

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391970** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.09.28

(22) Дата подачи заявки
2022.01.07

(51) Int. Cl. **C12P 41/00** (2006.01)
C12P 7/02 (2006.01)
C12P 11/00 (2006.01)
C12R 1/72 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНКЕРНОГО ФРАГМЕНТА КОНЬЮГАТА**

(31) **63/135,088**

(32) **2021.01.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/011629**

(87) **WO 2022/150596 2022.07.14**

(71) Заявитель:
СИБРЕКСА 2, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Магуайр Роберт Джон (US), Ван
Влит Михил Кристиан Александер,
Схуварт Виллем Роберт Клас (NL)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения линкеров, применимых при конъюгации терапевтических молекул (например, цитотоксических агентов) с нацеливающими фрагментами (например, белками, пептидами, антителами, наночастицами, нуклеиновыми кислотами). В ходе указанных процессов липазы, такие как липаза В, полученная из *Candida antarctica*, были использованы для энантиоселективного разделения (S,S)-2-бензилтиоциклогексанола или (S,S)-2-бензилтиоциклопентанола в присутствии ацилирующего агента, которые восстанавливают для снятия защиты с получением (S,S)-2-меркаптоциклогексанола или (S,S)-2-меркаптоциклопентанола, которые затем могут быть использованы для связывания терапевтических и нацеливающих фрагментов.

A1

202391970

202391970

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-5788806EA/055

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНКЕРНОГО ФРАГМЕНТА КОНЬЮГАТА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам получения линкеров, пригодных для конъюгации терапевтических молекул (например, цитотоксических агентов) с нацеливающими фрагментами (например, белками, пептидами, антителами, наночастицами, нуклеиновыми кислотами).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

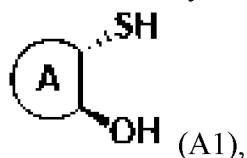
Рак представляет собой группу заболеваний, характеризующихся нарушением контроля роста клеток. Ежегодная заболеваемость раком только в Соединенных Штатах оценивается более чем в 1,6 миллиона человек. Хотя для лечения рака используются хирургия, лучевая терапия, химиотерапия и гормоны, он остается второй по значимости причиной смерти в США, и необходимы дополнительные стратегии лечения. Конъюгаты лекарственных средств стали жизнеспособным и постоянно исследуемым подходом для воздействия на злокачественные опухоли.

Несмотря на успехи в селективности химиотерапевтических препаратов за последние несколько десятилетий, традиционные цитотоксические химиотерапевтические препараты часто не обладают достаточной специфичностью и направленным действием, вызывая повреждение нормальных нераковых клеток, что может привести к серьезным побочным реакциям. Конъюгаты лекарственных средств, состоящие из лекарственного средства (например, цитотоксического агента), связанного с нацеливающим фрагментом (например, пептидом, белком или антителом), были разработаны для использования в таргетной терапии опухолей. Конъюгаты лекарственных средств могут обеспечить предпочтительную доставку лекарственного средства в пораженную ткань, уменьшая нежелательные побочные эффекты, такие как повреждение нераковой ткани. См., например, Vrettos, V., "On the design principles of peptide-drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site," *Beilstein J. Org. Chem.* 2018, 14:930-954.

Разработка линкеров, групп, которые соединяют лекарственное средство с нацеливающим фрагментом, стала важным аспектом в дизайне новых конъюгатов лекарственных средств. Желательно, чтобы линкеры были достаточно стабильны *in vivo*, чтобы обеспечить доставку лекарственного средства в пораженную клетку-мишень. Кроме того, линкер не должен нарушать аффинность связывания нацеливающего фрагмента с его мишенью. Наконец, после локализации лекарственного средства на мишени линкер должен быть способен высвободить лекарство, чтобы высвобожденное лекарство могло связываться со своей мишенью. См. Lu, J., "Linkers Having a Crucial Role in Antibody-Drug Conjugates," *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1-22; and Corso A.D., "Innovative Linker Strategies for Tumor-Targeted Drug Conjugates," *Chem. Eur. J.* 2019, 25(65):14740-14757. Таким образом, существует потребность в разработке новых линкеров и способов их получения.

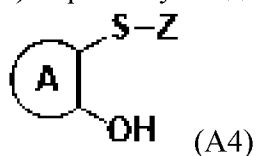
СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе представлен способ получения соединения формулы (A1)

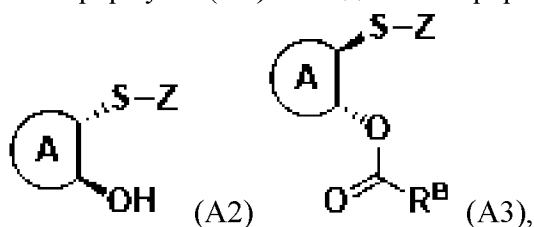


или его соли, где кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил, включающий:

а) обработку соединения формулы (A4)



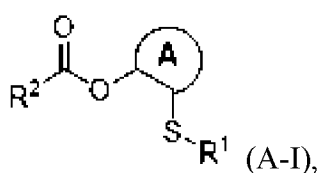
или его соли, где Z представляет собой защитную группу, с помощью Ak1, где Ak1 представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (A2) и соединения формулы (A3);



или их солей; где R^B представляет собой C₁₋₆ алкил, необязательно замещенный COOH; и

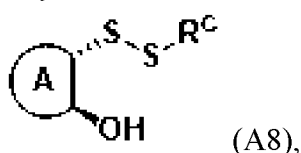
б) снятие защиты с соединения формулы (A2) или его соли с получением соединения формулы (A1) или его соли.

В данном документе также представлен способ получения соединения формулы (A-I):



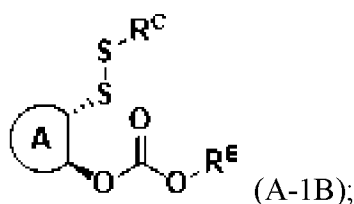
или его фармацевтически приемлемой соли, где кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил; R¹ представляет собой нацеливающий фрагмент; а R² представляет собой терапевтический фрагмент; включающий:

введение в реакцию соединения формулы (A1) или его соли, полученных способом по любому из пп. 1-48, с R^C-S-S-R^C с получением соединения формулы (A8)



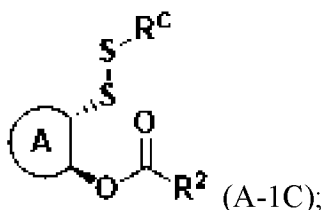
или его соли, где R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

введение в реакцию соединения формулы (A8) или его соли с $R^E OC(O)OR^E$, где R^E представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ; с получением соединения формулы (A-1B)



или его соли;

введение в реакцию соединения формулы (A-1B) или его соли с R^2H с получением соединения формулы (A-1C)



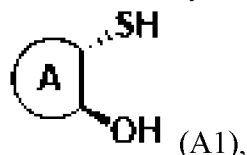
или его соли; и

введение в реакцию соединения формулы (A-1C) или его соли с R^1H с получением соединения формулы (A-1).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Получение соединений формулы (A1)

В данном документе представлен способ получения соединения формулы (A1)

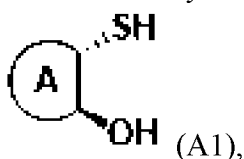


или его соли, где кольцо A представляет собой C_{5-7} циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил, которые пригодны для получения конъюгатов терапевтических агентов, таких как, например, цитотоксические агенты.

Способы получения соединений формулы (A1) описаны в U.S. Patent Publication No. US 2019/209580, U.S. Patent Application No. 16/925,094 (U.S. Publication No. 2021/0009719), and U.S. Patent Application No. 16/924,445 (U.S. Publication No. 2021/0009536). Настоящее

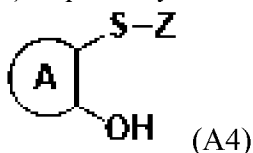
изобретение обеспечивает преимущества по сравнению с ранее раскрытыми способами получения соединений формулы (A1), предлагая лучшие выходы, масштабируемость и требуя менее интенсивных процедур очистки. В частности, в настоящем изобретении предложено катализируемое ферментами разделение энантиомеров соединений формулы (A1). Кроме того, в изобретении предложен энантиоселективный синтез соединений формулы (A4), которые являются предшественниками соединений формулы (A1). Напротив, ранее раскрытые способы основывались на разделении энантиомеров с помощью ВЭЖХ или с помощью хиральной хроматографии, что труднее осуществить в больших масштабах и более дорого, чем способы, представленные в данном документе.

В данном документе предложен способ получения соединения формулы (A1)

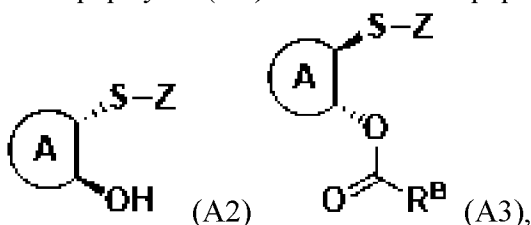


или его соли, где кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил, включающий:

а) обработку соединения формулы (A4)



или его соли, где Z представляет собой защитную группу, с помощью Ak1, где Ak1 представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (A2) и соединения формулы (A3);



или их солей; где R^B представляет собой C₁₋₆ алкил, необязательно замещенный COOH; и

б) снятие защиты с соединения формулы (A2) или его соли с получением соединения формулы (A1) или его соли.

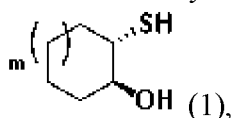
В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой циклопентил. В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой циклогексил. В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой циклогептил.

В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой циклопентил. В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой

циклогексил. В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой циклогептил.

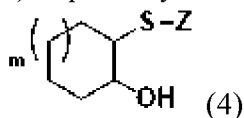
В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой 5-7-членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой 5-членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой 6-членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой 7-членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой тетрагидрофуранил. В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой тетрагидропиранил.

В данном документе также представлен способ получения соединения формулы (1)



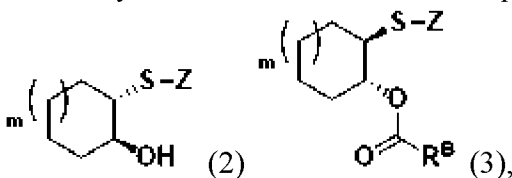
или его соли, где m равен 0, 1 или 2, включающий:

а) обработку соединения формулы (4)



или его соли, где Z представляет собой защитную группу,

с помощью $Ak1$, где $Ak1$ представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (2) и соединения формулы (3);



или их солей; где R^B представляет собой C_{1-6} алкил, необязательно замещенный $COOH$; и

снятие защиты с соединения формулы (2) или его соли с получением соединения формулы (1) или его соли.

В некоторых вариантах осуществления m равен 0. В некоторых вариантах осуществления m равен 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 2.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-CH_2R^A$, где R^A представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил, каждый, необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 .

В некоторых вариантах осуществления R^A представляет собой C_{6-10} арил. В некоторых вариантах осуществления R^A представляет собой фенил.

В некоторых вариантах осуществления $Ak1$ представляет собой глутаровый

ангидрид, янтарный ангидрид или изопропенилацетат. В некоторых вариантах осуществления Ak1 представляет собой глутаровый ангидрид. В некоторых вариантах осуществления Ak1 представляет собой янтарный ангидрид. В некоторых вариантах осуществления Ak1 представляет собой изопропенилацетат.

В некоторых вариантах осуществления R^B представляет собой CH₃, CH₂CH₂COOH или CH₂CH₂CH₂COOH. В некоторых вариантах осуществления R^B представляет собой CH₃. В некоторых вариантах осуществления R^B представляет собой CH₂CH₂COOH. В некоторых вариантах осуществления R^B представляет собой CH₂CH₂CH₂COOH.

В контексте данного документа термин «фермент» относится к белку, который катализирует химические реакции. В некоторых вариантах осуществления фермент может катализировать реакции этерификации (например, образование сложного эфира из спирта). В некоторых вариантах осуществления фермент может катализировать реакции этерификации энантиоселективным образом (например, способствуя образованию одного энантиомера вместо противоположного энантиомера). В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу.

В контексте данного документа термин «фермент липаза» относится к ферменту, который в природных условиях (например, в водной среде) катализирует гидролиз липидов. В неводных средах (например, в органических растворителях) некоторые ферменты липазы могут катализировать реакции этерификации (например, превращение спиртов в сложные эфиры). Ферменты липазы, которые способны катализировать реакции этерификации в органических растворителях энантиоселективным образом (например, способствуя образованию одного энантиомера вместо противоположного энантиомера), известны в данной области. См., например, Kumar et al., "Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications," *Biol. Proced. Online* 2016; 18:2; Ducret, A., "Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity," *Enzyme and Microbial Technology* 1998, 22(4):212-216.

В некоторых вариантах осуществления фермент иммобилизован на твердой подложке (т.е. связан с твердым веществом, нерастворимым в реакционной среде). Фермент может быть связан с твердой подложкой посредством, например, ковалентного связывания с функциональными группами на твердой подложке, адсорбции на твердой подложке и захвата или инкапсуляции на твердой подложке. Иммобилизация на твердом субстрате может повысить стабильность ферментов и облегчить извлечение продуктов и рециклизацию ферментов. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой диоксид кремния или неорганический оксид. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой активированный уголь или модифицированный или немодифицированный уголь. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой синтетический полимер (например, амино- и карбоксил-плазмоактивированная полипропиленовая пленка; и сополимеры метакрилата). В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой Immobead. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой

ионообменную смолу (например, Amberlite и Sepabeads). В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой силикагель. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой полистирол. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой нанокристаллы целлюлозы. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой хитозан. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой акриловую бусину. Способы иммобилизации ферментов хорошо известны в данной области. См. Zdarta, J., "A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility," *Catalysts* 2018, 8, 92, 1-27; и Miletic, N., "Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on polystyrene nanoparticles," *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, 31(1):71-74.

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из бактериального или грибкового источника. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из грибкового источника. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из бактериального источника. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus*, *Alcaligenes* sp., Resinase HT, Lipex 100L, Novozymes Stickaway, *Candida cylindracea* sp. или *Bacillus subtilis*. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из *Candida antarctica*. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу В *Candida antarctica*. Ферменты могут быть получены от Novozymes, Genencor, Sigma-Aldrich, c-Lecta, Aum Enzymes и иммобилизованы на твердом субстрате, таком как, например, Immobead COV-1.

В некоторых вариантах осуществления фермент выбран из следующего:

липаза А из *Candida antarctica*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
 липаза В из *Candida antarctica*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
 генерическая липаза В из *Candida antarctica*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Rhizomucor miehei*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Thermomyces lanuginosa*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Candida rugosa*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Pseudomonas cepacia*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Pseudomonas fluorescens*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Rhizopus oryzae*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Mucor javanicus*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Aspergillus niger*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Rhizopus niveus*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Alcaligenes* sp., ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза Resinase HT, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза Lipex 100L, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Fusarium solani* pisi, Novozyme 51032, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Candida cylindracea* sp, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Bacillus subtilis*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам.

В некоторых вариантах осуществления фермент выбран из следующего:

ChiralVision Product No. IMMCALA-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMCALB-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMCALBY-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMRML-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMTLL-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMCRL-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMABC-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMAMPF-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMARO-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMAMJ-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMANA-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMRNA-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMASMQ-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMRES-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMLIPX-T2-150;
ChiralVision Product No. IMML51-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMCCMO-T2-150;
ChiralVision Product No. IMMAULI-T2-150; и
ChiralVision Product No. CaLB-ADS4,

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой продукт ChiralVision № IMMCALB-T2-150. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой продукт ChiralVision № CaLB-ADS4.

Обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 можно проводить при

температуре от около 15°C до около 20°C. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят при комнатной температуре.

Обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 можно проводить в течение периода от около 6 часов до около 24 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят в течение периода времени около 16 часов.

Обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 можно проводить в присутствии S1, где S1 представляет собой растворитель. В некоторых вариантах осуществления S1 представляет собой эфирный растворитель. В некоторых вариантах осуществления S1 представляет собой метил-трет-бутиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления S1 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

Способ может дополнительно включать стадию отделения соединения формулы (A2) от соединения формулы (A3). В некоторых вариантах осуществления разделение включает обработку смеси водным основанием и отделение водного слоя от смеси. В некоторых вариантах осуществления водное основание представляет собой водный раствор карбоната натрия.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-\text{CH}_2\text{R}^A$, и снятие защиты включает восстановление соединения формулы (A2) с помощью RA1, где RA1 представляет собой восстанавливающий агент. В некоторых вариантах осуществления R^A представляет собой фенил.

В некоторых вариантах осуществления RA1 представляет собой металлический литий, металлический натрий или металлический кальций. В некоторых вариантах осуществления RA1 представляет собой металлический литий.

Восстановление можно проводить в присутствии S2, где S2 представляет собой растворитель. В некоторых вариантах осуществления S2 представляет собой эфирный растворитель. В некоторых вариантах осуществления S2 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A1) выделяют в энантиомерном избытке более 75%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A1) выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A1) выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A1) выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

В некоторых вариантах осуществления соединения 1 выделяют в энантиомерном избытке более 75%. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

Соединение формулы (A4) может быть получено способом, включающим введение

в реакцию соединения формулы (A5)



или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)), или его соли, с получением соединения формулы (A4) или его соли, где R^A имеет значение, определенное в данном документе.

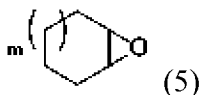
В некоторых вариантах осуществления введение в реакцию соединения формулы (A5) или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) или его солью проводят в присутствии M1, где M1 представляет собой металлический катализатор. В некоторых вариантах осуществления M1 представляет собой соль цинка. В некоторых вариантах осуществления M1 представляет собой (D)-тарtrat цинка.

Введение в реакцию соединения формулы (A5) или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) можно проводить в присутствии B1, где B1 представляет собой основание. В некоторых вариантах осуществления B1 представляет собой алкоксидное основание. В некоторых вариантах осуществления B1 представляет собой этоксид натрия.

Введение в реакцию соединения формулы (A5) с соединением формулы (A6) можно проводить в присутствии S3, где S3 представляет собой растворитель. В некоторых вариантах осуществления S3 представляет собой галогенированный растворитель или эфирный растворитель. В некоторых вариантах осуществления S3 представляет собой дихлорметан. В некоторых вариантах осуществления S3 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 25%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 50%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 70%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 80%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

Соединение формулы (4) может быть получено способом, включающим введение в реакцию соединения формулы (5)



или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) или его солью для получения соединения формулы (4) или его соли, где m и R^A являются такими, как определено в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления m равен 0. В некоторых вариантах осуществления m равен 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 2.

В некоторых вариантах осуществления введения в реакцию соединения формулы (5)

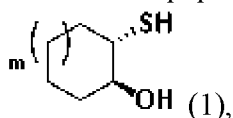
или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) или его солью проводят в присутствии M1, где M1 представляет собой металлический катализатор. В некоторых вариантах осуществления M1 представляет собой соль цинка. В некоторых вариантах осуществления M1 представляет собой (D)-тарترات цинка.

Введение в реакцию соединения формулы (5) или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) можно проводить в присутствии B1, где B1 представляет собой основание. В некоторых вариантах осуществления B1 представляет собой алкоксидное основание. В некоторых вариантах осуществления B1 представляет собой этоксид натрия.

Введение в реакцию соединения формулы (5) с соединением формулы (6) можно проводить в присутствии S3, где S3 представляет собой растворитель. В некоторых вариантах осуществления S3 представляет собой галогенированный растворитель или эфирный растворитель. В некоторых вариантах осуществления S3 представляет собой дихлорметан. В некоторых вариантах осуществления S3 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

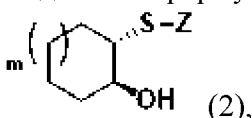
В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 25%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 50%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 70%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 80%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (4) выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A1) представляет собой соединение формулы (1)



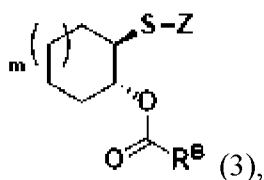
или его соль, где m равен 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A2) представляет собой соединение формулы (2)



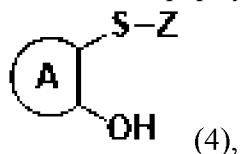
или его соль, где m равен 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (A3) представляет собой соединение формулы (3)



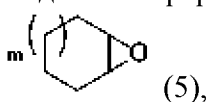
или его соль, где m равен 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A4) представляет собой соединение формулы (4)



или его соль, где m равен 0, 1 или 2.

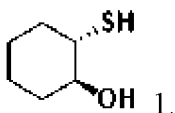
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A5) представляет собой соединение формулы (5)



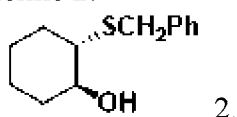
или его соль, где m равен 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления m равен 0. В некоторых вариантах осуществления m равен 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 2.

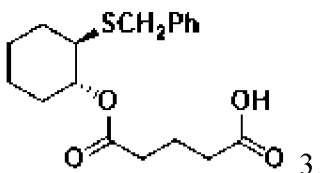
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (1) представляет собой соединение 1:



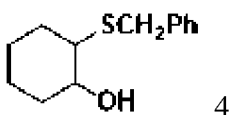
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (2) представляет собой соединение 2:



В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (3) представляет собой соединение 3:

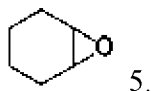


В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (4) представляет собой соединение 4:



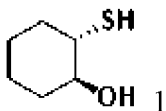
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (5) представляет собой

соединение 5:



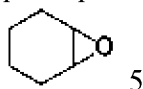
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (6) представляет собой бензилмеркаптан.

Также в данном документе предложен способ получения Соединения 1, имеющего формулу:

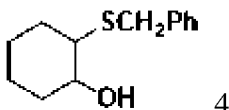


или его соли, включающий:

реагирование соединения 5, имеющего формулу:

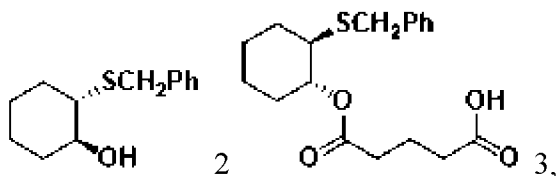


или его соли с бензилмеркаптаном с получением соединения 4, имеющего формулу:



или его соли;

обработку соединения 4 глутаровым ангидридом в присутствии фермента с получением смеси соединения 2 и соединения 3;



или их солей; и

восстановление соединения 2 с получением соединения 1.

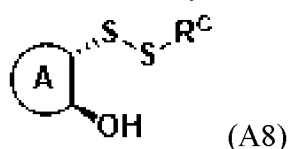
В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу.

Также в данном документе предложено соединение формулы (A1), полученное любым из способов получения соединения формулы (A1), описанных в данном документе.

Получение соединения A8 и соединения 8.

В данном документе предложен способ получения соединения формулы A8, которое представляет собой линкер конъюгата, который можно использовать при получении конъюгатов в качестве терапевтических средств.

В данном документе предложен способ получения соединения формулы (A8):

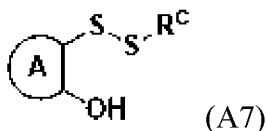


или его соли, где:

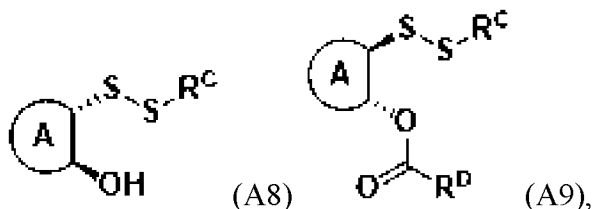
кольцо А представляет собой C₅₋₇ циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил;

R^C представляет собой C₆₋₁₀ арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C₆₋₁₀ арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C₁₋₄ алкила, галогена, CN, NO₂, OH и OCH₃,

включающий введение в реакцию соединения формулы (A7)



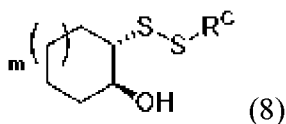
или его соли с Ak2, где Ak2 представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (A8) и соединения формулы (A9);



или их солей, где R^D представляет собой C₁₋₆ алкил, необязательно замещенный COOH.

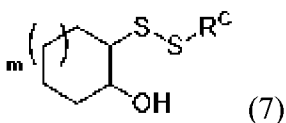
В данном документе предложен способ получения соединения формулы 8, которое представляет собой линкер конъюгата, который можно использовать при получении конъюгатов в качестве терапевтических средств.

В данном документе предложен способ получения соединения формулы (8):

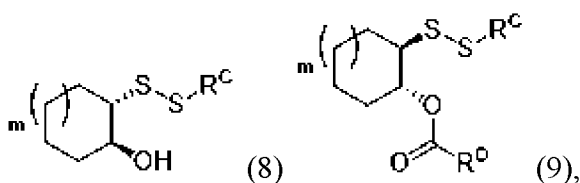


или его соли, где m равен 0, 1 или 2, и R^C представляет собой C₆₋₁₀ арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C₆₋₁₀ арил и 5-10-членный гетероарил, каждый, необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C₁₋₄ алкила, галогена, CN, NO₂, OH и OCH₃,

включающий введение в реакцию соединения формулы (7)



или его соли с Ak2, где Ak2 представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (8) и соединения формулы (9);



или их солей, где R^D представляет собой C_{1-6} алкил, необязательно замещенный $COOH$.

Соединения формулы (A7) и формулы (7) и способы их получения описаны в патентной публикации США № US 2019/209580, заявке на патент США № 16/925,094 и заявке на патент США № 16/924,445.

В некоторых вариантах осуществления m равен 0. В некоторых вариантах осуществления m равен 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 2.

В некоторых вариантах осуществления $Ac2$ представляет собой глутаровый ангидрид, янтарный ангидрид или изопропенилацетат. В некоторых вариантах осуществления $Ac2$ представляет собой глутаровый ангидрид. В некоторых вариантах осуществления $Ac2$ представляет собой янтарный ангидрид. В некоторых вариантах осуществления $Ac2$ представляет собой изопропенилацетат.

В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой 5-10-членный гетероарил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой 5-10-членный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой пиридинил.

В некоторых вариантах осуществления R^D представляет собой CH_3 , CH_2CH_2COOH или $CH_2CH_2CH_2COOH$. В некоторых вариантах осуществления R^D представляет собой CH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^D представляет собой CH_2CH_2COOH . В некоторых вариантах осуществления R^D представляет собой $CH_2CH_2CH_2COOH$.

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу.

В некоторых вариантах осуществления фермент иммобилизован на твердой подложке (т.е. связан с твердым веществом, нерастворимым в реакционной среде). Фермент может быть связан с твердой подложкой посредством, например, ковалентного связывания с функциональными группами на твердой подложке, адсорбции на твердой подложке и захвата или инкапсуляции на твердой подложке. Иммобилизация на твердом субстрате может повысить стабильность ферментов и облегчить извлечение продуктов и рециклизацию ферментов. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой диоксид кремния или неорганический оксид. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой активированный уголь или

модифицированный или немодифицированный уголь. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой синтетический полимер (например, amino- и карбоксил-плазмоактивированная полипропиленовая пленка; и сополимеры метакрилата). В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой Immobead. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой ионообменную смолу (например, Amberlite и Sepabeads). В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой силикагель. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой полистирол. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой нанокристаллы целлюлозы. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой хитозан. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка представляет собой акриловую бусину. Способы иммобилизации ферментов хорошо известны в данной области. См. Zdarta, J., “A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility,” *Catalysts* 2018, 8, 92, 1-27; и Miletic, N., “Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on polystyrene nanoparticles,” *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, 31(1):71-74.

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из бактериального или грибкового источника. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из грибкового источника. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из бактериального источника. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces Lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus*, *Alcaligenes* sp., Resinase HT, Lipex 100L, Novozymes Stickaway, *Candida cylindracea* sp. или *Bacillus subtilis*. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу, полученную из *Candida antarctica*. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой липазу В *Candida antarctica*. Ферменты могут быть получены от Novozymes, Genencor, Sigma-Aldrich, c-Lecta, Aum Enzymes и иммобилизованы на твердом субстрате, таком как, например, Immobead COV-1.

В некоторых вариантах осуществления фермент выбран из следующего:

липаза А из *Candida antarctica*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза В из *Candida antarctica*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

генерическая липаза В из *Candida antarctica*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Rhizomucor miehei*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Thermomyces lanuginosa*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Candida rugosa*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Pseudomonas cepacia*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;
липаза из *Pseudomonas fluorescens*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Rhizopus oryzae*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Mucor javanicus*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Aspergillus niger*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Rhizopus niveus*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Alcaligenes* sp., ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза Resinase HT, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза Lipex 100L, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Fusarium solani* pisi, Novozyme 51032, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Candida cylindracea* sp, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам;

липаза из *Bacillus subtilis*, ковалентно присоединенная к сухим акриловым бусинам.

В некоторых вариантах осуществления фермент выбран из следующего:

Chiral Vision Product No. IMMCALA-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMCALB-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMCALBY-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMRML-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMTLL-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMCRL-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMABC-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMAPP-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMARO-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMAMJ-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMANA-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMRNA-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMASMQ-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMRES-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMLIPX-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMML51-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMCCMO-T2-150;

Chiral Vision Product No. IMMAULI-T2-150; и

Chiral Vision Product No. CaLB-ADS4,

В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой продукт ChiralVision № IMMCALB-T2-150. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой продукт ChiralVision № CaLB-ADS4.

Обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak2 можно проводить при температуре от около 15°C до около 20°C. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak2 проводят при комнатной температуре.

Обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak2 можно проводить в течение от около 12 часов до около 60 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak2 проводят в течение от около 24 часов до около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak2 проводят в течение около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak2 проводят в течение около 42 часов.

Обработку соединения формулы (A7) с помощью Ak1 можно проводить в присутствии S4, где S4 представляет собой растворитель. В некоторых вариантах осуществления S4 представляет собой эфирный растворитель. В некоторых вариантах осуществления S4 представляет собой метил-трет-бутиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления S4 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

Способ может дополнительно включать стадию отделения соединения формулы (A8) от соединения формулы (A9). В некоторых вариантах осуществления разделение включает обработку смеси водным основанием и отделение водного слоя от смеси. В некоторых вариантах осуществления водное основание представляет собой водный раствор карбоната натрия.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 25%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 50%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 70%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 80%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

Обработку соединения формулы (7) с помощью Ak2 можно проводить при температуре от около 15°C до около 20°C. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (7) с помощью Ak2 проводят при комнатной температуре.

Обработку соединения формулы (7) с помощью Ak2 можно проводить в течение от около 12 часов до около 60 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (7) с помощью Ak2 проводят в течение от около 24 часов до около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (7) с

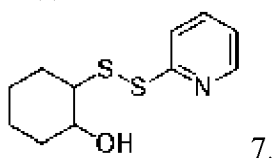
помощью Ak2 проводят в течение около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления обработку соединения формулы (7) с помощью Ak2 проводят в течение около 42 часов.

Обработку соединения формулы (7) с помощью Ak1 можно проводить в присутствии S4, где S4 представляет собой растворитель. В некоторых вариантах осуществления S4 представляет собой эфирный растворитель. В некоторых вариантах осуществления S4 представляет собой метил-трет-бутиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления S4 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

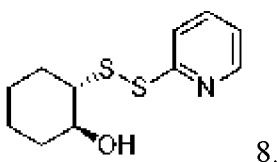
Способ может дополнительно включать стадию отделения соединения формулы (8) от соединения формулы (9). В некоторых вариантах осуществления разделение включает обработку смеси водным основанием и отделение водного слоя от смеси. В некоторых вариантах осуществления водное основание представляет собой водный раствор карбоната натрия.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 25%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 50%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 70%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 80%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (8) выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

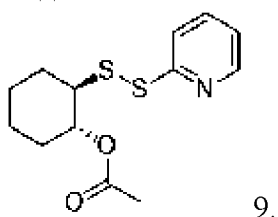
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A7) представляет собой соединение 7:



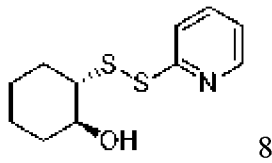
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A8) представляет собой соединение 8:



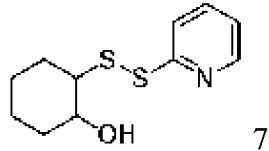
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A9) представляет собой соединение 9:



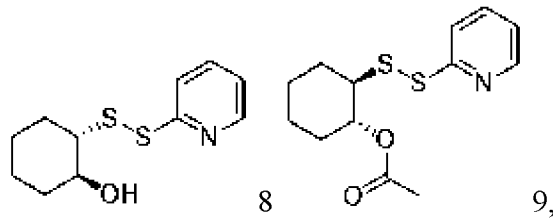
В другом варианте осуществления в данном документе предложен способ получения соединения 8, имеющего формулу:



или его соли, включающий введение в реакцию соединения 7, имеющего формулу:



или его соли с изопропенилацетатом в присутствии фермента с получением смеси соединения 8 и соединения 9;



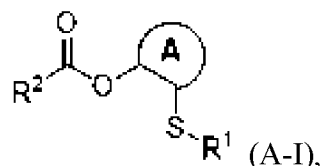
или их солей.

В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 25%. В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 50%. В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 70%. В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 80%. В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 90%. В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 95%. В некоторых вариантах осуществления соединение 8 выделяют в энантиомерном избытке более 99%.

Также в данном документе предложено соединение формулы (A8), полученное любым из способов получения соединения формулы (A8), описанных в данном документе.

Получение соединения формулы (I)

В данном документе предложен способ получения соединения формулы (A-I):



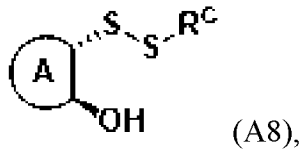
или его фармацевтически приемлемой соли, где кольцо A представляет собой a C₅₋₇ циклоалкильную группу или 5-7-членную гетероциклоалкильную группу;

R¹ представляет собой нацеливающий фрагмент; а

R² представляет собой терапевтический фрагмент;

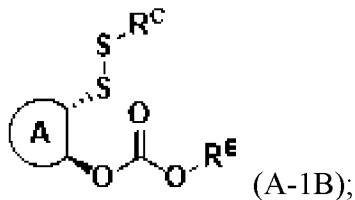
включающий:

введение в реакцию соединения формулы (A1) или его соли, полученных описанным в данном документе способом, с $R^C-S-S-R^C$ с получением соединения формулы (A8)



или его соли, где R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

введение в реакцию соединения формулы (A8) или его соли с $R^E OC(O)R^F$, с получением соединения формулы (A-1B)

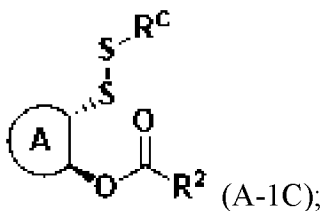


или его соли, где:

R^E представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ; и

R^F представляет собой галоген или OR^{F1} , где OR^{F1} представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

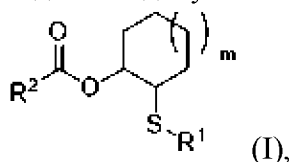
введение в реакцию соединения формулы (A-1B) или его соли с R^2H с получением соединения формулы (A-1C)



или его соли; и

введение в реакцию соединения формулы (A-1C) или его соли с R^1H с получением соединения формулы (A-I).

В данном документе предложен способ получения соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, где

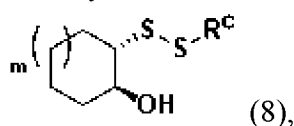
R^1 представляет собой нацеливающий фрагмент;

R^2 представляет собой терапевтический фрагмент; и

m равен 0, 1 или 2;

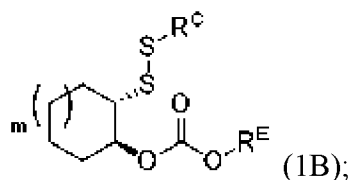
включающий:

введение в реакцию соединения формулы (1) или его соли, полученного описанным в данном документе способом, с $R^C-S-S-R^C$ с получением соединения формулы (8)



или его соли, где R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

введение в реакцию соединения формулы (8) или его соли с $R^E OC(O)R^F$, с получением соединения формулы (1B)

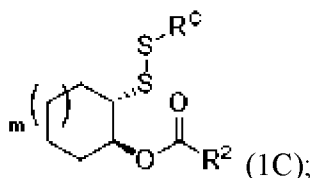


или его соли, где:

R^E представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ; и

R^F представляет собой галоген или OR^{F1} , где OR^{F1} представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

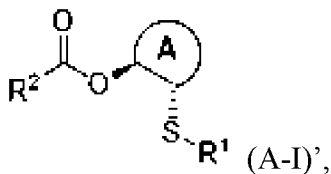
введение в реакцию соединения формулы (1B) или его соли с R^2H с получением соединения формулы (1C)



или его соли; и

введение в реакцию соединения формулы (1C) или его соли с R^1H с получением соединения формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (A-I) имеет формулу (A-I)':



или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления m равен 0. В некоторых вариантах осуществления m равен 1. В некоторых вариантах осуществления m равен 2.

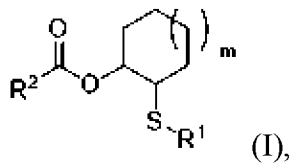
В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой 5-10-членный гетероарил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой 5-10-членный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой пиридинил. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой пиридин-2-ил.

В некоторых вариантах осуществления R^E представляет собой C_{6-10} арил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^E представляет собой фенил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^E представляет собой фенил, замещенный NO_2 .

В некоторых вариантах осуществления R^F представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления R^F представляет собой хлор. В некоторых вариантах осуществления R^F представляет собой C_{6-10} арил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^F представляет собой фенил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления R^F представляет собой фенил, замещенный NO_2 .

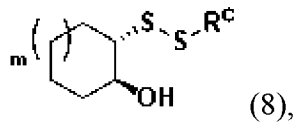
В некоторых вариантах осуществления $R^C-S-S-R^C$ представляет собой бис(5-нитрофенил)карбонат.

В данном документе предложен способ получения соединения формулы (I):



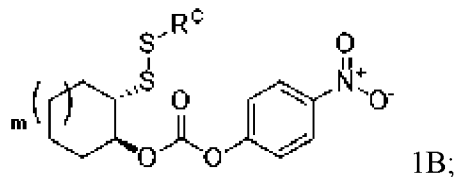
или его фармацевтически приемлемой соли, где R^1 представляет собой нацеливающий фрагмент; а R^2 представляет собой терапевтический фрагмент; включающий:

введение в реакцию соединения формулы (1) или его соли, полученного описанным в данном документе способом, с $R^C-S-S-R^C$ с получением соединения формулы (8)



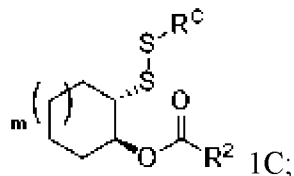
или его соли, где R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

введение в реакцию соединения 1A или его соли с бис(4-нитрофенил)карбонатом с получением соединения 1B, имеющего формулу:



или его соли;

введение в реакцию соединения 1B или его соли с R^2H с получением соединения формулы (1C):



или его соли;

введение в реакцию соединения 1C или его соли с R^1H с получением соединения формулы (I).

Нацеливающий фрагмент может иметь сродство к конкретному типу клеток или тканей, где присутствие аномальных уровней биомаркера может быть связано с одним или более конкретными болезненными состояниями. Типичные биомаркеры включают белки клеточной поверхности (например, рецепторы), включая, но не ограничиваясь ими, рецептор трансферрина; рецептор ЛПНП; рецепторы фактора роста, такие как члены семейства рецепторов эпидермального фактора роста (например, EGFR, Her2, Her3, Her4)

или рецепторы фактора роста эндотелия сосудов, рецепторы цитокинов, молекулы клеточной адгезии, интегрин, селектины и молекулы CD. Маркер может представлять собой молекулу, которая присутствует исключительно или в больших количествах на злокачественной клетке, например, опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела, обладающие специфичностью в отношении антигена, экспрессированного на интересующей клетке-мишени или в интересующем сайте-мишени. Было идентифицировано большое разнообразие антигенов, специфичных для опухолей или других заболеваний, и антитела к этим антигенам были использованы или предложены для использования при лечении таких опухолей или других заболеваний. Антитела, известные в данной области, могут быть использованы в соединениях по изобретению, в частности, для лечения заболевания, с которым связан антиген-мишень.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой антитело, фрагмент антитела, биспецифическое антитело или другую молекулу или соединение на основе антитела. В дополнительных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может представлять собой аптамер, авимер, рецептор-связывающий лиганд, нуклеиновую кислоту, биотин-авидиновую связывающую пару и т.п.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой пептид. В некоторых вариантах осуществления пептид содержит от 10 до 50 аминокислот, от 20 до 40 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот, от 20 до 30 аминокислот или от 30 до 40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой конформационно ограниченный пептид. Конформационно ограниченный пептид может включать, например, макроциклические пептиды и сшитые пептиды. Сшитый пептид представляет собой пептид, ограниченный ковалентной связью между двумя боковыми цепями аминокислот, образуя пептидный макроцикл. Конформационно ограниченные пептиды описаны, например, в Guerlavais et al., *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 2014, 49, 331-345; Chang et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2013), 110(36), E3445-E3454; Tesauro et al., *Molecules* 2019, 24, 351-377; Dougherty et al., *Journal of Medicinal Chemistry* (2019), 62(22), 10098-10107; и Dougherty et al., *Chemical Reviews* (2019), 119(17), 10241-10287, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент представляет собой экологически чувствительный пептид, описанный, например, в патентах США No. 8,076,451 и 9,289,508 и патенте США Пат. № 2019/209580 (каждый из которых полностью включен в данный документ в качестве ссылки), хотя можно использовать и другие пептиды, способные к такой селективной вставке. Другие подходящие пептиды описаны, например, в Weerakkody, *et al.*, *PNAS* 110 (15), 5834-5839 (9 апреля 2013 г.), который также полностью включен в данный документ посредством ссылки. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что экологически чувствительный пептид претерпевает

конформационные изменения и внедряется через клеточные мембраны в ответ на физиологические изменения (например, рН). Пептид может нацеливаться на кислые ткани и избирательно перемещать полярные, непроницаемые для клеток молекулы через клеточные мембраны в ответ на низкий внеклеточный рН. В некоторых вариантах осуществления пептид способен избирательно доставлять молекулы через клеточную мембрану, имеющую кислую или гипоксическую мантию с рН менее, чем около 6,0. В некоторых вариантах осуществления пептид способен избирательно доставлять молекулу через клеточную мембрану, имеющую кислую или гипоксическую мантию с рН менее, чем около 6,5. В некоторых вариантах осуществления пептид способен избирательно доставлять молекулу через клеточную мембрану, имеющую кислую или гипоксическую мантию с рН менее, чем около 5,5. В некоторых вариантах осуществления пептид способен избирательно доставлять молекулу через клеточную мембрану, имеющую кислую или гипоксическую мантию с рН от около 5,0 до около 6,0.

Термин «кислая и/или гипоксическая мантия» относится к среде клетки в рассматриваемой пораженной ткани, имеющей рН ниже 7,0 и предпочтительно ниже 6,5. Кислая или гипоксическая мантия более предпочтительно имеет рН около 5,5 и наиболее предпочтительно имеет рН около 5,0. Соединения формулы (I) встраиваются через клеточную мембрану, имеющую кислую и/или гипоксическую мантию в зависимости от рН, чтобы ввести R^2 - в клетку, после чего дисульфидный линкер расщепляется с доставкой свободного R^2H . Поскольку соединения формулы (I) зависят от рН, они предпочтительно внедряются через клеточную мембрану только в присутствии кислой или гипоксической мантии, окружающей клетку, а не через клеточную мембрану «нормальных» клеток, которые не имеют кислой или гипоксической мантии. Примером клетки, имеющей кислую или гипоксическую мантию, является раковая клетка.

В контексте данного документа термины «рН-чувствительный» или «рН-зависимый», используемые для обозначения пептида R^1 или способа введения пептида R^1 или соединений по изобретению через клеточную мембрану, означают, что пептид имеет более высокое сродство к липидному бислою клеточной мембраны, имеющему кислую или гипоксическую мантию, чем к липидному бислою мембраны при нейтральном рН. Таким образом, соединения по изобретению предпочтительно внедряются через клеточную мембрану, чтобы вставить R^2 - внутрь клетки (и, таким образом, доставлять R^2H , как описано выше), когда липидный бислой клеточной мембраны имеет кислую или гипоксическую мантию («больная» клетка), но не проникает через клеточную мембрану, когда мантия (среда липидного бислоя клеточной мембраны) не является кислой или гипоксической («нормальная» клетка). Считается, что эта предпочтительная вставка достигается в результате того, что пептид R^1 образует спиральную конфигурацию, которая облегчает вставку в мембрану.

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит по меньшей мере одну из следующих последовательностей:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),

AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2);
 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3);
 Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4); и
 AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит по меньшей мере одну из следующих последовательностей:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),
 AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2) и
 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит последовательность ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит последовательность AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит последовательность ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит последовательность Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид содержит последовательность AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид состоит по существу из последовательности ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид состоит по существу из последовательности AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид состоит по существу из последовательности ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид состоит по существу из последовательности AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

В некоторых вариантах осуществления экологически чувствительный пептид состоит по существу из последовательности AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5).

Дополнительные экологически чувствительные пептиды раскрыты в патентной

публикации США № US 2019/209580, заявке на патент США № 16/925,094 и заявке на патент США № 16/924,445, каждая из которых включена в настоящий документ во всей своей полноте.

В контексте данного документа термин «терапевтический фрагмент» относится к фрагменту (например, R²-), полученному из терапевтической молекулы или агента. Подходящие терапевтические молекулы (например, R²H) для применения в изобретении включают ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы I и низкомолекулярные фрагменты, нацеленные на микротрубочки, которые могут иметь нежелательные побочные эффекты при системной доставке из-за их возможного вредного воздействия на нормальную ткань.

Три ингибитора PARP (олапариб, рупартиб и нирапариб) в настоящее время коммерчески доступны, другие находятся в разработке, например, AG-014699 (Agiroon/Pfizer), KU-0059436 (KuDOS/AstraZeneca), INO-1001 (Inotek/Genentech), NT-125 (сейчас E-7449; Eisai; 3H-пиридазино[3,4,5-де]хиназолин-3-он, 8-[(1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)метил]-1,2-дигидро-), 2X-121 (2X Oncology; 3H-пиридазино[3,4,5-де]хиназолин-3-он, 8-[(1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)метил]-1,2-дигидро-) и ABT-888 (Abbvie). Ингибиторы PARP раскрыты, например, в патентах США 6100283; 6 310 082; 6 495 541; 6 548 494; 6 696 437; 7 151 102; 7 196 085; 7 449 464; 7 692 006; 7 781 596; 8 067 613; 8 071 623; и 8,697,736, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Соединения формулы (I), содержащие фрагмент ингибитора PARP, описаны в патентной публикации США № US 2019/209580.

Термин «низкомолекулярный фрагмент, нацеленный на топоизомеразу I» или «ингибитор топоизомеразы I» относится к химической группе, которая связывается с топоизомеразой I. Низкомолекулярный фрагмент, нацеленный на топоизомеразу I, может представлять собой группу, полученную из соединения, которое ингибирует активность топоизомеразы I. Ингибиторы топоизомеразы включают камптотецин и его производные и аналоги, такие как опотекан, иринотекан (CPT-11), силатекан (DB-67, AR-67), коситекан (BNP-1350), луртотекан, гиматекан (ST1481), белотекан (CKD-602), рубитекан, топотекан, дерукстекан и эксатекан. Ингибиторы топоизомеразы описаны, например, в Ogitani, Bioorg. Med. Chem. Lett. 26 (2016), 5069-5072; Kumazawa, E., Cancer Chemother Pharmacol 1998, 42: 210-220; Tahara, M, Mol Cancer Ther 2014, 13(5): 1170-1180; Nakada, T., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2016, 26: 1542-1545.

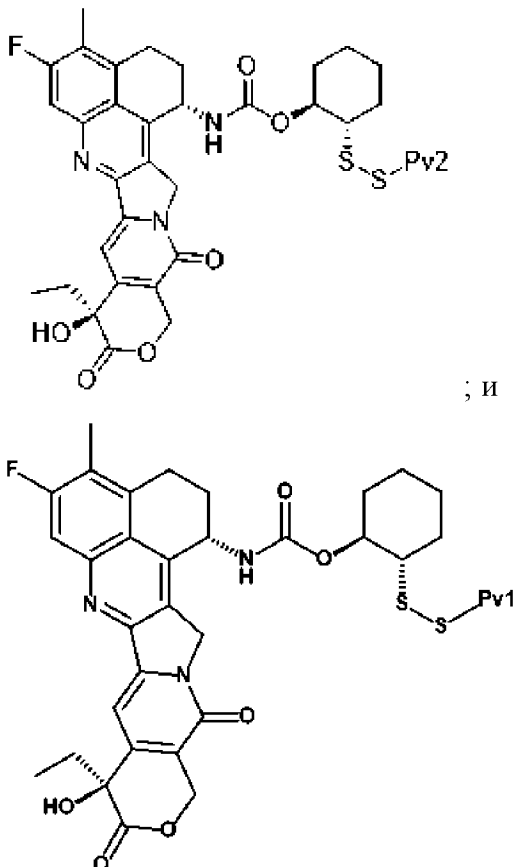
Соединения формулы (I), содержащие фрагмент, нацеленный на топоизомеразу I, описаны в заявке на патент США № 16/925094. В некоторых вариантах осуществления соединений формулы (I) R² представляет собой камптотецин, опотекан, иринотекан (CPT-11), силатекан (DB-67, AR-67), коситекан (BNP-1350), луртотекан, гиматекан (ST1481), белотекан. (CKD-602), рубитекан, топотекан, дерукстекан или эксатекан. В некоторых вариантах осуществления соединений формулы (I) R² представляет собой эксатекан.

Подходящие низкомолекулярные фрагменты, нацеленные на микротрубочки

(например, R^2), могут быть цитотоксическими соединениями, такими как майтанзиноиды, которые могут иметь нежелательные побочные эффекты при системной доставке из-за их возможного вредного воздействия на нормальную ткань. Низкомолекулярные средства, нацеленные на микротрубочки, включают, но не ограничиваются ими, майтанзиноиды, аклитаксел, доцетаксел, эпотилоны, дискодермолид, алкалоиды барвинка, колхицин, комбретастатины и производные и аналоги вышеупомянутых. Средства, целенаправленно воздействующие на микротрубочки, описаны в Tangutur, A.D., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017 17(22): 2523-2537. Средства, целенаправленно воздействующие на микротрубочки, также включают майтанзиноиды, такие как майтанзин (DM1) и его производные и аналоги, которые описаны в Lopus, M, *Cancer Lett.*, 2011, 307(2): 113-118; и Widdison, W., *J. Med. хим.* 2006, 49:4392-4408.

Соединения формулы (I), содержащие фрагмент, нацеленный на микротрубочки, описаны в заявке на патент США № 16/924445. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой майтанзиноид. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой DM1. В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой DM4.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) выбрано из:



Молекулы по изобретению можно пометить, например, с помощью зонда, такого как флуорофор, радиоизотоп и т.п. В некоторых вариантах осуществления зонд представляет собой флуоресцентный зонд, такой как LICOR. Флуоресцентный зонд может включать любой фрагмент, который может повторно излучать свет при возбуждении светом

(например, флуорофор).

Далее следует отметить, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предусмотрены в комбинации в одном варианте осуществления (при этом варианты осуществления предназначены для объединения, как если бы они были написаны в кратко-зависимой форме). И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. Таким образом, предполагается, что признаки, описанные в качестве вариантов осуществления соединений формулы (I), могут быть объединены в любой подходящей комбинации.

В контексте данного документа термин «около» означает $\pm 20\%$ от установленного значения и включает, более конкретно, значения $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$ и $\pm 1\%$ от установленного значения.

В контексте данного документа термин «введение в реакцию» или «контактирование» при описании определенного процесса используется, как известно в данной области техники, и обычно относится к объединению химических реагентов таким образом, чтобы обеспечить их введение в реакцию на молекулярном уровне для достижения химического или физического превращения. В некоторых вариантах осуществления введение в реакцию включает два реагента, при этом используются один или несколько эквивалентов второго реагента по отношению к первому реагенту. Стадии реакции по способам, описанным в данном документе можно проводить в течение времени и в условиях, подходящих для получения идентифицированного продукта.

Термин "основание" относится к соединению, которое является донором электронной пары в кислотно-основной реакции.

Термин «кислота» относится к соединению, которое является акцептором электронной пары в кислотно-основной реакции.

Реакции по способам, описанным в данном документе, можно проводить в подходящих растворителях, которые легко может выбрать специалист в области органического синтеза. Подходящие растворители могут практически не реагировать с исходными материалами (реагентами), промежуточными продуктами или продуктами при температурах, при которых проводятся реакции, например, температурах, которые могут находиться в диапазоне от температуры замерзания растворителя до температуры кипения растворителя. Данную реакцию можно проводить в одном растворителе или в смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции можно выбрать подходящие растворители для конкретной стадии реакции. В некоторых вариантах осуществления реакции можно проводить в отсутствие растворителя, например, когда по меньшей мере один из реагентов представляет собой жидкость или газ.

Подходящие растворители могут включать галогенированные растворители, такие как четыреххлористый углерод, бромдихлорметан, дибромхлорметан, бромформ, хлороформ, бромхлорметан, дибромметан, бутилхлорид, дихлорметан (метиленхлорид),

тетрахлорэтилен, трихлорэтилен, 1,1,1-трихлорэтан, 1,1,2-трихлорэтан, 1,1-дихлорэтан, 2-хлорпропан, 1,1,1-трифтортолуол, 1,2-дихлорэтан, 1,2-дибромэтан, гексафторбензол, 1,2,4-трихлорбензол, 1,2-дихлорбензол, хлорбензол, фторбензол, их смеси и т.п.

Подходящие эфирные растворители включают: диметоксиметан, тетрагидрофуран, циклопентилметилловый эфир, 1,3-диоксан, 1,4-диоксан, фуран, тетрагидрофуран (ТГФ), диэтиловый эфир, диметилловый эфир этиленгликоля, диэтиловый эфир этиленгликоля, диметилловый эфир диэтиленгликоля (диглим), диэтиловый эфир диэтиленгликоля, диметилловый эфир триэтиленгликоля, анизол, метил *трет*-бутиловый эфир, их смеси и т.п.

Термин «ацилирующий реагент» относится к соединению, которое вводит карбонильную группу в нуклеофильное положение реагирующего соединения. Например, электрофильная карбонильная группа может реагировать с нуклеофильным атомом О или N. Примеры ацилирующих реагентов включают изопропенилацетат, янтарный ангидрид и глутаровый ангидрид.

Термин «восстановитель» относится к соединению, которое вводит гидрид в электрофильное положение реагирующего соединения, такого как ненасыщенный углерод (*например*, углерод карбонильной группы или иминной группы). Например, восстановитель может вводить гидрид в реакционное соединение, преобразуя амидсодержащее реакционное соединение в аминный продукт, преобразуя иминсодержащее реакционное соединение в аминный продукт, преобразуя кетонсодержащее реакционное соединение в спиртовой продукт или преобразуя сложный эфир содержащее реакционное соединение в спиртовой продукт.

Реакции по способам, описанным в данном документе, можно проводить на воздухе или в инертной атмосфере. Как правило, реакции, содержащие реагенты или продукты, которые в значительной степени реагируют с воздухом, можно проводить с использованием чувствительных к воздуху способов синтеза, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

Описанные в данном документе процессы можно контролировать любым подходящим способом, известным в данной области. Например, образование продукта можно контролировать спектроскопическими способами, такими как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, спектрофотометрия (например, УФ-видимая) или масс-спектрометрия; или хроматографией, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография. Соединения, полученные в результате реакций, можно очищать любым подходящим способом, известным в данной области. Например, хроматографией (среднее давление) на подходящем адсорбенте (например, силикагель, оксид алюминия и т.п.), ВЭЖХ или препаративной тонкослойной хроматографией; дистилляцией; сублимацией, растиранием или перекристаллизацией. Чистота соединений, как правило, определяется физическими способами, такими как измерение точки плавления (в случае твердого вещества), получение спектра ЯМР или выполнение разделения с помощью ВЭЖХ. Если температура плавления снижается, если уменьшаются

нежелательные сигналы в спектре ЯМР или если удаляются посторонние пики на кривой ВЭЖХ, можно сказать, что соединение очищено. В некоторых вариантах осуществления соединения в значительной степени очищены.

В контексте данного документа выражения «температура окружающей среды» и «комнатная температура» являются общепринятыми в данной области техники и обычно означают температуру, *например*, температуру реакции, которая соответствует температуре помещения, в котором проводится реакция. *например*, температуре от около 20 °С до около 30 °С.

В различных местах настоящего описания определенные характеристики соединений раскрываются в группах или в диапазонах. В частности, предполагается, что такое раскрытие включает каждую отдельную подкомбинацию членов таких групп и диапазонов. *Например*, термин «C₁₋₆ алкил» специально предназначен для индивидуального раскрытия (без ограничения) метила, этила, C₃ алкила, C₄ алкила, C₅ алкила и C₆ алкила.

Термин «n-членный», где n представляет собой целое число, обычно описывает количество кольцеобразующих атомов в фрагменте, где число кольцеобразующих атомов равен n. *Например*, пиперидинил представляет собой пример 6-членного гетероциклоалкильного кольца, пиразолил представляет собой пример 5-членного гетероарильного кольца, пиридил представляет собой пример 6-членного гетероарильного кольца и 1,2,3,4-тетрагидронафтаден представляет собой пример 10-членной циклоалкильной группы.

Термин «замещенный» означает, что атом или группа атомов формально замещает водород в качестве «заместителя», присоединенного к другой группе. Термин «замещенный», если не указано иное, относится к любому уровню замещения, *например*, моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещению, где такое замещение разрешено. Заместители выбраны независимо, и замещение может быть в любом химически доступном положении. Следует понимать, что замещение в указанном атоме ограничено валентностью. Следует понимать, что замещение в указанном атоме приводит к образованию химически стабильной молекулы. Фраза «необязательно замещенный» означает незамещенный или замещенный. Термин «замещенный» означает, что атом водорода удален и заменен заместителем. Один двухвалентный заместитель, *например* оксо, может заменять два атома водорода.

Термин «C_{n-m}» указывает диапазон, который включает конечные точки, где n и m являются целыми числами и указывают количество атомов углерода. Примеры включают C₁₋₄, C₁₋₆ и т. п.

Термин «алкил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к насыщенной углеводородной группе, которая может быть с прямой цепью или разветвленной цепью. Термин «C_{n-m} алкил» относится к алкильной группе, имеющей от n до m атомов углерода. Алкильная группа формально соответствует алкану с одной связью C-H, замененной точкой присоединения алкильной группы к остатку соединения. В некоторых вариантах осуществления алкильная группа содержит от 1 до 6 атомов углерода,

от 1 до 4 атомов углерода, от 1 до 3 атомов углерода или от 1 до 2 атомов углерода. Примеры алкильных фрагментов включают, но не ограничиваются этим, химические группы, такие как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, *трет*-бутил, изобутил, *втор*-бутил; высшие гомологи, такие как 2-метил-1-бутил, *n*-пентил, 3-пентил, *n*-гексил, 1,2,2-триметилпропил и т. п.

Термин «алкенил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к углеводородной группе с прямой или разветвленной цепью, соответствующей алкильной группе, имеющей одну или несколько двойных углерод-углеродных связей. Алкенильная группа формально соответствует алкену с одной связью С-Н, замененной точкой присоединения алкенильной группы к остатку соединения. Термин «C_{n-m} алкенил» относится к алкенильной группе, имеющей от *n* до *m* атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкенильный фрагмент содержит от 2 до 6, от 2 до 4 или от 2 до 3 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, этенил, *n*-пропенил, изопроепенил, *n*-бутенил, *втор*-бутенил и т. п.

Термин «алкинил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к углеводородной группе с прямой или разветвленной цепью, соответствующей алкильной группе, имеющей одну или несколько тройных углерод-углеродных связей. Алкинильная группа формально соответствует алкину с одной связью С-Н, замененной точкой присоединения алкильной группы к остатку соединения. Термин «C_{n-m} алкинил» относится к алкинильной группе, содержащей от *n* до *m* атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают, но не ограничиваются ими, этинильную, пропин-1-ильную, пропин-2-ильную и т. п. В некоторых вариантах осуществления алкинильный фрагмент содержит от 2 до 6, от 2 до 4 или от 2 до 3 атомов углерода.

Термин «алкилен», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к двухвалентной алкильной связывающей группе. Алкиленовая группа формально соответствует алкану с одной связью С-Н, замененной точками присоединения алкиленовой группы к остатку соединения. Термин «C_{n-m} алкилен» относится к алкиленовой группе, содержащей от *n* до *m* атомов углерода. Примеры алкиленовых групп включают, но не ограничиваются ими, этан-1,2-диил, этан-1,1-диил, пропан-1,3-диил, пропан-1,2-диил, пропан-1,1-диил, бутан-1,4-диил, бутан-1,3-диил, бутан-1,2-диил, 2-метил-пропан-1,3-диил и т. п.

Термины «гало» или «галоген», используемые отдельно или в комбинации с другими терминами, относятся к фтору, хлору, бром и йоду. В некоторых вариантах осуществления «гало» относится к атому галогена, выбранному из F, Cl или Br. В некоторых вариантах осуществления галогеновые группы представляют собой F.

Термин «ароматический» относится к карбоциклу или гетероциклу, имеющему одно или несколько полиненасыщенных колец, имеющих ароматический характер (*m.e.*, содержащих $(4n+2)$ делокализованных π (пи) электронов, где *n* равен целому числу).

термин «арил», используемый отдельно или в сочетании с другими терминами, относится к ароматической углеводородной группе, которая может быть моноциклической

или полициклической (*например*, имеющей 2 конденсированных кольца). Термин «С_{n-m} арил» относится к арильной группе, содержащей от n до m кольцевых атомов углерода. Арильные группы включают, *например*, фенил, нафтил и т.п. В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат от 6 до около 10 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат 6 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат 10 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой фенил.

Термин «гетероарил» или «гетероароматический», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к моноциклическому или полициклическому ароматическому гетероциклу, имеющему по меньшей мере один гетероатом в кольце, независимо выбранный из серы, кислорода и азота. В некоторых вариантах осуществления гетероарильное кольцо имеет 1, 2, 3 или 4 члена кольца, представляющих собой гетероатом, независимо выбранный из азота, серы и кислорода. В некоторых вариантах осуществления любой кольцообразующий N в гетероарильном фрагменте может представлять собой N-оксид. В некоторых вариантах осуществления гетероарил имеет 5-14 атомов в кольце, включая атомы углерода, и 1, 2, 3 или 4 члена кольца, представляющих собой гетероатом, независимо выбранный из азота, серы и кислорода. В некоторых вариантах осуществления гетероарил имеет 5-10 атомов в кольце, включая атомы углерода, и 1, 2, 3 или 4 члена кольца, представляющих собой гетероатом, независимо выбранный из азота, серы и кислорода. В некоторых вариантах осуществления гетероарил имеет 5-6 атомов в кольце и 1 или 2 члена кольца, представляющих собой гетероатом, независимо выбранный из азота, серы и кислорода. В некоторых вариантах осуществления гетероарил представляет собой пятичленное или шестичленное гетероарильное кольцо. В других вариантах осуществления гетероарил представляет собой восьмичленное, девятичленное или десятичленное конденсированное бициклическое гетероарильное кольцо.

Термин «циклоалкил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к неароматической углеводородной кольцевой системе (моноциклической, бициклической или полициклической), включающей циклизированные алкильные и алкенильные группы. Термин «С_{n-m} циклоалкил» относится к циклоалкилу, имеющему от n до m атомов углерода в кольце. Циклоалкильные группы могут включать моно- или полициклические (*например*, с 2, 3 или 4 конденсированными кольцами) группы и спироциклы. Циклоалкильные группы могут содержать 3, 4, 5, 6 или 7 кольцообразующих атомов углерода (С₃₋₇). В некоторых вариантах осуществления циклоалкильная группа имеет от 3 до 6 членов кольца, от 3 до 5 членов кольца или от 3 до 4 членов кольца. В некоторых вариантах осуществления циклоалкильная группа является моноциклической. В некоторых вариантах осуществления циклоалкильная группа является моноциклической или бициклической. В некоторых вариантах осуществления циклоалкильная группа представляет собой С₃₋₆ моноциклическую циклоалкильную группу. Образующие кольцо атомы углерода циклоалкильной группы необязательно могут быть окислены с образованием оксо- или сульфидогруппы. Циклоалкильные группы также включают

циклоалкилидены. В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. В это определение циклоалкила также включены фрагменты, которые имеют одно или более ароматических колец, конденсированных (*т.е.*, имеющих общую связь) с циклоалкильным кольцом, *например*, бензо- или тиенильные производные циклопентана, циклогексана и т.п. Циклоалкильная группа, содержащая конденсированное ароматическое кольцо, может быть присоединена через любой кольцообразующий атом, включая кольцообразующий атом конденсированного ароматического кольца. Примеры циклоалкильных групп включают циклопентил, циклогексил и циклогептил.

Термин «гетероциклоалкил» используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к неароматическому кольцу или кольцевой системе, которая необязательно может содержать одну или несколько алкениленовых групп как часть кольцевой структуры, которая имеет по меньшей мере один гетероатомный член кольца, независимо выбранный из азота, серы, кислорода и фосфора, и которая имеет 4-10 членов в кольце, 4-7 членов в кольце или 4-6 членов в кольце. Термин «гетероциклоалкил» включает моноциклические 4-, 5-, 6- и 7-членные гетероциклоалкильные группы. Гетероциклоалкильные группы могут включать моно- или бициклические (*например*, с двумя конденсированными или мостиковыми кольцами) или спироциклические кольцевые системы. В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа представляет собой моноциклическую группу, имеющую 1, 2 или 3 гетероатома, независимо выбранных из азота, серы и кислорода. Кольцообразующие атомы углерода и гетероатомы гетероциклоалкильной группы могут быть необязательно окислены с образованием оксо- или сульфидогруппы или другой окисленной связи (*например*, C(O), S(O), C(S) или S(O)₂, N-оксид и т. д.), или же атом азота может быть кватернизирован. Гетероциклоалкильная группа может быть присоединена через кольцообразующий атом углерода или кольцообразующий гетероатом. В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа содержит от 0 до 3 двойных связей. В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа содержит от 0 до 2 двойных связей. В определение гетероциклоалкила также включены фрагменты, которые имеют одно или более ароматических колец, конденсированных (*т.е.*, имеющих общую связь) с гетероциклоалкильным кольцом, *например*, бензо- или тиенильные производные пиперидина, морфолина, азепина и т.п. Гетероциклоалкильная группа, содержащая конденсированное ароматическое кольцо, может быть присоединена через любой кольцообразующий атом, включая кольцообразующий атом конденсированного ароматического кольца. Примеры гетероциклоалкильных групп включают тетрагидропиранил.

В определенных местах определения или варианты осуществления относятся к конкретным кольцам (*например*, азетидиновому кольцу, пиридиновому кольцу и т.п.). Если не указано иное, эти кольца могут быть присоединены к любому члену кольца при условии, что валентность атома не превышена. Например, азетидиновое кольцо может быть

присоединено в любом положении кольца, тогда как азетидин-3-ильное кольцо присоединено в 3-положении.

В контексте данного документа термины «защита» и «снятие защиты» в химической реакции относятся к включению химической группы в процесс, и такая группа удаляется на более поздней стадии процесса. Термин получение соединения 1 и его солей может включать защиту и снятие защиты различных химических групп. Необходимость введения защитной группы и снятия защитной группы, а также выбор подходящих защитных групп может быть легко определена специалистом в данной области техники. Химия защитных групп описана, *например*, в Kocienski, *Protecting Groups*, (Thieme, 2007); Robertson, *Protecting Group Chemistry*, (Oxford University Press, 2000); Smith *et al.*, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 6th Ed. (Wiley, 2007); Petursson *et al.*, "Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry," *J. Chem. Educ.*, 1997, 74(11), 1297; и Wuts *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., (Wiley, 2006). Примеры защитных групп включают тиозащитные группы.

В контексте данного документа выражения «температура окружающей среды» и «комнатная температура» понятны в данной области техники и обычно относятся к температуре, *например*, температуре реакции, которая является близкой к комнатной температуре, при которой проводят реакцию, *например*, температуре от около 20 °C до около 30 °C.

Настоящее изобретение также включает фармацевтически приемлемые соли описанных в данном документе соединений. Термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, соли минеральных или органических кислот и основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т. п. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают нетоксичные соли исходного соединения, образованные, *например*, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, обычными химическими способами. Как правило, такие соли можно получать реакцией форм свободной кислоты или основания этих соединений со стехиометрическим количеством подходящих основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; как правило, предпочтительными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, спирты (*например*, метанол, этанол, изопропанол или бутанол) или ацетонитрил (MeCN). Перечни подходящих солей можно найти в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Ed., (Mack Publishing Company, Easton, 1985), p. 1418, Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66(1), 1-19 и в Stahl *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, (Wiley, 2002). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе соединения включают формы N-оксидов.

ПРИМЕРЫ

В контексте данного документа все сокращения, символы и условные обозначения соответствуют используемым в современной научной литературе. См, например, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2nd Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997.

Исходные материалы и ферменты

Ферменты получали от Novozymes, Genencor, Sigma-Aldrich (в т.ч. ферменты Amano), c-Lecta, Aum Enzymes и иммобилизованы на Immobead COV-1. Исходные материалы получали от TCI и Sigma-Aldrich.

Хиральная газовая хроматография (ГХ)

Хиральную ГХ проводили с использованием Supelco betaDEX 325 (30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм df), используя водород в качестве газа-носителя при линейной скорости 0,5 м/сек и температурный градиент (скорость 2-10 °С/мин).

Первым элюировали (*S*, *S*)-энантиомер 2-(ацетилтио)циклогексилацетата. Другие компоненты не были разделены на хиральной ГХ с использованием этой колонки.

Время удерживания:

Продукт	T(°C)	t _R (мин; <i>R/S</i>)	Примечания
2-Меркаптоциклогексанол	50-210	9,9	10°С/мин
	120-210	3,79	10°С/мин
	120-160	5,8	2°С/мин
2-меркаптоциклогексилацетат	120-210	4,7	10°С/мин
	120-160	7,8	2°С/мин
2-(ацетилтио)циклогексилацетат	120-210	7,3	10°С/мин
	120-160	15,7/15,5	2°С/мин
Бензилтиоциклогексанол	50-210	20,0	10°С/мин

Ахиральная ГХ

Ахиральную ГХ использовали для определения нескольких конверсий и для образцов, несовместимых с чувствительной хиральной колонкой. Использовали колонку Supelco METbiodisel с водородом в качестве газа-носителя при линейной скорости 0,5 м/с. Быстрый градиент 50-250 °С использовали при 20 °С/мин.

Время удерживания:

Продукт	T(°C)	t _R (мин)	Примечания
2-Меркаптоциклогексанол	50-250	1,55	цис-изомер 1,42 мин
Бензилтиоциклогексанол	50-250	6,0	
2-Меркаптопиридин	50-250	2,5	широкий
Дипиридилдисульфид	50-250	6,8	
2-(пиридин-2-	50-250	7,2	

илдисульфанил)циклогексан-1-ол			
2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексилацетат	50-250	7,8	

Хиральная ВЭЖХ:

Хиральную ВЭЖХ проводили на колонке ChiralPak AD3 250×4,6 мм с использованием смеси гептан/изопропанол/этанол. Производные бензилтиоэфира можно анализировать, используя смесь гептан/изопропанол 90/10 (элюент А), для более полярных производных пиридилдисульфида требуется смесь гептан/изопропанол/этанол 63/7/30 (элюент В). Детектирование проводили при 220 нм.

Время удерживания:

Продукт	Элюент:	t _R (мин; R/S)	Примечания
Бензилмеркаптан	А	3,9	
Бензилтиоциклогексанол	А	8,7/9,2	
Бензилтиоциклогексилацетат	А	5,1	Не разрешенный
Бензилтиоциклогексилглутарат	А	10,2/14,3	Второй пик не определен
2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ол	В	6,4/14,7	
2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексилацетат	В	7,3/5,4	
4-оксо-4-((2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексил)окси)бутановая кислота	В	9,9/12,7	
5-оксо-5-((2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексил)окси)пентановая кислота	В	10,2/11,5	
2-Меркаптопиридин	В	7,1	Широкий
Дипиридилдисульфид	В	7,1	Острый

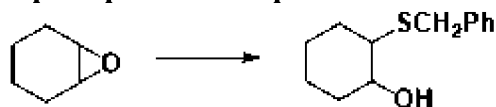
Пример 1. Синтез (D)-тартрата цинка

(D)-Тартаровую кислоту (150 г; 1 моль) растворяли в воде (1,5 л). При механическом перемешивании добавляли раствор хлорида цинка (136 г; 1 моль) в воде (1 л) и 20 мл 3,5% HCl (20 мл). Кислую смесь нейтрализовали до pH 4, используя 33%-ный водный раствор гидроксида натрия. Образовывался осадок, и смесь перемешивали еще час. Смесь фильтровали на стеклянном фильтре P3. Твердое вещество промывали водой, ацетоном и этилацетатом. Твердое вещество сушили в вакуумной печи с получением целевого

продукта в виде белого порошка высокой плотности (270 г).

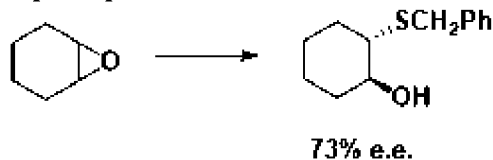
Альтернативно, (D)-Тартаровую кислоту (15 г; 0,1 моль), растворенную в деионизированной воде (0,15 л), нейтрализовали до pH 12, используя 33% NaOH (20 мл, 0,2 моль). При механическом перемешивании по каплям добавляли раствор хлорида цинка (13,6 г) в деионизированной воде (50 мл). Первоначально образовывался гель, который трансформировался в молочную взвесь. В конце добавления pH снизился до нейтрального. Фильтрацию проводили с использованием стеклянного фильтра P3 (в течение около 1 ч), и твердое вещество промывали деионизированной водой, ацетоном и этилацетатом. После вакуумной сушки в печи получали белый пушистый порошок (22 г).

Пример 2. Синтез рацемического 2-бензилтиоциклогексанола.



Бензилмеркаптан (1,24 г; 10 ммоль) и оксид циклогексена (1,9 г; 19 ммоль) растворяли в 2-метилтетрагидрофуране. Добавляли *N*-метилморфолин (0,5 мл). В течение ночи реакция не произошла. Добавление раствора этоксида натрия (1 мл 20%) обеспечило быструю реакцию (50% за 1 ч, полная конверсия меркаптана). Обработка водой и выпаривание привели к получению желтого масла (2,18 г). Масло перегоняли при пониженном давлении, с использованием аппарата Кугельроп (печь 145 °C/ <1 мбар) с получением прозрачного масла (1,89 г; 8,5 ммоль; 85%). ВЭЖХ: 2 пика 8,7 м (*R, R*) и 9,2 м (*S, S*) с использованием Chiralpak AD3 с гептаном/изопропанолом 90/10. УФ-детектирование при 220 нм.

Пример 3. Обогащенный 2-бензилтиоциклогексанол



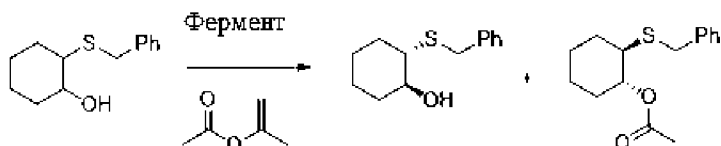
В реактор объемом 5 л загружали (D)-тартрат цинка (263 г), дихлорметан (2 л), бензилмеркаптан (124 г, 1 моль) и оксид циклогексена (147 г, 1,5 экв.). Реакцию помещали в атмосферу аргона. Смесь перемешивали в течение 5 дней (что привело к конверсии меркаптана > 99%) и фильтровали через 7 дней. Фильтрат выпаривали и переносили в колбу меньшего размера с использованием этилацетата. Выпаривание и перегонка в высоком вакууме привели к получению прозрачного бесцветного масла (215 г). ВЭЖХ: 87% (*S, S*) [75% э. и.] и 1% других компонентов.

Катализатор на основе (D)-тартрата цинка можно использовать повторно. В реактор объемом 2 л загружали восстановленный катализатор (D)-тартрат цинка (468 г), дихлорметан (1 л), бензилмеркаптан (124 г, 1 моль) и оксид циклогексена (147 г, 1,5 экв.). Реакцию помещали в атмосферу аргона. Смесь перемешивали в течение 1 дня (в результате конверсия меркаптана составила >99%) и фильтровали. Фильтрат выпаривали и переносили в колбу меньшего размера с использованием этилацетата. В результате выпаривания

получали прозрачное бесцветное масло (225 г). ВЭЖХ: 85% (*S, S*) [73% э. и.] и 1% других компонентов.

Пример 4. Эксперимент по скринингу ферментов.

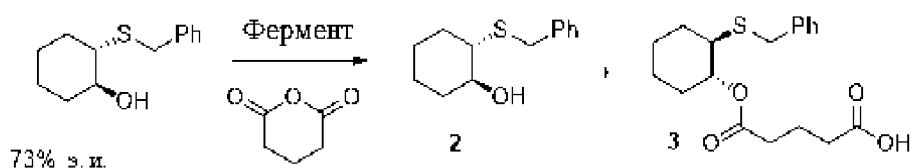
В сосуд объемом 2 мл добавляли 20-25 мг фермента. К содержимому добавляли рацемический 2-бензилтиоциклогексанол (22 мг), растворенный в 1 мл безводного МТБЭ, содержащего 5 об.% изопрпенилацетата. Сосуд закрывали и встряхивали при 24 °С в течение 16 ч в термостатируемом шейкере. После инкубации проводили анализ с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием Chiralpak AD3, 100х разбавление в подвижной фазе; гептан/изопропанол (90/10). Результаты скрининга показаны в таблице ниже.



Номер п/п	Фермент	Источник	Конв	Субстрат ее	E (est)
1	IMMCALA-T2-150	Candida antarctica, A	21%	6,6%	< 2
2	IMMCALB-T2-150	Candida antarctica, B	49%	>99,8%	>1000
3	IMMCALBY-T2-150	Candida antarctica, B	49%	>99,8%	>1000
4	IMMRML-T2-150	Rhizomucor miehei	2%		
5	IMMTLL-T2-150	Thermomyces lanuginosa	47%	91,3%	>500
6	IMMCRL-T2-150	Candida rugosa	7%		
7	IMMABC-T2-150	Pseudomonas cepacia	48%	96,5%	>500
8	IMMAPF-T2-150	Pseudomonas fluorescens	49%	98,9%	>500
9	IMMARO-T2-150	Rhizopus oryzae	16%	20%	
10	IMMAMJ-T2-150	Mucor javanicus	12%	16%	
11	IMMANA-T2-	Aspergillus niger	7%		

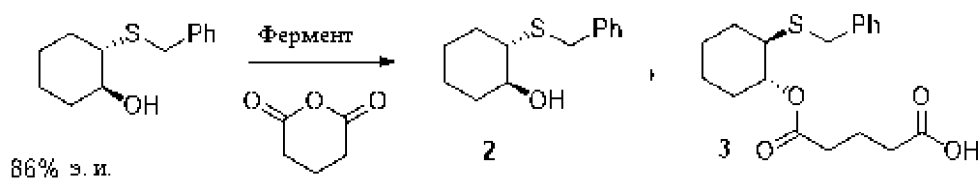
	150				
12	IMMRNA-T2-150	Rhizopus niveus	<1%		
13	IMMASMQ-T2-150	Alcaligenes sp.	8%		
14	IMMRES-T2-150	Resinase HT	49%	99,3%	>500
15	IMMLIPX-T2-150	Lipex 100L	49%	99,5%	>1000
16	IMML51-T2-150	Novozymes Stickaway	50%	99,1%	>300
17	IMMCCMO-T2-150	Candida cylindracea sp.	7%		
18	IMMAULI-T2-150	Bacillus subtilis	30%	44%	>100

Дальнейшие исследования с использованием циклических ангидридов (например, глутарового ангидрида и янтарного ангидрида) также оказались эффективными.



Глутаровый ангидрид использовали вместо изопронилацетата в описанном выше эксперименте по скринингу ферментов. Использование фермента CaL-B-T2 позволило провести *R*-селективное удаление с получением смеси соединения 2 и соединения 3 в соотношении 85:15. Соединение 3 было удалено из реакционной смеси путем экстракции основанием 2 М NH₃ с последующей промывкой мягким основанием (например, водным Na₂CO₃). Продукт сушили в атмосфере аргона с получением соединения 2.

Пример 5. Ферментативное разделение обогащенного 2-бензилтиоциклогексанола

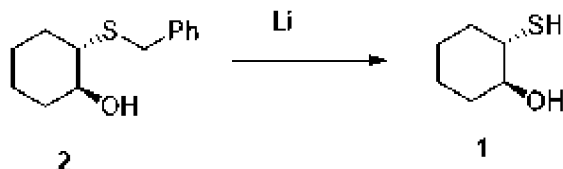


Обогащенный 2-бензилтиоциклогексанол (225 г, 86% э. и., 1 моль) помещали в колбу на 2 л. Добавляли МТБЭ (1,5 л), глутаровый ангидрид (33 г, 0,29 моль) и иммобилизованный фермент (продукт № CaLB-ADS4 от ChiralVision; 50 г). Смесь

перемешивали при 180 об/мин с помощью механической мешалки в течение 2 дней. Через 1 сутки минорный (*R, R*)-энантиомер полностью удаляли. На следующий день реакционную смесь фильтровали и фермент промывали изопропилацетатом. Фильтрат промывали 2 М раствором водного аммиака (0,5 л) и 1,25 М водным раствором карбоната натрия (0,5 л). Органическую фазу выделяли, сушили над сульфатом натрия и выпаривали с получением соединения 2 в виде слегка мутного бесцветного масла (172 г; 76%).

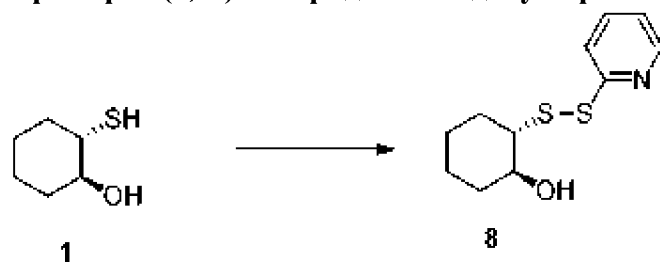
ВЭЖХ: 98,0%, 100,0% э. и. Обнаружено около 1,1% дибензилдисульфида.

Пример 6. Восстановительное расщепление соединения 2



Перегнанный (*S, S*)-2-бензилтиоциклогексанол (11,1 г; 50 ммоль) помещали в сухую круглодонную колбу на 250 мл в атмосфере аргона и растворяли в 100 мл безводного 2-метилтетрагидрофурана. При механическом перемешивании двумя порциями добавляли гранулы лития (всего 1,4 г; 200 ммоль). Реакцию охлаждали на водяной бане. Перемешивание в течение ночи при температуре окружающей среды привело к получению серой суспензии. Полученную суспензию, содержащую избыток непрореагировавшего лития, выливали в 100 мл холодной воды. После полного гашения металлического лития прозрачный раствор разделяли на фазы. Водную фазу, содержащую литиевую соль целевого продукта (рН >11), подкисляли твердой лимонной кислотой (10 г) до рН 5. Экстрагировали 100 мл этилацетата, сушили на сульфате натрия и тщательно выпаривали с получением (*S, S*)-2-меркаптоциклогексанола в виде светло-желтого масла (5 г; 38 ммоль; 76%). ГХ: >99%. $[\alpha]_D^{25}$: +42° (с=1 в MeOH).

Пример 7. (*S, S*)-2-пиридин-2-илдисульфанил)циклогексанол

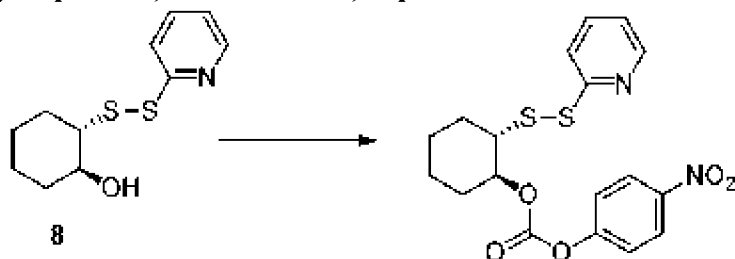


(*S, S*)-2-меркаптоциклогексанол (7,0 г; 53 ммоль) растворяли в 50 мл метанола в атмосфере аргона и добавляли по каплям к раствору дипиридилдисульфида (12 г; 55 ммоль) в метаноле (100 мл). Через 1,5 часа реакционную смесь выпаривали досуха и остаток смешивали с МТБЭ (100 мл). Осажденный 2-меркаптопиридин отфильтровывали и прозрачный фильтрат промывали 1 М раствором карбоната натрия (2×100 мл), сушили над сульфатом натрия и выпаривали до желтого масла (13 г). Масло растирали со 100 мл н-гептана до твердого светло-коричневого вещества (11 г (86%); ГХ: 91%).

Твердое вещество очищали путем растворения в МТБЭ (25 мл), смешивания с 50 мл гептана и затравки желаемым продуктом (затравки получали, например, на стадии 1

примера 9). Образовывался белый кристаллический порошок. Смесь охлаждали на ледяной бане и фильтровали. Твердое вещество промывали н-гептаном (25 мл). Тщательная вакуумная сушка приводила к образованию белого порошка (7,6 г; 31,5 ммоль; выход 59% из меркаптоциклогексанола; выход 44% из 2-бензилтиоциклогексанола). ГХ: 99,0%; ВЭЖХ: 99,8%; Хиральная ВЭЖХ: 100% э. и.; т.пл.: 70-72°C; $[\alpha]_D$: -146° (с=1 в MeOH).

Пример 8. 4-нитрофенил(S, S)-2-пиридин-2-илдисульфанил)циклогексил)карбонат

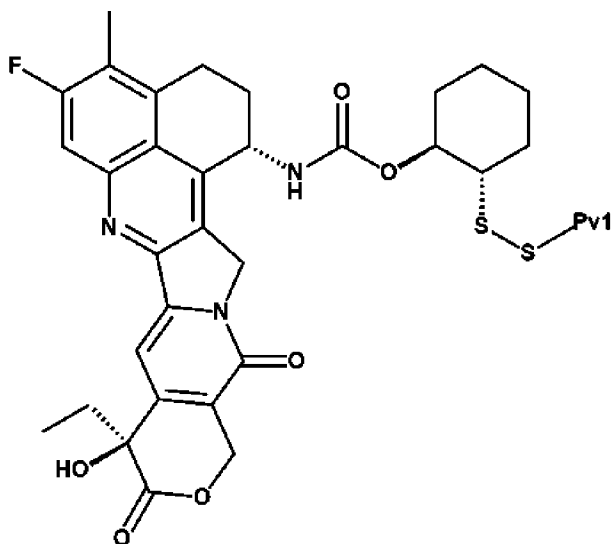


(S, S)-2-Пиридин-2-илдисульфанил)циклогексанол (4,8 г; 20 ммоль) помещали в сухую колбу в атмосфере аргона и растворяли в 80 мл безводного дихлорметана. Добавляли пиридин (5 мл; 60 ммоль; 3 экв.). Раствор 4-нитрофенилхлорформиата (4,08 г; 20,2 ммоль) в 40 мл безводного дихлорметана добавляли по каплям в атмосфере аргона в течение около 1 часа при температуре окружающей среды. ВЭЖХ-проба показала 2% остаточного (S, S)-2-пиридин-2-илдисульфанил)циклогексанола, 3% бис(4-нитрофенил)карбоната и 95% целевого продукта. Дальнейшее перемешивание в течение 1 часа не привело к увеличению конверсии. Смесь гасили водой (10 мл) и промывали 0,5 М водным раствором хлористоводородной кислоты (100 мл), насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (25 мл) и сушили над сульфатом натрия. Выпаривание привело к получению желтого масла (8,4 г). Остаток растворяли в смеси МТБЭ (35 мл) и н-гептане (50 мл). Нагревание до 50°C и медленное охлаждение до 30 °C при перемешивании и засеивании привели к образованию густой суспензии. Ее разбавляли н-гептаном (20 мл) и охлаждали на ледяной бане. Осадок отфильтровывали, промывали н-гептаном (30 мл) и сушили в вакууме с получением целевого продукта в виде белого порошка (16,3 ммоль; 81%).

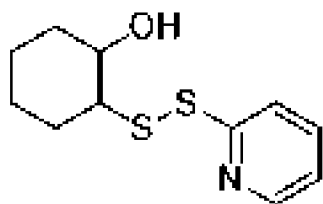
ВЭЖХ: 99,4%; Хиральная ВЭЖХ: чистота 99,2%, э. и. 100%; т.пл.: 77-79 °C; $[\alpha]_D$: +104° (с=1 в MeOH).

Пример 9. Синтез конъюгата 1

Конъюгат 1 можно получить в соответствии со способом, описанным в примере 11 заявки на патент США № 16/925094, с использованием соединения 1 ((1S,2S)-2-меркаптоциклогексан-1-ол) вместо рацемического 2-меркаптоциклогексан-1-ола. Пример 11 заявки на патент США № 16/925094 приводится ниже.



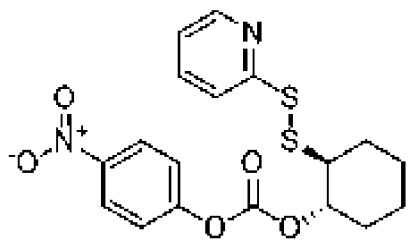
Стадия 1. Синтез 2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ола



К раствору 1,2-ди(пиридин-2-ил)дисульфана (15,2 г, 68,9 ммоль) в MeOH (дегазированный N₂) (30 мл) по каплям добавляли 2-меркаптоциклогексан-1-ол (11,4 г, 86,2 ммоль) (дегазированный N₂) и перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме. Полученный неочищенный материал очищали колоночной хроматографией, используя 30% EtOAc/гексаны, с получением титульного соединения в виде желтой жидкости. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,54-8,53 (м, 1H), 7,60-7,56 (м, 1H), 7,40-7,38 (м, 1H), 7,17-7,14 (м, 1H), 3,38-3,34 (м, 1H), 2,62-2,57 (м, 1H), 2,11-2,02 (м, 1H), 1,75-1,74 (м, 2H), 1,61-1,60 (м, 1H), 1,42-1,24 (м, 4H).

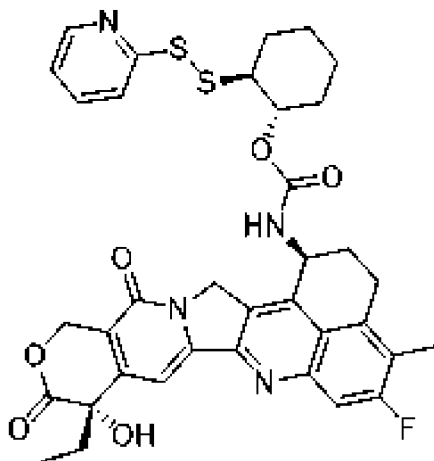
Титульное соединение подвергали хиральной препаративной ВЭЖХ, условия (Chiralpak IG: 250 мм x 20 мм x 5 микрон; *n*-гексан: ИПС с 0,1% диэтиламина (80:20); 19 мл/мин; 25 °С (комнатная температура). Сначала элюировали (1R,2R)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ол (4,5 г, 18,6 ммоль) (время удерживания: 3,9 минуты), затем элюировали (1S,2S)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ол (время удерживания: 11,3 минуты). Абсолютную стереохимию подтверждали путем сравнения продукта стадии 2 с хиральным материалом, имеющим заявленную абсолютную стереохимию (см. Monaco, M.R.; J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 49, 16982-16985).

Стадия 2. Синтез 4-нитрофенил((1S,2S)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексил)карбоната.



К раствору (1R,2R)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ола (4,5 г, 18,6 ммоль) в ДМФА (90,0 мл) добавляли ДИПЭА (10,3 мл, 56,0 ммоль) и бис(4-нитрофенил)карбонат (11,35 г, 27,3 ммоль) при комнатной температуре. Реакционный сосуд закрывали и перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ (20% EtOAc/гексан). После завершения реакции реакционную смесь гасили водой (20,0 мл) и экстрагировали EtOAc (20,0 мл). Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией с использованием 20-30% EtOAc/гексанов с получением титульного продукта в виде не совсем белого твердого вещества (5,0 г, выход 66%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,44 (д, $J=4$ Гц, 1H), 8,28 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,72 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,61-7,57 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,41 (д, $J=9,6$ Гц, 2H), 7,08-7,05 (т, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,85-4,74 (м, 1H), 3,03-2,92 (м, 1H), 2,28 (д, $J=9,6$ Гц, 1H), 2,20-2,12 (м, 1H), 1,85-1,62 (м, 3H), 1,45-1,25 (м, 3H). ЖХ-МС m/z рассчитано: 406,7; найдено: 407,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Стадия 3. Синтез [(1S,2S)-2-(2-тиридилдисульфанил)циклогексил]N-[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16(24),17,19-гептаен-23-ил]карбамата



К (10S,23S)-23-амино-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.02,14.04,13.06,11.020,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16(24),17,19-гептаен-

5,9-дионметансульфоновой кислоте (250 мг, 0,470 ммоль) в 10 мл сухого ДМФ добавляли 4-нитрофенил((1S,2S)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексил)карбонат (со

стадии 2; 191 мг, 0,470 ммоль), N, N-диизопропилэтиламин (122 мг, 0,941 ммоль) и ДМАП (115 мг, 0,941 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ-МС показала, что целевой продукт сочетания образовался. Затем реакционную смесь разбавляли EtOAc, промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl, H₂O и рассолом. Смесь сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией, используя 0-5% MeOH/дихлорметан, с получением 240 мг целевого продукта с выходом 72,6% (240 мг).

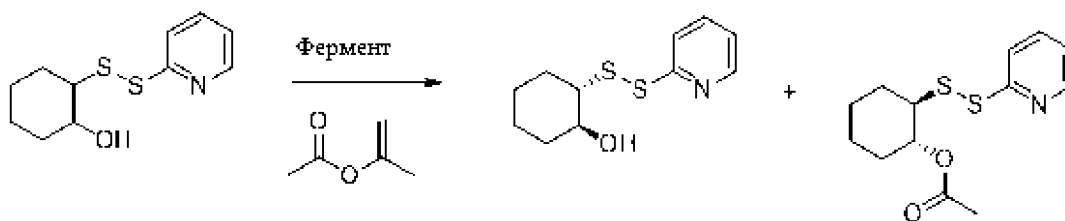
Стадия 4. Реакция сочетания с Pv1 (Соединение 11)

В сосуд добавляли Pv1 (275 мг, 0,0811 ммоль), соединение со стадии 3 (74,1 мг, 0,105 ммоль), ацетонитрил (10 мл) и воду (5 мл). К этой смеси добавляли н-метилморфолин (0,303 г, 0,0030 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ-МС показала, что целевой продукт сочетания образовался.

Реакционную смесь очищали непосредственно с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (20-85% ацетонитрил/вода, 0,5% уксусная кислота на колонке Sunfire Prep C18 (10 мкм, 50×150 мм), время удерживания: 7,022 мин) с получением 213 мг целевого продукта с выходом 68% (213 мг). ИЭР (M+3H/3)³⁺: 1291,6

Пример 10: Ферментный скрининг альтернативного субстрата

В сосуд объемом 2 мл добавляли 20-25 мг фермента. Туда же добавляли рацемический 2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ол (12 мг), растворенный в 1 мл 2-метилтетрагидрофурана, содержащего 5 об.% изопропилацетата. Сосуд закрывали и встряхивали при 21 °С в течение двух дней в термостатируемом шейкере. После инкубации проводили анализ с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием Chiralpak AD3, 100х разбавление в подвижной фазе; гептан/изопропанол/этанол (63/7/30). Результаты скрининга показаны в таблице ниже.

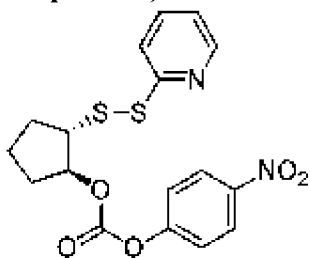


Номер п/п	Фермент	м(мг)	t(ч)	Конв (площадь)	Субстрат э. и.	Продукт э. и.	E
1	IMMCALA-T2-150	22,3	42	7%	-	8%	1,2
2	IMMCALB-T2-150	20,1	24	50%	99,3%	>99,9%	
			42	50,5%	>99,9%	>99,9%	>15000
3	IMMCALBY-T2-150	20,1	42	49,1%	93%	>99,8%	>5000
4	IMMRML-T2-150	20,3	42	0%			

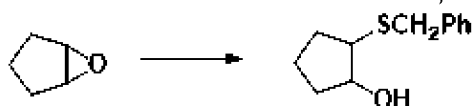
5	IMMTLL-T2-150	22,4	42	6%		>99%	>200
6	IMMCRL-T2-150	20,3	42	0%			
7	IMMABC-T2-150	22,7	42	8%		>99%	>200
8	IMMAPF-T2-150	20,5	42	12%		>99%	>200
9	IMMARO-T2-150	21,0	42	0%			
10	IMMAMJ-T2-150	22,0	42	0%			
11	IMMANA-T2-150	20,4	42	0%			
12	IMMRNA-T2-150	22,8	42	0%			
13	IMMASMQ-T2-150	23	42	1%			
14	IMMRES-T2-150	23,3	42	13%		87%	16
15	IMMLIPX-T2-150	20,7	42	19%*		93%	
16	IMML51-T2-150	22,3	42	39%		97%	130
17	IMMCCMO-T2-150	21,5	42	1%			
18	IMMAULI-T2-150	20,4	42	1%			

Энантиобогащенный 2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклогексан-1-ол можно использовать вместо рацемического материала на стадии 6 примера 2 для получения конъюгата 1 примера 9.

Пример 11: Синтез 4-нитрофенил[(S, S)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклопентил]карбоната

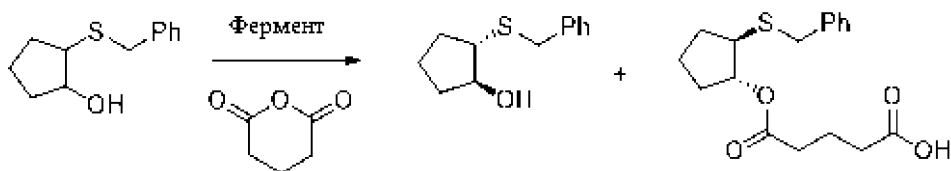


Стадия 1. Синтез 2-бензилтиоциклопентанола.



В 5-литровый реактор загружали D-тарtrat цинка (500 г), дихлорметан (2 л), бензилмеркаптан (127 г, 1 моль) и циклопентенноксид (100 г, 1,1 экв.). Реакционную смесь помещали в атмосферу аргона. Смесь перемешивали в течение 15 дней (обеспечивая конверсию меркаптана > 99%) и фильтровали. Фильтрат выпаривали и переносили в колбу меньшего размера с использованием этилацетата. Выпаривание привело к получению мутного масла (210 г; 58% э. и.). Масло перегоняли под глубоким вакуумом с использованием стандартной дистилляционной установки Claisen. Были получены четыре фракции при 102-108 °C/0,07-0,15 мбар.

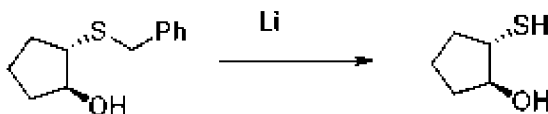
Стадия 2. Синтез (S, S)-2-бензилтиоциклопентанола



Обогащенный 2-бензилтиоциклопентанол (88 г; 58% э. и.; чистота 95% предварительная перегонка) помещали в колбу емкостью 1 л. Добавляли МТБЭ (0,6 л), глутаровый ангидрид (23 г; 0,2 моль) и иммобилизованный фермент (CaLB-ADS4; 10 г). Смесь перемешивали при 180 об/мин с помощью механической мешалки в течение 1 дня. Через 18 ч минорный (*R, R*)-энантиомер полностью удаляли. Реакционную смесь декантировали, и фермент повторно использовали в следующей процедуре. Декантированный раствор промывали водным раствором аммиака (0,25 л, 2 М) и карбонатом натрия (0,1 л, 1,25 М). Органическую фазу выделяли, сушили над сульфатом натрия и выпаривали до слегка мутного бесцветного масла (64 г; 73%). Полученное масло перегоняли методом Кугельнора двумя порциями, с получением 54 г масла с чистотой 95% по ГХ, демонстрирующего 99,8% э. и.

В качестве альтернативы, обогащенный 2-бензилтиоциклопентанол (104 г; 57% э. и., чистота 97,6% основная перегонка) помещали в 1-литровую колбу. Добавляли МТБЭ (0,5 л), глутаровый ангидрид (23 г; 0,2 моль) и иммобилизованный фермент (CaLB-ADS4; 10 г восстановленного и 10 г свежего). Смесь перемешивали при 180 об/мин с помощью механической мешалки в течение 1 дня. Через 24 часа минорный (*R, R*)-энантиомер полностью удаляли. Реакционную смесь фильтровали. Фильтрат промывали водным раствором аммиака (0,25+0,05 л; 2 М). Органическую фазу выделяли, сушили над сульфатом натрия и выпаривали до слегка мутного бесцветного масла (80 г; 77%). Это масло подвергали перегонке Кугельнором (печь 175°C/0,06 мбар) в 3 порции с получением 74 г масла с чистотой 97,5% по ГХ, демонстрируя более 99,8% э. и. $[\alpha]_D: +14^\circ$ (с=5 в ДХМ); $[\alpha]_D: -17^\circ$ (с=1 в MeOH).

Стадия 3. Синтез (S, S)-2-меркаптоциклопентанола.



Перегнанный (*S, S*)-2-бензилтиоциклопентанол (21 г; 100 ммоль) помещали в сухую круглодонную колбу на 250 мл в атмосфере аргона и растворяли в 200 мл безводного 2-метилтетрагидрофурана. При механическом перемешивании добавляли гранулы лития (всего 2,8 г; 0,4 моль). Реакцию охлаждали на водяной бане. Перемешивание в течение ночи при температуре окружающей среды привело к получению серой суспензии. ГХ образца показала 15% продукта по площади. Смесь гасили медленным добавлением MeOH (25 мл) в течение 2 часов. Наблюдали обильное газовыделение. ГХ показала более высокую конверсию образца после гашения. Дальнейшее гашение водным раствором этанола приводило к большому пенообразованию.

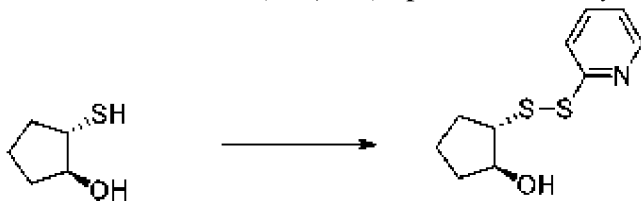
Реакционную смесь разбавляли 0,25 л воды. Органическую фазу удаляли, а водную

фазу промывали EtOAc. Промытую водную фазу подкисляли 30 г твердой лимонной кислоты и экстрагировали EtOAc (200+100 мл). Экстракты концентрировали при пониженном давлении с получением едкого масла (8 г). Перегонкой Кугельнора получали бесцветное масло (1,39 г+3,95 г).

Альтернативно дистиллированный (*S, S*)-2-бензилтиоциклопентанол (21 г; 100 ммоль) смешивали с MeOH (3,2 г; 100 ммоль) и растворяли в безводном 2-метилтетрагидрофуране (25 мл). Этот раствор добавляли по каплям в течение 2,5 ч к суспензии гранул лития (2,8 г; 0,4 моль) в безводном 2-метилтетрагидрофуране (250 мл) в сухой круглодонной колбе объемом 1 л в атмосфере аргона при механическом перемешивании. Через 4 часа по каплям добавляли раствор MeOH (3,5 мл) в 2-метилтетрагидрофуране (50 мл) в течение 1 часа. Смесь гасили медленным добавлением MeOH (10 мл) в 2-МеТНФ (40 мл) в течение 1 часа. Наблюдали обильное газовыделение.

Реакционную смесь разбавляли водой (0,3 л). Органическую фазу удаляли, а сильноосновную водную фазу промывали 2-МеТНФ. Промытую водную фазу подкисляли твердой лимонной кислотой (30 г) и экстрагировали EtOAc (250+100 мл). Экстракты упаривали при пониженном давлении с получением едкого масла (7,5 г). Перегонкой Кугельнора [печь 125-135°C/18 мбар] получали бесцветное масло (7,0 г). ГХ 99,5%. [59 ммоль; 59%]; $[\alpha]_D$: +49° (с=1 в MeOH).

Стадия 4. Синтез (S, S)-2-(тиридин-2-илдисульфанил)циклопентанола



(*S, S*)-2-меркаптоциклопентанол (5,9 г; 50 ммоль) растворяли в 50 мл метанола в атмосфере аргона и добавляли по каплям в течение 1 часа 30 мин к раствору дипиридилдисульфида (10,9 г; 49 ммоль) в метаноле (70 мл). После 5-часового дополнительного перемешивания реакционную смесь выпаривали досуха и остаток (17 г) смешивали с МТБЭ (250 мл) и раствором гидроксида натрия (0,2 л; 1 М). Органическую фазу промывали гидроксидом натрия (50 мл, 1 М), водой (50 мл), раствором бикарбоната натрия (25 мл) и рассолом (25 мл). Органический экстракт сушили над сульфатом натрия и выпаривали до желтого масла (11,1 г, количественный выход); ВЭЖХ: 100% э. и., 8,6% площади DPDS.

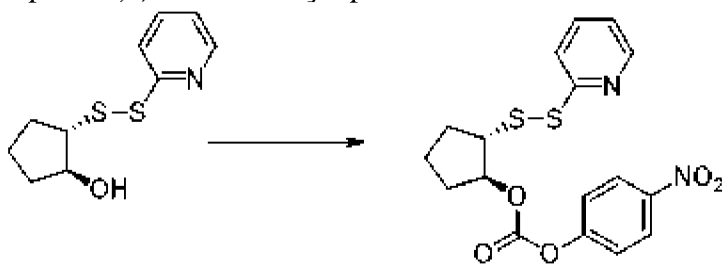
Часть масла (4 г) смешивали с МТБЭ (8 мл) и пентаном до помутнения. Эту смесь охлаждали в течение ночи до -25 °С в морозильной камере; наблюдали выпадение масла без обогащения/обеднения примесями по данным ВЭЖХ.

Масло выделяли и очищали колоночной хроматографией на 100 г диоксида кремния. Колонку элюировали смесью 8:2 гексан/этилацетат, затем смесью 7:3 гексан/этилацетат.

Продукт выделяли в виде слегка мутного масла с общим выходом 80%.

ГХ: > 99,5%; ВЭЖХ: 99,8%; Хиральная ВЭЖХ: 100% э. и.; $[\alpha]_D$: -46° (с=1 в EtOH).

Стадия 5. Синтез 4-нитрофенил[(S, S)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклопентил]карбоната



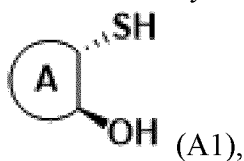
Неочищенный (S, S)-2-(пиридин-2-илдисульфанил)циклопентанол (7 г; около 25 ммоль) помещали в сухую колбу в атмосфере аргона и растворяли в безводном дихлорметане (80 мл). Добавляли пиридин (5 мл; 60 ммоль; 3 экв.). По каплям добавляли раствор 4-нитрофенилхлорформиата (4,5 г; 23 ммоль) в безводном дихлорметане (20 мл) в атмосфере аргона в течение около 1 часа при температуре окружающей среды. Смесь гасили водой, промывали разбавленной соляной кислотой (100+50 мл; 1 М), водой и раствором бикарбоната натрия. Фильтровали через пробку из сульфата натрия и выпаривали при пониженном давлении с получением титульного соединения в виде мутного масла (10 г, количественный выход). ВЭЖХ: чистота 85%.

Конъюгаты, содержащие циклопентильный линкерный фрагмент, можно получать в соответствии со способами, раскрытыми в примере 11 заявки на патент США № 16/925094, а также в примере 9 в данном документе.

Различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания. Такие модификации также подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения. Каждая ссылка, включая без ограничения все патенты, патентные заявки и публикации, цитируемые в настоящей заявке, полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

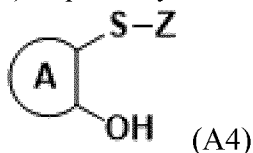
ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединения формулы (A1)

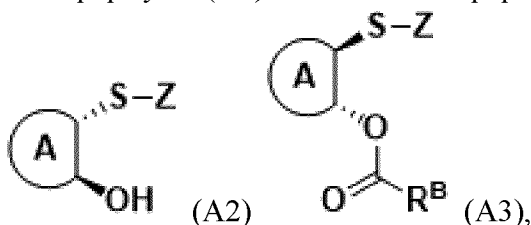


или его соли, где кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил, включающий:

а) обработку соединения формулы (A4)



или его соли, где Z представляет собой защитную группу, с помощью Ak1, где Ak1 представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (A2) и соединения формулы (A3);



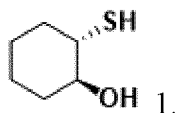
или их солей; где R^B представляет собой C₁₋₆ алкил, необязательно замещенный COOH; и

снятие защиты с соединения формулы (A2) или его соли с получением соединения формулы (A1) или его соли.

2. Способ по п. 1, в котором кольцо A представляет собой C₅₋₇ циклоалкил.

3. Способ по п. 1, в котором кольцо A представляет собой циклогексил.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором соединение формулы (A1) представляет собой соединение 1:



5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором Z представляет собой -CH₂R^A, где R^A представляет собой C₆₋₁₀ арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C₆₋₁₀ арил и 5-10-членный гетероарил, каждый необязательно замещены 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C₁₋₄ алкила, галогена, CN, NO₂, OH и OCH₃.

6. Способ по п. 5, в котором R^A представляет собой фенил.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором Ak1 представляет собой глутаровый ангидрид, янтарный ангидрид или изопрпенилацетат.

8. Способ по любому из пп. 1-6, в котором Ak1 представляет собой глутаровый ангидрид.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором R^B представляет собой CH₃, CH₂CH₂COOH или CH₂CH₂CH₂COOH.

10. Способ по любому из пп. 1-8, в котором R^B представляет собой CH₂CH₂CH₂COOH.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором фермент представляет собой липазу, полученную из *Candida antarctica*.

12. Способ по любому из пп. 1-10, в котором фермент представляет собой липазу В, полученную из *Candida antarctica*.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором фермент иммобилизован на твердой подложке.

14. Способ по п. 13, в котором твердая подложка содержит акриловые бусины.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят при температуре от около 15°C до около 20°C.

16. Способ по любому из пп. 1-14, в котором обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят при комнатной температуре.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят в течение периода времени от около 6 часов до около 24 часов.

18. Способ по любому из пп. 1-16, в котором обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят в течение периода времени около 16 часов.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором обработку соединения формулы (A4) с помощью Ak1 проводят в присутствии S1, где S1 представляет собой растворитель.

20. Способ по п. 19, в котором S1 представляет собой эфирный растворитель.

21. Способ по п. 19, в котором S1 представляет собой метил-трет-бутиловый эфир.

22. Способ по п. 19, в котором S1 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.

23. Способ по любому из пп. 1-22, дополнительно включающий стадию отделения соединения формулы (A2) от соединения формулы (A3).

24. Способ по п. 23, в котором разделение включает обработку смеси водным основанием и отделение водного слоя от смеси.

25. Способ по п. 24, в котором водное основание представляет собой водный раствор карбоната натрия.

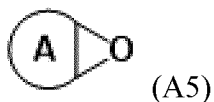
26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором Z представляет собой -CH₂R^A, а снятие защиты включает восстановление соединения формулы (A2) с помощью RA1, где RA1 представляет собой восстановитель.

27. Способ по п. 26, в котором RA1 представляет собой металлический литий, металлический натрий или металлический кальций.

28. Способ по п. 26, в котором RA1 представляет собой металлический литий.

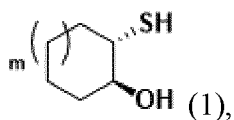
29. Способ по любому из пп. 26-28, в котором восстановление проводят в присутствии S2, где S2 представляет собой растворитель.

30. Способ по п. 29, в котором S2 представляет собой эфирный растворитель.
31. Способ по п. 29, в котором S2 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.
32. Способ по любому из пп. 1-31, в котором соединение 1 выделяют в энантиомерном избытке более 75%.
33. Способ по любому из пп. 1-31, в котором соединение 1 выделяют в энантиомерном избытке более 90%.
34. Способ по любому из пп. 1-31, в котором соединение 1 выделяют в энантиомерном избытке более 95%.
35. Способ по любому из пп. 1-34, в котором соединение формулы (A4) получают способом, включающим введение в реакцию соединения формулы (A5)



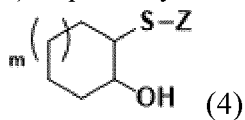
или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) или его солью с получением соединения формулы (A4) или его соли.

36. Способ по п. 35, в котором введение в реакцию соединения формулы (A5) или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) или его солью проводят в присутствии M1, где M1 представляет собой металлический катализатор.
37. Способ по п. 36, в котором M1 представляет собой соль цинка.
38. Способ по п. 36, в котором M1 представляет собой (D)-тарترات цинка.
39. Способ по любому из пп. 35-38, в котором введение в реакцию соединения формулы (A5) или его соли с $R^A\text{CH}_2\text{SH}$ (формула (6)) проводят в присутствии B1, где B1 представляет собой основание.
40. Способ по п. 39, в котором B1 представляет собой алкоксидное основание.
41. Способ по п. 39, в котором B1 представляет собой этоксид натрия.
42. Способ по любому из пп. 36-41, в котором введение в реакцию соединения формулы (A5) с соединением формулы (6) проводят в присутствии S3, где S3 представляет собой растворитель.
43. Способ по п. 42, в котором S3 представляет собой галогенированный растворитель или эфирный растворитель.
44. Способ по п. 42, в котором S3 представляет собой дихлорметан.
45. Способ по п. 42, в котором S3 представляет собой 2-метилтетрагидрофуран.
46. Способ по любому из пп. 35-45, в котором соединение формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 25%.
47. Способ по любому из пп. 35-45, в котором соединение формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 50%.
48. Способ по любому из пп. 35-45, в котором соединение формулы (A4) выделяют в энантиомерном избытке более 70%.
49. Способ получения соединения формулы (1)

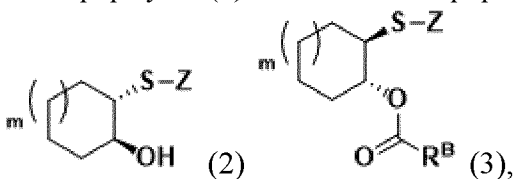


или его соли, где m равен 0, 1 или 2, включающий:

а) обработку соединения формулы (4)



или его соли, где Z представляет собой защитную группу, с помощью $Ak1$, где $Ak1$ представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (2) и соединения формулы (3);

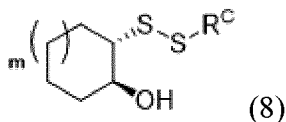


или их солей; где R^B представляет собой C_{1-6} алкил, необязательно замещенный $COOH$; и

снятие защиты с соединения формулы (2) или его соли с получением соединения формулы (1) или его соли.

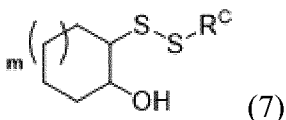
50. Способ по п. 49, в котором m равен 1.

51. Способ получения соединения формулы (8):

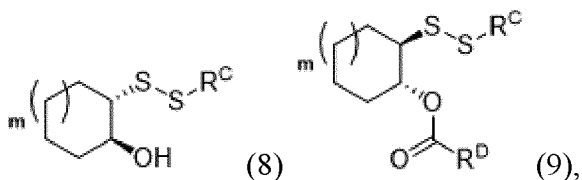


или его соли, в котором m равен 0, 1 или 2, и R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ,

включающий введение в реакцию соединения формулы (7)

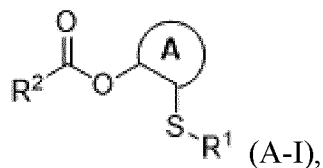


или его соли с $Ak2$, где $Ak2$ представляет собой ацилирующий реагент, в присутствии фермента с получением смеси соединения формулы (8) и соединения формулы (9);



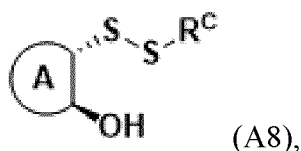
или их солей, где R^D представляет собой C_{1-6} алкил, необязательно замещенный $COOH$.

52. Способ получения соединения формулы (A-I):



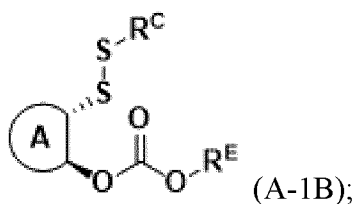
или его фармацевтически приемлемой соли, в котором кольцо A представляет собой C_{5-7} циклоалкил или 5-7-членный гетероциклоалкил; R^1 представляет собой нацеливающий фрагмент; а R^2 представляет собой терапевтический фрагмент; включающий:

введение в реакцию соединения формулы (A1) или его соли, полученных способом по любому из пп. 1-48, с $R^C-S-S-R^C$ с получением соединения формулы (A8)



или его соли, где R^C представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, независимо выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ;

введение в реакцию соединения формулы (A8) или его соли с $R^E O C(O) R^F$ с получением соединения формулы (A-1B)



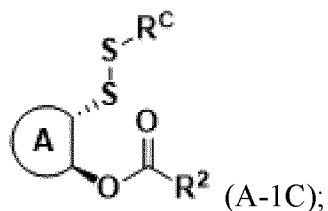
или его соли, где:

R^E представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена, CN, NO_2 , OH и OCH_3 ; и

R^F представляет собой галоген или OR^{F1} , где OR^{F1} представляет собой C_{6-10} арил или 5-10-членный гетероарил; где 5-10-членный гетероарил имеет по меньшей мере один кольцообразующий атом углерода и 1, 2, 3 или 4 кольцообразующих гетероатома, независимо выбранных из N, O и S; и где C_{6-10} арил и 5-10-членный гетероарил каждый необязательно замещен 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, выбранными из C_{1-4} алкила, галогена,

CN, NO₂, OH и OCH₃;

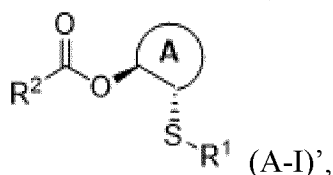
введение в реакцию соединения формулы (A-1B) или его соли с R²H с получением соединения формулы (A-1C)



или его соли; и

введение в реакцию соединения формулы (A-1C) или его соли с R¹H с получением соединения формулы (A-I).

53. Способ по п. 52, в котором соединение формулы (A-I) имеет формулу (A-I)':



или его фармацевтически приемлемая соль.

54. Способ по п. 52 или 53, в котором R¹ представляет собой пептид, содержащий по меньшей мере одну из следующих последовательностей:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO: 1; Pv1),

AEQNPIYWARADWLFTTPLLDDLALLVDADECG (SEQ ID NO: 2; Pv2) и

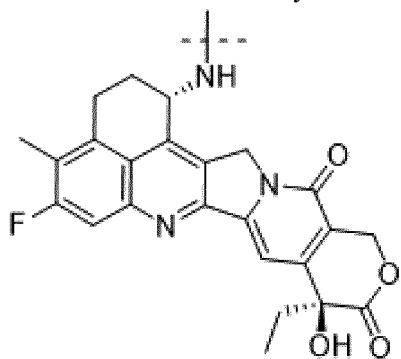
ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO: 3; Pv3),

и в котором R¹ присоединен к атому S соединения формулы (I) через остаток цистеина R¹.

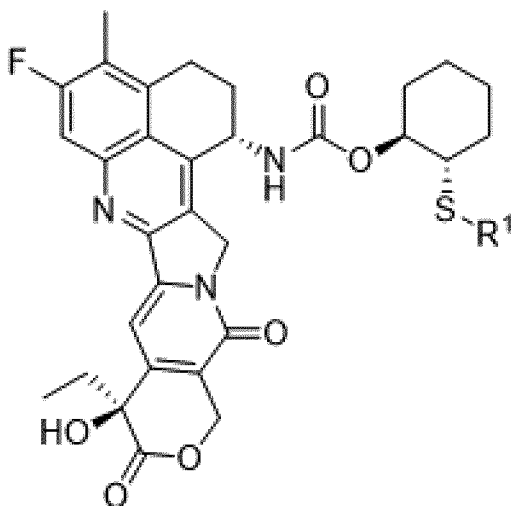
55. Способ по п. 52 или 53, в котором R¹ представляет собой ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO: 1; Pv1) и в котором R¹ присоединен к атому S соединения формулы (I) через остаток цистеина R¹.

56. Способ по любому из пп. 52-55, в котором R² представляет собой фрагмент, нацеливающий на топоизомеразу I.

57. Способ по любому из пп. 52-55, в котором R² представляет собой:



58. Способ по п. 52, в котором соединение формулы (A-I) представляет собой



59. Соединение формулы (A1) или его соль, полученные способом по любому из пп. 1-48.
60. Соединение формулы (1) или его соль, полученные способом по п. 49 или 50.
61. Соединение формулы (8) или его соль, полученные способом по п. 51.
62. Соединение формулы (I) или его соль, полученные способом по любому из пп. 52-58.

По доверенности