurde. Der Ansatz wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser (1:1) wurden 15 mg (97% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.79 min; MS (ESIpos): m/z = 1083 $(M+H)^+$.

**Beispiel 361**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid



40 mg (40 µmol) von Intermediat 227 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 11.5 mg (40 µmol) $N^2$-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-lysin sowie 13 µL (80 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 32.5 mg (70% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten.

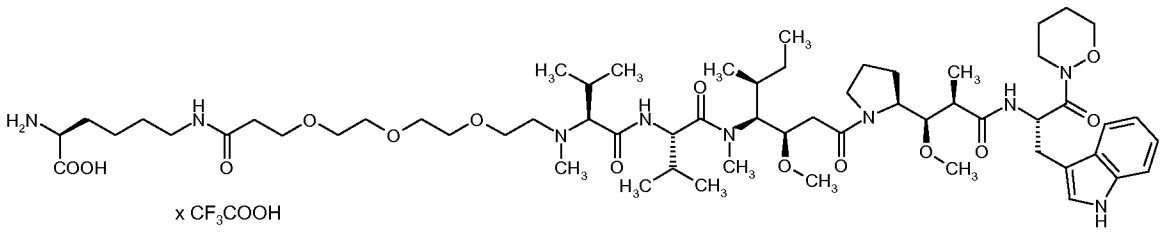
32.5 mg dieses Intermediats wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 30 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation des Rückstandes aus Dioxan/Wasser (1:1) wurden 26 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1014 $(M+H)^+$.

**Beispiel 362**

N-[(18S)-18-Amino-18-carboxy-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azaoctadec-1-yl]-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat

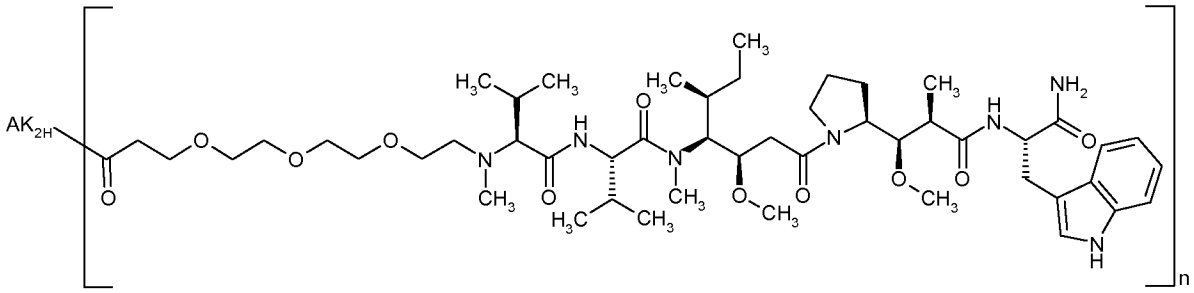



3.5 mg (3 µmol) von Intermediat 202 wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 0.8 mg (3 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 1.6 µL (10 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen, mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurde 1 mg (25% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 500µl Dichlormethan aufgenommen und mit 500µl Trifluoressigsäure entschützt wurde. Der Ansatz wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser (1:1) wurde 1 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1173 $(M+H)^+$.

**Beispiel 363**

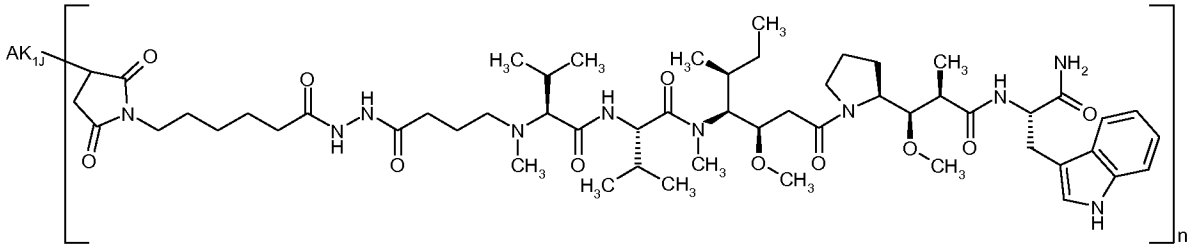


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 2.2 mg anti-TYRP1 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.14 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.1

**Beispiel 364**

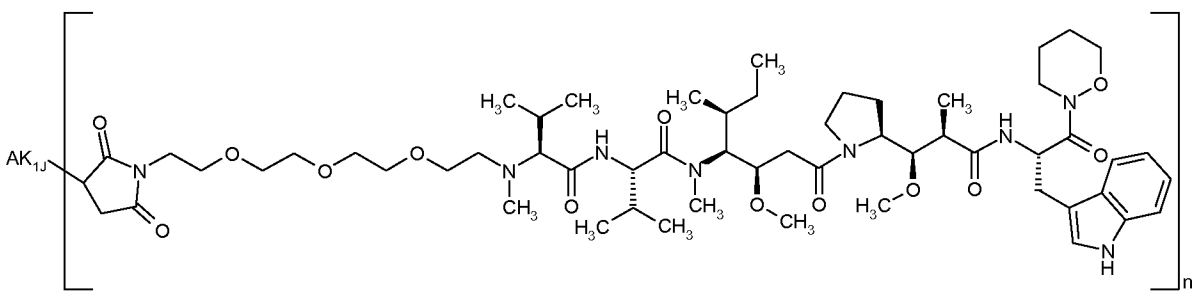


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 3 mg anti-Glypican-3 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.17 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

**Beispiel 365**

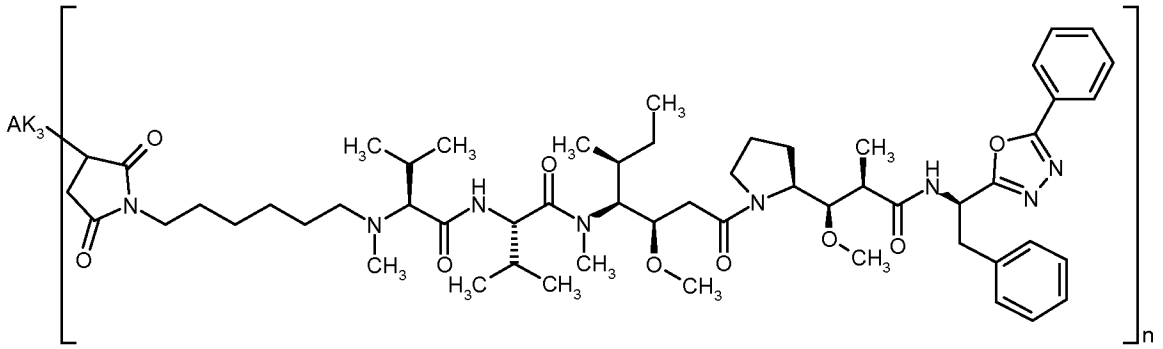


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 3 mg anti-Glypican-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.25 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 366**

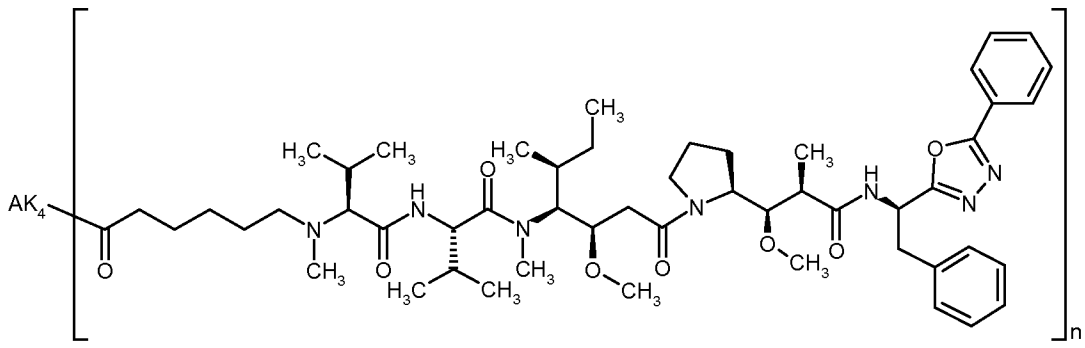


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 0.81 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

**Beispiel 367**

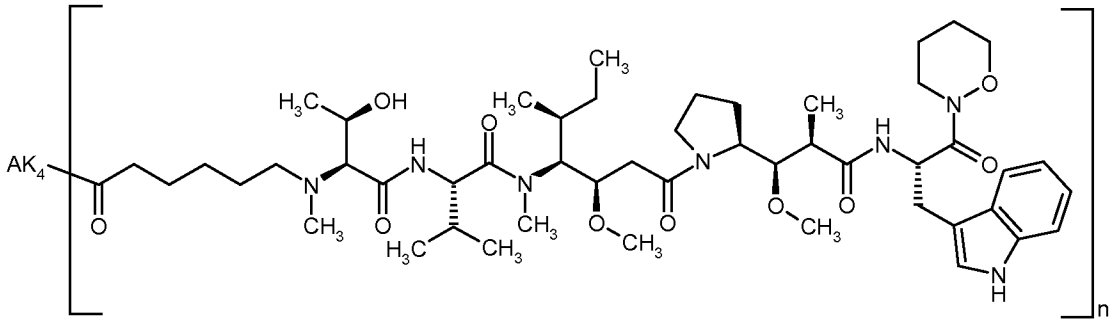


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.06 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

**Beispiel 368**

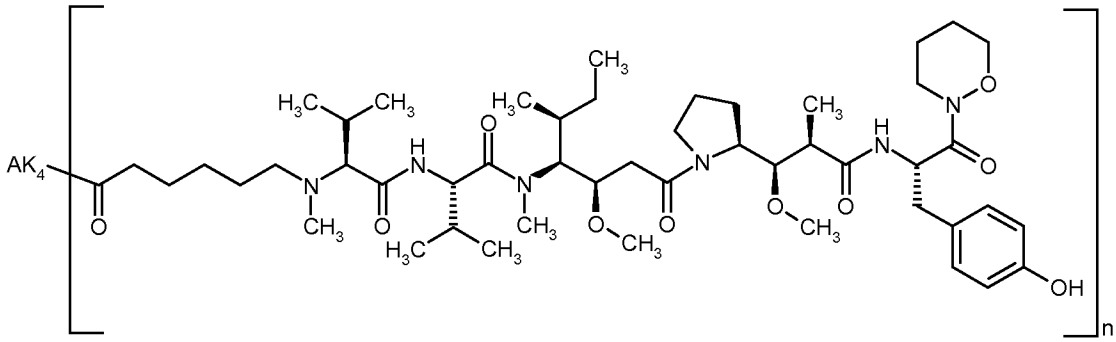


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.36 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 7.2

**Beispiel 369**

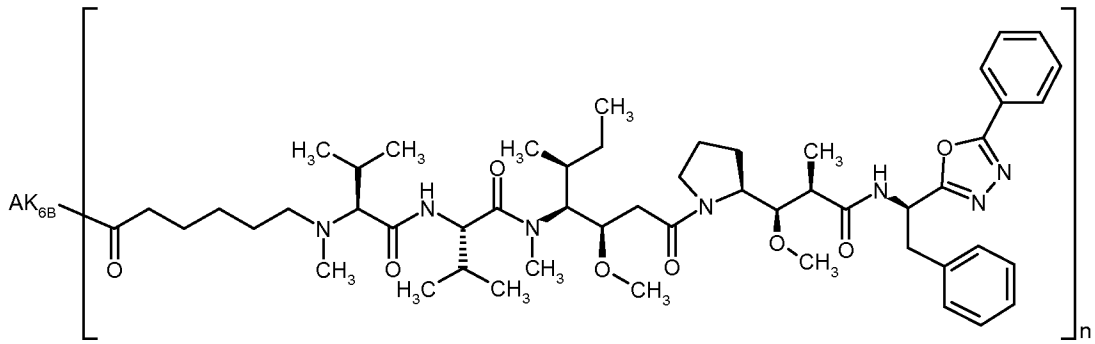


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.9

**Beispiel 370**

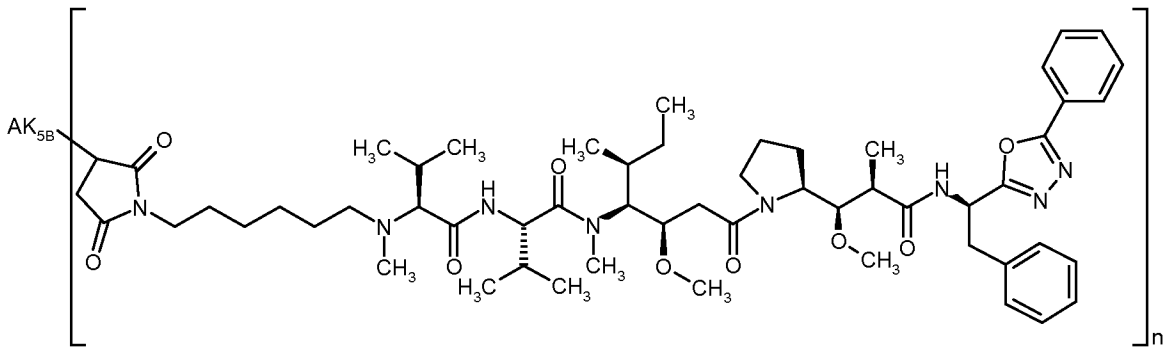


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 0.89 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.8

**Beispiel 371**

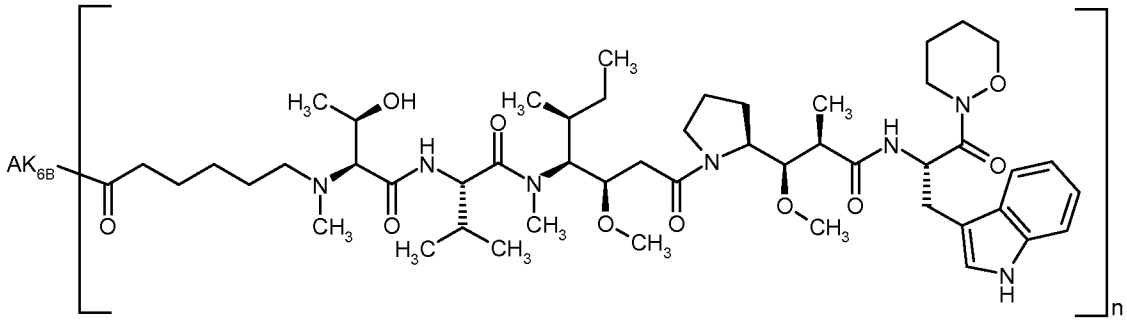


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 0.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.5

**Beispiel 372**

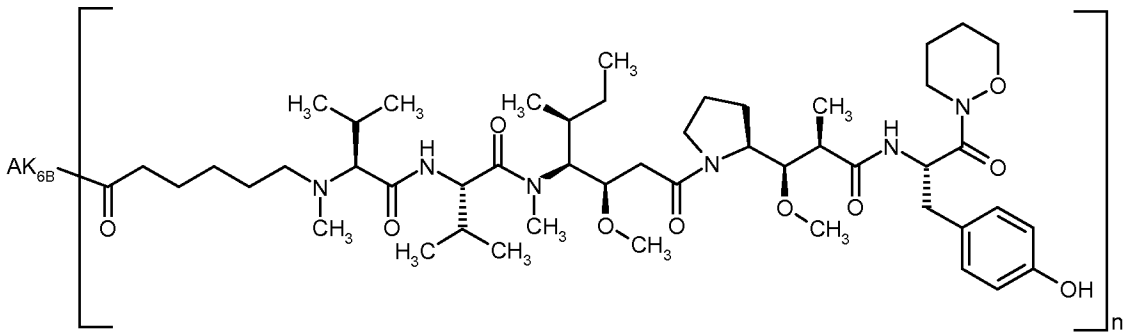


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.39 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 7.1

**Beispiel 373**

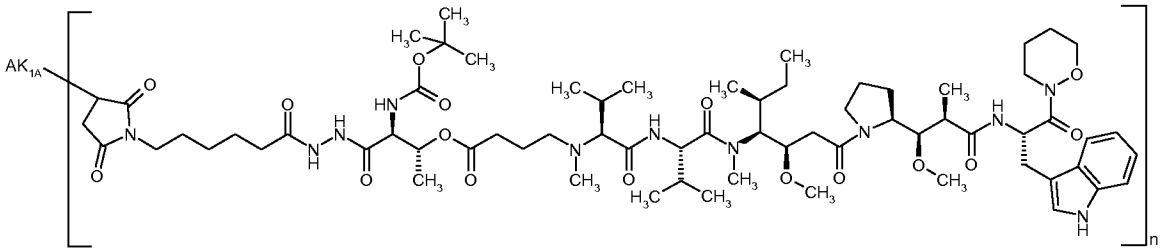


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.54 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

**Beispiel 374**

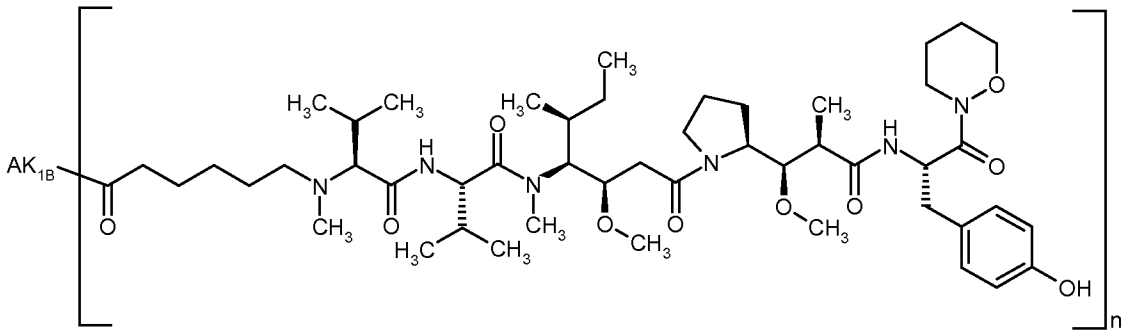


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.55 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 1.8

**Beispiel 375**

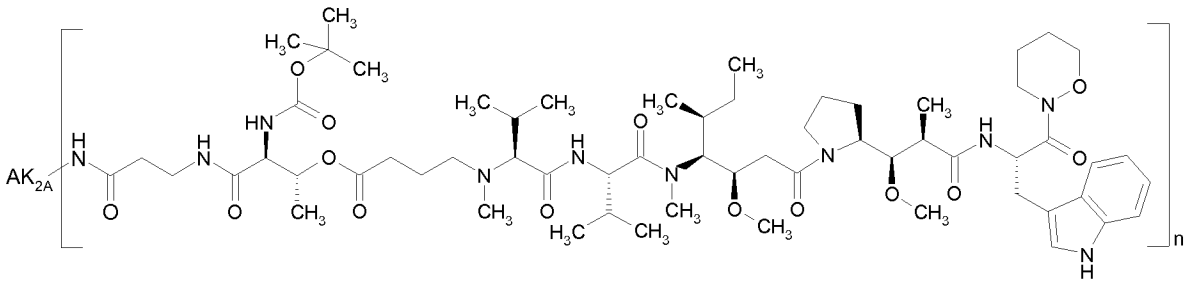


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.36 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 1.9

**Beispiel 376**

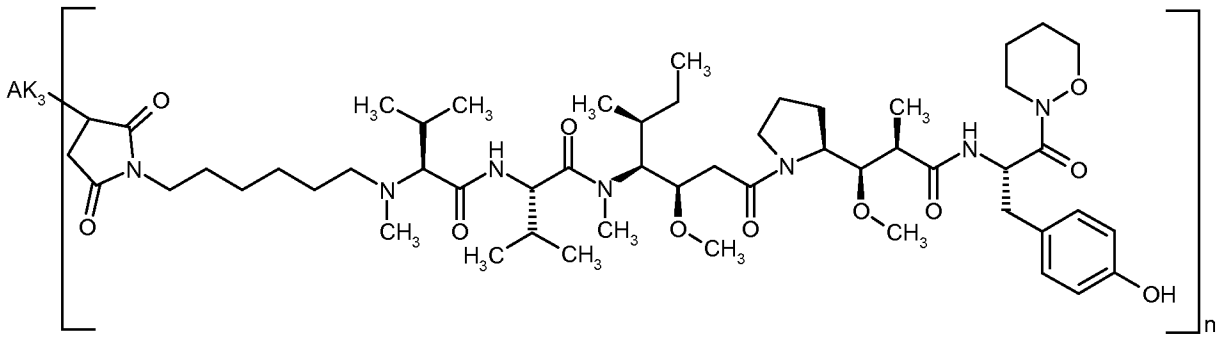


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg Cetuximab in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.73 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 3.7

**Beispiel 377**

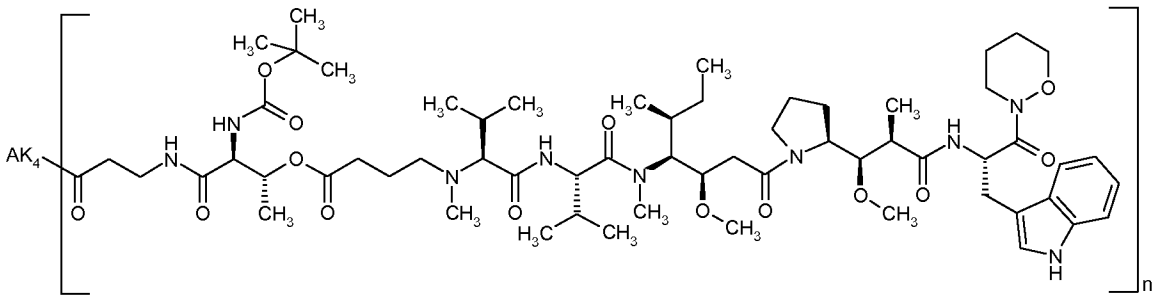


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.44 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.5

**Beispiel 378**

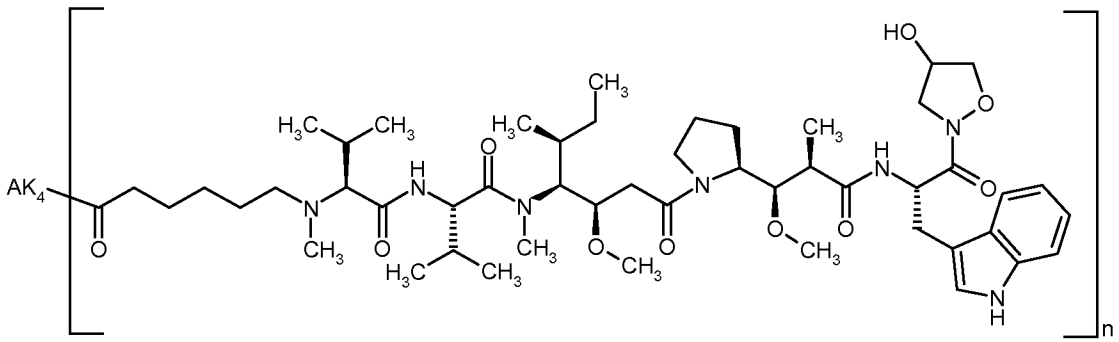


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg MF-Ta in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.74 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 3.6

**Beispiel 379 (Diastereomer 1)**

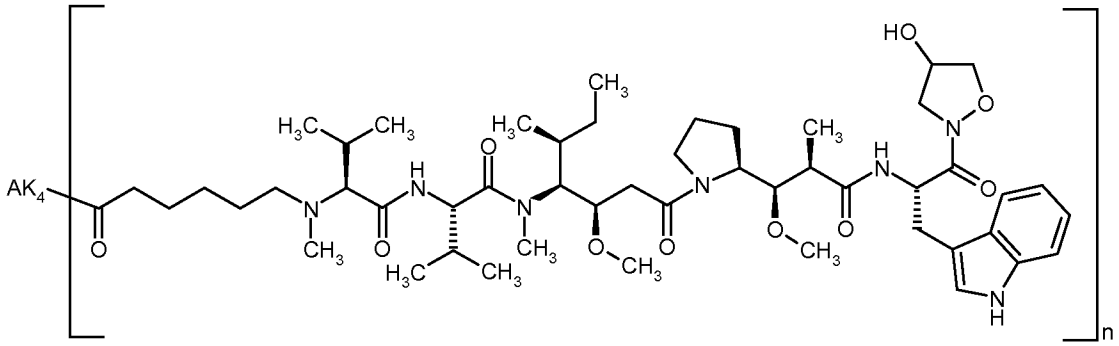


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung Intermediat 247a und 5 mg MF-Ta in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.57 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.2

**Beispiel 380 (Diastereomer 2)**



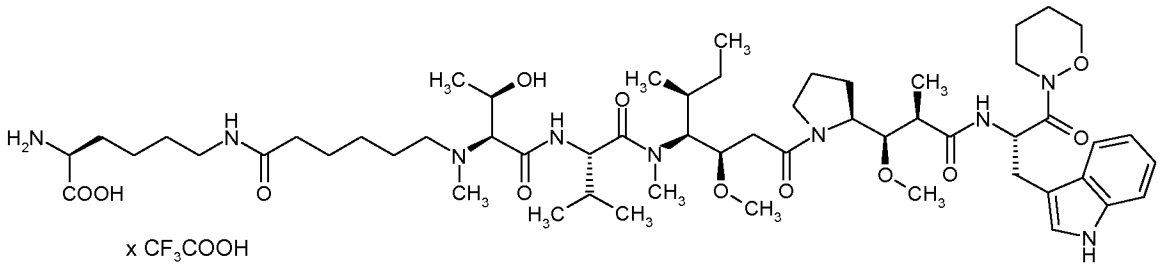
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung Intermediat 247b und 5 mg MF-Ta in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.42 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

**Beispiel 381**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-threonyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



8.6 mg (8 µmol) von Intermediat 240 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 4.0 mg (16 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 2 µL (16 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4h bei RT gerührt, dann nochmals mit den gleichen Mengen $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin und *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden 7 mg (72% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 0.5 ml

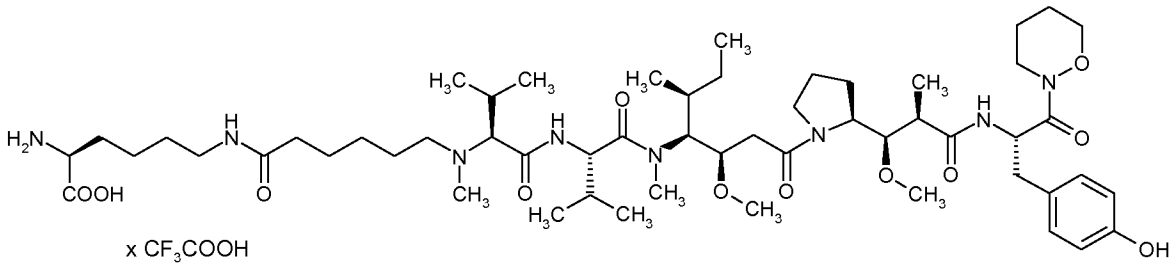
Trifluoressigsäure entschützt wurde. Der Ansatz wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden 3.3 mg (47% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 5): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 1084 $(M+H)^+$.

**Beispiel 382**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



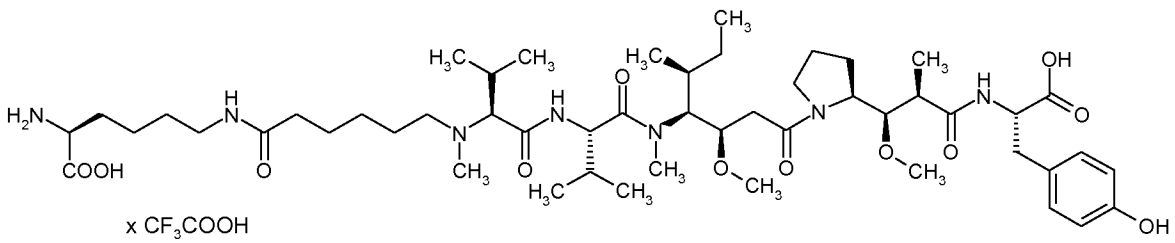

8 mg (8 µmol) von Intermediat 242 wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 2.9 mg (12 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 2.7 µL (16 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, dann nochmals mit den gleichen Mengen $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin und *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und dann weitere 4h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 6.5 mg (72% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten, das anschließend in 5 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 0.75 ml Trifluoressigsäure entschützt wurde. Der Ansatz wurde eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Dioxan/Wasser wurden 5 mg (76% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.7 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.69 min; MS (ESIpos): m/z = 1059 $(M+H)^+$.

**Beispiel 383**

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat



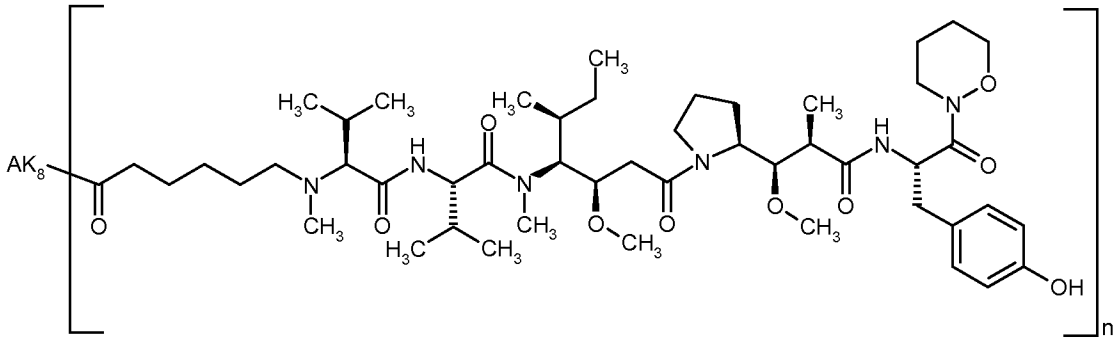

38 mg (41 µmol) von Intermediat 248 wurden zunächst in den N-Hydroxysuccinimid-ester überführt. 72 mg des erhaltenen Rohproduktes wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 24 mg (100 µmol) $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 23 µL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, dann nochmals mit 16 mg $N^2$-(tert.-Butoxycarbonyl)-L-lysin und 12 µL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und anschließend weitere 2h im Ultraschallbad behandelt. Dann wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 20 mg (50% d.Th.) des geschützten Intermediats der Titelverbindung erhalten.

15 mg (12 µmol) von diesem Intermediat wurden anschließend in 3 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 40 min Rühren bei RT wurden weitere 1.5 ml Trifluoressigsäure zugegeben und der Ansatz 1 h im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde der Ansatz eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Dioxan/Wasser wurden 13 mg (90% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 12): $R_t$ = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): $R_t$ = 0.68 min; MS (ESIpos): m/z = 990 $(M+H)^+$.

**Beispiel 384**

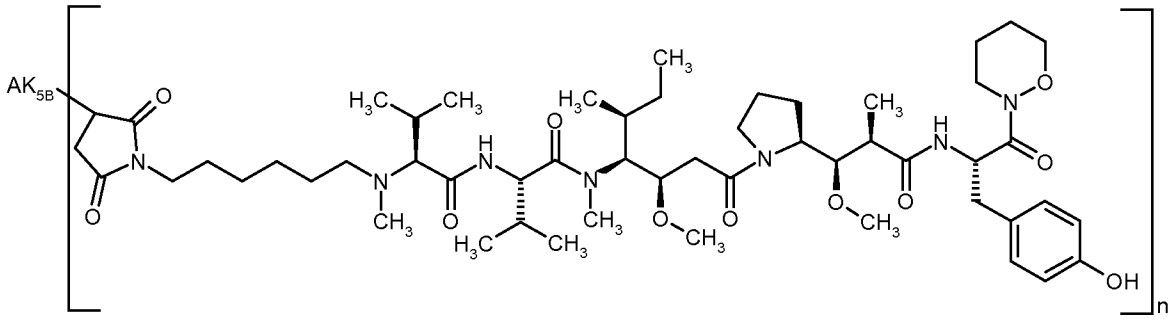


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-CA9 in PBS und das Reaktionsgemisch wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.4 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.0

**Beispiel 385**

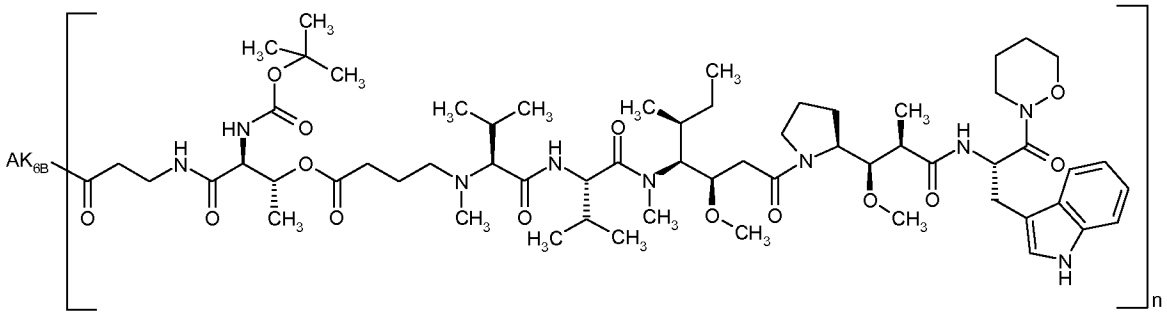


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.48 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 2.4

**Beispiel 386**

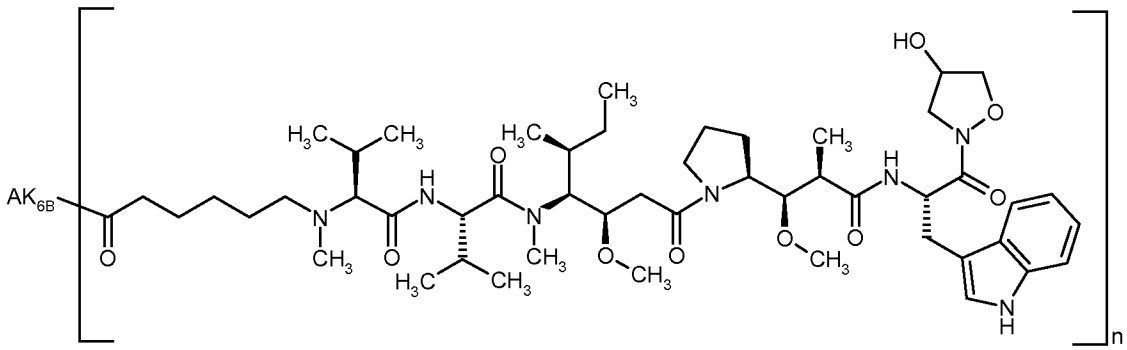


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Proteinkonzentration: 1.43 mg/ml

Drug/mAb-Ratio: 3.6

**Beispiel 387 Diastereomer 1**

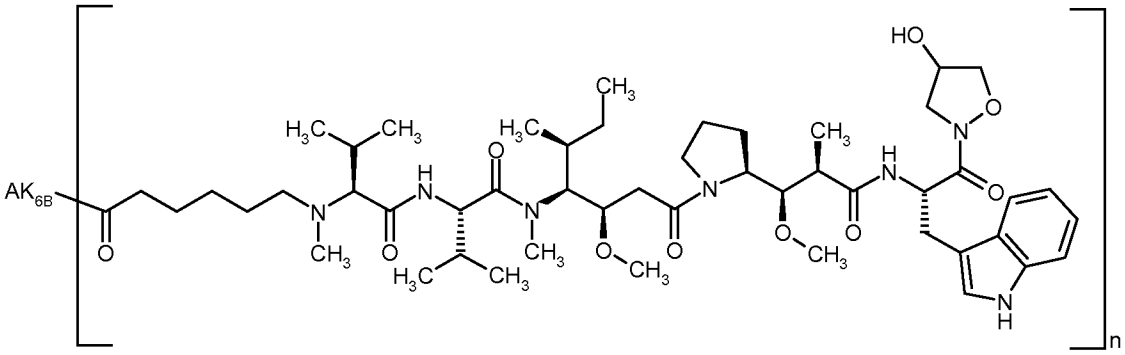


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung Intermediat 247a und 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.45 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.8

**Beispiel 388 Diastereomer 2**



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung Intermediat 247a und 5 mg anti-C4.4a B01-3 in PBS und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.42 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 4.0

## C. Bewertung der biologischen Wirksamkeit

Die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Verbindungen kann durch in vitro- und in vivo-Untersuchungen, wie sie dem Fachmann bekannt sind, nachgewiesen werden.

Die biologische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen wurde in den nachstehend beschriebenen Assays gezeigt:

### C-1.1 In vitro Zellproliferationstest

Um die Wirkung von anti-EGFR ADCs zu testen werden humane Tumorzellen verwendet, die EGFR exprimieren. Dies sind z.B. NCI-H292 oder A431 mit hoher Expression. Als Kontrolle für die EGFR-abhängige Cytotoxizität dienen Zellen mit niedriger EGFR Expression wie z.B. HT29 oder Zellen mit praktisch keiner EGFR Expression wie NCI-H520.

Versuchsbeschreibung

Tag 1: Die Zellen werden in 100 µl/well in Medium in einer 96-well Platte (Perkin Elmer, weiß, Cat.6005680) ausplattiert. In einer Parallelplatte werden Zellen für die Nullzeitpunktbestimmung ausplattiert. Alle Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tag 2: Es wird eine 3fache Verdünnungsreihe der Testsubstanzen in Medium hergestellt und 100µL von den 3fach Verdünnungen / well in die Platten pipettiert. Die Platten werden im Brutschrank bei 37°C für 96h inkubiert. Messung der Nullzeitpunktplatte: 100µL/well CTG Lösung (Promega Cell Titer Glo solution (Catalog # G755B and G756B)) werden in die entsprechenden wells pipettiert und 2min auf einem Schüttler + 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Lumineszenz mit dem Gerät VICTOR V (Perkin Elmer) gemessen.

Tag 6: Messung aller anderen Ansätze: 100µL/Well CTG Lösung (Promega Cell Titer Glo solution (Catalog # G755B and G756B)) werden in die entsprechenden wells pipettiert und 2min auf einem Schüttler + 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Lumineszenz mit dem Gerät VICTOR V (Perkin Elmer) gemessen.

Die Lumineszent wird als Marker für die Anzahl lebender Zellen verwendet.

Der Messwert der Nullzeitpunktplatte wird gleich Null gesetzt, der Messwert der Zellen, die nur in Medium ohne Wirksubstanz inkubiert wurden wird gleich 100 Prozent gesetzt. Es ergibt sich eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve, aus der eine $IC_{50}$ bestimmt werden kann (Software GraphPadPrism).

A431: 2500 Zellen / well, Medium: DMEM Hams; Biochrom, #FG4815 + 10% FCS

NCI-H292: 2500 Zellen / well, Medium: RPMI1640; Biochrom, #FG1215 + 10% FCS

HT29 2500 Zellen / well, Medium: DMEM Hams; Biochrom, #FG4815 + 10% FCS

Substanzen, die die Zellproliferation bei <1 x $10^{-7}$ M hemmen, werden als wirksam eingestuft.

Substanzen, die die Zellproliferation bei <1 x $10^{-9}$ M hemmen, werden als besonders gut wirksam eingestuft.

In der folgenden Tabelle 3 sind die $IC_{50}$-Werte[1)] repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt.

Tabelle 3

| **Beispiel** | **$IC_{50}$ [nM] A431** | **$IC_{50}$ [nM] NCI-H292** | **$IC_{50}$ [nM] HT29** |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.03 | < 0.03 | < 0.03 |
| 2 | 1.50 | | 1.47 |
| 3 | 0.28 | | 0.12 |
| 4 | 0.19 | | 0.17 |
| 5 | < 0.03 | < 0.03 | < 0.03 |
| 6 | 2.79 | 0.79 | 6.22 |
| 7 | 0.91 | 0.06 | 10.40 |
| 10 | 0.08 | < 0.03 | 2.46 |
| 11 | 2.91 | 0.36 | 46.70 |
| 12 | 0.39 | < 0.03 | 0.27 |
| 13 | 1.59 | 0.49 | 2.94 |
| 38 | 0.60 | 0.24 | 1.06 |

[1)]Die angegebenen Wirkdaten beziehen sich auf auf die konkret beschriebenen ADC Batches und können bei anderen Batches mit anderen Drug/Antibody Ratios ggf. abweichen.

C-1.2 Protokoll Proliferationsassay mit kurzer Substanzinkubation (Puls-Assay)

Das Protokoll wird wie oben beschrieben durchgeführt. Jedoch wird nach 4 Stunden Inkubation mit den Testsubstanzen die Substanz wieder abgesaugt, und durch frisches Medium ersetzt. Die Auswertung erfolgt wie oben nach insgesamt 96 Stunden.

In der folgenden Tabelle 4 sind die $IC_{50}$-Werte[1) 2)] repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt.

Tabelle 4

| Beispiel | Antikörper | A431 | NCI H292 |
|---|---|---|---|
| 7 | Cetuximab | 0.99 | 0.01 |
| 8 | Nimotuzumab | >200 | 34.4 |
| 9 | Panitumumab | 90.5 | 26.4 |
| 10 | Cetuximab | 0.0526 | 0.0884 |
| 14 | Cetuximab | 0.258 | 0.248 |
| 15 | Cetuximab | 13.4 | 3.5 |
| 16 | Cetuximab | 0.943 | 0.689 |
| 17 | Cetuximab | 0.285 | 0.133 |
| 18 | Cetuximab | 17.4 | 3.63 |
| 19 | Cetuximab | | 0.89 |
| 20 | Cetuximab | 31.9 | 42.3 |
| 21 | Nimotuzumab | 54.6 | 120 |
| 22 | Panitumumab | 44.3 | 51.8 |
| 23 | Cetuximab | 88.1 | 124 |
| 24 | Nimotuzumab | 111 | >200 |
| 25 | Panitumumab | 53 | 77 |
| 26 | Cetuximab | 10.6 | 3.02 |
| 27 | Nimotuzumab | 11.4 | 20.4 |
| 28 | Panitumumab | 5.78 | 8.6 |
| 29 | Cetuximab | 0.37 | 0.03 |
| 30 | Panitumumab | 23.2 | 3.34 |
| 31 | Nimotuzumab | 13.71 | 4.24 |
| 32 | Cetuximab | 50.8 | 20.4 |
| 33 | Nimotuzumab | 49 | 42 |
| 34 | Panitumumab | 51.1 | 32.2 |
| 35 | Cetuximab | 0.716 | 0.125 |
| 36 | Cetuximab | 0.357 | 0.0589 |

| Beispiel | Antikörper | A431 | NCI H292 |
|---|---|---|---|
| 37 | Cetuximab | 0.52 | 0.17 |
| 38 | Cetuximab | | 7.21 |
| 39 | Cetuximab | 1.49 | 0.03 |
| 40 | Nimotuzumab | 36 | 2.38 |
| 41 | Panitumumab | 110 | 6.91 |
| 42 | Cetuximab | 2.84 | 0.0949 |
| 43 | Cetuximab | 2.44 | 0.587 |
| 44 | Cetuximab | 0.456 | 0.571 |
| 52 | Cetuximab | >200 | 0.961 |
| 53 | Cetuximab | 0.253 | 0.133 |
| 54 | Cetuximab | 166 | 1.83 |
| 55 | Cetuximab | 1.47 | 0.11 |
| 337 | Cetuximab | 0.175 | 0.0746 |
| 338 | Cetuximab | 1.79 | 0.152 |
| 339 | Cetuximab | 2.57 | 0.194 |
| 340 | Cetuximab | 0.225 | 0.101 |
| 341 | Cetuximab | 2.25 | 0.232 |
| 342 | Cetuximab | 24.5 | 0.267 |
| 343 | Panitumumab | >200 | 20.3 |

[1)]Die angegebenen Wirkdaten beziehen sich auf auf die konkret beschriebenen ADC Batches und können bei anderen Batches mit anderen Drug/Antibody Ratios ggf. abweichen.

[2)]Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 (A431) bzw. 3 (NCI-H292) Experimenten.

C-1.3 Bestimmung des Einflusses auf die Tubulinpolymerisation

Krebszellen sind entartete Zellen, die häufig auch durch eine gesteigerte Zellteilung zu einer Tumorbildung führen. Microtubuli bilden die Spindelfasern des Spindelapparates und sind ein essentieller Bestandteil des Zellzyklus. Der geregelte Auf- und Abbau von Microtubuli ermöglicht die genaue Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen und stellt einen kontinuierlich dynamischen Prozess dar. Eine Störung dieser Dynamik führt zu einer fehlerhaften Zellteilung und letztlich zum Zelltod. Die gesteigerte Zellteilung von Krebszellen macht diese jedoch auch besonders empfänglich gegenüber Spindelfasergiften, die einen festen Bestandteil der Chemotherapie darstellen. Spindelfasergifte wie Paclitaxel oder Epothilon führen zu einer stark erhöhten Polymerisationsgeschwindigkeit der Microtubuli, während Vinca-Alkaloide oder auch Monomethylauristatin E (MMAE) zu einer stark reduzierten Polymerisationsgeschwindigkeit der Microtubuli führen. In

beiden Fällen ist die notwendige Dynamik des Zellzyklus empfindlich gestört. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung untersuchten Verbindungen führen zu einer reduzierten Polymerisationsgeschwindigkeit der Microtubuli.

Zur Untersuchung der Tubulinpolymerisation wurde das "Fluorescence-based Microtubule Polymerisation Assay Kit" der Firma Cytoskeleton (Denver, Colorado, USA; Bestellnummer: BK011) verwendet. Bei diesem Assay wird unpolymerisiertem Tubulin GTP zugesetzt, womit die Polymerisation spontan stattfinden kann. Der Assay beruht auf der Bindung des Fluorophors 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) an Tubulin. Freies und gebundenes DAPI können aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektra differenziert werden. Da DAPI eine deutlich höhere Affinität gegenüber polymerisiertem im Vergleich zu nicht-polymerisiertem Tubulin zeigt, läßt sich die Tubulinpolymerisation über die Zunahme der Fluoreszenz gebundener DAPI-Fluorophore verfolgen.

Zur Durchführung dieses Assays wurden die in DMSO gelösten Testsubstanzen von ihrer Ausgangskonzentration von 10 mM auf 1 µM in Wasser verdünnt. Neben der Puffer-Kontrolle wurde als Assay-Kontrolle auch polymerisationssteigernd Paclitaxel und andererseits polymerisationshemmend Vinblastin mitgeführt. Für die Messung wurden 96-well-Lochplatten mit halber Bodenfläche verwendet. Die Kinetik der Tubulinpolymerisation wurde 1 h lang bei 37°C in einem Fluorimeter verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug 355 nm, die Emission wurde bei 460 nm verfolgt. Für den Bereich des linearen Anstiegs innerhalb der ersten 10 Minuten wurde die Fluoreszenzänderung pro Minute ($\Delta$F/min) berechnet, welche die Polymerisationsgeschwindigkeit der Microtubuli darstellt. Die Potenz der Testsubstanzen wurde anhand der jeweiligen Reduktion der Polymerisationsgeschwindigkeit quantifiziert.

Der Wert der Inhibition von MMAF bei einer Konzentration von 1µM wird als 100% gesetzt.

In Tabelle 5 sind Daten zur Inhibition der Tubulin Polymerisation von repräsentativen Ausführungsbeispielen angegeben.

Tabelle 5

| **Toxophor/ Beispiel** | **Konzentration [µM]** | **% Inhibition der Tubulinpolymerisation** |
|---|---|---|
| MMAF | 1 | 100 |
| MMAF | 10 | 34 |
| MMAF | 100 | 0 |

| | | |
|---|---|---|
| 360 | 1 | 45 |
| 360 | 10 | 1 |
| 361 | 1 | 80 |
| 361 | 10 | 14 |
| 362 | 1 | 60 |
| 362 | 10 | 0 |
| 233 | 1 | 88 |
| 233 | 10 | 25 |
| 234 | 1 | 109 |
| 234 | 10 | 27 |
| 235 | 1 | 120 |
| 236 | 1 | 117 |
| 236 | 10 | 64 |
| 237 | 1 | 107 |
| 237 | 10 | 25 |
| 238 | 1 | 121 |
| 238 | 10 | 35 |
| 239 | 1 | 111 |
| 239 | 10 | 45 |
| 240 | 1 | 110 |
| 381 | 1 | 102 |

| | | |
|---|---|---|
| 381 | 10 | 31 |
| 382 | 1 | 88 |
| 382 | 10 | 21 |
| 383 | 1 | 90 |
| 383 | 10 | 17 |

Das Toxophore MMAF und die Ausführungsbeispiele hemmen konzentrationsabhängig die Tubulinpolymerisation. Bei 100 µM MMAF ist die Tubulinpolymerisation vollständig gehemm,t. Das Ausführungsbeispiel 115 hemmt die Tubulinpolymerisationsgeschwindigkeit bei 1 µM auf 45% des Wertes der bei 1 µM MMAF gemessen wird.

C-1.4 Wirksamkeitstest in vivo

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate wurde in vivo beispielsweise mittels Xenograft-Modellen getestet. Der Fachmann kennt Methoden im Stand der Technik, wie die Wirksamkeit eines erfindungsgemäßen Konjugats getestet werden kann (siehe z.B. WO2005081711; 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 Implantattieren entweder ein erfindungsgemäßes Konjugat oder ein Kontrollantikörper oder isotonische Salzlösung appliziert. Die Applikation erfolgte einmalig oder öfters. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Tagen wurde die Tumorgröße im Vergleich von Konjugat-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe bestimmt.

C-1.4a Wachstumshemmung / Regression von experimentellen Tumoren in der Maus

Humane Tumorzellen, die das Antigen für das ADC exprimieren, werden subkutan in die Flanke von immunsupprimierten Mäusen inokuliert, beispielsweise 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, frühestens bei einer Tumorgröße von 20 $mm^2$. Um die Wirkung auf größere Tumoren zu untersuchen, kann die Behandlung auch erst bei einer Tumorgröße von 50-100 $mm^2$ 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. 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. Diese Zahl kann sich erhöhen, wenn besonders starke Schwankungen beim Tumorwachstum oder nach der Behandlung zu erwarten sind. 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.

Am Ende des Experiments werden die Tumore entnommen und gewogen. Der Vergleich der mittleren Tumorgewichte der Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe wird als T/C angegeben.

C-1.4b Wirksamkeit im BxPC3 Pankreaskarzinom-Tumormodell

2 Mio BxPC3 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen inokuliert.

Bei einer Tumorgröße von 40 $mm^2$ an Tag 15 beginnt die Behandlung intravenös mit einer Dosis von 10 mg / kg (Tag 15, 19, 22). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 77 verfolgt. Die Tiere der Kontrollgruppe müssen bereits an Tag 50 aufgrund der großen Tumoren aus tierschutzrechtlichen Gründen fachgerecht getötet werden.

Ein nackter anti-EGFR-Antikörper zeigt ein verlangsamtes Tumorwachstum um ca. 14 Tage.

Tiere, die mit den anti-EGFR-ADCs behandelt werden (Beispiel 7 und Beispiel 10), zeigen ab dem Tag der Behandlung kein weiteres Tumorwachstum bis zum Ende des Experiments an Tag 77.

C-1.4c Wirksamkeit im NCI-H292 NSCLC Tumormodell

5 Mio NCI-H292 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen inokuliert.

Bei einer Tumorgröße von 100 $mm^2$ an Tag 15 beginnt die Behandlung intravenös mit einer Dosis von 3 mg / kg (Tag 15, 19, 23). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 27 verfolgt. Am Ende des Experiments werden die Tumoren entnommen und gewogen. Das

Experiment wird an Tag 27 beendet, weil die Tiere der Kontrollgruppe aufgrund der großen Tumore euthanisiert werden müssen. Die Tiere, die mit nacktem anti-EGFR Antikörper behandelt wurden zeigen eine Tumorwachstumshemmung. Die Tiere, die mit den anti-EGFR ADCs behandelt wurden, zeigen eine Tumorregression. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Tagen wurde die Tumorgröße im Vergleich von Konjugat-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe (T/C) bestimmt. Die Konjugat-behandelten Tiere zeigten eine geringere Tumorgröße.

T/C ist bei den ADCs zwischen 0.05 (Beispiel 10) und 0.1 (Beispiel 7), mit dem nackten anti-EGFR Antikörper dagegen bei 0.3.

**C-2.1** In vitro Zellproliferationstests

Die zytotoxische Wirkung der erfindungsgemäßen Konjugate wurde in einem in vitro Zellproliferationstest getestet. Dazu wurde eine mammalische Zelle, die entweder das Zielmolekül des Binders endogen oder rekombinant exprimiert, mit dem erfindungsgemäßen Konjugat inkubiert. Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden bis mehreren Tagen anhand der Zellzahl im Vergleich zu einer Kontrolle, welcher kein Konjugat zugesetzt wurde, bestimmt. Als weitere Kontrollen können das nicht-konjugierte Toxophor allein zugesetzt werden bzw. Zellen verwendet werden, die das Zielmolekül des Binders nicht exprimieren. Die Zellzahl wurde mittels dem Fachmann bekannter Methoden bestimmt, beispielsweise durch Auszählen oder durch Verwendung eines Testkits, welcher über eine ATP-Messung die Bestimmung der Zellzahl erlaubt (z.B. ATPlite™, Perkin-Elmer). Somit wurde der $IC_{50}$-Wert der erfindungsgemäßen Konjugate ermittelt. Durch Vergleich des $IC_{50}$-Wertes des Konjugats bei Messungen an Zellen, die das Zielmolekül des Binders tragen und nicht tragenden Zellen, ließ sich die Selektivität des Konjugats bestimmen.

**C-2.2** Bestimmung der anti-proliferativen Wirkung von anti-Mesothelin ADC an der humanen Colonkarzinom-Zellline HT29

Eine definierte Zellzahl der humanen Colonkarzinom Zelllinie HT29wt (2500c/well, wildtype) wurde in einer 96-well MTP im Vollmedium (10%FCS-RPMI) ausgesät und über Nacht bei 37°C/5% Kohlendioxid inkubiert. Parallel hierzu wurden transfizierte HT29 Zellen, die stabil Mesothelin exprimieren, in einer 96-well MTP in Vollmedium ausplattiert und über Nacht inkubiert (2500c/well; 37°C/5% Kohlendioxid).

Nach 18h wurde das Aussaatmedium durch frisches Medium mit 10% FCS ersetzt. Die Behandlung startete mit der Zugabe der erfindungsgemäßen Verbindungen. Hierbei wurden die transfizierten und die HT29wt Zellen identisch behandelt.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden Dosis-Wirkungskurven in einem Konzentrationsbereich von $10^{-5}$ M-$10^{-14}$M (1:10 Verdünnungsreihe) bestimmt.

Es wurden Inkubationszeiten von 48h-96h gewählt.

Die Detektion der Proliferation erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays (ATCC, Manassas, Virginia, USA, Katalog-Nr. 30-1010K). Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeit wurden die HT29wt Zellen mit MTT für 4h inkubiert, bevor durch Zugabe des Detergens die Lyse der Zellen über Nacht erfolgte.

Die Detektion des gebildeten Farbstoffs erfolgte bei 570nm.

Die Proliferation nicht mit Testsubstanz, aber ansonsten identisch behandelter Zellen, wurde als 100% Wert definiert. Die aus diesem Test gewonnenen Daten repräsentieren Dreifachbestimmungen, und es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

In der folgenden Tabelle 6 sind die $IC_{50}$-Werte[1)] repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt:

**Tabelle 6**

| Beispiel | HT29 meso$^+$ $IC_{50}$ [nM] | HT29 wt $IC_{50}$ [nM] | Beispiel | HT29 meso$^+$ $IC_{50}$ [nM] | HT29 wt $IC_{50}$ [nM] |
|---|---|---|---|---|---|
| **56** | 0.17 | 5.3 | **101** | 3 | 500 |
| **57** | 0.4 | 162 | **102** | 7.2 | 294 |
| **58** | 5 | 22 | **103** | 10 | 32 |
| **59** | 1 | 13 | **104** | 1.8 | 0.9 |
| **60** | 0.06 | 8 | **105** | 0.6 | 1.4 |
| **60** | 0.16 | 5.4 | **106** | 0.8 | 15 |
| **61** | 0.019 | 0.27 | **107** | 3 | 2 |
| **62** | 20 | >300 | **108** | 0.74 | 9.2 |
| **63** | 0.03 | 1 | **109** | 0.09 | 1.1 |
| **64** | 0.11 | 1.4 | **110** | 0.002 | 0.28 |
| **65** | 0.14 | 3.3 | **111** | 0.7 | 162 |
| **66** | 1.5 | 8.6 | **112** | 0.018 | 4 |
| **67** | 0.015 | 11 | **113** | 0.4 | 2.5 |
| **68** | 2 | 9 | **114** | 0.6 | 4.1 |
| **69** | 0.07 | 20 | **115** | 0.06 | 10 |

| Beispiel | HT29 meso$^+$ $IC_{50}$ [nM] | HT29 wt $IC_{50}$ [nM] | Beispiel | HT29 meso$^+$ $IC_{50}$ [nM] | HT29 wt $IC_{50}$ [nM] |
|---|---|---|---|---|---|
| **70** | 0.02 | 2 | **129** | 5.3 | 57 |
| **71** | 0.6 | 11 | **130** | 0.13 | 672 |
| **72** | 0.05 | 8 | **131** | 0.09 | 769 |
| **73** | 25 | 221 | **132** | 3.3 | >1000 |
| **74** | 9 | >50 | **133** | 2.1 | 219 |
| **75** | 0.2 | 0.29 | **134** | 0.03 | 199 |
| **76** | 0.35 | 3 | **135** | 0.25 | 317 |
| **77** | 0.8 | 3.6 | **136** | 1.6 | 3000 |
| **78** | 1.1 | 6 | **137** | 0.04 | 10 |
| **79** | 0.5 | 5 | **138** | 0.3 | >1000 |
| **80** | 4.4 | 14 | **139** | 70 | >1000 |
| **81** | 0.02 | 1.4 | **140** | 6.8 | >1000 |
| **82** | 24 | >1000 | **141** | 43 | >1000 |
| **83** | 0.3 | 31 | **142** | 0.27 | 554 |
| **84** | 6 | 14 | **143** | 0.3 | 54 |
| **85** | 0.2 | 2 | **144** | 2.7 | 74 |
| **86** | 0.45 | >500 | **145** | 7.4 | 135 |
| **87** | 0.9 | 3 | **146** | 13 | >1000 |
| **88** | 0.01 | 0.2 | **147** | 5.6 | 18 |
| **89** | 0.06 | 3.1 | **148** | 425 | >1000 |
| **90** | 2.6 | 60 | **149** | 3.1 | 33 |
| **91** | 0.35 | 1.1 | **150** | <0,1 | 0,15 |
| **92** | 38 | 167 | **151** | >1000 | >1000 |
| **93** | 52 | 89 | **152** | 4.1 | >1000 |
| **94** | 0.6 | >500 | **153** | 30 | >1000 |
| **95** | 0.013 | 4.9 | **154** | 2.2 | >1000 |
| **96** | 25 | >500 | **155** | 0.5 | >500 |
| **97** | 0.2 | 0.2 | **156** | 4.6 | >500 |
| **98** | 1.7 | 6.3 | **157** | 0.09 | 839 |
| **99** | 0.27 | 1.6 | **158** | 0.18 | 602 |
| **100** | 2 | 44 | **159** | 177 | >500 |
| **366** | 1.3 | 16 | **367** | 0.06 | 10 |

| Beispiel | HT29 meso$^+$ $IC_{50}$ [nM] | HT29 wt $IC_{50}$ [nM] | Beispiel | HT29 meso$^+$ $IC_{50}$ [nM] | HT29 wt $IC_{50}$ [nM] |
|---|---|---|---|---|---|
| **368** | 3.1 | >500 | **369** | 0.02 | 14 |
| **377** | 1.6 | >500 | **378** | 0.04 | >500 |
| **379** | 7 | >500 | **380** | 15 | >500 |

[1)] 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.

**C-2.3** Pharmakokinetik im HT29 Tumormodell mit Mesothelin-transfizierten bzw. nichttranfizierten HT29 Zellen

Nach i.v. Applikation von 16 mg/kg von Beispiel **60** wurden die Plasma- und Tumorkonzentrationen von Beispiel **60** sowie potentiell auftretenden Metaboliten wie beispielsweise von Beispiel **119** gemessen. In den Tieren mit Mesothelin-transfizierten Tumoren betrug die Fläche unter der Kurve (AUC) der Verbindung aus Beispiel **119** in Plasma ca. 0.50 mg*h/l; im Tumor war die Exposition der Verbindung aus Beispiel **119** ca. 400fach höher (AUC = 203 mg*h/L). In den Tieren mit nichtransfizierten Tumortieren war die Exposition von Beispiel **119** in Plasma identisch zu der Exposition in Plasma in Tieren mit transfizierten Tumoren. Hingegen war die AUC im Tumor in den nichttransfizierten Tieren ca. 8fach niedriger, als in den transfizierten Tieren. Dies zeigt einen deutlichen Targetingeffekt im Tumor in Anwesenheit des Antigens.

Analytik zur Quantifizierung der Verbindung aus Beispiel **119**

Die Messung der Verbindung aus Beispiel **119** in Plasma und Tumor erfolgte nach Fällung der Proteine mit Methanol durch eine Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer (MS).

Zur Aufarbeitung von 100 µL Plasma wurden diese mit 400 µL Methanol und 10 µL internem Standard (ISTD, 50 ng/mL in Methanol) versetzt und für 10 Sekunden geschüttelt. Nach dem 5minütigen Zentrifugieren bei 16000 g wurden 250 µL Überstand in ein Autosampler-Vial überführt, mit 250 µL Ammoniumacetat-Puffer (AAC, 10 mM, pH 6.8) aufgefüllt und erneut geschüttelt.

Bei der Aufarbeitung eines Tumors wurde dieser mit der 4fachen Menge an Methanol versetzt. Im Tissuelyser II (Quiagen) wurde die Probe 6 Minuten bei 30 Schlägen pro Minute zerkleinert und anschließend 5 Minuten bei 16000 g abzentrifugiert. 50 µL des Überstandes wurde in ein

Autosampler-Vial überführt und mit 50 µL Ammoniumacetat-Puffer (10 mM, pH 6.8), sowie 5 µL ISTD aufgefüllt. Nach erneutem Schütteln war die Tumorprobe messfertig.

Die Messung beider Matrixproben erfolgte schließlich an dem mit einer HPLC gekoppelten atmospheric pressure ionizatition/tandem Massenspektrometer mittels TurboIonspray interface (TISP) auf einem API4000-Gerät der Firma SCIEX. Gemessen wurden folgende m/z-Übergänge:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Beispiel **119** (Quantifier) | 614.652 | → | 570.9 |
| Beispiel **119** (Qualifier 1) | 614.652 | → | 555.0 |
| Beispiel **119** (Qualifier 2) | 614.652 | → | 500.4 |
| Interner Standard (ISTD) | 726.665 | → | 694.5 |

Die HPLC/LC-MSMS (TISP)-Analytik lief auf einer HP1100-Pumpe (Agilent) mit der Säule Gemini (5µm C18 110 A, 50 x 3 mm, Phenomenex) unter folgenden Gradientenbedingungen: Fluss 0.4 mL/min; Gradient: 0.0 min – 1.0 min 10% Acetonitril/90% AAC, 1.0 min – 3.0 min 10% Acetonitril/90% AAC → 50% Acetonitril/50% AAC, 3.0 min – 5.5 min 50% Acetonitril/50% AAC, 5.5 min – 5.6 min 50% Acetonitril/50% AAC → 10% Acetonitril/90% AAC, 5.6 min – 6.0 min 10% Acetonitril/90% AAC.

Zur Kalibrierung wurden Plasmaproben mit Konzentrationen von 0.5 – 2000 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze (LOQ) lag bei 2 µg/L. Der lineare Bereich erstreckte sich von 2 bis 1000 µg/L

Zur Kalibrierung der Tumorproben wurde der Überstand unbehandelter Tumore mit Konzentrationen von 0.5 – 200 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze lag bei 5 µg/L. Der lineare Bereich erstreckte sich von 5 bis 200 µg/L.

Qualitätskontrollen zur Gültigkeitsprüfung enthielten 5 und 50 µg/L, in Plasma zusätzlich 500 µg/L. Die bestimmten Konzentrationen dieser Proben wichen bis zu 20% vom Sollwert ab (Daten nicht angefügt).

### C-2.4 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 oder ein Kontrollantikörper oder isotonische Salzlösung appliziert. Die Applikation erfolgte einmalig oder öfters. 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-2.4a** Testung von anti-Mesothelin ADCs in experimentellen Tumoren in der Maus

Humane Tumorzellen, die Mesothelin exprimieren, werden subcutan in die Flanke von immunsupprimierten Mäusen gespritzt, beispielsweise Nude-Mäuse oder SCID-Mäuse. 1-10 Millionen Zellen werden aus der Zellkultur abgelöst, zentrifugiert und mit 100 µl Medium oder Medium / Matrigel 1:1 resuspendiert. Die Zellsuspension wird unter die Haut der Maus gespritzt.

Innerhalb von einigen Tagen wächst ein Tumor heran. Die Behandlung beginnt frühestens bei einer Tumorgröße von 20 mm². Um die Wirkung auf bereits etablierte Tumore 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 in PBS gelöst und 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. 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. Diese Zahl kann sich erhöhen, wenn besonders starke Schwankungen beim Tumorwachstum oder nach der Behandlung zu erwarten sind. 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.

Am Ende des Experiments werden die Tumore entnommen und gewogen. Der Quotient der mittleren Tumorgewichte der Therapiegruppe (T) mit der Kontrollgruppe (C) wird als T/C angegeben.

**C-2.4b** Wirksamkeit im HT29 Colonkarzinom-Tumormodell mit Mesothelin-transfizierten HT29 Zellen

1 Mio HT29 Zellen (stabil transfiziert mit Mesothelin) werden subcutan in die Flanke von NMRI-nude Mäusen inokuliert. Bei einer Tumorgröße von 20-30 mm² an Tag 6 beginnt die Behandlung intravenös (Tag 6, 10, 14). Im Anschluß an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 48 verfolgt.

**C-2.4c** Wirksamkeit im Ovcar3 Ovarialkarzinom Tumormodell

7 Mio Ovcar3 Zellen werden subcutan in die Flanke von NMRI-nude Mäusen inokuliert.

Bei einer Tumorgröße von 25-30 mm² an Tag 31 beginnt die Behandlung intravenös im Dosisbereich von 5-30 mg / kg (Tag 31, 35, 39). Im Anschluß an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 94 verfolgt. Am Ende des Experiments werden die Tumore entnommen und gewogen.

**C-3.1** Analyse der cytotoxischen Wirkung der gegen C4.4a gerichteten ADCs

Die Analyse der cytototoxischen Wirkung der anti-C4.4a-ADCs erfolgt auf verschiedenen Zelllinien:

- A549 (CCL-185, ATCC), die mit mit der Sequenz für den vollständigen C4.4a Rezeptor transfiziert wurden,
- A549, Mock transfiziert
- A549 Wildtyp (DSMZ, lot 11)
- NCI-H292, endogen C4.4a exprimierende Lungenkrebs-Zelllinie (CRL-1848, ATCC)
- SCC-4 endogen C4.4a exprimierende Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (CRL-1624, ATCC)
- SCC-9 endogen C4.4a exprimierende Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (CRL-1629, ATCC)
- HCT-116 endogen C4.4a exprimierende Kolonkarzinom-Zelllinie (CCL-247, ATCC)
- HCT-116/VM46, HCT-116 die mit VM46 transfiziert wurden
- A431NS (CRL-2592, ATCC)

Kultivierung der Zellen erfolgt nach Standardmethode, wie bei der American tissue type collection (ATCC) für die jeweiligen Zelllinien angegeben. Zur Durchführung werden 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 (2500 Zellen in 100µl/ well) und im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert. Nach 24 h werden die Antikörper-Wirkstoffkonjugate in 100µl Kulturmedium in Konzentrationen von $10^{-7}$M bis $10^{-11}$M auf die Zellen gegeben (Doppelwerte) und im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert. Nach 72 h wird die Zellviabilität mit dem Cell Titer Glow Luminescent Cell Viability Assay bestimmt.(Promega #G7573 und #G7571). Dazu werden pro Zellansatz 100 µl 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 dem 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 zu Vitalität der Zellen ist. Aus den gemessenen Daten wird die $IC_{50}$ mit der Laborsoftware Graph Pad Prism berechnet.

In der folgenden Tabelle 7 sind die $IC_{50}$-Werte[1)] repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt:

Tabelle 7

| **Beispiel** | **$IC_{50}$ [nM] A549 :C4.4a** | **$IC_{50}$ [nM] A549 Mock** | **Beispiel** | **$IC_{50}$ [nM] A549 :C4.4a** | **$IC_{50}$ [nM] A549 Mock** | **Beispiel** | **$IC_{50}$ [nM] A549 :C4.4a** | **$IC_{50}$ [nM] A549 Mock** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 163 | 0.081 | 11.15 | 203 | 0.4 | 2 | 252 | >100 | >100 |
| 164 | 0.7 | 50 | 204 | 0.1 | 14 | 253 | 0.15 | kH |
| 165 | 0.47 | 4.75 | 205 | 0.062 | 6.33 | 254 | 0.29 | >100 |
| 166 | 0.6 | 100 | 206 | 0.044 | 6.93 | 255 | 0.04 | >100 |
| 167 | 0.4<br>0.2<br>0.1 | 20<br>26<br>17 | 207 | 0.058 | 4.01 | 256 | 0.035 | 100 |
| 168 | 0.53 | 4.50 | 208 | 0.062 | 7.74 | 257 | 0.036 | >100 |
| 169 | 0.39 | 32 | 209 | 0.066 | 9.11 | 258 | 0.018 | >100 |
| 170 | 0.01 | 0.15 | 210 | 0.061 | 6.78 | 259 | 0.062 | >100 |
| 171 | 0.43 | 10 | 211 | 0.076 | 100 | 260 | 0.06 | >100 |
| 172 | 0.01 | 25 | 212 | 0.02 | 0.02 | 261 | 0.1 | 80 |
| 173 | 4 | >100 | 213 | 0.044 | 44 | 262 | 0.1 | kH |

| Beispiel | $IC_{50}$ [nM] A549 :C4.4a | $IC_{50}$ [nM] A549 Mock | Beispiel | $IC_{50}$ [nM] A549 :C4.4a | $IC_{50}$ [nM] A549 Mock | Beispiel | $IC_{50}$ [nM] A549 :C4.4a | $IC_{50}$ [nM] A549 Mock |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 174 | 0.58 | 6.36 | 214 | 0.04 | 45 | 263 | 0.3 | kH |
| 175 | 0.7 | 14.9 | 215 | 0.046 | 26 | 264 | 0.1 | kH |
| 176 | 0.1 | 65.5 | 216 | 0.074 | >100 | 265 | 0.2 | 30 |
| 177 | 0.030 | 9.53 | 217 | 0.053 | >100 | 266 | 3 | kH |
| 178 | 3.8 | 21 | 218 | 0.037 | 60 | 267 | 0.03 | 50 |
| 179 | 0.62 | 4.19 | 219 | 0.3 | 1 | 268 | 0.05 | 20 |
| 180 | 0.4 | >100 | 220 | 0.04 | >100 | 269 | >100 | kH |
| 181 | 1.2 | 66.1 | 221 | 0.1 | >100 | 270 | 0.03 | >100 |
| 182 | 0.46 | 4.20 | 222 | 0.04 | >100 | 271 | 1 | >100 |
| 183 | 4.5 | 12.7 | 223 | 0.44 | 6.8 | 272 | 0.2 | kH |
| 184 | 5 | 16 | 224 | 0.09 | 50 | | | |
| 185 | 0.4 | 0.7 | 225 | 0.1 | 0.4 | | | |
| 186 | 0.3 | 23 | 226 | 0.04 | 0,52 | 373 | 0.03 | 7 |
| 187 | 5.4 | 53 | 227 | 0.03 | 0,04 | 385 | 0.04 | >100 |
| 188 | 0.052 | 11.27 | 228 | 0.03 | 0,04 | 386 | 0.02 | >100 |
| 189 | 0.65 | 6.70 | 229 | 0.08 | 26 | 387 | 0.04 | >100 |
| 190 | 0.062 | >100 | 230 | 0.02 | >100 | 388 | 0.04 | >100 |
| 191 | 0.02 | 2.5 | 231 | 0.17 | 0,27 | | | |
| 192 | 0.1 | 71 | 212 | 0.06 | 7 | | | |
| 193 | 0.32 | 9 | 242 | 3.0 | >100 | | | |
| 194 | 0.035 | 6.19 | 243 | 0.045 | >100 | | | |
| 195 | 0.037 | ~30 | 244 | 0.06 | >100 | | | |
| 196 | | | 245 | 0.27 | >100 | | | |
| 197 | 0.3 | 20 | 246 | 0.13 | >100 | | | |
| 198 | 0.08 | >100 | 247 | 0,14 | >100 | | | |
| 199 | 0.1 | kH | 248 | 0.17 | >100 | | | |
| 200 | 0.03 | 50 | 249 | 0,28 | >100 | | | |
| 201 | 0.04 | 1.5 | 250 | 1.1 | >100 | | | |
| 202 | 0.6 | 50 | 251 | 1.3 | >100 | | | |

[1] 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.

**C-3.3** *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 (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 aktiv transportiert klassifiziert, wenn das Verhältnis von $P_{app}$ (B-A) zu $P_{app}$ (A-B) >2 oder <0.5 war.

Von entscheidender Bedeutung für Toxophore, die intrazellulär freigesetzt werden, ist die Permeabilität von B nach A [$P_{app}$ (B-A)]: Je niedriger diese Permeabilität ist, desto länger ist die Verweilzeit der Substanz in der Zelle nach intrazellulärer Freisetzung und damit auch die Zeit, die für eine Interaktion mit dem biochemischen Target (hier: Tubulin) zur Verfügung steht.

In der folgenden Tabelle sind Permeabilitätsdaten repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt:

Tabelle 8

| **Ausführungsbeispiel** | **$P_{app}$ (B-A) [nm/s]** |
|---|---|
| 233 | 2 |
| 234 | 1.6 |
| 235 | 2.5 |
| 236 | 5 |

| Ausführungsbeispiel | $P_{app}$ (B-A) [nm/s] |
|---|---|
| 237 | 1 |
| 239 | 7 |
| 277 | 2 |
| 278 | 1 |

Im Vergleich hierzu weisen Monomethylauristatin E (MMAE) und Monomethylauristatin F (MMAF) in diesem Test einen $P_{app}$ (B-A)-Wert von 73 nm/s auf.

**C-3.4** *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-Glykoprotein (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.

Tabelle 9

| **Ausführungsbeispiel** | **$P_{app}$ (B-A) [nm/s]** |
|---|---|
| 233 | 3 |
| 234 | 3.6 |
| 235 | 2.1 |
| 236 | 3.6 |
| 237 | 4 |
| 239 | 2 |
| 277 | 6 |
| 278 | 4 |

Auch in diesem Assay ist die Permeabilität der angeführten Beispiele von B nach A niedrig, d.h. die Verweilzeit der Toxophore in der Zelle lang.

**C-3.5** Wirksamkeitstest *in vivo*

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate wurde *in vivo* beispielsweise mittels Xenograft-Modellen getestet. Der Fachmann kennt Methoden im Stand der Technik, wie die Wirksamkeit eines erfindungsgemäßen Konjugats getestet werden kann (siehe z.B. WO2005/081711; Polson et al., Cancer Res. 2009 Mar 15;69(6):2358-64). Beispielsweise wurden hierzu Nagern (z.B. Mäusen) eine Tumorzelllinie, welche das Zielmolekül des Binders exprimiert, implantiert. Anschließend wurde diesen Tumor-tragenden Nagern entweder ein erfindungsgemäßes Konjugat oder ein Kontrollantikörper-Konjugat oder isotonische Salzlösung appliziert. Die Applikation erfolgte einmalig oder öfters. Das Tumorwachstum wurde mittels einer Schieblehre zwei Mal wöchentlich ermittelt. Nach einem Tumorwachstum von mehreren Wochen wurde die Tumorgröße von Konjugat-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe verglichen. Die Konjugat-behandelten Tiere zeigten eine signifikant geringere Tumorgröße.

**C-3.5a** Testung von ADCs in experimentellen Tumoren in der Maus

Humane Tumorzellen, die C4.4a exprimieren, werden subkutan in die Flanke von immunsupprimierten Mäusen inokuliert, beispielsweise Nude- oder SCID-Mäuse. 1-10 Millionen Zellen werden aus der Zellkultur abgelöst, zentrifugiert und mit 100 µl Medium oder 50% Medium / 50% Matrigel resuspendiert. Die Zellsuspension wird unter die Haut der Maus gespritzt.

Innerhalb von einigen Tagen wächst ein Tumor heran. Die Behandlung beginnt frühestens nach Tumoretablierung bei einer Tumorgröße von 25 $mm^2$.

Die Behandlung mit ADCs erfolgt über die intravenöse Route in die Schwanzvene der Maus. Das ADC wird in PBS gelöst und mit einem Volumen von 10 ml /kg appliziert.

Das Behandlungsschema richtet sich nach der Pharmakokinetik des Antikörpers. Als Standard wird drei Mal in Folge jeden vierten Tag behandelt. 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. Diese Zahl kann sich erhöhen, wenn besonders starke Schwankungen beim Tumorwachstum oder nach der Behandlung zu erwarten sind. 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.

Am Ende des Experiments werden die Tumore entnommen und gewogen. Der Quotient der mittleren Tumorgewichte der Therapiegruppe (T) mit der Kontrollgruppe (C) wird als T/C angegeben. Werden Kontroll- und Behandlungsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet, wird der T/C Wert anhand der Tumorflächen der letzten gemeinsamen Messung aller Behandlungs- und Kontrollgruppen errechnet.

1 Mio SCC-4 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen inokuliert.

Die intravenöse Behandlung mit den ADCs wird bei einer mittleren Tumorgröße von 30-35 $mm^2$ begonnen. Wenn die Kontrollgruppen die maximal zulässige Größe erreicht haben wird der Versuch beendet und die Tumoren entnommen und gewogen. Alle getesteten C4.4a targetierenden ADCs haben Dosis-abhängig das Tumorwachstum gehemmt. In der Dosis von 30 mg/kg erreichten alle getesteten ADCs einen T/C von $< 0,1$ (Beispiel 216, Beispiel 211, Beispiel 215, Beispiel 213).

Signifikante anti-Tumor Wirkung im Vergleich zur Kontrolle konnte für alle getesteten ADCs bis zu einer Dosis von 15 mg/kg erreicht werden.

1 Mio NCI-H292 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen inokuliert.

Die intravenöse Behandlung mit den ADCs wird bei einer mittleren Tumorgröße von 30-35 $mm^2$ begonnen. Kontroll- und Behandlungsgruppen werden jeweils beendet, wenn die maximal zulässige Tumorgröße erreicht ist. So können Unterschiede im Nachwachsen von Tumoren nach Behandlungsende zur weiteren Charakterisierung der ADCs beitragen. Daher wurde zur Ermittlung der anti-Tumorwirkung im Vergleich zur Kontrolle (T/C) die Tumorflächen am letzten gemeinsamen Messzeitpunkt herangezogen. Im verwendeten NCI-H292 Mausmodell wird gezeigt, dass alle getesteten ADCs das Tumorwachstum Dosis-abhängig im Vergleich zur Kontrolle reduzieren. Eine signifikante anti-Tumor Wirkung konnte für das Beispiel 216 bis zu einer Dosis von 1.9 mg/kg erzielt werden, für das Beispiel 211 bis zu einer Dosis von 3,75 mg/kg. Die minimalen T/C Werte die in diesem Modell erzielt werden, sind für Beispiel 216 ein T/C von 0,16 bei 30 mg/kg, für Beispiel 211 ein T/C von 0,17 bei 30 mg/kg, für Beispiel 215 ein T/C von 0,16 bei 30 mg/kg und für Beispiel 213 ein T/C von 0,17 bei 15 mg/kg.

**C-6.** Pharmakokinetik im A549 Tumormodell mit C4.4a-transfizierten bzw. nichttranfizierten A549 Zellen

Nach i.v. Applikation von 7-30 mg/kg verschiedener ADCs wurden die Plasma- und Tumorkonzentrationen von ADC sowie potentiell auftretenden Metaboliten gemessen und die pharmakokinetischen Parameter wie Clearance (CL), Fläche unter der Kurve (AUC) und Halbwertszeit ($t_{1/2}$) berechnet.

Analytik zur Quantifizierung der potentiell auftretenden Metabolite

Die Messung der Verbindungen in Plasma und Tumor erfolgte nach Fällung der Proteine mit Methanol durch eine Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer (MS).

Zur Aufarbeitung von 100 µL Plasma wurden diese mit 400 µL Methanol und 10 µL internem Standard (ISTD, 50 ng/mL in Methanol) versetzt und für 10 Sekunden geschüttelt. Nach dem 5minütigen Zentrifugieren bei 16000 g wurden 250 µL Überstand in ein Autosampler-Vial

überführt, mit 250 µL Ammoniumacetat-Puffer (AAC, 10 mM, pH 6.8) aufgefüllt und erneut geschüttelt.

Bei der Aufarbeitung eines Tumors wurde dieser mit der 4fachen Menge an Methanol versetzt. Im Tissuelyser II (Quiagen) wurde die Probe 6 Minuten bei 30 Schlägen pro Minute zerkleinert und anschließend 5 Minuten bei 16000 g abzentrifugiert. 50 µL des Überstandes wurde in ein Autosampler-Vial überführt und mit 50 µL Ammoniumacetat-Puffer (10 mM, pH 6.8), sowie 5 µL ISTD aufgefüllt. Nach erneutem Schütteln war die Tumorprobe messfertig.

Die Messung beider Matrixproben erfolgte schließlich an dem mit einer HPLC gekoppelten atmospheric pressure ionizatition/tandem Massenspektrometer mittels TurboIonspray interface (TISP) auf einem API4000-Gerät der Firma SCIEX.

Die HPLC/LC-MSMS (TISP)-Analytik lief auf einer HP1100-Pumpe (Agilent) mit der Säule Gemini (5µm C18 110 A, 50 x 3 mm, Phenomenex).

Zur Kalibrierung wurden Plasmaproben mit Konzentrationen von 0.5 – 2000 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze (LOQ) lag bei ca. 2 µg/L. Der lineare Bereich erstreckte sich von 2 bis 1000 µg/L

Zur Kalibrierung der Tumorproben wurde der Überstand unbehandelter Tumore mit Konzentrationen von 0.5 – 200 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze lag bei 5 µg/L. Der lineare Bereich erstreckte sich von 5 bis 200 µg/L.

Qualitätskontrollen zur Gültigkeitsprüfung enthielten 5 und 50 µg/L, in Plasma zusätzlich 500 µg/L. Die bestimmten Konzentrationen dieser Proben wichen bis zu 20% vom Sollwert ab (Daten nicht angefügt).

**C-4.1** In vitro Zellproliferationstest

Die zytotoxische Wirkung der erfindungsgemäßen Konjugate wurde in einem in vitro Zellproliferationstest getestet. Dazu wurde eine mammalische Zelle, die entweder das Zielmolekül des Binders endogen oder rekombinant exprimiert, mit dem erfindungsgemäßen Konjugat inkubiert. Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden bis mehreren Tagen anhand der Zellzahl im Vergleich zu einer Kontrolle, welcher kein Konjugat zugesetzt wurde, bestimmt. Als weitere Kontrollen können das nicht-konjugierte Toxophor allein zugesetzt werden bzw. Zellen verwendet werden, die das Zielmolekül des Binders nicht exprimieren. Die Zellzahl wurde mittels dem Fachmann bekannter Methoden bestimmt, beispielsweise durch Auszählen oder durch Verwendung eines Testkits, welcher über eine ATP-Messung die Bestimmung der Zellzahl erlaubt (z.B. ATPlite™, Perkin-Elmer). Somit wurde der IC50 Wert der erfindungsgemäßen

Konjugate ermittelt. Durch Vergleich des IC50 Wertes des Konjugats bei Messungen an Zellen, die das Zielmolekül des Binders tragen und nicht tragenden Zellen, ließ sich die Selektivität des Konjugats bestimmen.

**C-4.2** In vitro Zytotoxizität an den Zelllinien HT29, DLD-1 und SNU-5

Zur Testung des CA9-selektiven, zytotoxischen Effekts an Tumorzellen, die endogen CAIX positiv oder negativ sind, wurden die humanen Kolonkarzinom Zelllinien HT29 (CA9-positiv) und DLD-1 (CA9-negativ) sowie die Magenkarzinomzelllinie SNU-5 (CA9-positiv) verwendet. Eine definierte Zellzahl der Zelllinie HT29 (5000c/well) wurde in einer 96-well MTP für Lumineszenz im Vollmedium (DMEM/ HAM´sF12, 10% FCS hitzeinaktiviert) ausgesät und über Nacht bei 37°C/5%$CO_2$ inkubiert. Mit der Zellinie SNU-5 wurde gleichermaßen verfahren, das Medium war hier ISCOVE´s + 10% FCS (hitzeinaktiviert). Die antigen-negative Zelllinie DLD-1 wurde parallel in einer 96-well MTP für Lumineszenz in Vollmedium (RPMI1640, 10% FCS hitzeinaktiviert) ausplattiert und über Nacht inkubiert (5000c/well; 37°C/5%$CO_2$).

Nach 24h wurden die zu testenden Substanzen dreifach konzentriert in RPMI/ 5% FCS angesetzt. Die Behandlung startete mit der Zugabe der zu testenden Substanzen bzw. der ADC zu den Zellen. Hierbei wurden die HT29, SNU-5 und die DLD-1 Zellen identisch behandelt.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden Dosis-Wirkungskurven in einem Konzentrationsbereich von $3x10^{-7}$ M bis $10^{-12}$M bestimmt.

Es wurden Inkubationszeiten von 2h-96h gewählt.

Die Detektion der Proliferation erfolgte mit Hilfe des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay: (PROMEGA Katalog-Nr.#G7571). Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeit wurde das CellTiterGlo Reagens für 20min mit den Zellen inkubiert, die Messung der Lumineszenz erfolgte mit dem LuminescenceReader VICTORLight (PERKIN ELMER)

Die Proliferation nicht mit Testsubstanz, aber ansonsten identisch behandelter Zellen, wurde als 100% Wert definiert. Die aus diesem Test gewonnenen Daten repräsentieren Dreifachbestimmungen, und es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

In der folgenden Tabelle sind die $IC_{50}$-Werte repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt:

**Tabelle 10**

| Beispiel | $EC_{50}$ [nM] HT29 | $EC_{50}$ [nM] DLD-1 | $EC_{50}$ [nM] SNU-5 |
|---|---|---|---|
| **280** | 2.9 | 58 | n.d. |
| **281** | 1.7 | 23 | n.d. |
| **282** | <0.01 | <0.01 | n.d. |
| **283** | 0.3 | 20 | n.d. |
| **284** | 0.7 | 39 | 3 |
| **284** | 1.6 | 5.8 | 2.2 |
| **285** | 0.5 | 11.1 | n.d. |
| **286** | 0.03 | 6.6 | n.d. |
| **287** | >30 | >68 | n.d. |
| **288** | 39 | 72 | n.d. |
| **289** | 49 | >300 | n.d. |
| **290** | 115 | 7938 | 84 |
| **291** | 27 | 107 | n.d. |
| **292** | 223 | 74 | n.d. |
| **293** | 0.1 | 0.6 | n.d. |
| **294** | 13.6 | 5.5 | 21.4 |
| **295** | >100 | >100 | 63 |
| **296** | 0.4 | 16.4 | n.d. |
| **297** | <0.01 | <0.01 | n.d. |
| **298** | 2.5 | 31 | 7.8 |
| **299** | 4.1 | 32.3 | n.d. |
| **300** | 5 | 41 | n.d. |
| **301** | >30 | >300 | n.d. |
| **302** | >30 | >300 | n.d. |
| **303** | 2.2 | 18.3 | 3.3 |
| **304** | 0.05 | 8 | 0.6 |
| **305** | 0.9 | 23 | 2.2 |

| Beispiel | $EC_{50}$ [nM] HT29 | $EC_{50}$ [nM] DLD-1 | $EC_{50}$ [nM] SNU-5 |
|---|---|---|---|
| **306** | 66 | >100 | 33 |

**C-4.3** Bestimmung der anti-proliferativen Wirkung von anti-CAIX- ADC an der humanen Pankreaskarzinom-Zellline MIAPaCa 2 und Colonkarzinom Zelllinie HT29

Eine definierte Zellzahl der humanen Pankreaskarzinom-Zellline MIAPaCa 2 (2500c/well, wildtype) wurde in einer 96-well MTP im Vollmedium (DMEM,10%FCS/2,5% horse serum) ausgesät und über Nacht bei 37°C/5%$CO_2$ inkubiert. Transfizierte MIAPaCa2 Zellen (MIAPaCaMSL), die stabil CAIX exprimieren, wurden parallel in einer 96-well MTP in Vollmedium ausplattiert und über Nacht inkubiert (2500c/well; 37°C/5$CO_2$).

Zur Testung des zytotoxischen Effekts an Zellen, die endogen CAIX exprimieren, wurde die Colonkarzinom Zelllinie HT29 verwendet. Die Zellen (2500c/well, wildtype) wurden ebenfalls in einer 96-well MTP ausgesät und über Nacht in Vollmedium (RPMI, 10%FCS) inkubiert.

Nach 18h wurde das Aussaatmedium durch frisches Medium mit Serum ersetzt. Die Behandlung startete mit der Zugabe der zu testenden Substanzen bzw. der ADC. Hierbei wurden die transfizierten und MIAPaCa2 Zellen, sowie die HT29 Zellen identisch behandelt.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden Dosis-Wirkungskurven in einem Konzentrationsbereich von $10^{-5}$ M-$10^{-14}$M (1:10 Verdünnungsreihe) bestimmt.

Es wurden Inkubationszeiten von 48h-96h gewählt.

Die Detektion der Proliferation erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays (ATCC, Manassas, Virginia, USA, Katalog-Nr. 30-1010K). Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeit wurde das MTT Reagens für 4h mit den Zellen inkubiert, bevor, durch Zugabe des Detergens, die Lyse der Zellen über Nacht erfolgte.

Die Detektion es gebildeten Farbstoffs erfolgte bei 570nm.

Die Proliferation nicht mit Testsubstanz, aber ansonsten identisch behandelter Zellen, wurde als 100% Wert definiert. Die aus diesem Test gewonnenen Daten repräsentieren Dreifachbestimmungen, und es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

In der folgenden Tabelle sind die $IC_{50}$-Werte repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt:

Tabelle 11

| **Beispiel** | MiaPaCa 2/ CA9+ $IC_{50}$ [nM] | MiaPaCa2 wt $IC_{50}$ [nM]] | **Beispiel** | MiaPaCa 2/ CA9+ $IC_{50}$ [nM] | MiaPaCa2 wt $IC_{50}$ [nM]] |
|---|---|---|---|---|---|
| **280** | 0.4 | 8 | **296** | 0.6 | 0.9 |
| **281** | 1.2 | 4.1 | **297** | 0.02 | 0.4 |
| **282** | 0.05 | 0.5 | **298** | 1.1 | 9 |
| **283** | 0.4 | 2.1 | **299** | 0.8 | 3.3 |
| **284** | 0.9 | 5 | **300** | 0.3 | 1.1 |
| **285** | 0.6 | 1.8 | **301** | 22 | 34 |
| **286** | 0.8 | 2.7 | **302** | 3.9 | 39 |
| **287** | 69 | >1000 | **303** | 0.009 | 0.015 |
| **288** | 12 | 42 | **304** | 0.019 | 0.03 |
| **289** | 78 | >1000 | **305** | 2.6 | 3.7 |
| **290** | 1.9 | 357 | **306** | 21 | 25 |
| **291** | 22 | Nd | **313** | 3.8 | 44 |
| **292** | 35 | 1686 | **314** | 150 | >1000 |
| **293** | <0.1 | <0.1 | **315** | 3.2 | 23 |
| **294** | 1 | 7 | **320** | 19 | 78 |
| **295** | 25 | 1400 | **321** | 220 | 1142 |
| **322** | 172 | >1000 | **325** | 137 | >1000 |
| **323** | 238 | >500 | **326** | 2 | >500 |
| **324** | 11 | 15 | **327** | 19 | 26 |

### C-4.4 Wirksamkeitstest in vivo

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate wurde in vivo beispielsweise mittels Xenograft-Modellen getestet. Der Fachmann kennt Methoden im Stand der Technik, wie die Wirksamkeit eines erfindungsgemäßen Konjugats getestet werden kann (siehe z.B. WO 2005081711; Polson et al., Cancer Res. 2009 Mar 15;69(6):2358-64). Beispielsweise wurden hierzu Nagern (z.B. Mäusen) eine Tumorzelllinie, welche das Zielmolekül des Binders exprimiert, implantiert. Anschließend wurde den Implantattieren entweder ein erfindungsgemäßes Konjugat oder ein Kontrollantikörper oder

isotonische Salzlösung appliziert. Die Applikation erfolgte einmalig oder öfters. 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-4.4a** Testung der Wirksamkeit von anti-CA9 ADCs in experimentellen Tumoren in der Maus

Humane Tumorzellen, die CA9 exprimieren, werden subkutan in die Flanke von immunsupprimierten Mäusen inokuliert, beispielsweise Nude- oder nodSCID-Mäuse. 1-10 Millionen Zellen werden aus der Zellkultur abgelöst, zentrifugiert und mit 100 µl Medium oder Medium / Matrigel 1:1 resuspendiert. Die Zellsuspension wird unter die Haut der Maus gespritzt.

Innerhalb von einigen Tagen wächst ein Tumor heran. Die Behandlung beginnt frühestens nach Etablierung der Tumoren bei einer Tumorgröße von 20 $mm^2$. Um die Wirkung auf bereits etablierte Tumoren zu untersuchen, kann die Behandlung auch erst bei einer Tumorgröße von 50-100 $mm^2$ begonnen werden.

Die Behandlung mit ADCs erfolgt über die intravenöse Route in die Schwanzvene der Maus. Das ADC wird in PBS gelöst und 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. 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. Diese Zahl kann sich erhöhen, wenn besonders starke Schwankungen beim Tumorwachstum oder nach der Behandlung zu erwarten sind. 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.

Am Ende des Experiments werden die Tumoren entnommen und gewogen. Der Quotient der mittleren Tumorgewichte der Therapiegruppe (T) mit der Kontrollgruppe (C) wird als T/C angegeben. Werden Kontroll- und Behandlungsgruppen an unterschiedlichen Tagen beendet, wird die Tumorfläche am letzten Messzeitpunkt, bei dem noch alle Gruppen noch im Versuch sind, zur Berechnung des T/C verwendet.

**C-4.4b** Wirksamkeit im SNU-5 Magenkarzinom-Tumormodell

Drei Millionen SNU-5 Zellen werden subkutan in die Flanke von nodSCID Mäusen inokuliert.

Bei einer Tumorgröße von 30-40 $mm^2$ an Tag 15 beginnt die Behandlung intravenös im Dosisbereich zwischen 5 und 30 mg / kg (Tag 15, 19, 23). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum aller Gruppen verfolgt. Die Kontrollgruppen werden beendet, wenn diese die maximal zulässige Tumorgröße erreicht haben. Entweder werden zu diesem Zeitpunkt alle Gruppen gemeinsam beendet, die Tumoren entnommen und gewogen und der T/C Wert basierend auf dem Tumorgewicht gebildet, oder die Behandlungsgruppen werden hinsichtlich des weiteren Tumorwachstums beobachtet. Im letzteren Fall wird der T/C Wert basierend auf der Tumorfläche zum letzten gemeinsamen Messzeitpunkt berechnet. Die Tiere, die mit den anti-CA9 ADCs behandelt wurden, zeigen eine Tumorwachstumshemmung.

**C-4.4c** HT29- Modell

Weibliche athymische Nacktmäuse, die das nu/nu Gen tragen, wurden für die Human-Xenograft-Studie auf Mäusen verwendet. Diese Inzuchtmäuse (NMRI-background) wurden von Taconic, Dänemark mit einem Körpergewicht zwischen 18 und 21 g bezogen. Humane HT29 Kolonkarzinomzellen wurden entsprechend des ATCC-Protokolls im empfohlenen Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Zellen wurden für die Transplantation im subkonfluenten Zustand (80% Konfluenz) geerntet. Am Tag 0 wurden Tumoren durch subkutane (s.c.) Injektion von $1x10^6$ HT29-Zellen in 50% Matrigel/ 50% Kulturmedium (ohne FCS) in den Mäusen initiiert. Das Transplantationsvolumen war 100µl, Transplantationsstelle die linke Flanke. Das Tumorwachstum wurde bestimmt durch die Messung der Tumorfläche (Berechnung: längster Durchmesser x die Länge der Senkrechten dazu), gemessen per Kaliper. Die Tumoren wurden je nach Aufgabenstellung bis zu einer vorher definierten Größe von 20 – 30 oder 40 – 50$mm^2$ herangezogen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere randomisiert und den einzelnen Versuchsgruppen – Kontrollgruppen und Behandlungsgruppen - zugeordnet. Die Behandlung mit ADCs wurde jeden vierten Tag und insgesamt 3 mal durchgeführt (Q4Dx3). Die Behandlungsform war eine intravenöse (i.v.) Injektion in die Schwanzvene. Die Behandlung jedes Tieres basierte auf dem individuellen Körpergewicht, Behandlungsvolumina waren 5 - 10 mL/ kg Körpergewicht. Die Messung von Tumorfläche und Körpergewicht erfolgte zweimal wöchentlich, das Körpergewicht wurde als Maß für die behandlungsassoziierte Toxizität überwacht. Tiere wurden getötet bei Anzeichen von Toxizität, oder wenn der Tumor eine Größe von 150$mm^2$ erreichte oder wenn Tumoren nekrotisch wurden. Zum Zeitpunkt der Beendigung einer Gruppe wurden die Tiere getötet, die Tumoren entnommen und das jeweilige Tumornaßgewicht bestimmt. Das Ansprechen auf die Behandlung wurde berechnet als

Verhältnis Behandlung zu Kontrolle, basierend auf der Tumorfläche oder dem finalen Tumorgewicht, wo zutreffend.

**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:**

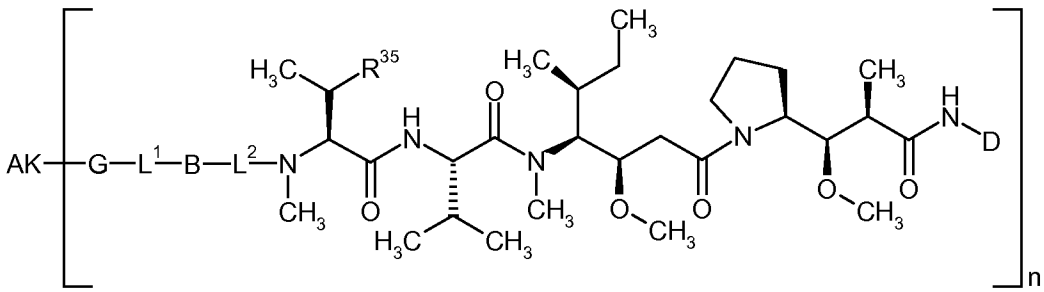
Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch „Mischen mit" bzw. „Lösen in" inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen (z.B. Puffersubstanzen, Stabilisatoren, Lösungsvermittler, Konservierungsmittel) 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.

**Ansprüche**

1. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia)



(Ia),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für einen Binder steht,

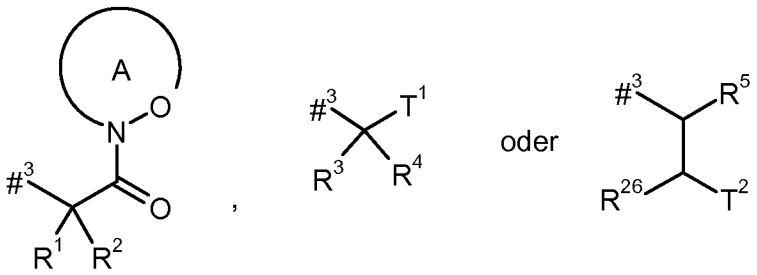
die Gruppe §-G-$L^1$-B-$L^2$-§§ für einen Linker steht,

wobei

§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

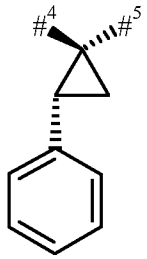
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

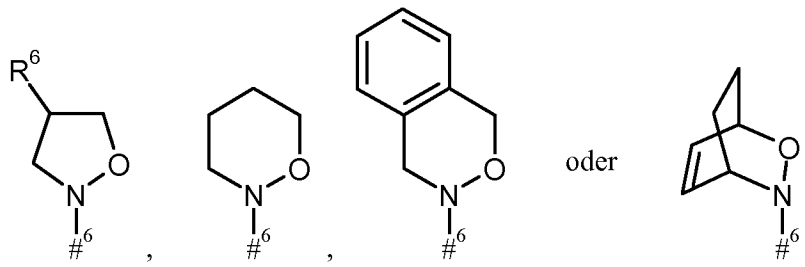



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

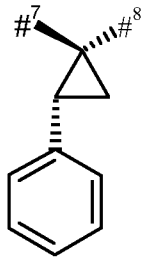
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

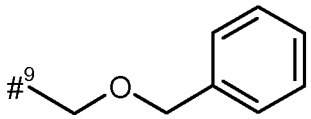
oder

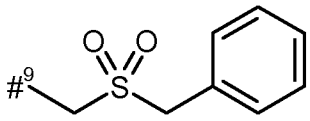
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

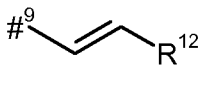
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

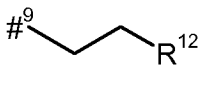
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

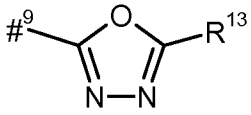


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

2. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß Anspruch 1, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

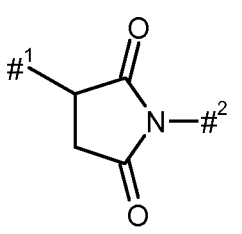
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

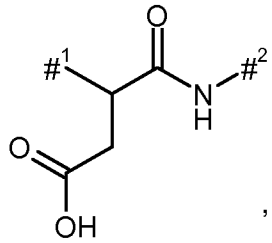
wobei

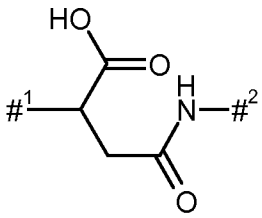
$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

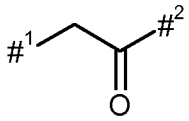
$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



,


,



oder 


steht, wobei

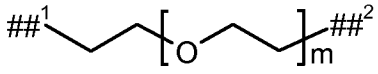
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

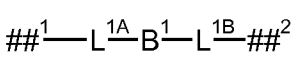
$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^1$ kennzeichnet,

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



oder 


steht, wobei

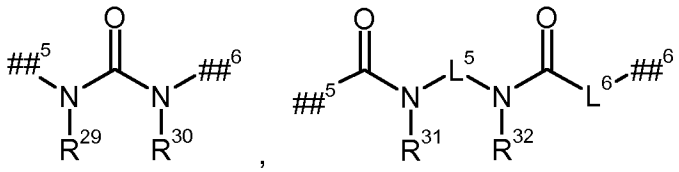
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

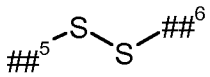
## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

$##^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



oder 

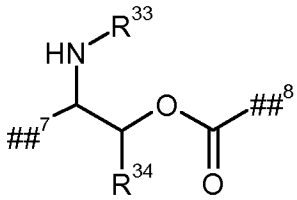
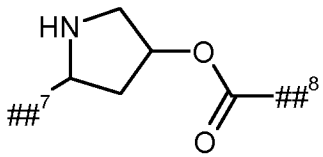
steht, worin

$##^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

$##^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, worin

$##^7$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

$##^8$ die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

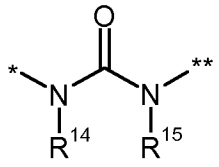
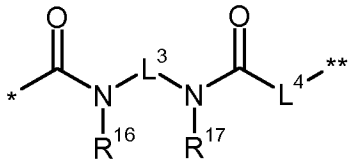
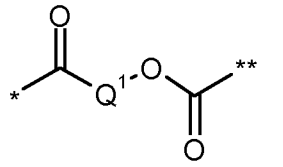
und

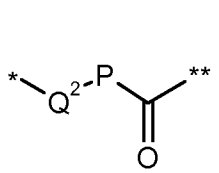
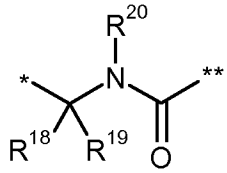
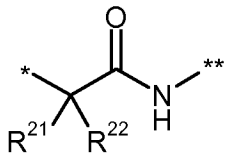
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

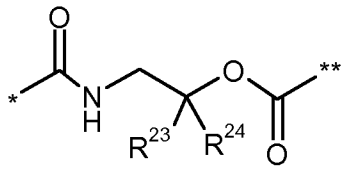
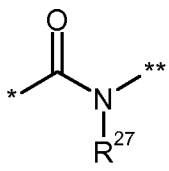
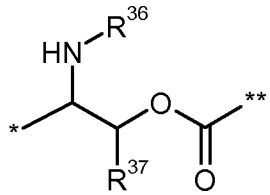
und

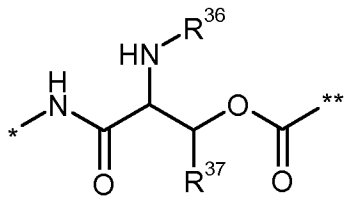
wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,

,


,

,

,


,

,


oder 

steht, wobei

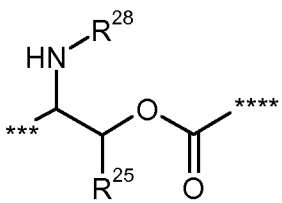
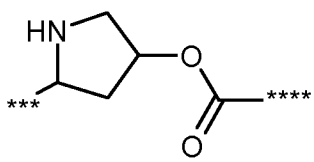
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder $(C_2\text{-}C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder 

steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

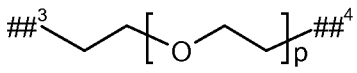
$R^{36}$ für Wasserstoff, ($C_1$-$C_4$)-Alkylcarbonyl, tert.-Butyloxycarbonyl oder Benzyloxy carbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

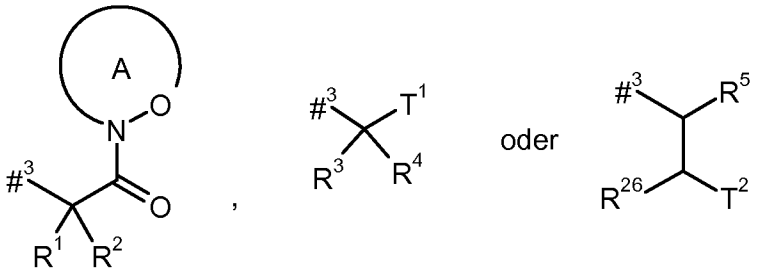
wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlen-

stoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

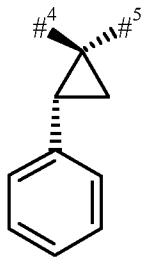
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

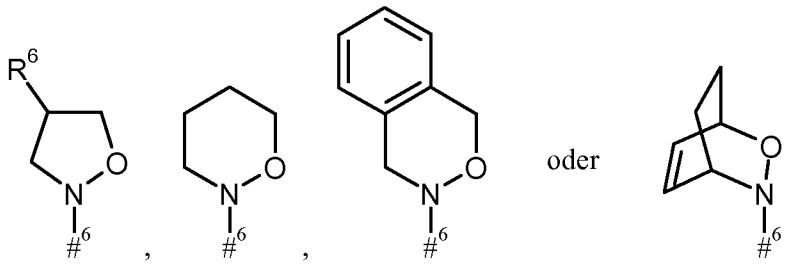



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

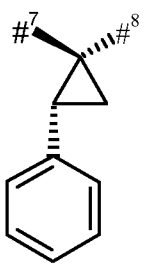
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

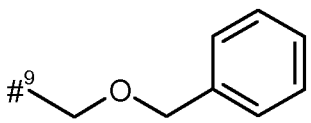
oder

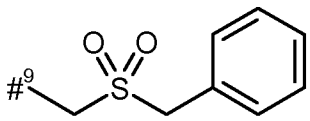
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

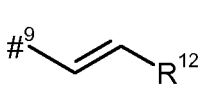
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

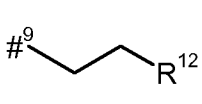
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

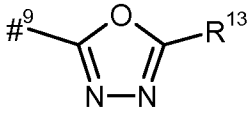


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

3. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß Anspruch 1 oder 2, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

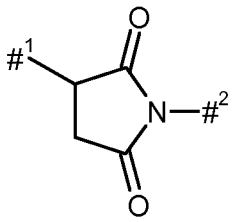
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

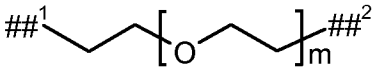
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

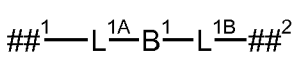
$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^1$ kennzeichnet,

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel




oder 


steht, wobei

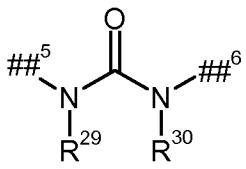
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

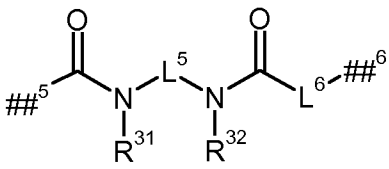
## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

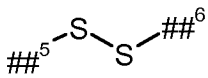
$\#\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel




, 


oder 

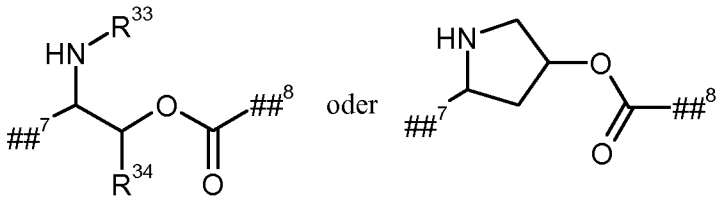

steht, worin

## 5 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## 6 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

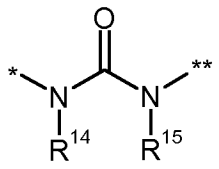
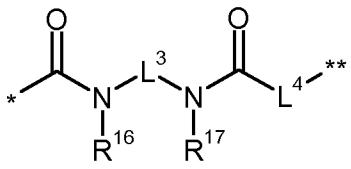
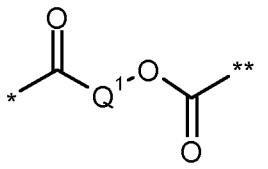
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

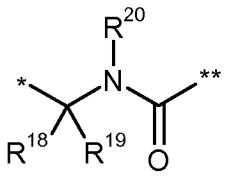
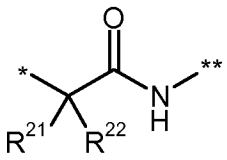
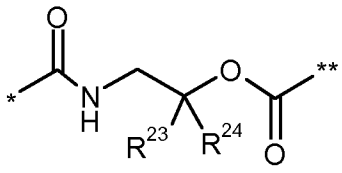
$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

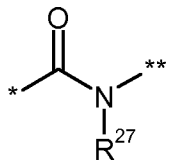
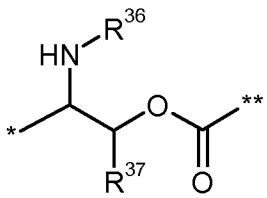
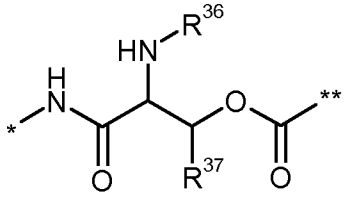
und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,

,


,

,

,


,

oder


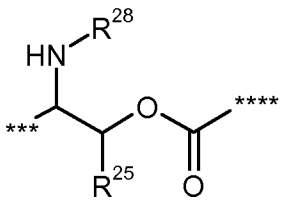
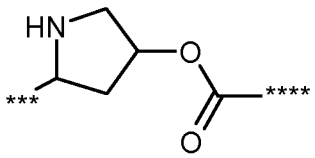
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff steht,

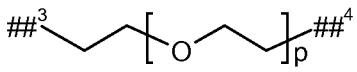
$R^{36}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{36}$ und $R^{37}$ bilden zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinring,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

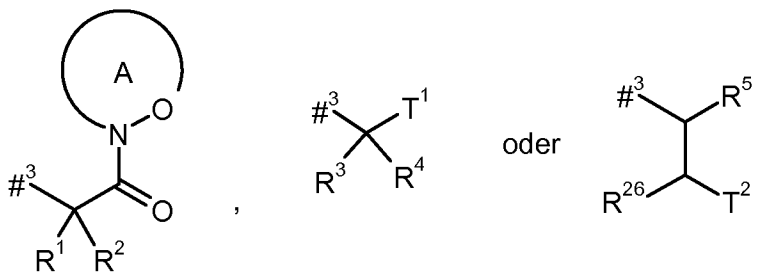
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

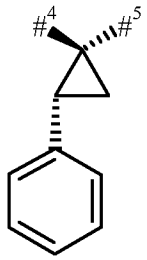
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

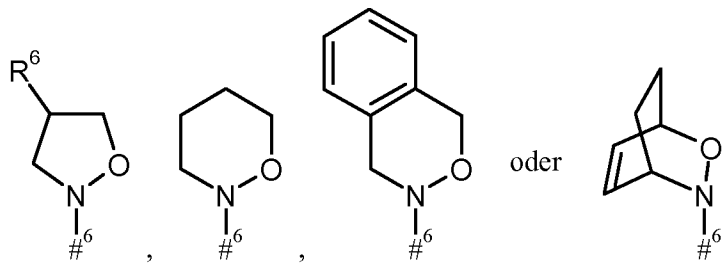



bilden, worin

#4 die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

#5 die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

#6 die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

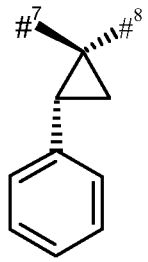
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

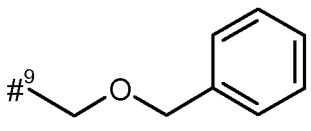
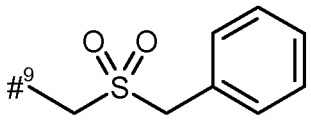
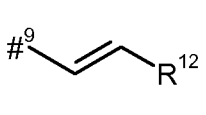
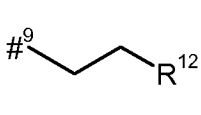
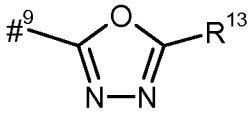
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel





oder


steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

4. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

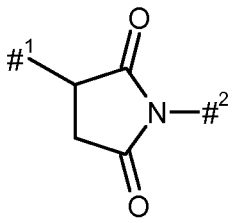
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

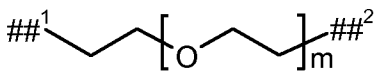
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



steht, wobei

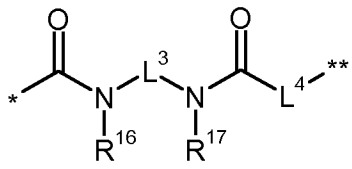
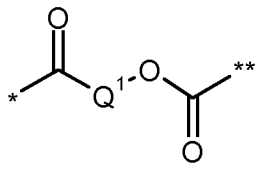
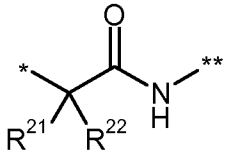
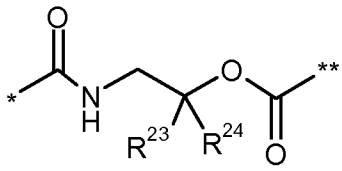
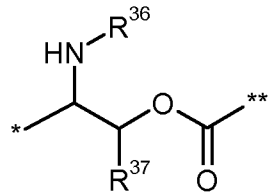
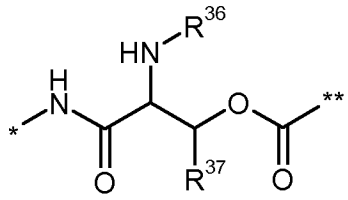
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel






oder


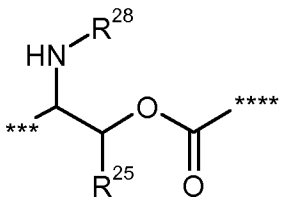
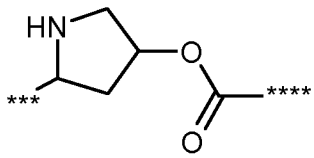
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

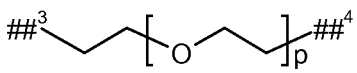
$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$R^{36}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{37}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



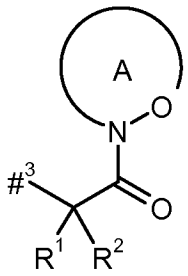

steht, wobei

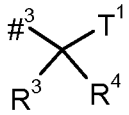
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

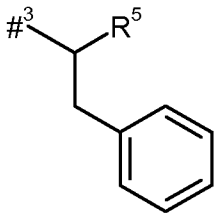
## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

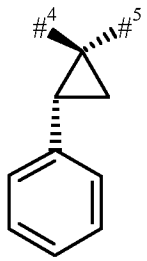
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

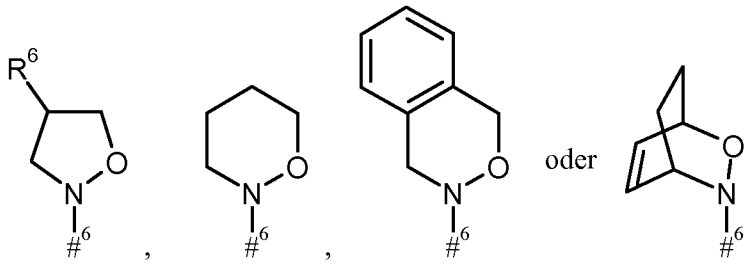



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

#6 die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

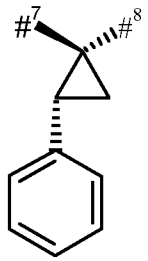
R6 für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

R3 für Wasserstoff steht,

R4 für Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

R3 und R4 zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

#7 die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

#8 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe T1 kennzeichnet,

T1 für eine Gruppe der Formel -C(=O)-OR7, -C(=O)-NR8R9 oder -CH2-O-R11 steht,

worin

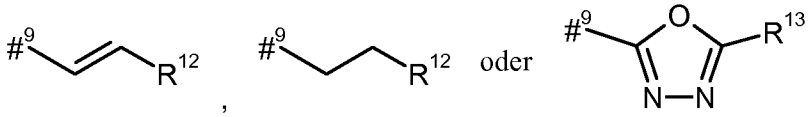
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ für Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

5. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß einem der Ansprüche Ansprüchen 1 bis 4, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

AK für $AK_2$ steht,

wobei

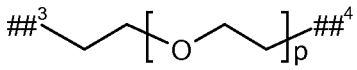
$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



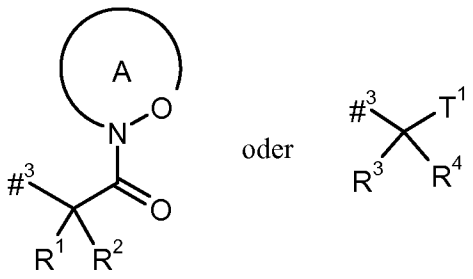

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

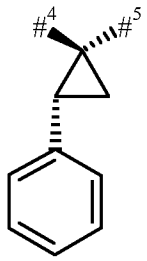
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

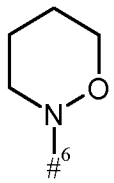


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

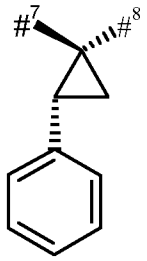
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff oder Benzyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

6. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in welcher

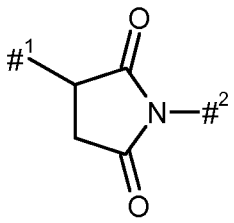
n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

AK für $AK_1$ steht,

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für eine Gruppe der Formel

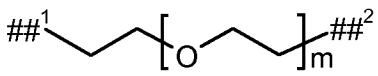


steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

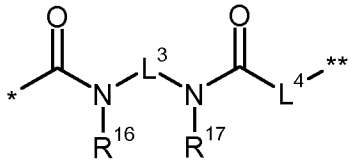
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



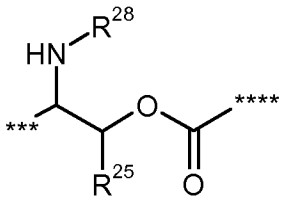
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

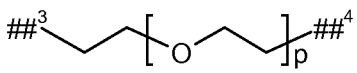
$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_3$-$C_5$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



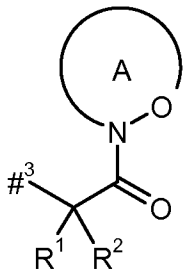
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

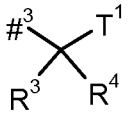
## $^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

## $^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



oder



steht, wobei

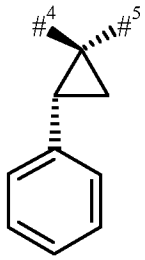
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

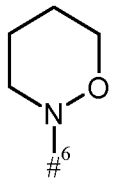


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

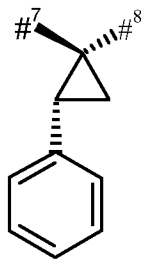
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 4-Hydroxybenzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

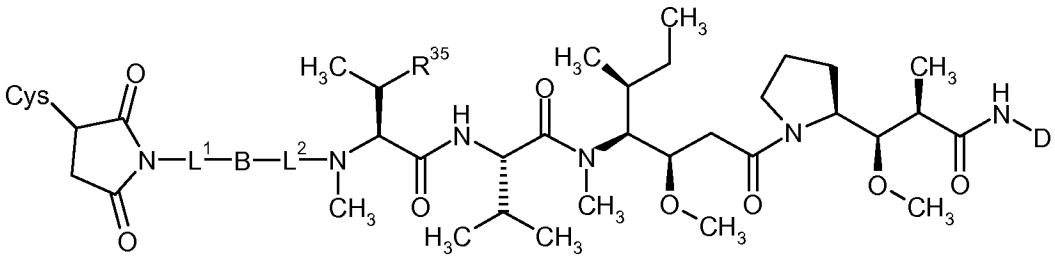
$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff oder Benzyl steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

7. Verbindungen der Formel (XXXa)

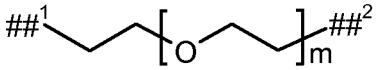
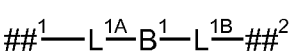


(XXXa),

in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette an ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

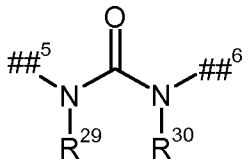
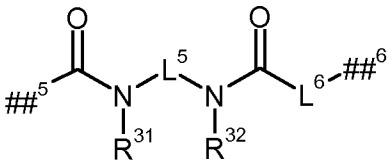
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

$##^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

$##^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder $(C_2$-$C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares $(C_2$-$C_{10})$-Alkandiyl steht,

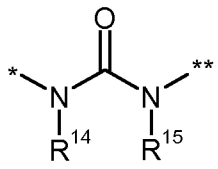
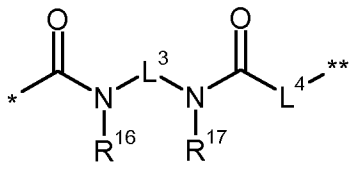
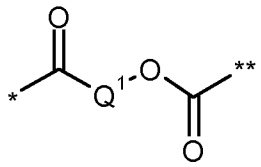
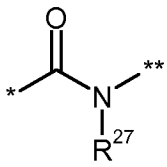
und

wobei $(C_1$-$C_{10})$-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem $(C_3$-$C_6)$-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder


steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder $(C_2\text{-}C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

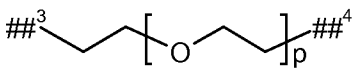
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

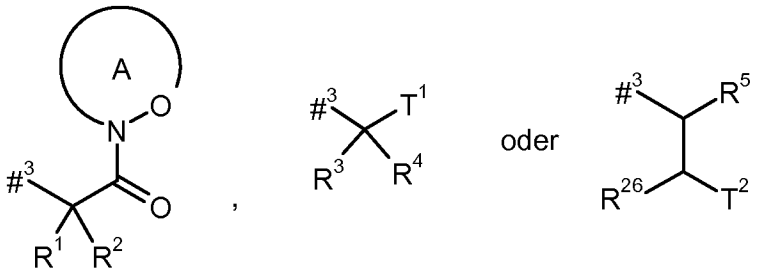
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

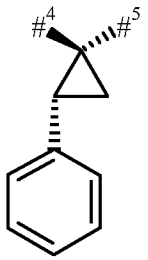
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

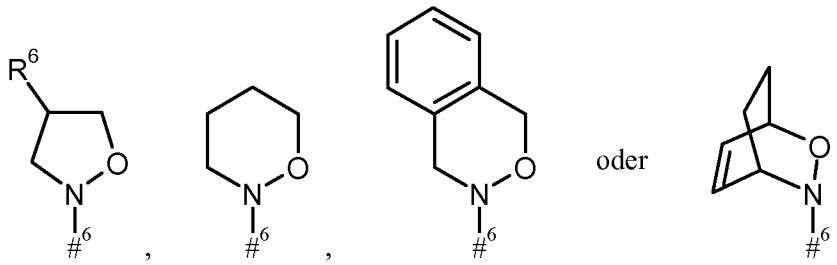



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

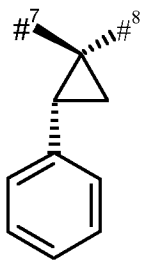
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

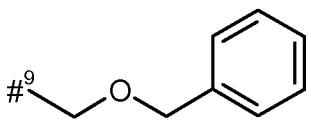
oder

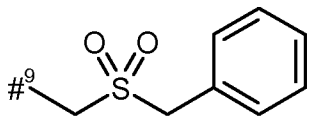
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

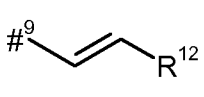
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

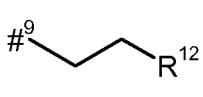
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

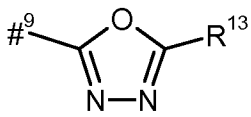


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

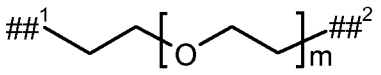
$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

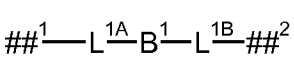
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

8. Verbindungen der Formel (XXXa) gemäß Anspruch 7, in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



oder



steht, wobei

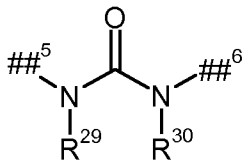
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

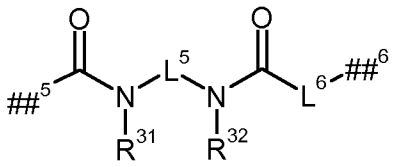
## 1 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

##2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel



oder



steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

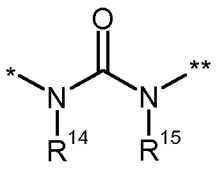
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

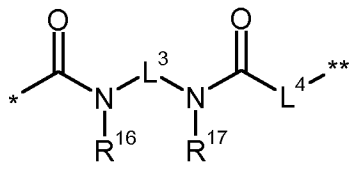
und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

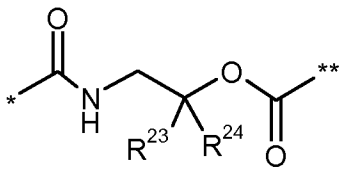
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



,



oder



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

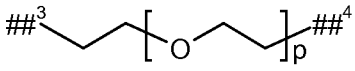
oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, Piperazinylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



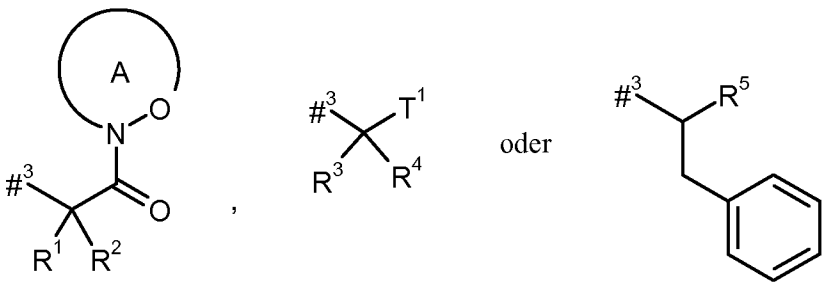

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

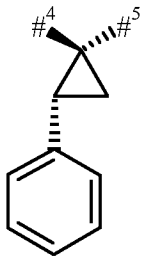
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

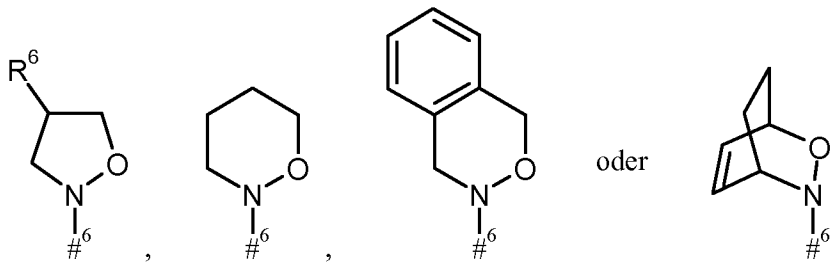



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

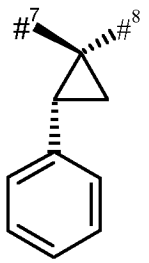
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

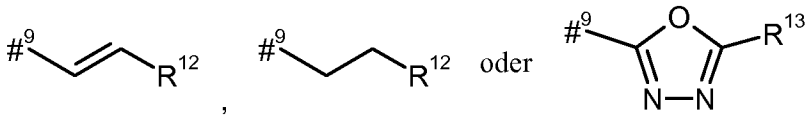
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^{5}$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

$\#^{9}$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

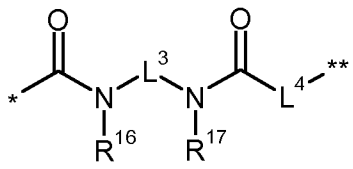
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

9. Verbindungen der Formel (XXXa) gemäß Ansprüchen 7 und 8, in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^{1}$ für eine Bindung oder lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^{1}$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^{2}$ kennzeichnet,

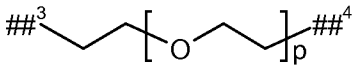
$L^3$ für eine Bindung steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



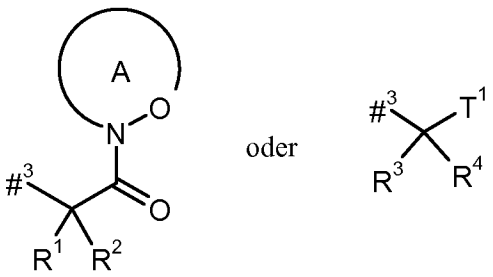

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

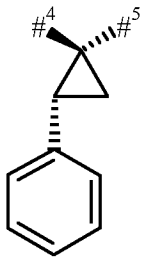
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

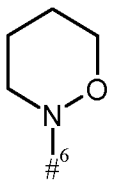


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

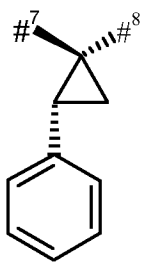
$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$ oder $-C(=O)-NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

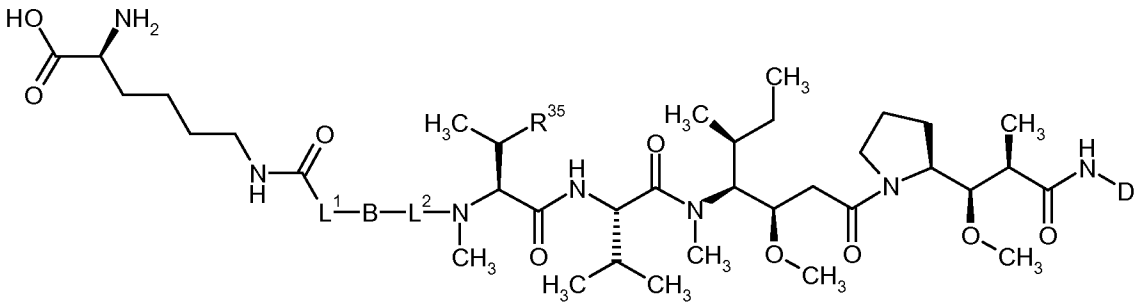
$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

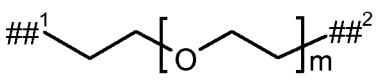
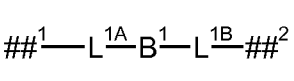
10. Verbindungen der Formel (XXXI)



(XXXI),

in welcher

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

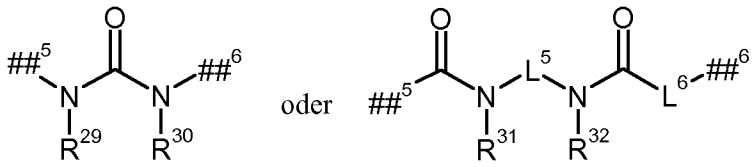
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

## [2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel




steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung oder ($C_2$-$C_4$)-Alkandiyl steht,

$L^6$ für eine Bindung steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{29}$ und $R^{30}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{32}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{31}$ und $R^{32}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl steht,

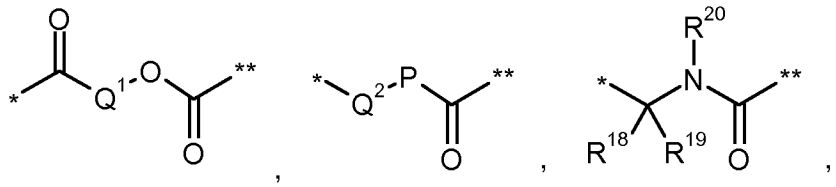
und

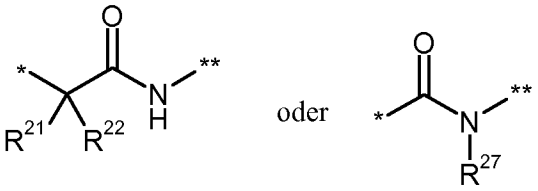
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel





oder



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

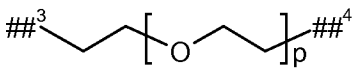
$R^{22}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

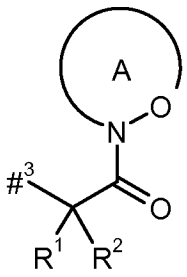
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

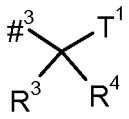
wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

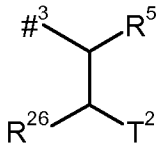
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

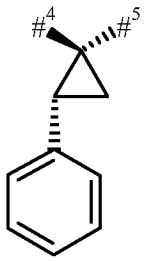
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

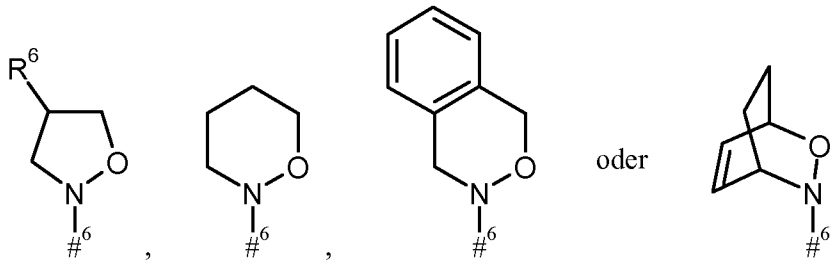



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

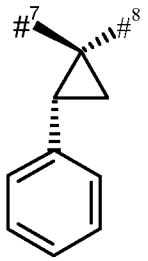
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

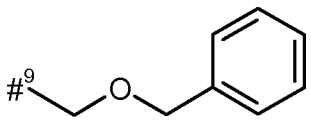
oder

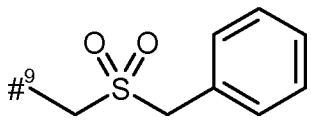
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

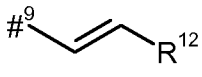
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

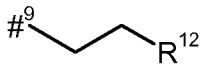
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

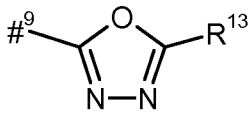


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

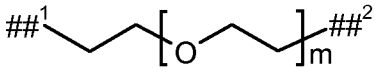
$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

11. Verbindungen der Formel (XXXI) gemäß Anspruch 10, in welcher

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

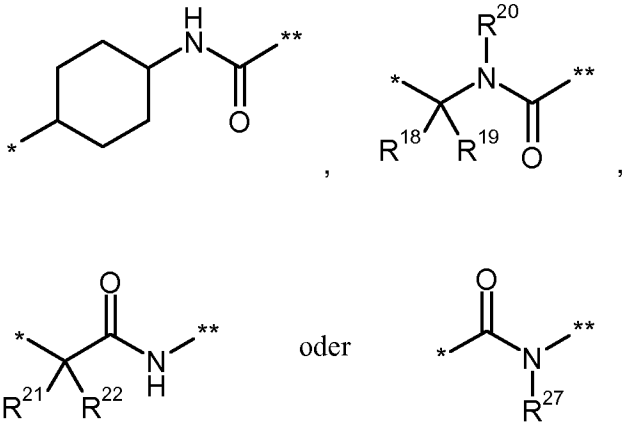
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## [1] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

$##^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Methyl, Propan-2-yl, 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

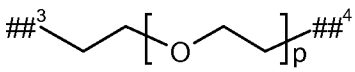
$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropyl-Ring bilden,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

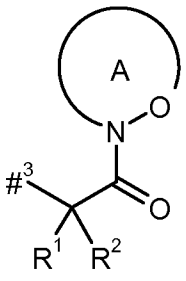
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

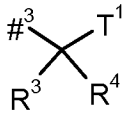
wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

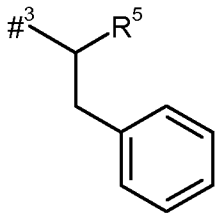
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel



,


oder



steht, wobei

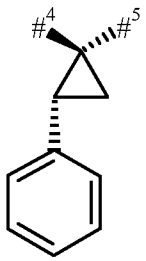
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

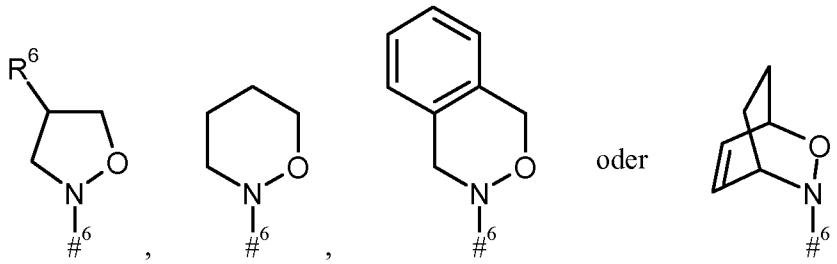



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

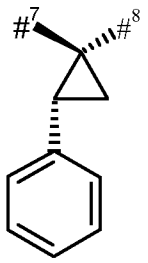
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-yl-methyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$, $-C(=O)-NH-NH-R^{10}$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

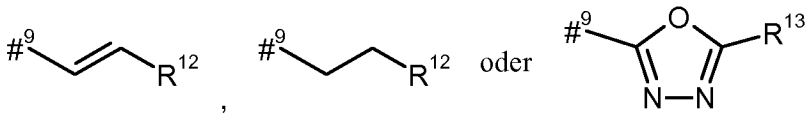
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

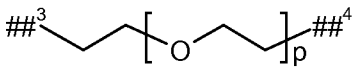
sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

12. Verbindungen der Formel (XXXI) gemäß Ansprüchen 10 und 11, in welcher

$L^1$ für eine Bindung steht,

B für eine Bindung steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



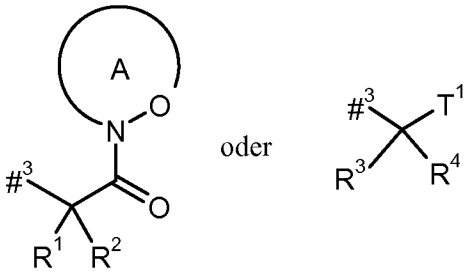
steht, wobei

p für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

$##^3$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

$##^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



oder



steht, wobei

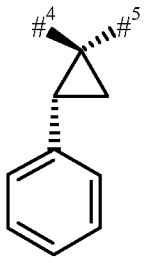
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

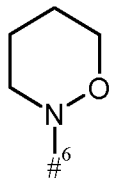


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

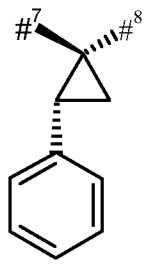
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$ oder -C(=O)-$NR^8R^9$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff steht,

$R^8$ für Wasserstoff steht,

$R^9$ für Wasserstoff steht,

$R^{35}$ für Methyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

13. Verbindungen der Formeln (XXXa) und (XXXI) ausgewählt aus der Gruppe:

*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-carboxy-2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid,

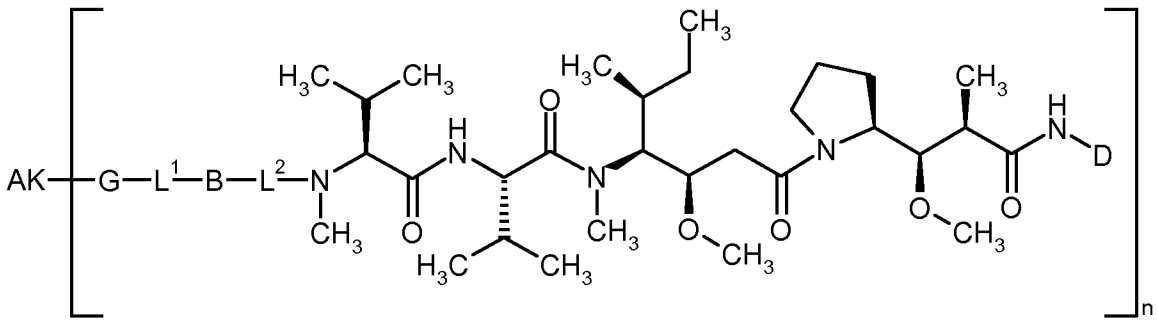
*N*-[6-(3-{[(2*R*)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexyl]-*N*-methyl-L-valyl-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-*N*-methyl-L-valinamid,

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(1,2-oxazinan-2-yl)-1-oxopropan-2-yl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid-Trifluoracetat,

N-(6-{[(5S)-5-Amino-5-carboxypentyl]amino}-6-oxohexyl)-N-methyl-L-valyl-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-yl}-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valinamid,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

14. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (I)



(I),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für einen Binder steht,

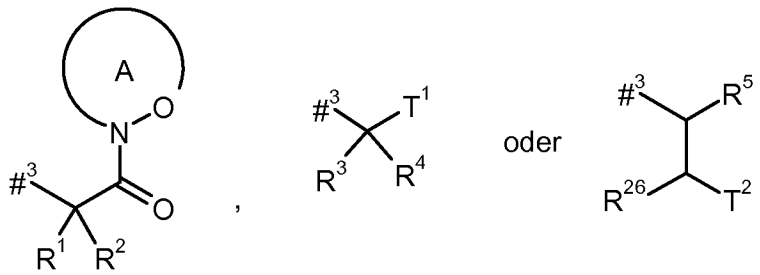
die Gruppe §-G-L$^1$-B-L$^2$-§§ für einen Linker steht,

wobei

§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

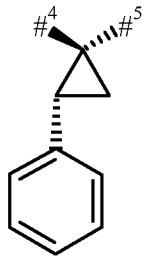
#$^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

R$^1$ für Wasserstoff steht,

R$^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

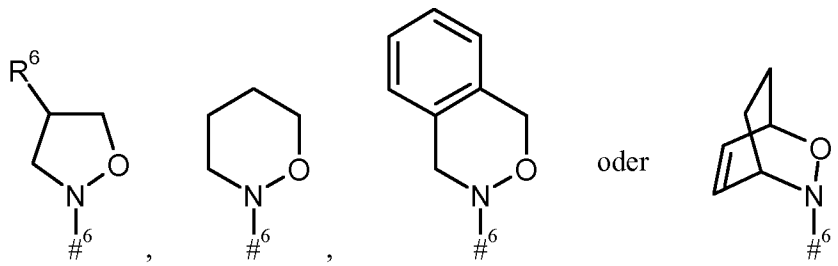


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

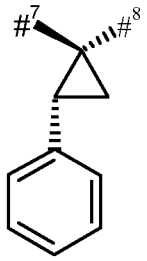
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

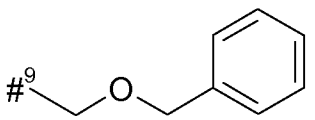
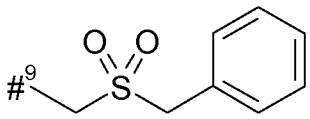
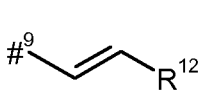
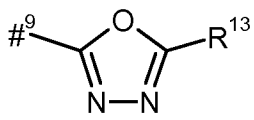
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel




oder


steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

15. Binder-Wirkstoff Konjugate nach Anspruch 14 der allgemeinen Formel (I),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

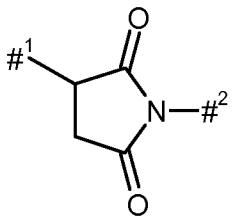
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

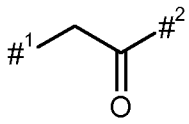
$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




oder




steht, wobei

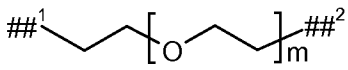
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

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

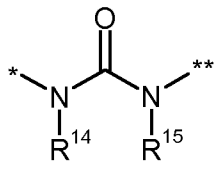
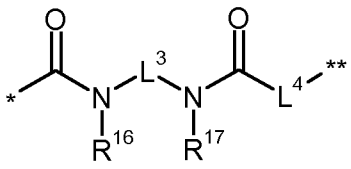
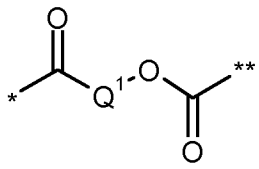
$\#\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

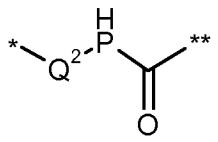
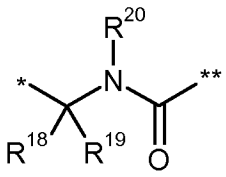
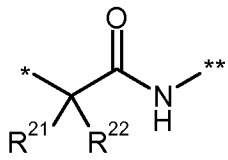
wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

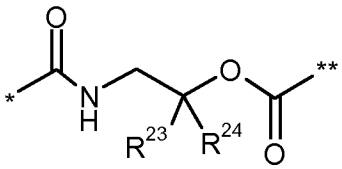
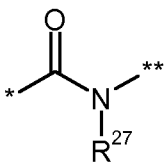
und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,

,


,

,

,


oder


steht, wobei

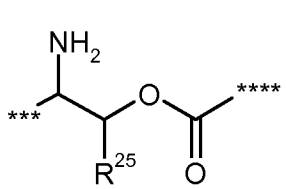
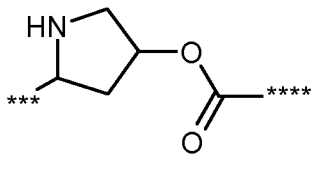
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder $(C_2$-$C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

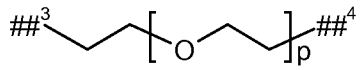
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder ($C_1$-$C_4$)-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D die in Anspruch 14 angegebenen Bedeutungen aufweist,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

16. Binder-Wirkstoff Konjugate nach Anspruch 14 oder 15 der allgemeinen Formel (I),

in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht und über ein Schwefelatom an die Gruppe G gebunden sind,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht und über ein Stickstoffatom an die Gruppe G gebunden sind,

n, G, $L^1$, B, $L^2$ und D die in Anspruch 14 oder 15 angegebenen Bedeutungen aufweisen,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

17. Binder-Wirkstoff Konjugate nach einem der Ansprüche 14 bis 16 der allgemeinen Formel (I), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

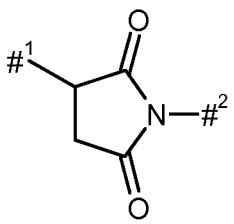
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörperfragment steht, der bzw. das an EGFR bindet und über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

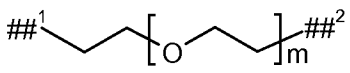
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

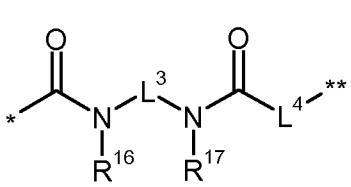
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

$##^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

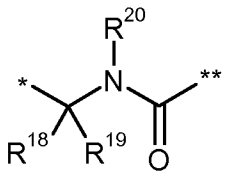
$##^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

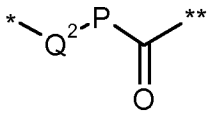
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



,



oder



steht, wobei

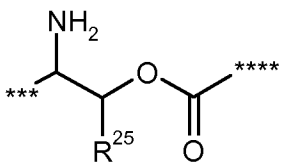
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$Q^2$ für Cyclopentyl oder Cyclohexyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

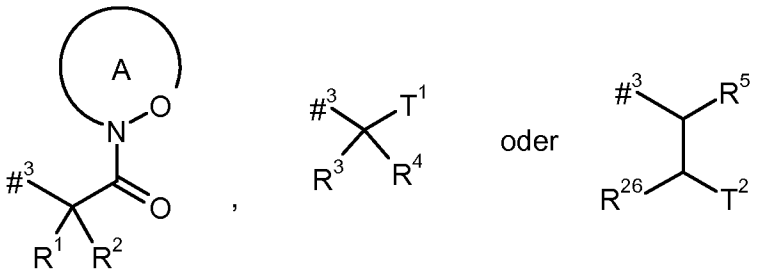
oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

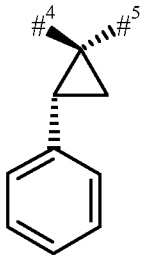
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

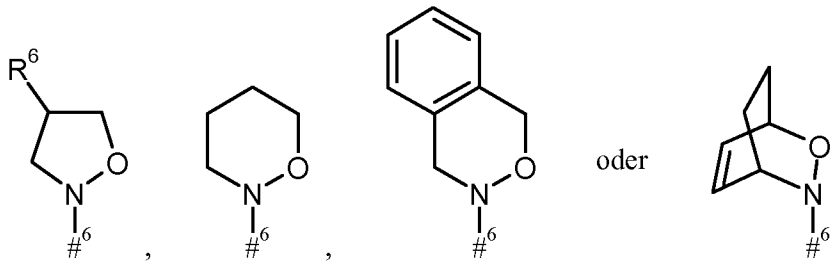



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

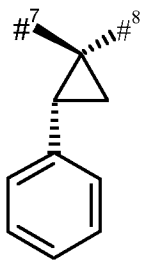
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

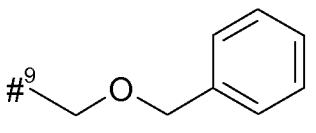
oder

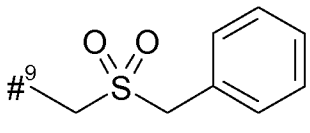
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

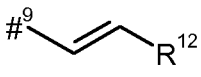
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

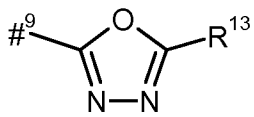
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

18. Binder-Wirkstoff Konjugate nach einem der Ansprüche 14 bis 17 der allgemeinen Formel (I), in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

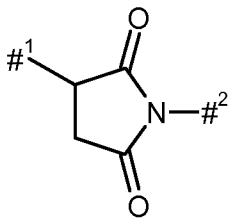
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über das Schwefelatom eines Cystein-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, der über die NH-Seitengruppe eines Lysin-Restes des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

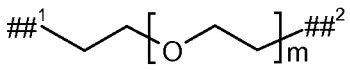
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

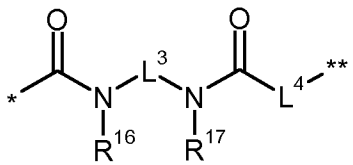
m für eine Zahl 2 oder 3 steht,

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

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



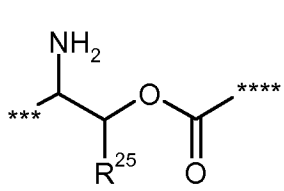
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

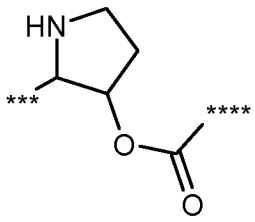
** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

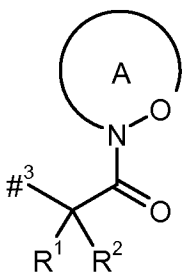
$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

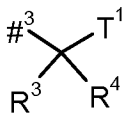
$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

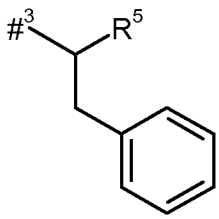
D für eine Gruppe der Formel




,




oder




steht, wobei

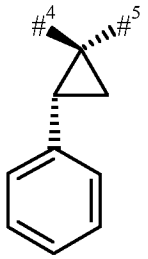
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

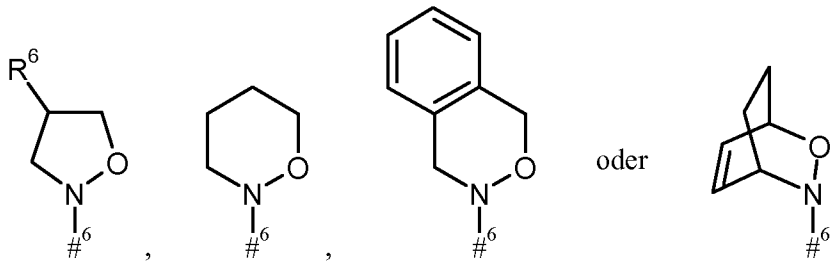



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

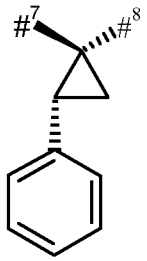
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe T kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

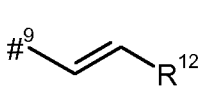
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

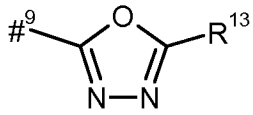
$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel




oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit –CHC($R^{26}$)Phenyl kennzeichnet,

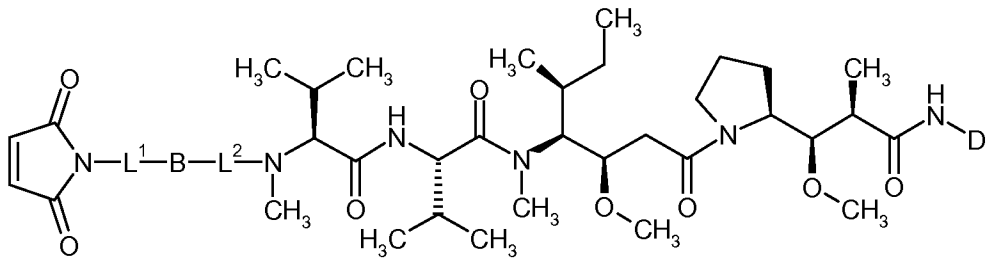
$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $–S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

19. Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) wie in einem der Ansprüche 14- bis 18 definiert, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung des Binders in einem Puffer

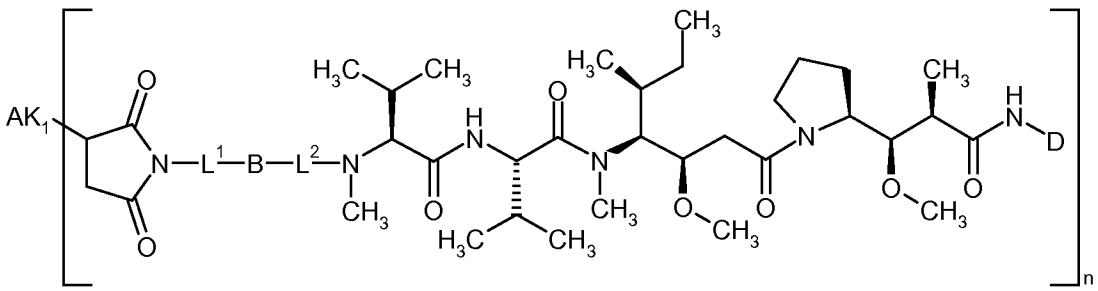
[A] mit einem geeigneten Reduktionsmittel, wie beispielsweise Dithiothreitol oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid, versetzt, und anschließend mit einer Verbindung der Formel (II)



(II),

in welcher D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die die in den Ansprüchen 14 bis 18 angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (I-A)



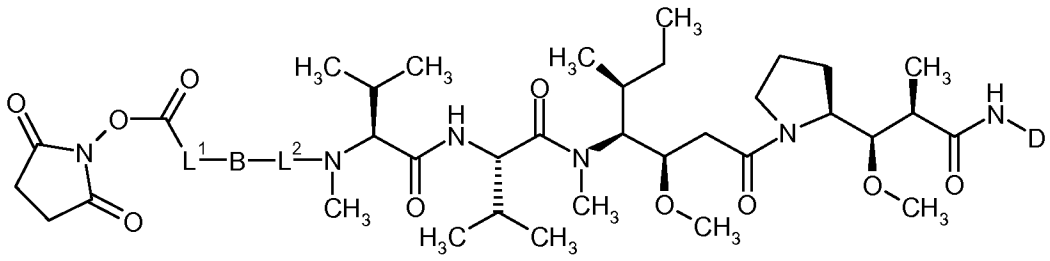
(I-A),

in welcher n, $AK_1$, D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die die in den Ansprüchen 14 bis 18 angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt,

oder

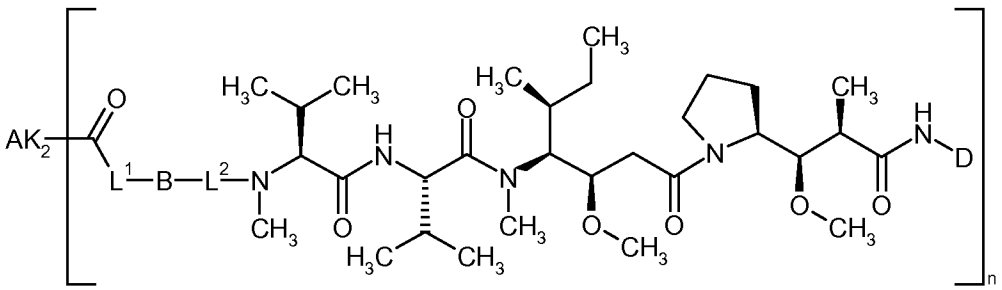
[B] mit einer Verbindung der Formel (III)



(III),

in welcher D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die die in den Ansprüchen 14 bis 18 angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (I-B)



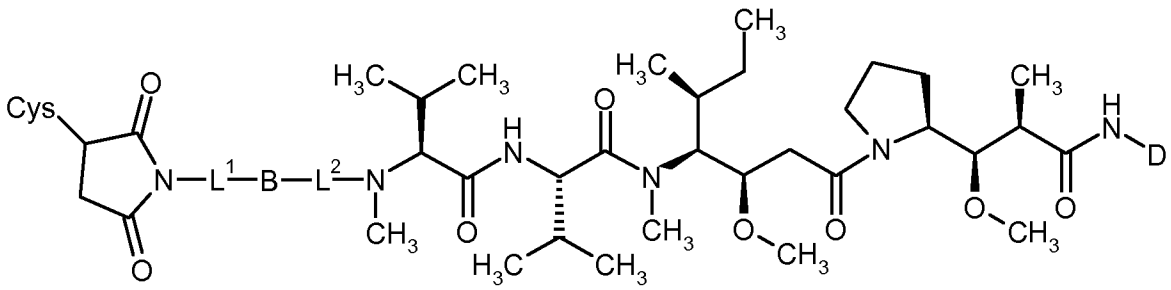
(I-B),

in welcher n, $AK_2$, D, $L^1$, B und $L^2$ jeweils die die in den Ansprüchen 14 bis 18 angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

20. Verbindungen hergestellt nach dem Verfahren gemäß Anspruch 19 oder 51, wobei $AK_1$ und $AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab, Nimutuzumab steht sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

21. Verbindungen der Formel (XXX)

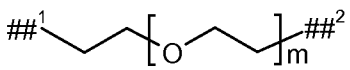


(XXX),

in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette an ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## $^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

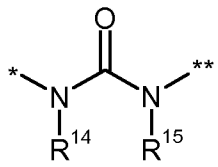
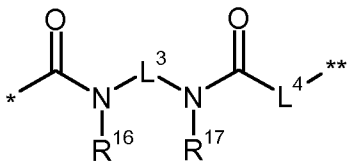
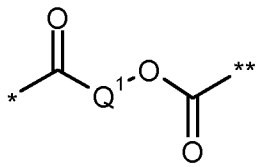
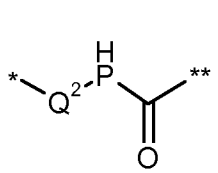
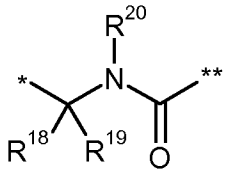
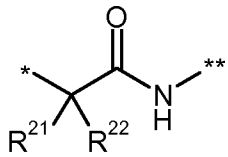
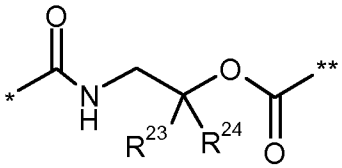
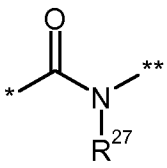
## $^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_1$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel








oder


steht, wobei

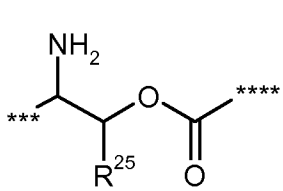
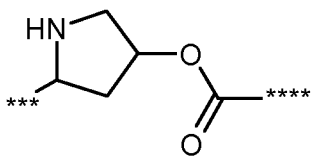
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

P für O oder NH steht,

$L^3$ für eine Bindung, oder $(C_2\text{-}C_4)$-Alkandiyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$Q^1$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Aza-Heterocyclus steht,

$Q^2$ für einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus oder einen 4- bis 7-gliedrigen Aza-Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{14}$ und $R^{15}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff oder die Seitengruppe einer natürlichen α-Aminosäure oder ihrer Homologe oder Isomere steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder $(C_1$-$C_4)$-Alkyl steht,

oder

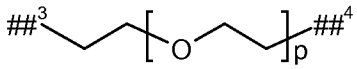
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen 3- bis 7-gliedrigen Carbocyclus bilden,

$R^{23}$ für $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff oder $(C_1\text{-}C_4)$-Alkyl steht,

$L^2$ für lineares $(C_2\text{-}C_{10})$-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

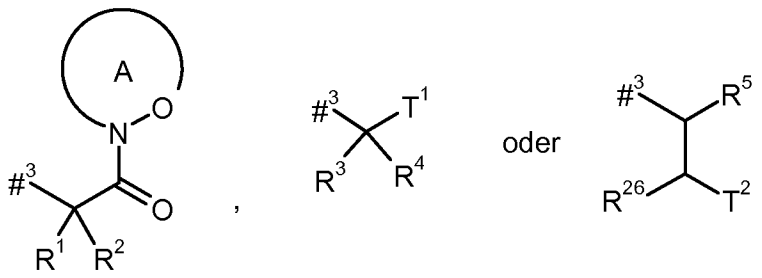
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei $(C_2\text{-}C_{10})$-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem $(C_3\text{-}C_6)$-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

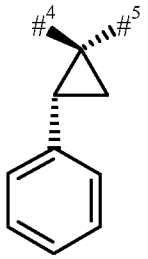
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

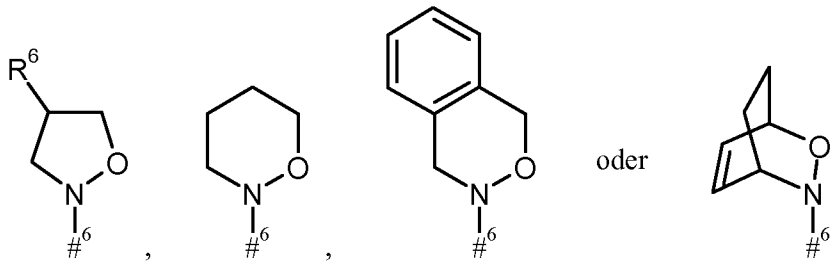



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

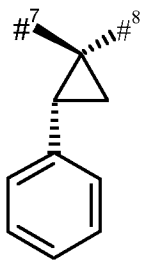
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

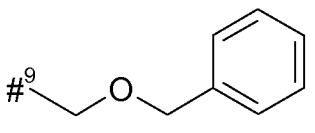
oder

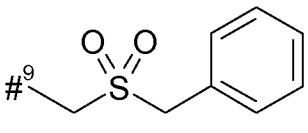
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

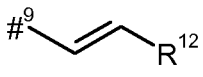
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

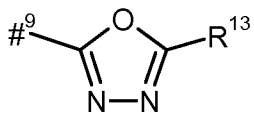
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel



,


,



oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

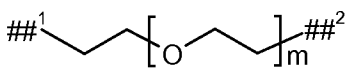
$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

22. Verbindungen der Formel (XXX) nach Anspruch 21, in welcher

Cys für einen Cystein-Rest steht, der über das Schwefelatom der Seitenkette über ein Kohlenstoffatom des Succinimids gebunden ist, steht

$L^1$ für eine Bindung, lineares $(C_2-C_6)$-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

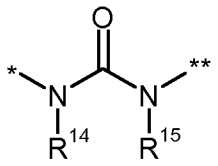
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

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

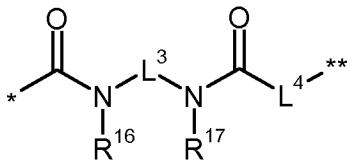
##[2] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

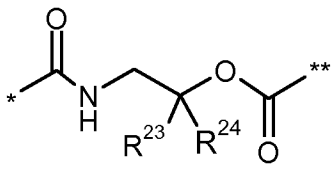
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel




,




oder




steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

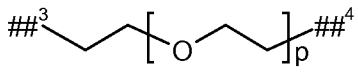
oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



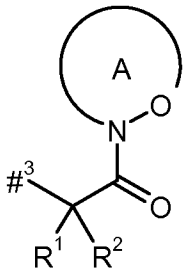
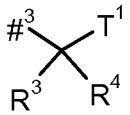
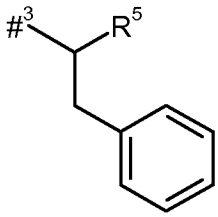
steht, wobei

p für eine Zahl 2 oder 3 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel


,

oder


steht, wobei

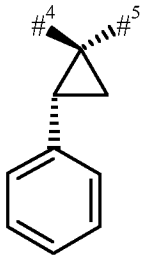
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

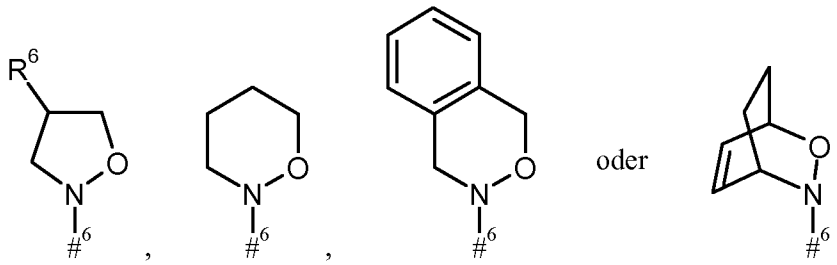


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

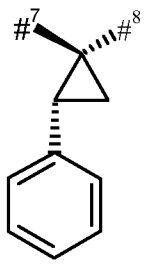
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe T kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

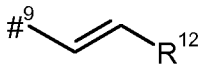
$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

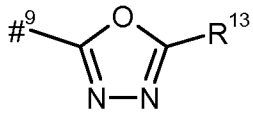
$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel




oder




steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit –CHC($R^{26}$)Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel –S(O)$_2$OH substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

23. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 49 – 50, wobei der Binder an ein Krebs-Zielmolekül bindet.

24. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 23 oder 49 – 50, wobei der Binder an ein extrazelluläres Zielmolekül bindet.

25. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23 oder 24 oder 49 – 50, wobei der Binder an ein extrazelluläres Krebs-Zielmolekül bindet.

26. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24 oder 25 oder 49 – 50, wobei das Zielmolekül, extrazelluläre Zielmolekül, Krebs-Zielmolekül oder extrazelluläre Krebs-Zielmolekül ein Protein ist.

27. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25 oder 26 oder 49 – 50, wobei der Binder nach Bindung an das extrazelluläre Zielmolekül von der das Zielmolekül exprimierenden Zelle internalisiert wird.

28. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26 oder 27 oder 49 – 50, wobei der Binder ein Bindeprotein ist.

29. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27 oder 28 oder 49 – 50, wobei der Binder ein Antikörper oder ein antigen-bindendes Antikörperfragment davon oder ein Antikörpermimetikum ist.

30. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28 oder 29 oder 49 – 50, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

31. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 oder 30 oder 49 – 50, wobei der Antikörper ein humaner, humanisierter oder chimärer Antikörper ist.

32. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 oder 31 oder 49 – 50, wobei der Antikörper ein intakter oder ein modifizierter intakter Antikörper ist.

33. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 oder 32 oder 49 – 50, wobei der Antikörper ein Antikörper der IgG Klasse ist.

34. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 oder 33 oder 49 – 50, wobei der Binder an ein extrazelluläres Krebs-Zielmolekül bindet, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus EGF-Rezeptor (NP_005219.2), Mesothelin (Q13421-3), C4.4a (NP_055215.2), Carboanhydrase IX (CA IX; NP_001207.2) ), Her2, Glypican-3, TYRP1, Fibroblast growth factor receptor 3,

Single-pass type I membrane protein ICOSLG, und Programmed cell death 1 ligand 1.

35. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 oder 34 oder 49 – 50, wobei der Binder spezifisch an ein extrazelluläres Krebs-Zielmolekül bindet, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus EGF-Rezeptor (NP_005219.2), Mesothelin (Q13421-3), C4.4a (NP_055215.2, Carboanhydrase IX (CA IX; NP_001207.2) ), Glypican-3, TYRP1, Fibroblast growth factor receptor 3, Single-pass type I membrane protein ICOSLG, und Programmed cell death 1 ligand 1.

36. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 oder 35 oder 49 – 50, wobei der Antikörper an EGFR bindet.

37. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 23 – 36 oder 49 – 50, wobei der Antikörper spezifisch an EGFR bindet.

38. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 23 – 37 oder 49 – 50, wobei der anti-EGFR Antikörper ausgewählt wird 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.

39. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 23 – 38 oder 49 – 50, wobei der anti-EGFR Antikörper ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, die die sechs CDR Sequenzen eines der folgenden Antikörper umfassen: 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.

40. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 23 – 39, wobei der anti-EGFR Antikörper ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, die die Amnosäuresequenz der variablen leichten Kette und der variablen schweren Kette eines der folgenden Antikörper umfassen 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.

41. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 – 6, 14 – 18 oder 23 – 40 oder 49 – 50, wobei der anti-EGFR Antikörper ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab, Zalutumumab, Necitumumab und Matuzumab.

42. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat oder eine Verbindgung nach einem der Ansprüche 1 – 18 oder 23 – 41 oder 49 – 50, zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

43. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat oder eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 – 18 oder 23 – 41 oder 49 – 50, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung und/ oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen.

44. Ein Binder-Wirkstoff-Konjugat oder eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 – 18 oder 23 – 41 oder 49 – 50, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen.

45. Arzneimittel enthaltend ein Binder-Wirkstoff-Konjugat oder eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 – 18 oder 23 – 41 oder 49 – 50, in Kombination mit einem inerten, nicht-toxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff.

46. Arzneimittel enthaltend ein Binder-Wirkstoff-Konjugat oder eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 – 18 oder 23 – 41 oder 49 – 50, in Kombination mit einer oder mehreren anti-hyperproliferativen, zytostatischen oder zytotoxischen Substanzen.

47. Arzneimittel nach Anspruch 44 bis 46 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen.

48. Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen bei Menschen und Tieren unter Verwendung einer wirksamen Menge mindestens eines Binder-Wirkstoff-Konjugates oder eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 – 18 oder 23 – 41 oder 49 – 50, oder eines Arzneimittels, wie in einem der Ansprüche 44 bis 46 definiert.

49. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß Anspruch 1, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 20 steht,

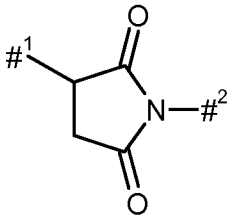
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

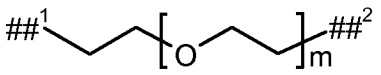
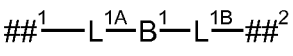
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel

 oder 

steht, wobei

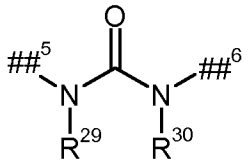
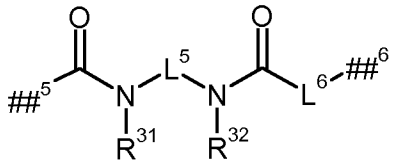
m für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

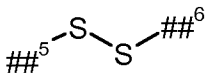
$\#\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

$L^{1A}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

$B^1$ für eine Gruppe der Formel

oder 

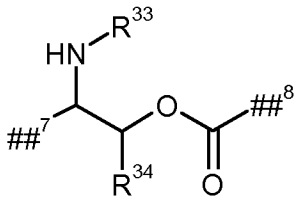
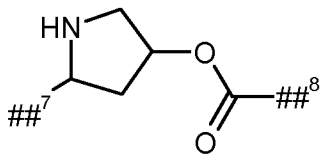
steht, worin

## [5] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1A}$ kennzeichnet,

## [6] die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $L^{1B}$ kennzeichnet,

$L^5$ für eine Bindung steht,

$L^6$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder 

steht, worin

## [7] die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

## [8] die Verknüpfungsstelle mit $L^{1B}$ kennzeichnet,

$R^{33}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$R^{34}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{29}$ für Wasserstoff steht,

$R^{30}$ für Wasserstoff steht,

$R^{31}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

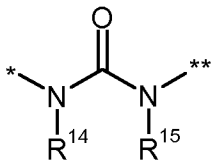
$R^{32}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

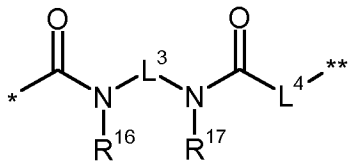
$L^{1B}$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl steht,

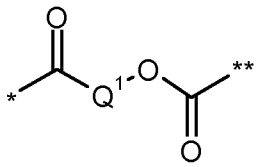
und

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

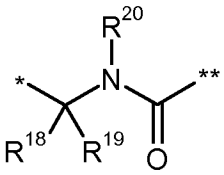
B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel

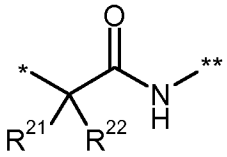


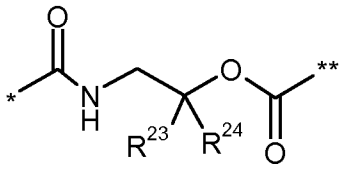
,


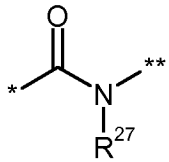
,


,



,


,



oder 

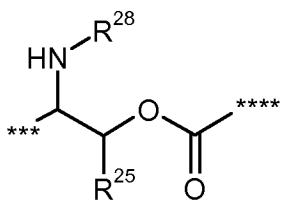

steht, wobei

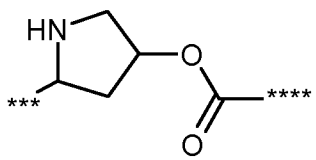
* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel



oder 


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus steht,

$R^{14}$ für Wasserstoff steht,

$R^{15}$ für Wasserstoff steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{18}$ für Wasserstoff steht,

$R^{19}$ für Wasserstoff, Methyl, Propan-2-yl , 2-Methylpropan-1-yl oder 1-Methylpropan-1-yl steht,

$R^{20}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{19}$ und $R^{20}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Pyrrolidinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

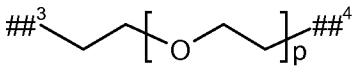
$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{27}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

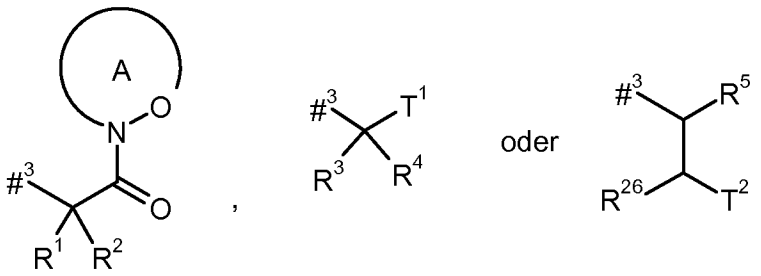
p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

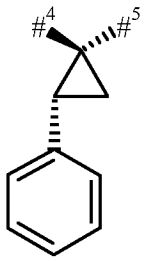
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

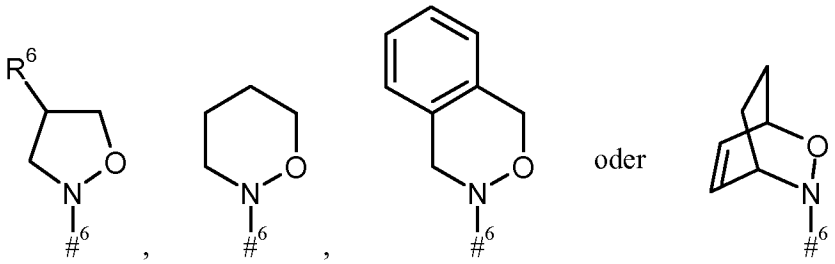


bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

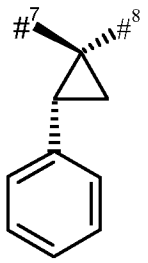
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-$OR^7$, -C(=O)-$NR^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

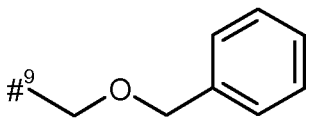
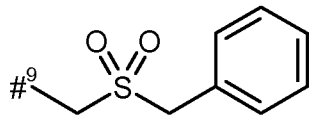
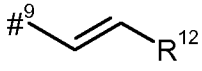
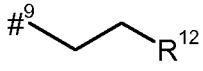
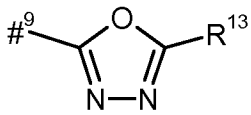
oder

$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel





oder


steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHC(R^{26})-T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

50. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß Anspruch 1, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 10 steht,

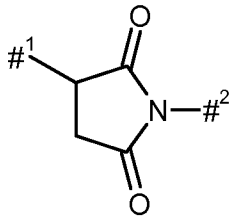
AK für $AK_1$ oder $AK_2$ steht

wobei

$AK_1$ für einen Binder, der über ein Schwefelatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

$AK_2$ für einen Binder, der über ein Stickstoffatom des Binders an die Gruppe G gebunden ist,

G für den Fall, dass AK = $AK_1$ ist, für eine Gruppe der Formel



steht, wobei

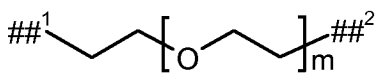
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Cystein-Rest des Binders kennzeichnet,

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

oder

für den Fall, dass AK = $AK_2$ ist, für Carbonyl steht,

$L^1$ für eine Bindung, lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl, eine Gruppe der Formel



steht, wobei

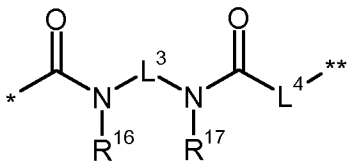
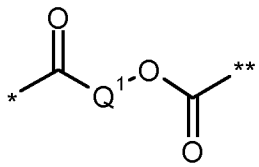
m für eine Zahl von 2 oder 3 steht,

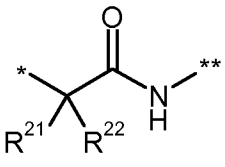
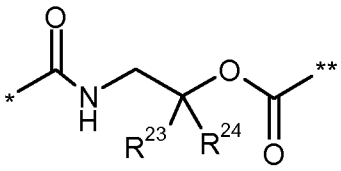
$\#\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe G kennzeichnet,

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

wobei ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl mit 1 oder 2 Substituenten Methyl substiuiert sein kann,

B für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


,

,


oder


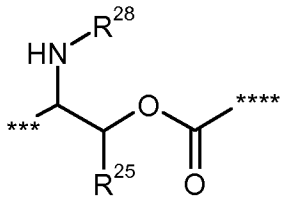
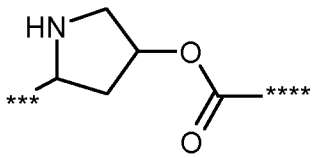
steht, wobei

* die Verknüpfungsstelle mit $L^1$ kennzeichnet,

** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$L^3$ für eine Bindung oder Ethan-1,2-diyl steht,

$L^4$ für eine Bindung oder eine Gruppe der Formel


oder


steht, worin

*** die Verknüpfungsstelle mit der Carbonylgruppe kennzeichnet,

**** die Verknüpfungsstelle mit $L^2$ kennzeichnet,

$R^{25}$ für Methyl steht,

$R^{28}$ für Wasserstoff, Methylcarbonyl oder tert.-Butyloxycarbonyl steht,

$Q^1$ für Piperidin-1,4-diyl steht,

$R^{16}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{17}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

oder

$R^{16}$ und $R^{17}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Piperazinylring bilden,

$R^{21}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^{22}$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

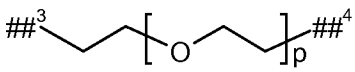
oder

$R^{21}$ und $R^{22}$ zusammen mit den Atomen, an die sie gebunden sind, einen Cyclopropylring bilden,

$R^{23}$ für Methyl steht,

$R^{24}$ für Wasserstoff steht,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_6$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel



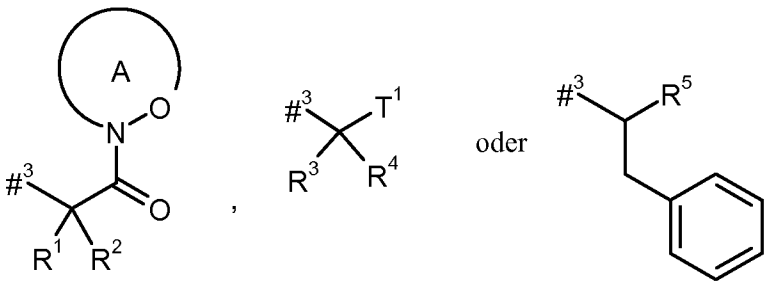

steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

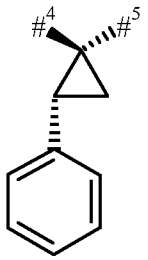
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff steht,

$R^2$ für 1-Hydroxyethyl, Benzyl, 1-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

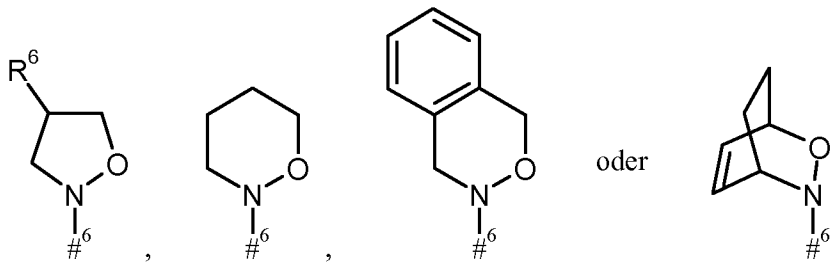



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel




steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

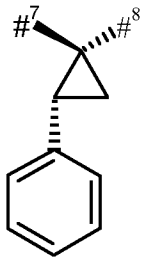
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff steht,

$R^4$ für Benzyl, 1-Hydroxybenzyl, 1-Phenylethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel




bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel $-C(=O)-OR^7$, $-C(=O)-NR^8R^9$ oder $-CH_2-O-R^{11}$ steht,

worin

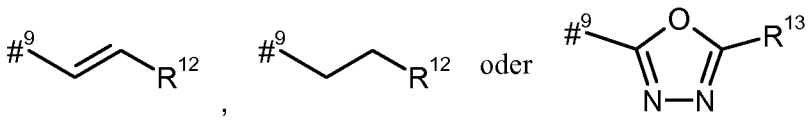
$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel




steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit $-CHCH_2$Phenyl kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel $-S(O)_2OH$ substituiert sein kann,

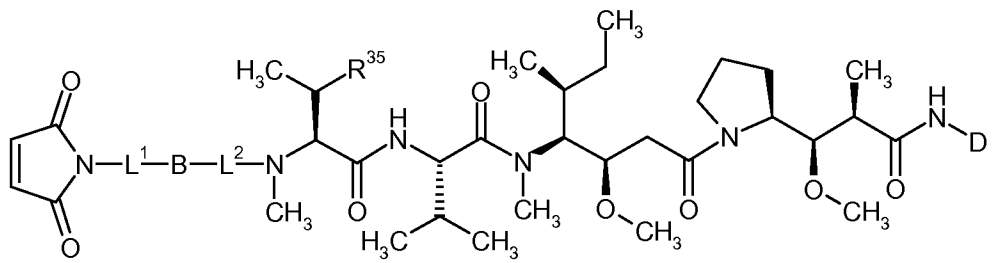
$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

51. Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, der allgemeinen Formel (Ia), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung des Binders in einem Puffer

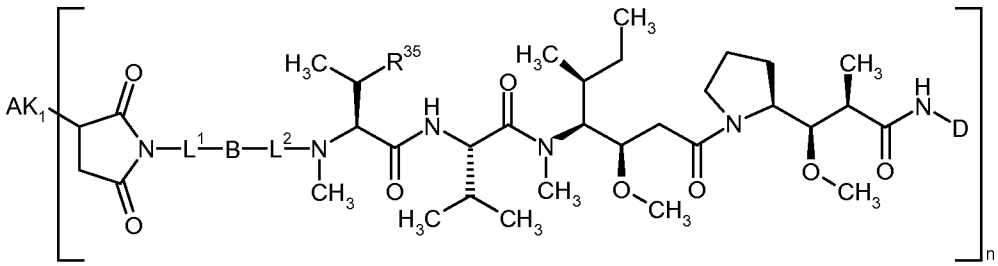
[A] mit einem geeigneten Reduktionsmittel, wie beispielsweise Dithiothreitol oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid, versetzt, und anschließend mit einer Verbindung der Formel (IIa)



(IIa),

in welcher D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die in den Ansprüchen 1 bis 6 angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (Ia-A)



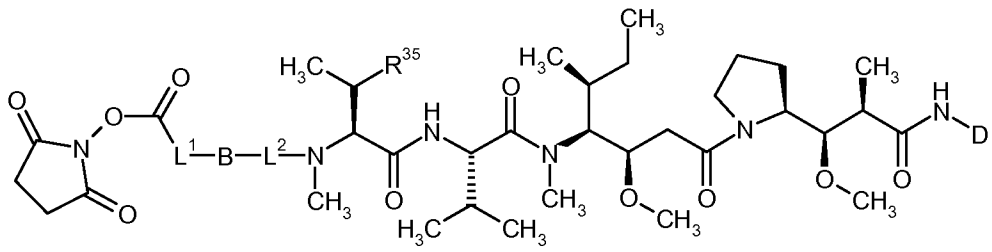
(Ia-A),

in welcher n, $AK_1$, D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die in den Ansprüchen 1 bis 6 angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt,

oder

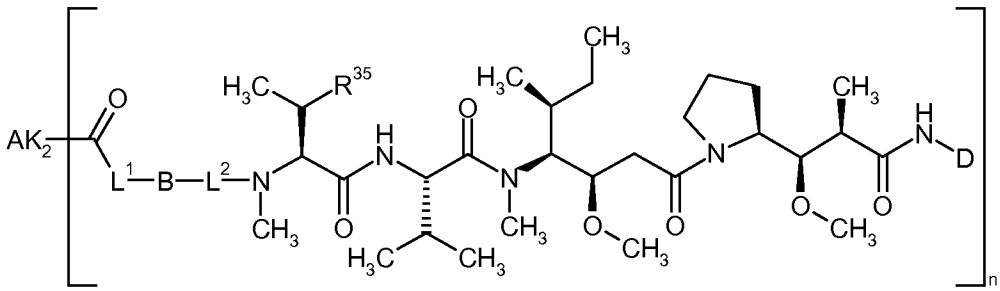
[B] mit einer Verbindung der Formel (IIIa)



(IIIa),

in welcher D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die in den Ansprüchen 1 bis 6 angegebenen Bedeutungen haben,

zu einer Verbindung der Formel (Ia-B)



(Ia-B),

in welcher n, $AK_2$, D, $L^1$, B, $L^2$ und $R^{35}$ jeweils die in den Ansprüchen 1 bis 6 angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt.

52. Verbindungen hergestellt nach dem Verfahren in Anspruch 51, wobei $AK_1$ und $AK_2$ für Cetuximab, Pantitumumab oder Nimutuzumab steht, sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.

53. Binder-Wirkstoff Konjugate der allgemeinen Formel (Ia) gemäß Anspruch 1, in welcher

n für eine Zahl von 1 bis 50 steht,

AK für einen Binder steht,

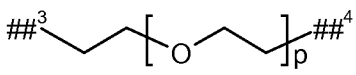
die Gruppe §-G-$L^1$-B-§§ für einen Linker steht,

wobei

§ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe AK kennzeichnet und

§§ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$L^2$ für lineares ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl oder für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

p für eine Zahl von 2 bis 6 steht,

## 3 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe B kennzeichnet,

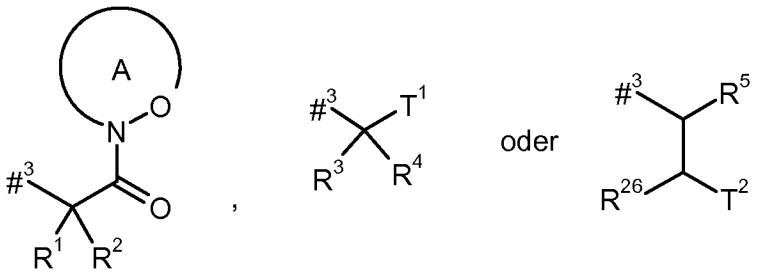
##4 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

wobei ($C_2$-$C_{10}$)-Alkandiyl mit 1 bis 4 Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe Methyl, Hydroxy und Benzyl substiuiert sein kann,

und

wobei zwei Kohlenstoffatome der Alkandiyl-Kette in 1,2-, 1,3- oder 1,4-Relation zueinander unter Einbezug der gegebenenfalls zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatome zu einem ($C_3$-$C_6$)-Cycloalkyl-Ring oder einem Phenyl-Ring verbrückt sein können,

D für eine Gruppe der Formel




steht, wobei

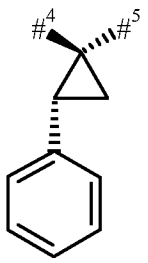
$\#^3$ die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet,

$R^1$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^2$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^1$ und $R^2$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel

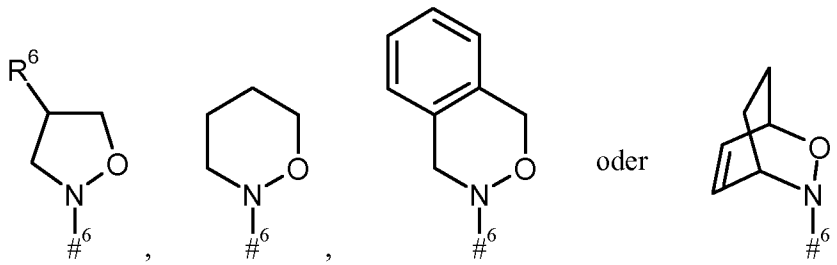



bilden, worin

$\#^4$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^5$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

der Ring A mit der darin enthaltenen N-O-Gruppierung für einen mono- oder bicyclischen, gegebenenfalls substituierten Heterocyclus der Formel



steht, worin

$\#^6$ die Verknüpfungsstelle mit der Carbonyl-Gruppe kennzeichnet,

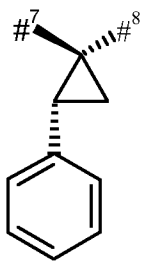
$R^6$ für Wasserstoff, Hydroxy oder Benzyloxy steht,

$R^3$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^4$ für Isopropyl, Isobutyl, *sec.*-Butyl, *tert.*-Butyl, Phenyl, Benzyl, 1-Hydroxyethyl, 4-Hydroxybenzyl, 4-Hydroxy-3-nitrobenzyl, 4-Hydroxy-3-aminobenzyl, 1-Phenylethyl, Diphenylmethyl, 1*H*-Imidazol-4-ylmethyl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

oder

$R^3$ und $R^4$ zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an das sie gebunden sind, eine (1*S*,2*R*)-2-Phenylcyclopropan-1,1-diyl-Gruppe der Formel



bilden, worin

$\#^7$ die Verknüpfungsstelle mit dem angrenzenden Stickstoffatom kennzeichnet,

$\#^8$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe $T^1$ kennzeichnet,

$T^1$ für eine Gruppe der Formel -C(=O)-O$R^7$, -C(=O)-N$R^8R^9$, -C(=O)-NH-NH-$R^{10}$ oder -$CH_2$-O-$R^{11}$ steht,

worin

$R^7$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *tert.*-Butyl, Benzyl oder Adamantylmethyl steht,

$R^8$ für Wasserstoff oder Methyl steht,

$R^9$ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl, *n*-Propyl oder Benzyl steht,

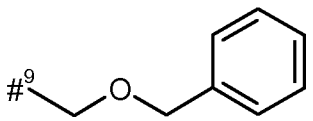
oder

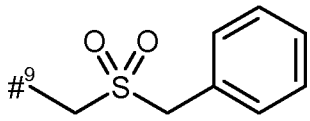
$R^8$ und $R^9$ bilden zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 4- bis 7-gliedrigen Heterocyclus,

$R^{10}$ für Benzoyl steht,

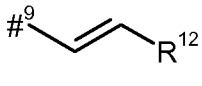
$R^{11}$ für Benzyl, das in der Phenylgruppe mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann, steht,

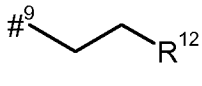
$R^5$ für Wasserstoff, Methyl oder eine Gruppe der Formel

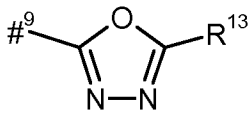


,


,



,


oder



steht, worin

$\#^9$ die Verknüpfungsstelle mit –CHC($R^{26}$)-$T^2$ kennzeichnet,

$R^{12}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl, Carboxyl oder einer Gruppe der Formel –S(O)$_2$OH substituiert sein kann,

$R^{13}$ Phenyl steht, das mit Methoxycarbonyl oder Carboxyl substituiert sein kann,

$R^{26}$ für Wasserstoff oder Hydroxy steht,

$T^2$ für Phenyl, Benzyl, 1*H*-Indol-3-yl oder 1*H*-Indol-3-ylmethyl steht,

$R^{35}$ für Methyl oder Hydroxy steht,

sowie ihre Salze, Solvate und Solvate der Salze.