

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Синтез новых производных талидомида

Обучающийся

М.Е. Гогонов

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

Р. Э. Гасанов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Аннотация

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех разделов, 20 рисунков, 28 схем, четырех таблиц, заключения и списка литературы из 76 источников, включая зарубежные.

Целью бакалаврской работы является получение новых производных талидомида в рамках синтеза библиотеки потенциальных деградеров для убиквитин-протеасомной системы CRBN-RNF126.

Объектом работы является разработка ковалентных рекрутеров E3-лигаз.

Предмет бакалаврской работы – синтез молекулярных сенсоров для биологического тестирования в целях определения деградируемой мишени.

В литературном обзоре приводится описание существующих концепций направленного протеолиза белков, исторический аспект развития стратегии молекулярных клеев, а также применение талидомида и его производных в ее рамках. Далее приводится обсуждение известных подходов к синтезу производных талидомида.

В экспериментальной части приведены методики синтезов полученных соединений, алгоритмы компьютерного моделирования и протоколы биологических испытаний.

На основе проделанной работы можно сделать вывод, что нами было получено 8 целевых соединений, 4 из которых представляют собой потенциальные деградеры системы CRBN-RNF126, а 4 – это соответствующие молекулы отрицательного контроля. Проведен ковалентный и молекулярный докинг исследуемых молекул, а также анализы цитотоксичности и деградации цереблона.

Abstract

The title of the graduation work is Synthesis of new thalidomide derivatives.

The senior thesis consists of an introduction, three sections, 20 figures, 28 schemes, four tables, a conclusion and the list of 76 references including foreign sources.

The aim of the graduation work is to obtain new thalidomide derivatives as a part of the synthesis of a library of potential molecular degraders for the CRBN-RNF126 ubiquitin-proteasome system.

The object of the work is the development of covalent recruiters of E3-ligases.

The subject of the graduation work is the synthesis of chemical sensors for biological testing in order to determine the degradable target.

The senior graduation work may be divided into several logically connected parts which are literature review, results and their discussion and experimental part.

The first part describes the existing concepts of directed protein proteolysis, the historical aspect of the development of the molecular glues strategy, as well as the use of thalidomide and its derivatives within its framework. The following is a discussion of known approaches to the synthesis of thalidomide derivatives.

The second part describes the design of the research and discusses synthetic procedures for obtaining both initial and target compounds. A description of computer simulation is also provided.

In the third part, the synthesis methods are presented, as well as the characteristics of the obtained compounds, computer simulation algorithms and biological test protocols.

It can be concluded that we have obtained 8 target compounds, 4 of which are potential degraders of the CRBN-RNF126 system, and 4 are the corresponding negative control molecules. Covalent and molecular docking of the studied molecules was also performed, as well as cytotoxicity and degradation analyses of CRBN.

Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Общие представления о направленной деградации	8
1.2 Молекулярные клеи.....	11
1.3 Комплекс E3 лигазы CRBN и IMiDs	13
1.4 RNF126 как перспективная биомишень	18
1.5 Подходы к синтезу талидомида и его производных.....	20
2 Результаты и их обсуждение	34
2.1 Синтез исследуемых соединений.....	35
2.2 Компьютерное моделирование.....	43
2.3 Биологические испытания.....	52
3 Экспериментальная часть.....	55
3.1 Реагенты и оборудование	55
3.2 Синтез исходных соединений.....	55
3.3 Синтез целевых соединений	59
3.4 Компьютерное моделирование	64
3.5 Биологические испытания	65
Заключение	67
Список используемой литературы.....	68

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

BRCA1	белок предрасположенности к раку молочной железы 1 типа
BRD4	бромодоменсодержащий белок 4
CHK1	киназа контрольной точки 1
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
ERK	киназа, регулируемая внеклеточными сигналами
E2F1	фактор транскрипции 1 семейства E2F
GSPT1	субъединица ERF3A фактора высвобождения пептидной цепи эукариот
IKZF1	белок 1 цинкового пальца семейства Ikaros
IKZF3	белок 3 цинкового пальца семейства Ikaros
MAPK	митоген-активируемая протеинкиназа
mTOR	мишень рапамицина млекопитающих
RING	действительно интересный новый ген пальцевого домена
RNF8	белок 8, содержащий RING домен
RNF126	белок 126, содержащий RING домен
RNF168	белок 168, содержащий RING домен
SALL4	sal-подобный белок 4
SNAr	механизм присоединения-элиминирования ароматического нуклеофильного замещения

Введение

Медицинская химия богата обилием подходов, направленных на разработку биологически активных соединений, обладающих высокой эффективностью по отношению к определенным биомишеням, которыми как правило, выступают белки.

В настоящее время существует два основных таргетных метода противораковой терапии, это использование антител и низкомолекулярных ингибиторов. Первый метод - конъюгат антитело-лекарство привел к изменению парадигмы лечения рака. Такой фармакологический состав позволяет разработать систему, которая позволит высокоэффективно поражать раковые клетки ультратоксичной химиотерапией с меньшей токсичностью для организма [1]. В то же время, этот подход имеет и свои недостатки, так как поглощение цитотоксического препарата нормальными тканями все же сохраняется. В силу того, что антитела имеют довольно высокую молекулярную массу и низкую проницаемость, они оказываются нацелены прежде всего на белки, ассоциированные с мембраной, что вызывает ограничения в их применении [2].

Во втором методе применяют низкомолекулярные ингибиторы, действие которых обусловлено связыванием с ортостерическим сайтом белка-мишени, что и влечет изменения в биологической активности [3]. Серьезнейшим недостатком использования такой терапии является резистентность, развивающаяся при длительном приеме препаратов [4]. В дополнение к имеющимся недостаткам также нужно заметить, что идентифицированы белки, не имеющие целевых активных сайтов. Следовательно – это мишени, которые просто не поддаются лечению существующими препаратами. Для преодоления всех этих препятствий были разработаны новые эффективные стратегии, которые представляют собой физическое уничтожение мишени. Наиболее известны системы E3 убиквитин-протеасомной деградации, опосредуемой протеолизом. К ним относится стратегия химерных молекул

PROTAC (Proteolysis targeting chimera) и другие известные разновидности химер: AUTAC (Autophagy targeting chimera), ENDTAC (Endosome targeting chimera), LYTAC (Lysosome targeting chimera), а также концепция молекулярных клеев [5].

Естественно, становится очевидным, что изучение убиквитин-протеасомных подходов и, в частности, именно применение молекулярных клеев, является принципиально новой и беспроигрышной стратегией в разработке современных высокоэффективных лекарственных препаратов, чем и подчеркивается актуальность данной работы.

Цель работы: Синтез новых производных талидомида в рамках разработки библиотеки потенциальных ковалентных рекрутеров E3-лигазы RNF126 и оценка их биологической активности в системе деградации CRBN-RNF126.

Задачи:

1. Синтезировать библиотеку потенциальных деградеров системы CRBN-RNF126 и соответствующие соединения отрицательного контроля.
2. Провести ковалентный докинг целевых соединений в структуру RNF126 и оценить способ связывания в активном сайте CRBN.
3. Провести *in vitro* исследования полученных соединений.

1 Литературный обзор

1.1 Общие представления о направленной деградации

Направленная деградация белка (TPD) – это мощная терапевтическая стратегия, которая представляет собой разрушение белков, инициирующих развитие заболеваний. Как правило, такие белки не поддаются классическому медикаментозному лечению. В рамках TPD существует две основных концепции: использование комбинированных (химерных) молекул выборочного протеолиза (PROTACs), и применение молекулярных клеев. Оба варианта действуют по механизму убиквитин-протеасомной системы, что показано на рисунке 1 [1].

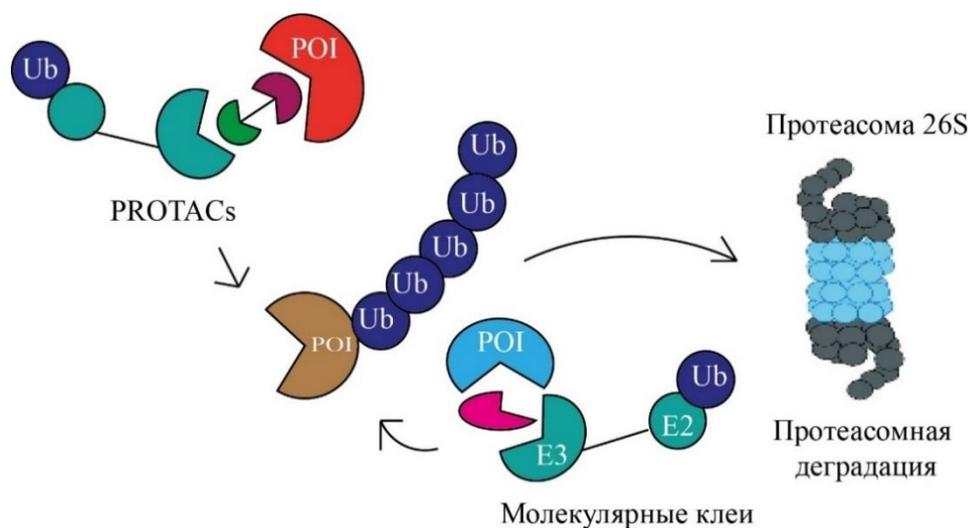


Рисунок 1 – Направленная деградация белка под действием PROTACs и молекулярных клеев

PROTACs являются более громоздкими конструкциями, так как имеют в своем составе лиганды, нацеленные на разные белки, как на мишень, так и на лигазу, что отличает их химерную природу. Также, как правило, они объединяются весьма массивными гибкими линкерами. Молекулярные клеи же представляют собой низкомолекулярные соединения, которые связываются с поверхностью лигазы, тем самым изменяя ее, что приводит к возникновению

взаимодействия с белком интереса. В таблице 1 приведено полное сравнение систем PROTAC и молекулярных клеев. Сами по себе молекулярные клеи были открыты чисто случайно в процессе фенотипического скрининга. Разработка стратегий рационального дизайна и синтеза подобных молекул является одной из самых важных задач современной медицинской химии [2].

Исходя из сравнительной характеристики, стоит заметить, что молекулярные клеи являются намного менее изученной стратегией, чем PROTAC, но в силу своих достоинств представляют весомый интерес для дальнейшего изучения.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика PROTAC и молекулярных клеев

Характеристика сравнения	Молекулярный клей	PROTAC
Механизм действия	Связывание происходит непосредственно с лигазой E3, связывание с мишенью не обязательно, так как индуцируется белок-белковое взаимодействие	Происходит одновременное связывание как с E3 лигазой, так и с мишенью
Открытие	Открываются случайным образом	Для PROTAC созданы стратегии рационального дизайна
Белки-мишени	Подбираются, идентифицируются	Как правило, известные биомишени
Молекулярная масса	Относительно небольшая	Большой молекулярный вес из-за громоздкости молекулы
Соответствие правилам Липински	Да	Нет, но линкеры, как правило, соответствуют

Как было замечено ранее, направленная деградация работает на основе процесса убиквитинилирования. Это ферментативная посттрансляционная модификация, которая заключается в присоединении убиквитина к субстрату. Механизм (рисунок 2) состоит из трех основных этапов: активации, конъюгации и лигирования убиквитина [8].

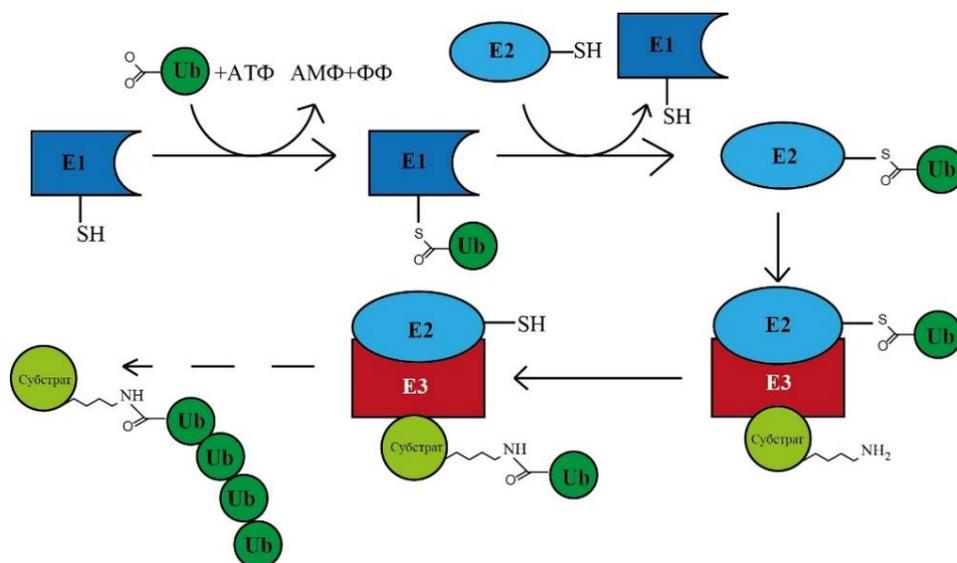


Рисунок 2 – Общий вид процесса убиквитинилирования

На первой стадии убиквитин активируется ферментом E1 или же убиквитинактиватором, этот процесс является АТФ-зависимым. Вторым этапом является конъюгирование убиквитина E2 ферментами, которые катализируют его перенос на активный сайт цистеина при помощи реакции тиоэтерификации. E2 связывается с комплексом E1-убиквитин [3].

На третьем этапе во взаимодействие вступают убиквитинлигазы E3, которые катализируют последний шаг в каскаде убиквитинилирования. E3 ферменты работают как распознающие субстрат субъединицы, а также они способны связываться с E2 [4].

На финальном этапе происходит мечение белка-субстрата убиквитином и последующая протеасомная деградация под действием протеасомы 26S. Стоит отметить, что существуют также E4 ферменты, которые являются факторами удлинения цепей убиквитина, они могут добавлять заранее сформированные цепи к субстрату [5].

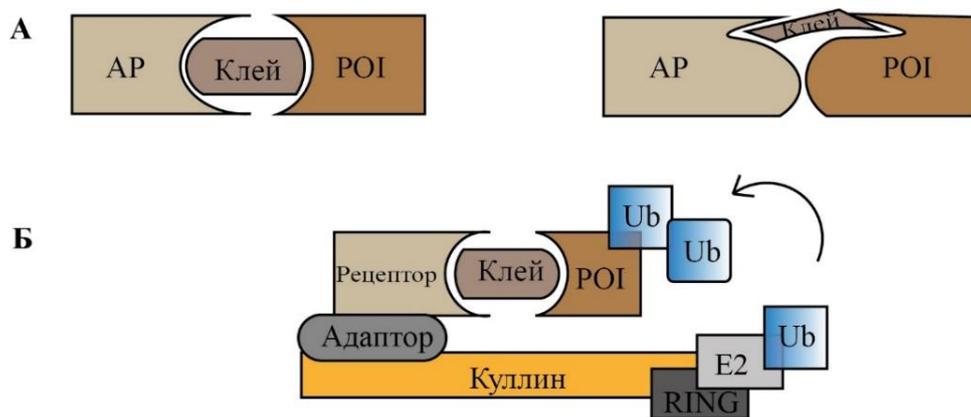
Еще одним важным моментом является специфичность связывания лигазы с мишенью. Обеспечивающим фактором здесь является наличие дегронов. Это участки структуры белка, регулирующие скорость разложения, то есть те, непосредственно с которыми связываются лигазы [6]. Они могут

содержать в себе мотивы, аминокислотные последовательности, или просто могут быть открытыми аминокислотами, как правило, это аргинин и лизин [7]. Как правило, дегроны делят на убиквитинозависимые и убиквитинонезависимые. Понятно, что убиквитинозависимые принимают участие в направленной деградации с дальнейшим нацеливанием протеасомы на мишень. Точный механизм работы дегронов в полиубиквитинилировании не ясен во многих случаях, поэтому принято считать, что если их удаление из структуры белка приводит к меньшему убиквитинилированию, то они являются убиквитинозависимыми [8].

1.2 Молекулярные клеи

Под молекулярным клеем подразумевается некая малая молекула, которая при связывании с поверхностями двух белков, не ассоциирующих друг с другом при обычных условиях, индуцирует белок-белковое взаимодействие между ними. Эти молекулы действуют также через убиквитинилирование мишени [9]. Главным отличием молекулярных клеев от традиционных ингибиторов является их субстехиометрическое действие, при котором они катализируют полное истощение мишеней, не поддающихся лечению. Такие молекулы имеют огромную клиническую эффективность и высокий спрос, но при этом есть и большая проблема – нет точного подхода к разработке, в основном все молекулярные клеи были найдены по счастливой случайности [10]. Само словосочетание «молекулярный клей» было впервые употреблено С. Шрайбером в 1992 году [11].

Действие молекулярных клеев можно описать следующим образом: есть некий белок интереса (POI), который же и является мишенью, также есть вспомогательный белок (AP). Молекула клея связывается с поверхностями обоих этих белков, тем самым, вызывая взаимодействие между ними (рисунок 3) [12].



Под буквой А показано взаимодействие малой молекулы с плоскими поверхностями мишени и вспомогательного белка, а также стабилизация ранее существовавших белок-белковых взаимодействий. Под буквой Б изображено участие в направленной деградации

Рисунок 3 – Действие молекулярных клеев

Бывают совсем благоприятные ситуации, в которых мишень и вспомогательные белки могут образовывать прямые контакты, тогда контактная поверхность AP позволяет связываться с неглубокой поверхностью POI. Примерно таким образом действуют природные препараты, например, циклоспорин **1**, рапамицин **2** (структуры приведены на рисунке 4) при аллостерическом блокировании атипичной mTOR [12].

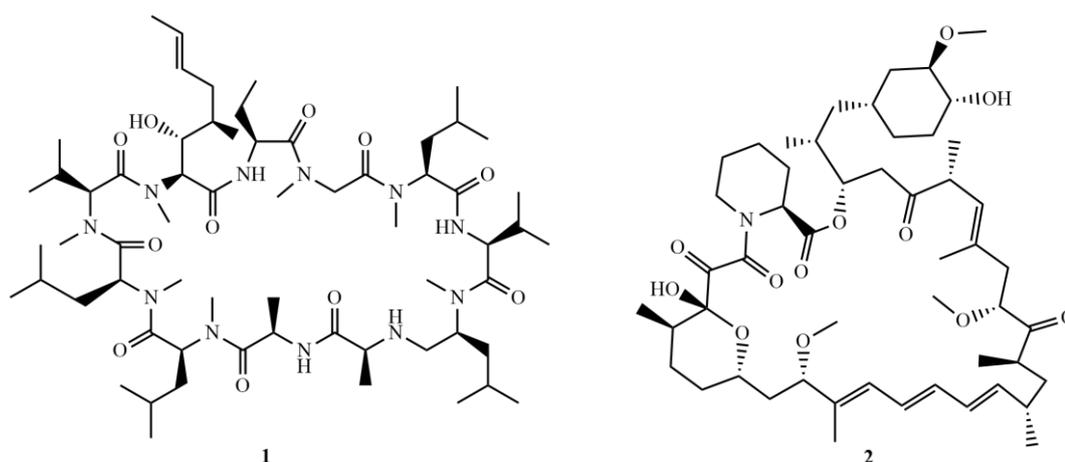


Рисунок 4 – Структуры циклоспорина **1** и рапамицина **2**

Естественно, нельзя оставлять без внимания, что молекулярные клеи всегда нуждаются в наличии вспомогательного белка, это обеспечивает должное воздействие на мишень. Известные AP экспрессируются во всем организме, что дает им широкое применение.

Есть предположения, что если подбирать белки-партнеры с ограниченной экспрессией, то клеи будут оказывать действия только непосредственно в клетках экспрессии, не затрагивая белки других клеток.

Если рассматривать молекулярное взаимодействие, то вспомогательный белок выступает в роли своеобразного реле, уберегая малую молекулу клея от непродуктивных взаимодействий с растворителем. Таким образом осуществляется связывание. Далее вспомогательный белок вступает во взаимодействие с мишенью, что усиливает связывание POI с молекулой клея [13, 15].

Молекулярные клеи могут выступать как стабилизаторы белок-белковых взаимодействий, при условии, что белки изначально могут связываться слабо. Также возможна работа с ферментами, что вызывает перенаправление их для действия на субстраты, такой вариант более специфичен для E3 лигаз при направленной деградации POI [14].

Открытие и развитие концепции молекулярных клеев является перспективным направлением, обеспечивающим отправную точку для разработки низкомолекулярных препаратов-разрушителей, которые нацелены на труднодоступные для классической терапии мишени.

1.3 Комплекс E3 лигазы CRBN и IMiDs

Цереблон (*англ.* CRBN, Cereblon) участвует в образовании комплекса убиквитинлигазы E3 с ДНК-связывающим белком 1 (*англ.* DDB1, DNA damage-binding protein 1), куллином-4А (*англ.* CUL4A, Cullin-4A) и регулятором куллина (*англ.* RBX1, RING-box protein 1). CRBN выполняет роль связывания белков, убиквитинирующих субстраты для протеолиза [16].

Для цереблona известны лиганды, которые носят название иммуномодулирующих имидных препаратов (IMiDs). Они представляют собой класс современных и перспективных иммуномодуляторов, которые применяются для лечения воспалительных, аутоиммунных и неопластических заболеваний. Изначально они были открыты как ангиогенные и костимулирующие Т-клетки препараты, благодаря этому появилась актуальность изучения IMiDs в терапии гематологических злокачественных новообразований, например, множественной миеломы. Эти препараты снижают нейротоксический и седативный эффекты. Все они оказывают примерно схожее действие на Т-клетки, секрецию воспалительных цитокинов и ангиогенез, но несмотря на это, надо отметить, что у всех IMiDs есть свои уникальные особенности и различия по эффективности [17].

Первый представитель IMiDs талидомид **3** впервые появился на рынке в 1950-х годах. Он носил статус небарбитуратного седативного средства, которое не вызывало привыкания, обладало противорвотными свойствами, чаще всего его прописывали беременным женщинам для избавления от утренней тошноты. Это стало причиной огромной трагедии, которая носит название «талидомидовы дети», когда после принятия этого препарата дети рождались с серьезными дефектами в развитии конечностей. Изначально причастность талидомида отрицалась, однако после исследований В. Ленца и В. Макбрайда 1961 года было подтверждено, что причиной являлся именно талидомид и его тератогенные свойства [18]. Это было вызвано тем, что талидомид связывался с ключевым фактором развития конечностей SALL4, тем самым вызывая его деградацию [19].

Несмотря на трагедию, исследования продолжались, так талидомид и его производные нашли широкое применение как IMiDs, они имеют большую популярность и используются для лечения тяжелых заболеваний. На рисунке 5 изображены талидомид **3** и его ближайшие производные леналидомид **4**, помалидомид **5** и более современные IMiDs: авадомид **6**, обладающий более широкой активностью [20], ибердомид **7**, который вызывает более сильную

деградацию IKZF1/3 [21] и CC-885 **8**, проявляющий широкую антипролиферативную активность начиная от рака крови, заканчивая солидными опухолями [22].

Цереблон необходим для активности имидных иммуномодуляторов против клеток множественной миеломы. В ходе множественных исследований была выявлена положительная связь между цереблоном и использованием талидомида [23].

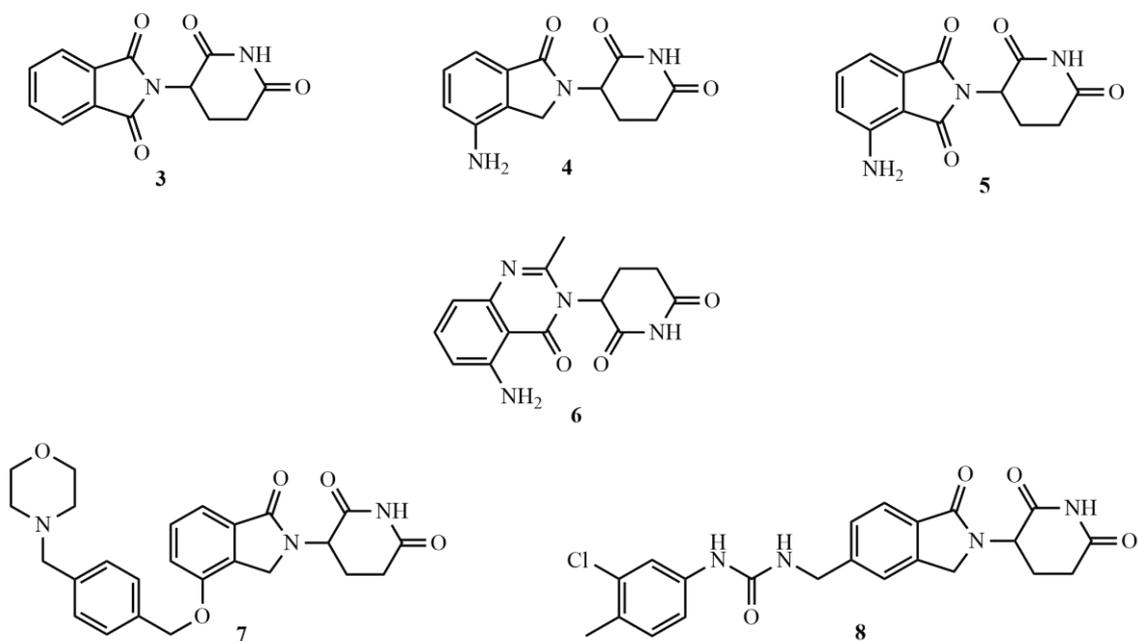


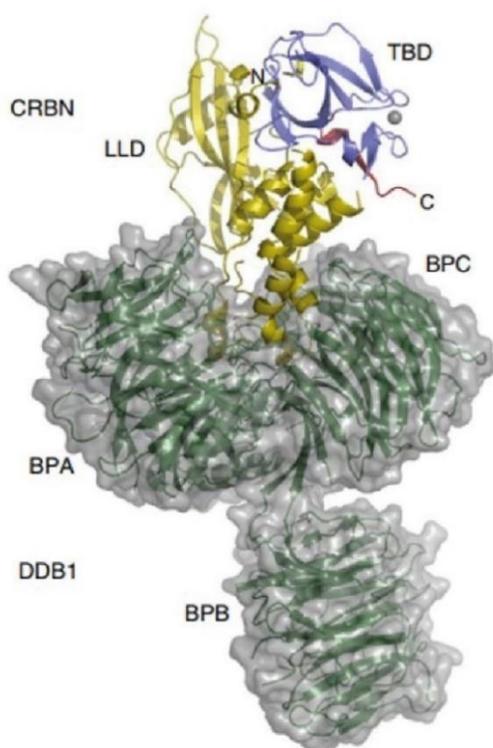
Рисунок 5 – Структуры иммуномодулирующих имидных препаратов на основе талидомида

Также при изучении было выявлено, что экспрессия цереблона непосредственно связана с терапевтическим ответом на терапию талидомидом [24].

1.3.1 Связывание IMiDs с CRBN

IMiDs связываются на С-конце CRBN в гидрофобном кармане, состоящем из трех аминокислотных остатков триптофана W380, W386, W400, мутации в которых могут приводить к возникновению резистентности. Также

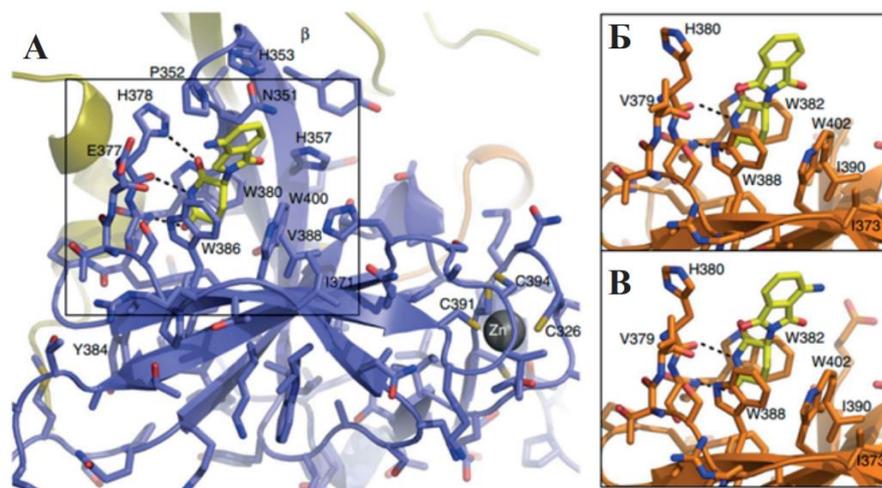
в состав кармана входит остаток фенилаланина F402, как раз в нем и происходит связывание глутарамидного фрагмента талидомида и других представителей IMiDs. Внутри кармана образуются еще три водородные связи с основной и боковой цепью H378, а также с W380. Домен, связывающий талидомид (TBD), является высоконсервативным. На рисунке 6 в общем виде показано расположение структуры препарата в сокристаллической структуре белков комплекса E3 лигазы CRBN [25].



Приведена полная структура связывания препарата с белковым комплексом, синим цветом указан TBD домен цереблona, зеленым DDB1, отмечены C- и N-концы цереблona.

Рисунок 6 – Связывание IMiDs с комплексом лигазы цереблona

Также в рамках исследований была представлена модель связывания талидомида, леналидомида и помалидомида непосредственно в структуре TBD домена цереблona, как у человека, так и у мыши. Результат показан на рисунке 7 [25].



Под буквой А показан TBD человеческого cerebellона синим цветом, леналидомид обозначен желтым цветом. Под буквой Б проиллюстрировано связывание TBD мышшиного cerebellона с талидомидом, а под буквой В помалидомидом.

Рисунок 7 – Связывание IMiDs в структуре TBD человеческого и мышшиного CRBN

TBD находится на ориентированной в сторону от сайта связывания с DDB1 поверхности cerebellона. Состоит домен из шестицепочечного антипараллельного ядра β -листа, а также иона цинка, который координирован четырьмя остатками цистеина, это C323, C326, C391 и C394.

Существуют предположения, что взаимодействие IMiDs с cerebellоном может также служить путем изменения специфичности комплекса убиквитинлигазы с помощью рекрутирования новых партнеров.

А также фталимидный (изоиндолиновый в случае леналидомида) фрагмент находится на поверхности комплекса лигазы, что указывает на доступность этой части молекулы для формирования интерфейса для рекрутирования [25].

1.3.2 Общий механизм действия талидомида и его производных

Механизм действия IMiDs был описан при изучении воздействия на два фактора транскрипции IKZF1 он же Ikaros и IKZF3 он же Aiolos [26]. IMiDs способствуют направлению этих белков на убиквитинилирование с последующей протеосомальной деградацией. IKZF1 и IKZF3 являются

факторами транскрипции дифференцировки В-клеток. Их нокаун в клетках миеломы вызывает цитотоксический эффект. IMiDs имеют очень широкий спектр действий, применимых в клинике, в том числе и высокую активность при множественной миеломе всех трех основных препаратов: талидомида, леналидомида, помалидомида [27, 28]. Механизм действия приведенных препаратов представлен на рисунке 8 [26].

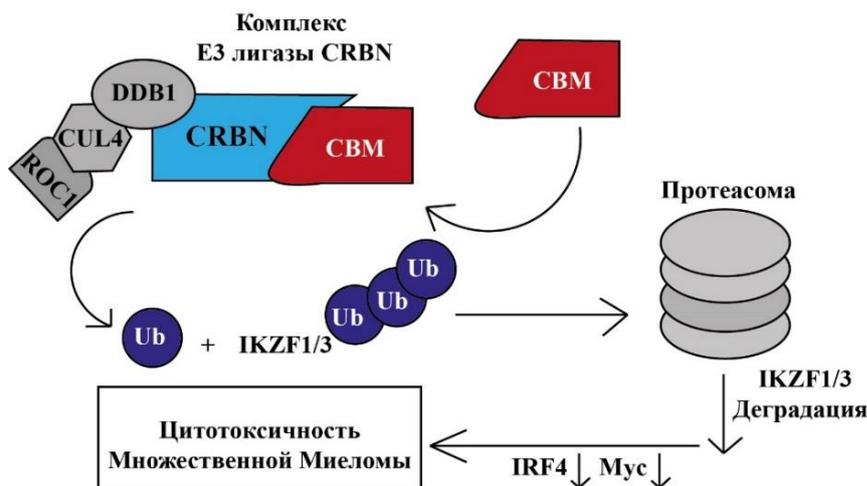


Рисунок 8 – Механизм деградации, вызываемой CBMs

Исходя из проведенных исследований появилась целесообразность в обозначении талидомидных препаратов CBMs – «связывающие цереброн молекулы».

1.4 RNF126 как перспективная биомишень

RNF126 представляет собой убиквитинлигазу E3 RING типа. Важным моментом является то, что лигазы RING типа опосредуют перенос E2 связанного убиквитина прямым способом, то есть без образования тиоэфирной связи [29]. Главными функциями RNF126 является участие в пролиферации клеток и восстановление повреждений ДНК [30].

Для RNF126 как E3 лигазы идентифицировано 9 субстратов. Так, она способствует пролиферации клеток рака молочной железы нацеливанием на p21 [31]. Также было обнаружено, что RNF126 нацеливается на пируватдегидрогеназы (PDKs), что способствует ингибированию рака молочной железы [32], может моноубиквитинилировать индуцированную цитидиндезаминазу (AID) [33], также она может связываться с E2F1, что приводит к индуцированию транскрипции BRCA1 и CHK1, следствием чего является репарация ДНК [34]. RNF126 взаимодействует с двумя другими важными E3 лигазами RNF8 и RNF168 [35]. Надо заметить, что RNF126 способствует убиквитинилированию эндосомальных рецепторов, включая EGFR [36], и рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF-IR) [37]. Все перечисленные взаимодействия регулируются сигнальным каскадом MAPK/ERK, как показано на рисунке 9.

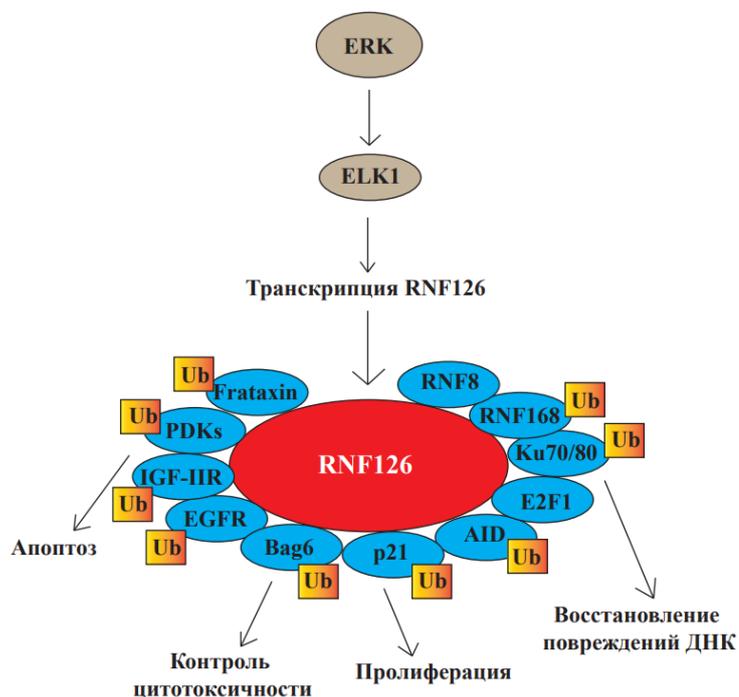


Рисунок 9 – Каскады, зависимые от RNF126

Исходя из рассмотренного выше, можно заметить, что RNF126 является важной E3 лигазой, регулирующей фундаментальные процессы, а ее

дисфункция играет роль в развитии рака. Все это несомненно делает ее привлекательной биомишенью.

В 2023 году профессором Калифорнийского университета Д. Номурой и его коллегами была предпринята попытка рационального дизайна ковалентного рекрутера E3-лигаз. Так, был идентифицирован ковалентно-реактивный молекулярный фрагмент фенилфумаровой кислоты **9** (рисунок 10) как активной боеголовки, которая способна превращать уже нацеленные на белок лиганды в молекулярные деструкторы соответствующих мишеней, в том числе и RNF126 [38].

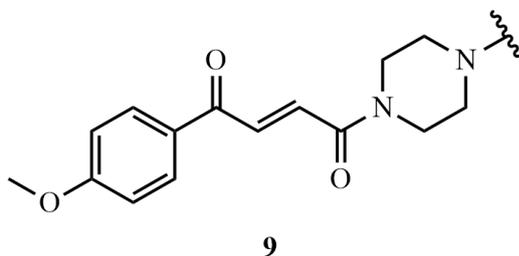


Рисунок 10 – Фрагмент фенилфумаровой кислоты

В ходе исследования было установлено, что молекулярный фрагмент метоксифенилфумаровой кислоты образует взаимодействие с Cys32 в структуре RNF126, что указывает на возможность разработки ковалентных рекрутеров с использованием данной боеголовки.

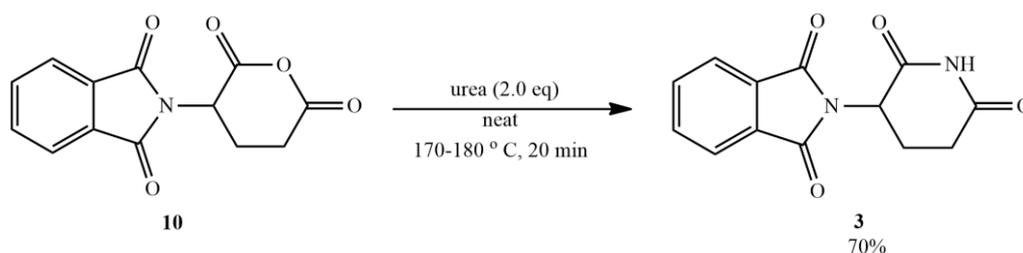
1.5 Подходы к синтезу талидомида и его производных

1.5.1 Синтез талидомида

В контексте цели данной работы талидомид выполняет сразу две роли. Он является основным каркасом молекулярного клея, в то же время представляет собой связующее звено с CRBN, поэтому целесообразно начать рассмотрение методик именно с него. Впервые талидомид был синтезирован

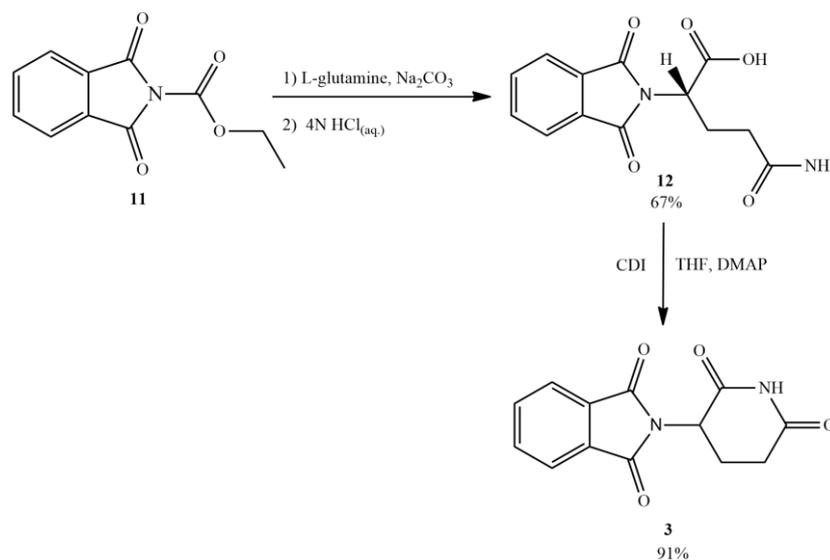
в 1954 году в Германии фармацевтической компанией Chemie Grunenthal. Согласно методике, изначально получали *N*-фталоилглутаминовой кислоты, которую затем нагревали с мочевиной (схема 1) [39].

Схема 1



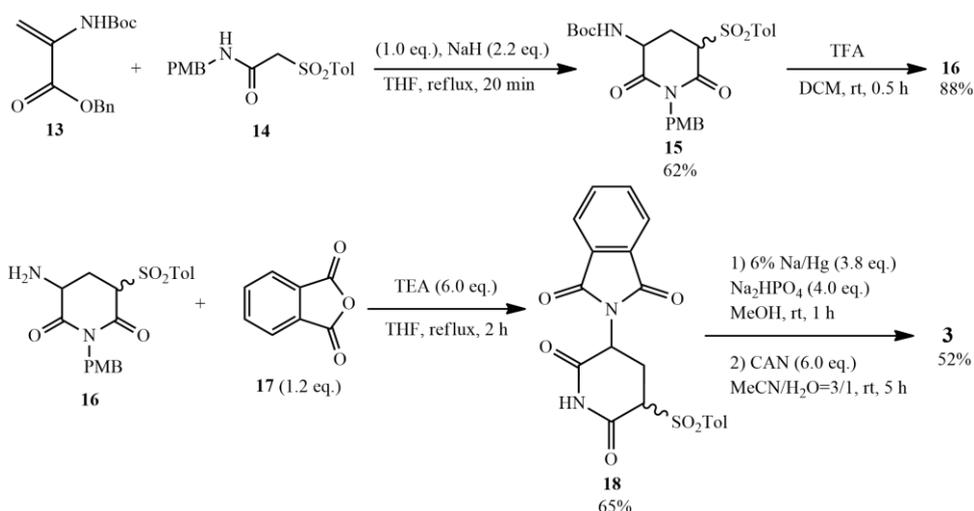
В рамках поиска более прямого двухстадийного синтеза талидомида было предложено использование *L*-глутамин вместо глутаминовой кислоты [40]. Изначально производится получение *N*-фталоил-*L*-глутамин **12** из глутамин с дальнейшим добавлением *N*-карбоэтоксифталимида, приводящего к хирально чистому продукту. Далее используется CDI в THF в присутствии DMAP (схема 2).

Схема 2

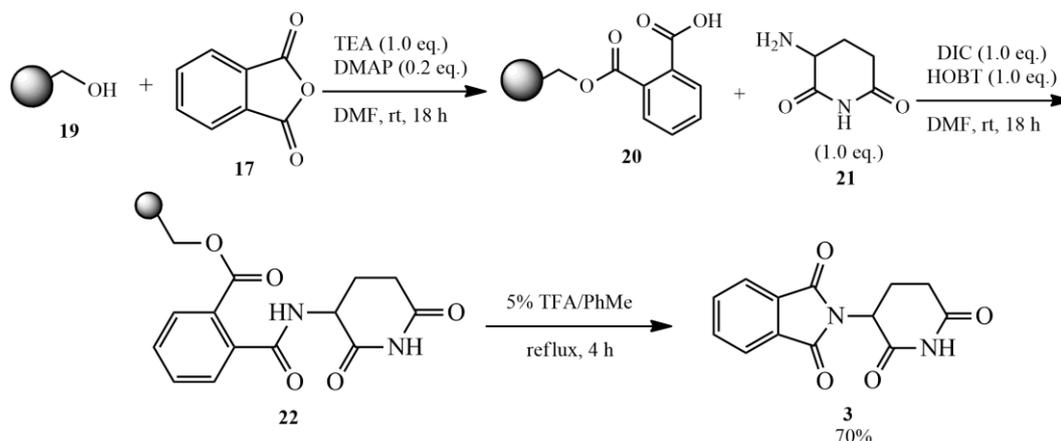


Коллеги из Тайваня сообщали о синтетической стратегии получения талидомида на основе [3+3]-циклоприсоединения толуолсульфонилацетамида **14** к ненасыщенным сложным эфирам. Получение завершалось десульфанированием и снятием защитной группы. Этот метод удобен тем, что благодаря ему можно избежать высоких температур проведения реакции, как было в классическом варианте. На схеме 3 показан процесс синтеза. Первая стадия является реакцией [3+3]-циклоприсоединения ненасыщенного эфира **13** и *N*-*p*-метоксibenзил- α -сульфонилацетамида **14** (схема 3) [41].

Схема 3



Также существуют сообщения о весьма успешном твердофазном синтезе талидомида. Этот подход позволяет в дальнейших исследованиях получать аналоги талидомида и создавать комбинаторные библиотеки [42]. Талидомид **3** получался путем трехстадийного синтеза. Сначала гидроксиметилполистирол **19** взаимодействует с фталевым ангидридом **17** с образованием смоловой кислоты **20**. Кислота связывается с аминоглутаримидом **21** в присутствии DIC и НОВТ, в результате чего получается амид **22**. Далее на полученное соединение действуют TFA в PhMe, из чего следует образование талидомида **3** с выходом 70%. Описанные стадии изображены на схеме 4.



Примером так называемого легкого синтеза талидомида может служить метод, который содержит всего две стадии, обеспечивает большие выходы и гораздо менее затратен, что указывает на его превосходство [43].

1.5.2 Асимметричный синтез талидомида

Когда была открыта тератогенность талидомида, встал вопрос о стереоспецифической природе этого свойства, так как талидомид имеет асимметричный центр во фталимидном кольце (рисунок 11).

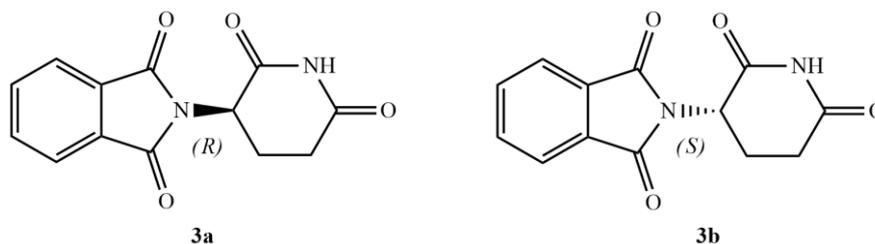


Рисунок 11 – Энантиомеры талидомида

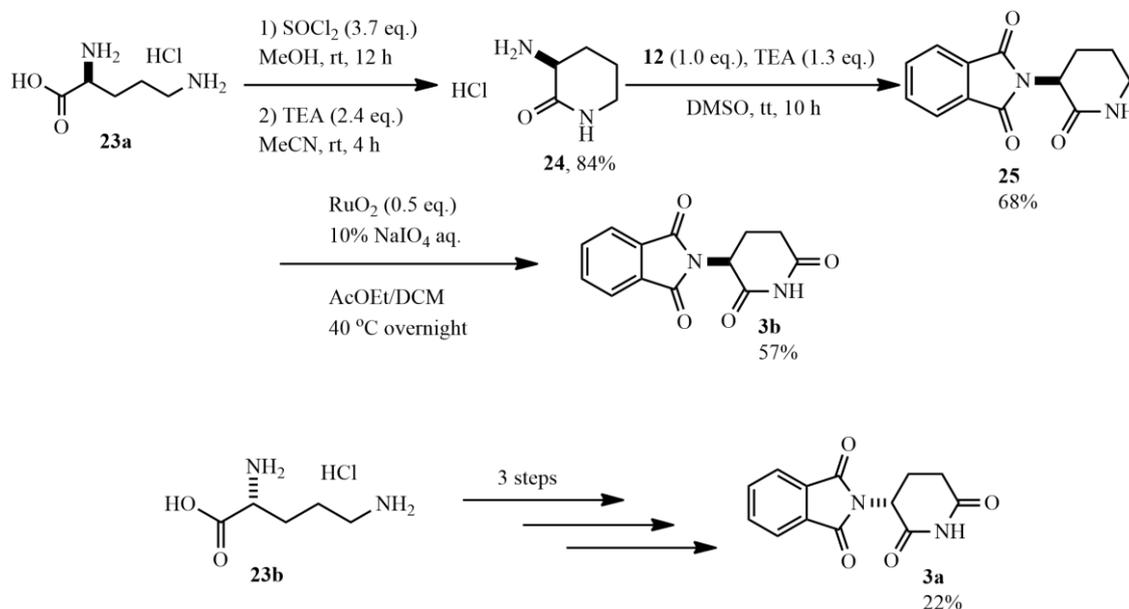
Так как раньше он поставлялся на рынки в виде рацематов, то было выдвинуто предположение, что причина проблемы - (S)-изомер **3b**. Если бы продавался только (R)-изомер **3a**, то страшной трагедии можно было бы избежать. Попытки исследований свелись к тому, что отдельное выделение

какого-то изомера из рацемической смеси довольно трудно [44]. Поэтому стало необходимым разработать асимметричные подходы к синтезу талидомида для достижения каждого изомера отдельно.

Довольно интересным методом получения энантиомерно чистых (*S*)- и (*R*)-изомеров (**3a**, **3b**) является синтез талидомида из ортинаина (**23a**, **23b**).

Процесс включает в себя три стадии, используется окисление $\text{RuO}_2/\text{NaIO}_4$ без рацемизации [45]. Синтез представлен на схеме 5.

Схема 5

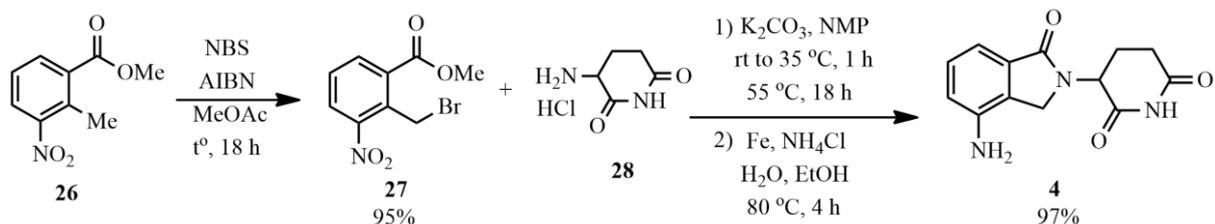


Большим плюсом метода является отсутствие необходимости очистки на колоночной хроматографии.

1.5.3 Синтетические стратегии получения производных талидомида

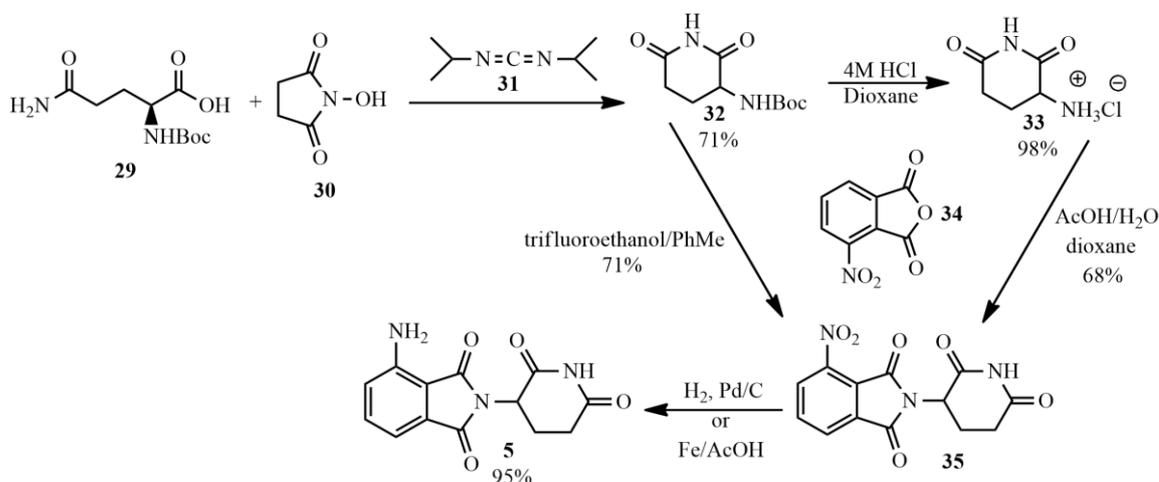
В 2015 году был разработан новый экологичный синтез леналидомида **4**, в котором использовался безметалловый катализатор платиновой группы (схема 6). Так, исходный 2-метил-3-нитробензоат **26**, можно бромировать в метилацетате без опасности образования больших количеств побочных ядовитых продуктов [46].

Схема 6



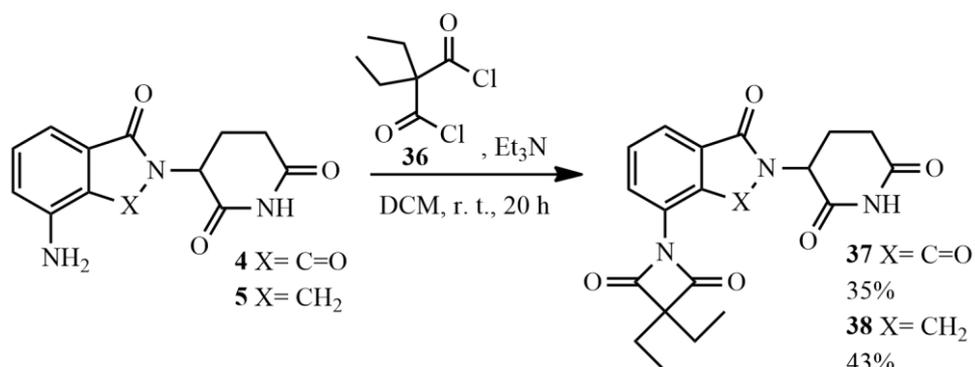
В 2022 году был разработан непрерывный синтез помалидомида, исходным соединением в котором является бокированный *L*-глутамин. Подход демонстрирует применение проточной химии в получении IMiDs, что обеспечивает безопасность, воспроизводимость и эффективность синтеза [47]. Сам процесс состоит из 3-х, либо 4-х стадий (схема 7).

Схема 7



В 2023 году была предпринята попытка разработки и синтеза производных талидомида как наномолярных ингибиторов эластазы нейтрофилов. В рамках работы был разработан рациональный подход к дизайну и синтезу эффективных ингибиторов, который заключался в получении леналидомида 4 или помалидомида 5 из фталевых ангидридов с последующей реакцией с диэтилмалонилдихлоридом 36 (схема 8) [48].

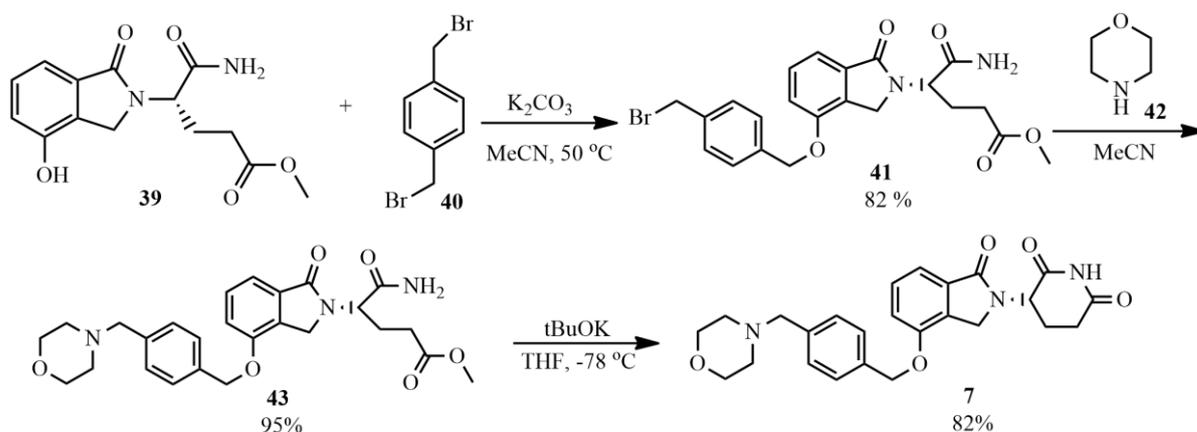
Схема 8



В исследовании 2017 года был предложен синтез известного представителя IMiDs ибердомида (CC-220) **7**. Его получили в три стадии из (*S*)-3-(4-гидрокси-1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона.

Субстрат алкилировали 1,4-бис(бромметил)бензолом **40** с получением соответствующего бромида **41**, который далее взаимодействовал с морфолином **42**. Полученное соединение **43** реагировало с трет-бутоксидом калия, что и дало продукт CC-220 **7**, выход которого составил 82%, чистота по ВЭЖХ 98.5% [21]. Синтез приведен на схеме 9.

Схема 9

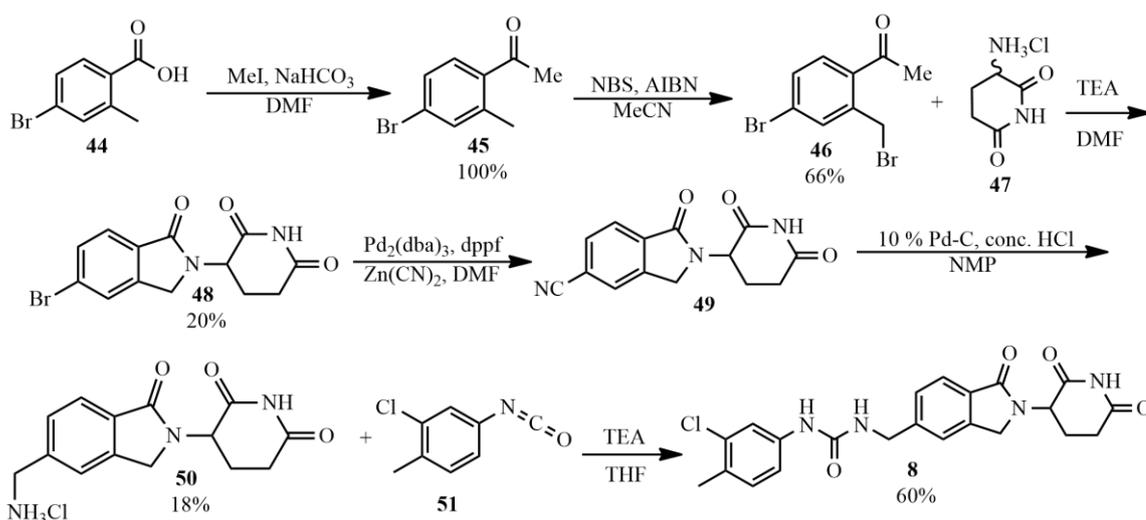


В рамках разработки селективных деградеров GSPT1, который сейчас изучается в качестве перспективной биомишени для лечения острого

миелоидного лейкоза, были разработаны ингибиторы, первым из которых является СС-885 **8**, синтез которого включает шесть стадий.

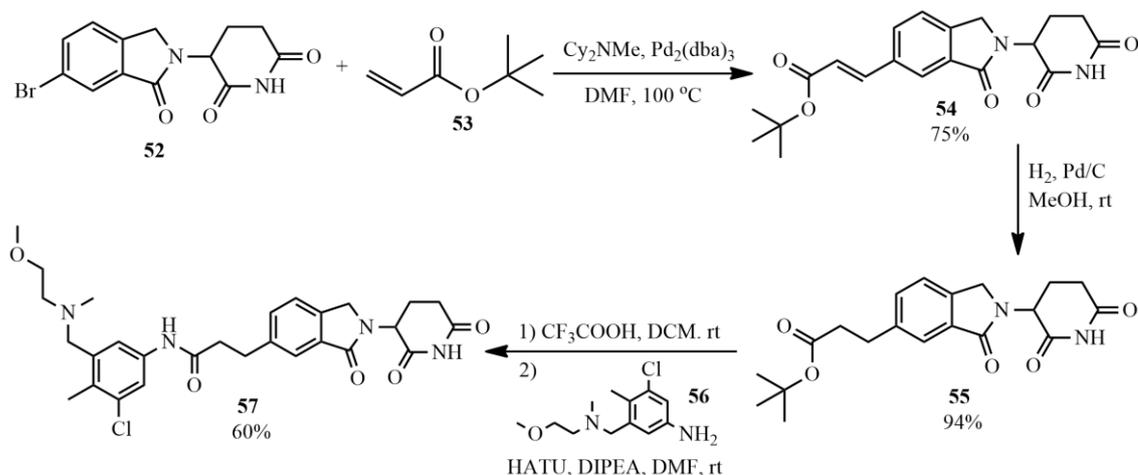
Исходным соединением является 4-бром-2-метилбензойная кислота **44**. Изначально был получен ее метиловый эфир **45**, который далее бромировался с NBS. Далее был получен, непосредственно, имид **48**, который вводили в реакцию нуклеофильного замещения на цианогруппу в пятом положении. На последних двух стадиях был получен гидрохлорид имеющегося соединения **50**, мочевиный фрагмент из изоцианата 4-метил-3-хлорфенила **51** [22]. Превращения приведены на схеме 10.

Схема 10



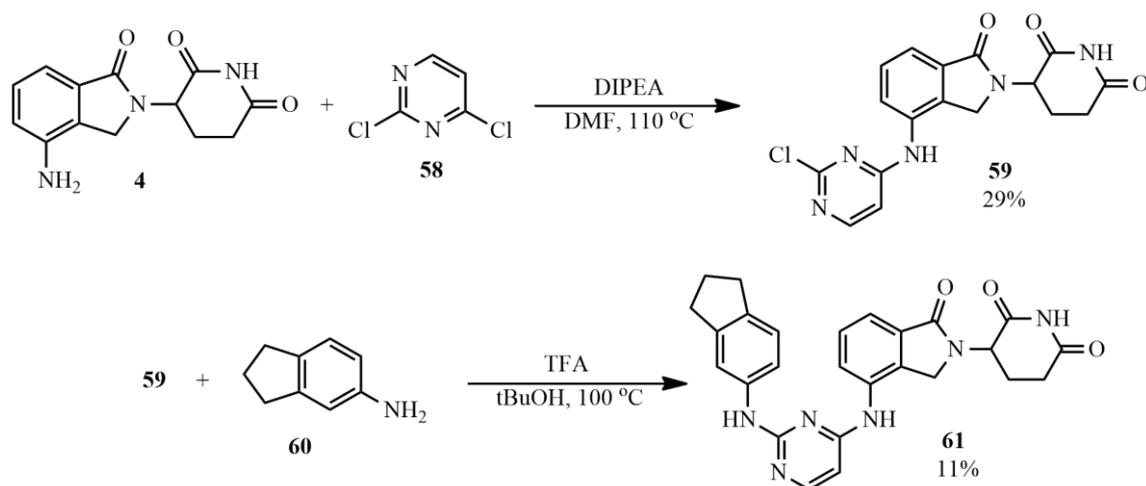
Помимо СС-885 **8**, разрабатываются новые структурно родственные рекрутеры цереблona для деградации GSPT1. Подход к синтезу таких соединений включает четыре стадии, и представлен на схеме 11 на примере соединения, демонстрирующего наибольшую активность **57** [49].

Схема 11



Еще одним примером исследований, направленных на разработку и синтез селективных деградеров фермента GSPT1 можно считать исследование 2020 года. Здесь изначально была предпринята попытка идентифицировать новые низкомолекулярные модуляторы CRBN, она заключалась в использовании целенаправленной комбинаторной библиотеки. В этом подходе объединяли глутаримидный фармакофор с гетероциклическим scaффолдом, который можно было подвергать модификациям. Методами количественной протеомики соединений было показано индуцирование селективной деградации фактора терминации трансляции GPST1 [50]. Подход к получению показан на схеме 12 на примере одного из соединений-хитов. Изначально из леналидомида **4** было получено промежуточное соединение **59**, затем при добавлении 2,3-дигидро-1*H*-инден-5-амин **60** был синтезирован продукт **61**.

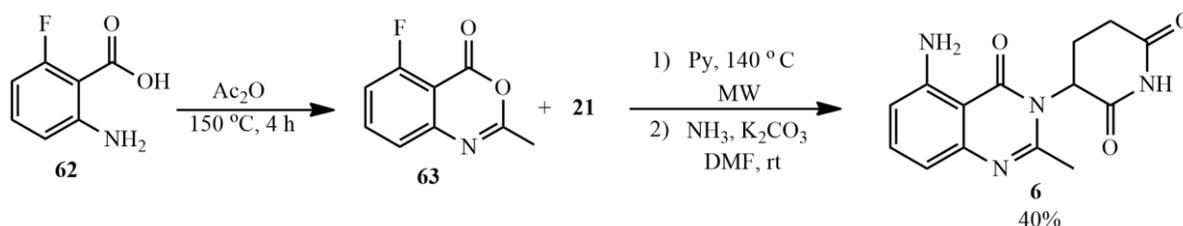
Схема 12



Известным представителем IMiDs является также и препарат авадомид, имеющий кодовый индекс СС-122 **6**. По своей структуре он больше схож с леналидомидом **4**, при этом он имеет более высокую активность, и вызывает эффективную деградацию IKZF1/3. Структурным отличием СС-122 является наличие хиназолинона [20].

Сейчас уже известны и некоторые производные СС-122, несмотря на то что сам препарат еще находится на второй фазе клинических испытаний. Получить эти соединения можно в три стадии из 2-амино-6-фторбензойной кислоты **62** [51]. Синтез приведен на схеме 13.

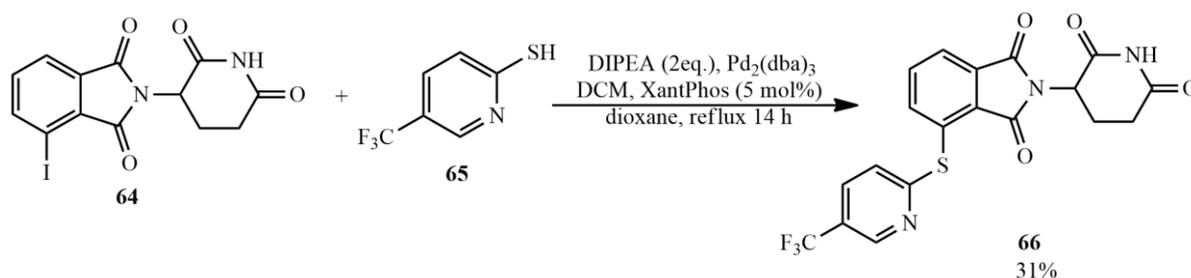
Схема 13



В 2021 году М. Дж. Наттом и коллегами проводился поиск селективных лигандов для лечения гепатоцеллюлярной карциномы печени. Соединения

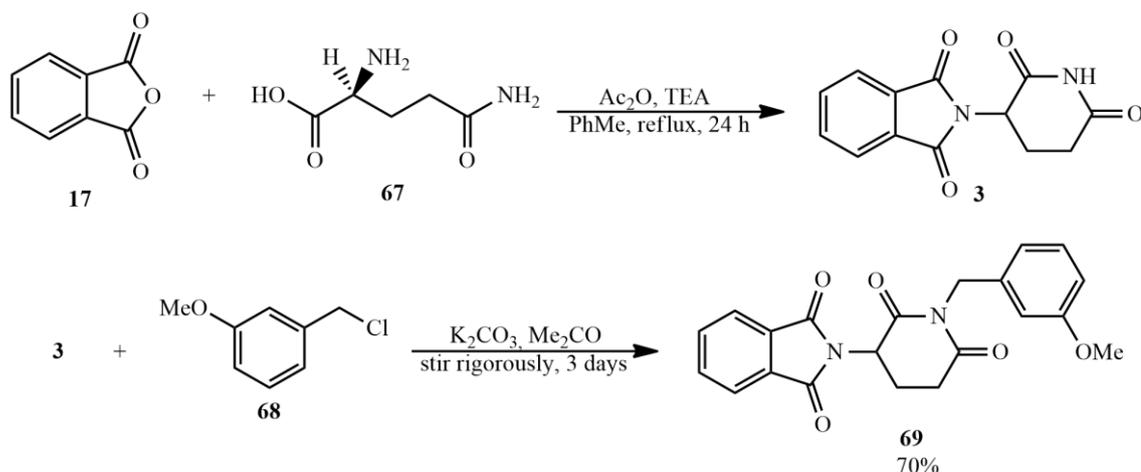
строились на базе талидомида. Разрабатываемые структуры были призваны продемонстрировать повышенную избирательность в цитотоксическом действии. В итоге была получена серия производных талидомида, преимущественно имеющих тиосодержащие заместители в 6 положении. Подход интересен тем, что был представлен синтез довольно редко встречающихся в литературе производных [52]. Как показано на схеме 14, исходным соединением являлся 6-йодталидомид **64**, который вступал в реакцию нуклеофильного замещения с замещенными в *para*-положении тиоэфирами или с тиоэпиридинами.

Схема 14



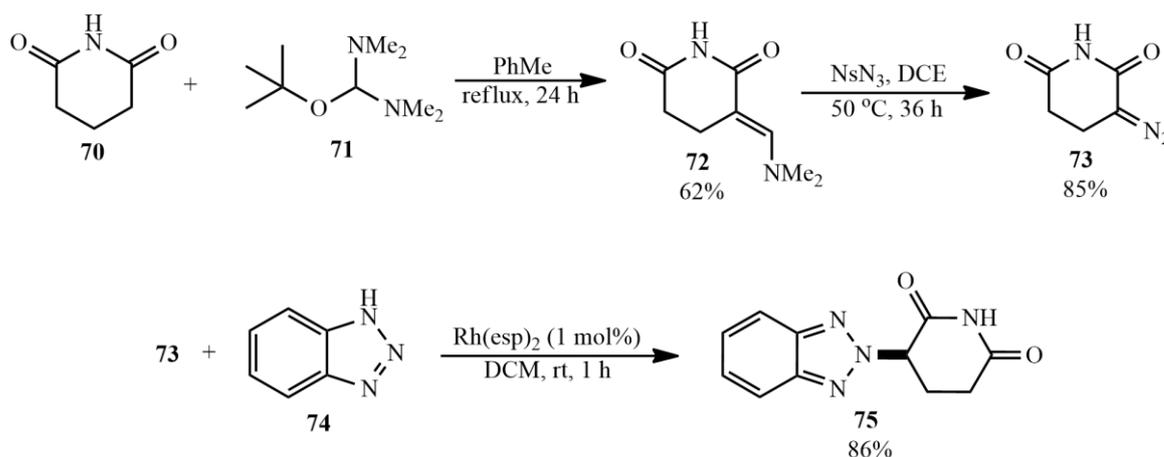
Следующая работа тайваньских коллег 2018 года была направлена на получение производных талидомида, обладающих активностью против псориаза. Синтез соединения, обладающего наибольшей активностью приведен на схеме 15. Талидомид **3** был получен из фталевого ангидрида **17** и *L*-аминоглутаминовой кислоты **67**, с дальнейшим ацилированием бензилхлоридом **68**. Синтез содержал всего две стадии, что указывает на его удобство, выход продукта **69** при этом составил 70% [53].

Схема 15



В 2022 году было проведено исследование, в ходе которого был предложен биоизостерный аналог талидомида бензотриазолоталидомид **75**. Экспериментальные данные показали, что соединение обладает почти в полтора раза более высокой активностью, чем талидомид **3**. **75** был получен в три стадии с выходом 86%, что показано на схеме 16 [54].

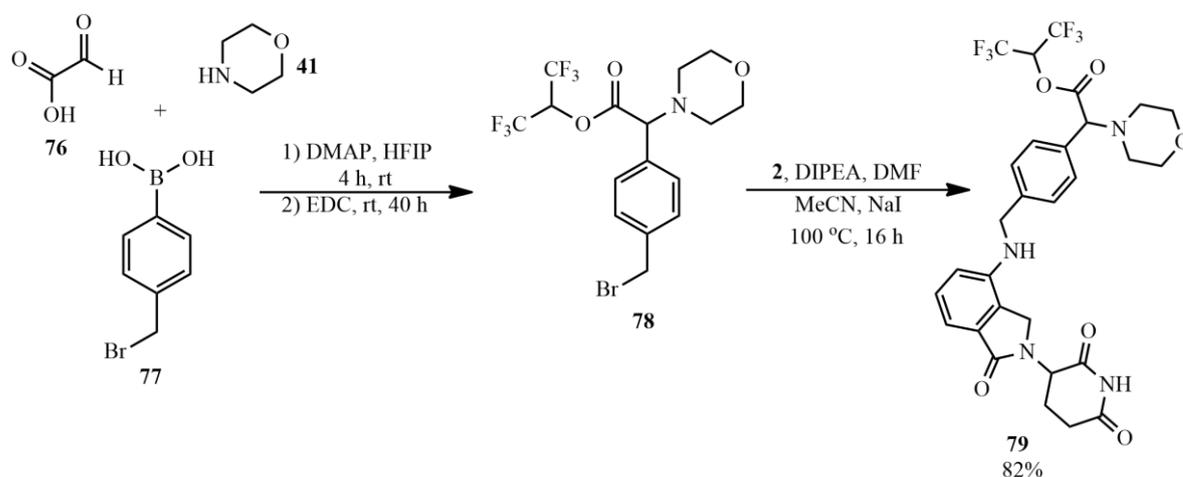
Схема 16



В исследовании 2023 года, направленном на открытие трехразветвленных лигандов цереблona для дальнейшей разработки нового вида молекулярных клеев, нацеленных на BRD4 был применен синтетический

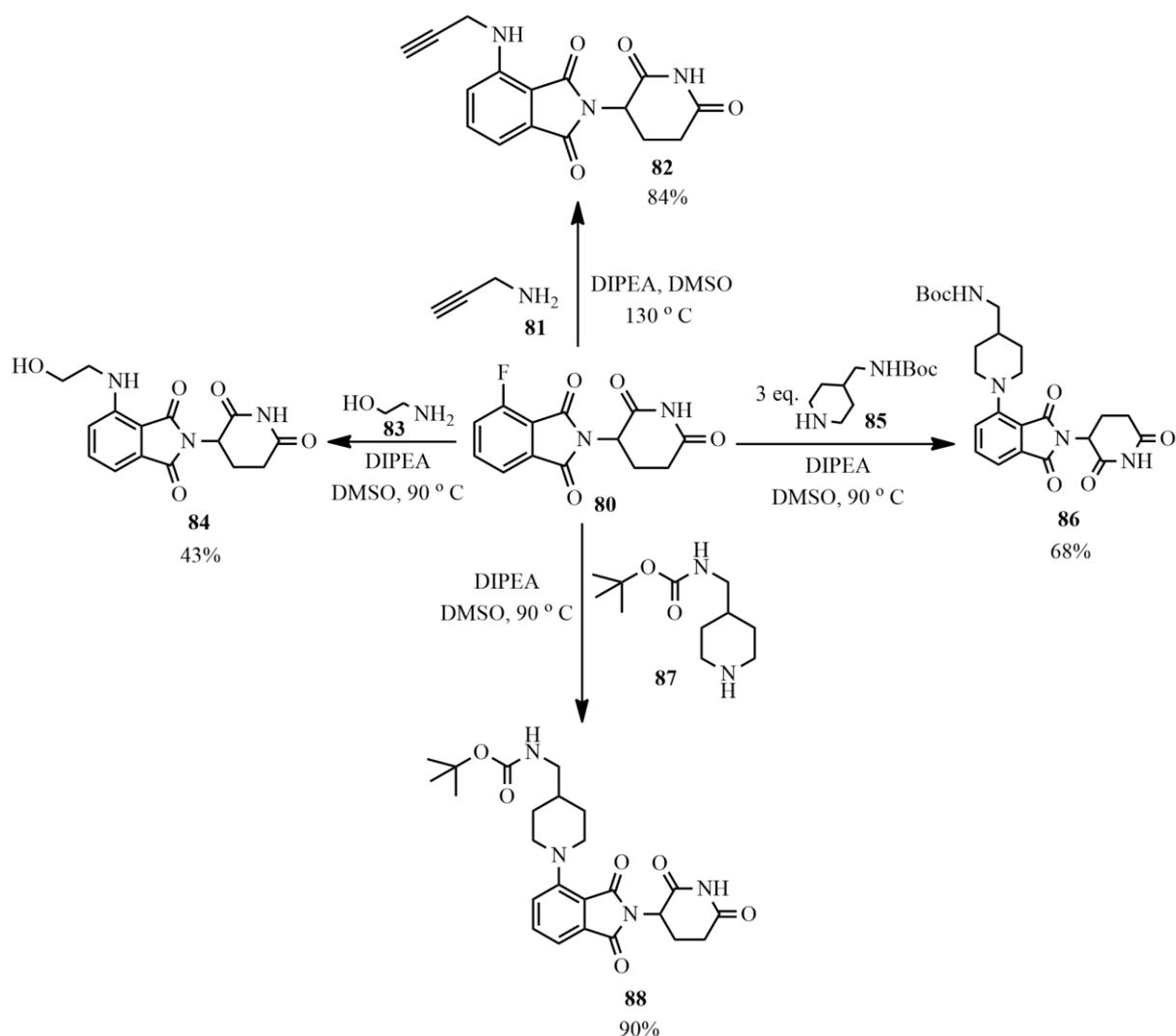
подход многокомпонентных реакций, являющийся весьма привлекательным при получении биологически активных соединений. Здесь используется реакция Петасиса броно-Манниха, которая позволила получить эфир **78** как универсальный строительный блок для дальнейшего получения молекулярного клея. Синтез показан на схеме 17 [55].

Схема 17



Довольно важную роль в современных исследованиях играет разработка препаратов на основе производных помалидомида, основными стратегиями получения таких соединений является алкилирование алкилгалогенидами, либо ацилирование аминогруппы, а также реакции нуклеофильного замещения по S_NAr механизму.

Обращаясь к весьма обширному труду Д. Броунси и его коллег 2021 года, стоит обговорить несколько примеров получения таких производных. Фторталидомид **80** является популярным исходным соединением для получения синтетически полезных производных талидомида. Авторами были описаны несколько примеров нуклеофильного замещения по S_NAr механизму исходя из фторталидомида **80**, пропаргиламина **81**, а также других аминов. Выходы продуктов составляли до 90% [56]. На схеме 18 приведены примеры таких подходов.



Не представляется возможным не отметить, что число методик синтеза талидомида и его производных весьма обширно. В настоящее время активно проводятся исследования по оптимизации уже существующих, а также разработке новых стратегий синтеза. В данном литературном обзоре были рассмотрены наиболее популярные подходы синтеза как самого талидомида, так и различных его производных, выступающих в роли перспективных деградеров.

2 Результаты и их обсуждение

Как уже отмечалось ранее в этой работе, RNF126 представляет собой весьма привлекательную биомишень, так как эта E3-лигаза принимает активное участие во многих важнейших сигнальных каскадах (PI3K/AKT, MAPK/ERK и т. д.) и регулирует регенерацию ДНК, ее дисфункция приводит к неизбежному возникновению онкологических заболеваний [57].

Исследовательская группа Д. Номуры в своей оригинальной работе с помощью протеомного анализа (isoTOP-ABPP) идентифицировала в структуре RNF126 наличие ковалентно-реактивной аминокислоты Cys32, что обеспечило потенциал разработки ковалентных рекрутеров для E3-лигаз. В качестве боеголовки для обеспечения связывания было презентовано производное 4-метоксифенилфумаровой кислоты **9**. Этот молекулярный фрагмент выгоден тем, что может реализовывать взаимодействие с Cys32 при помощи реакции сопряженного присоединения по Михаэлю как с первым, так и со вторым атомом двойной связи. Благодаря этому использование такого структурного мотива имеет кардинальный потенциал при разработке PROTAC и молекулярных клеев, что уже было доказано на примере успешно разработанных деградеров для убиквитинилирования BRD4, BCR-ABL и LRRK2 [38].

Наше исследование было направлено на получение библиотеки ковалентных рекрутеров E3 лигазы RNF126 в рамках разработки системы потенциальных деградеров CRBN-RNF126, включающих две реактивные боеголовки – талидомид в случае CRBN и 4-метоксифенилфумаровую кислоту в случае RNF126. Также работа включила в себя анализ связывания полученных соединений с помощью методов компьютерного моделирования и проверку биологической активности с помощью *in vitro* тестов (рисунок 12).

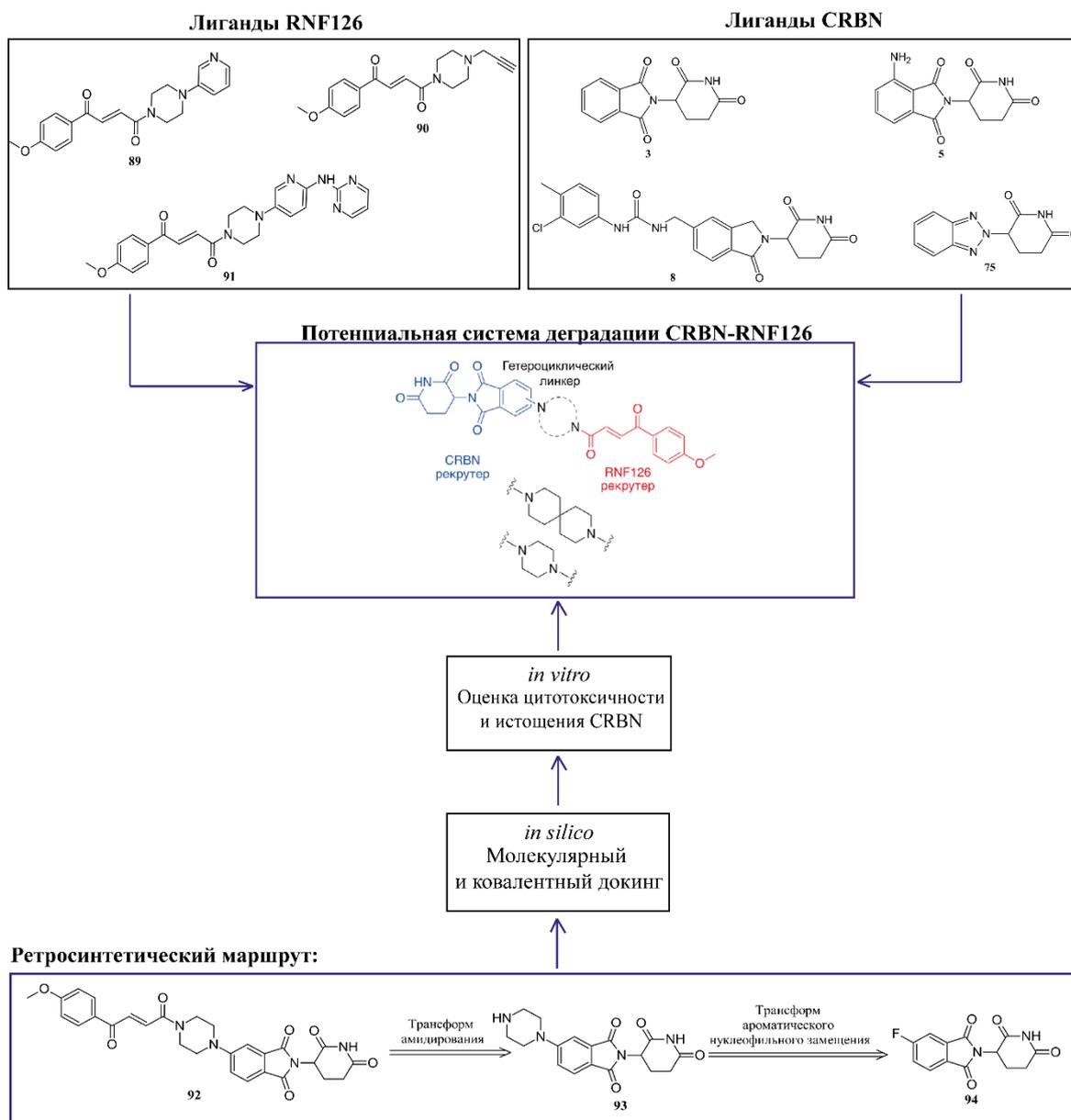


Рисунок 12 – Дизайн исследования

2.1 Синтез исследуемых соединений

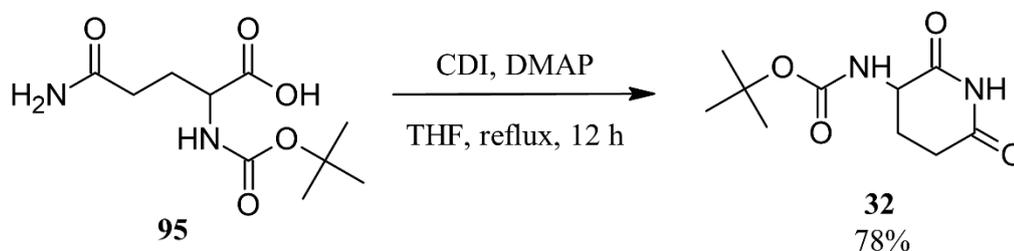
В данном разделе приводится полное описание синтетических процедур, направленных на получение соединений библиотеки ковалентных рекрутеров CRBN-RNF126 и соответствующих соединений отрицательного контроля для дальнейших *in vitro* исследований.

В работе группы Д. Номуры была предложена структура фумаровой боеголовки с пиперазиновым линкером. В нашей работе дополнительно были

получены новые производные, содержащие в своей структуре диазаспирундекановый фрагмент.

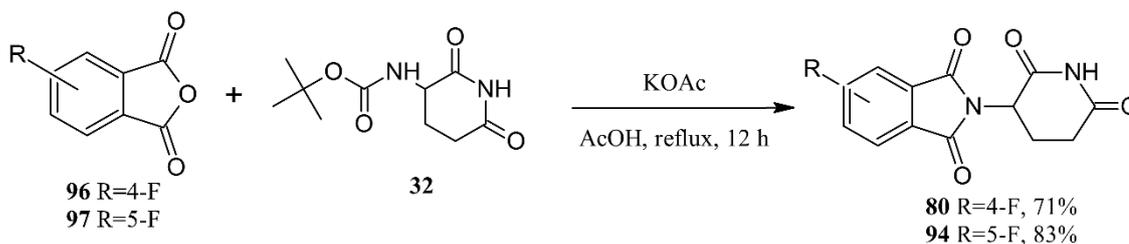
В качестве исходных молекул использовались 4-фторталидомид и изомерный ему 5-фторталидомид. Изначально реакцией внутримолекулярного амидирования из коммерческого Вос-глутамина **95** под действием CDI в THF в течение 12 часов кипячения был получен 3-(Вос-амино)глутаримид **32**, являющийся субстратом для **80** и **94**, катализатором реакции служил DMAP, выход составил 72% (схема 19).

Схема 19



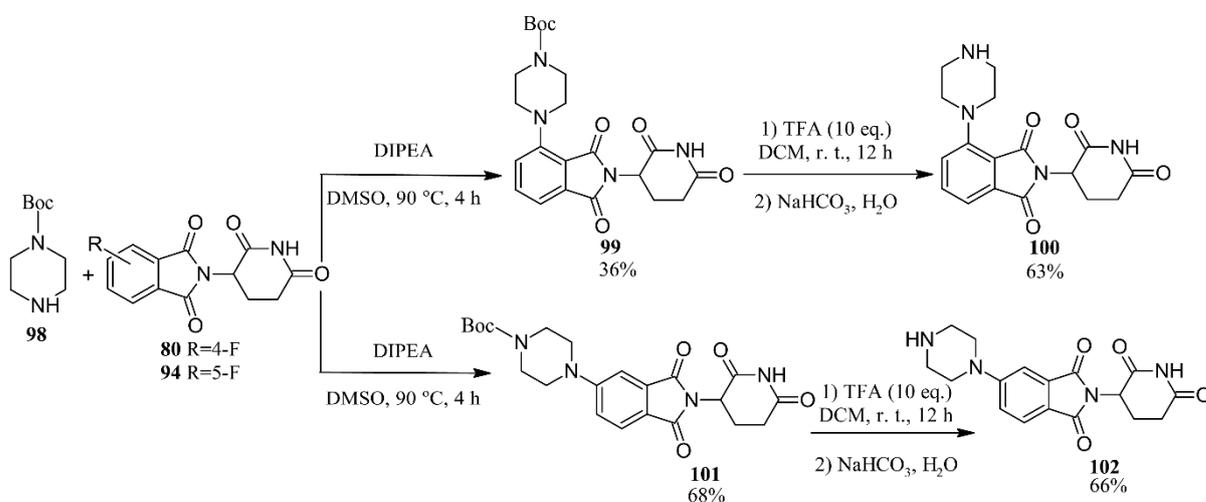
Фторталидомиды были непосредственно получены взаимодействием глутаримида (**32**) с соответствующим фторозамещенным фталевым ангидридом в присутствии KOAc и AcOH в течение 12 часов, при этом происходило удаление трет-бутоксикарбонильной защитной группы в кислой среде. 4-фторталидомид **80** был получен с выходом 71%, а 5-фторталидомид **94** 83% соответственно (схема 20).

Схема 20

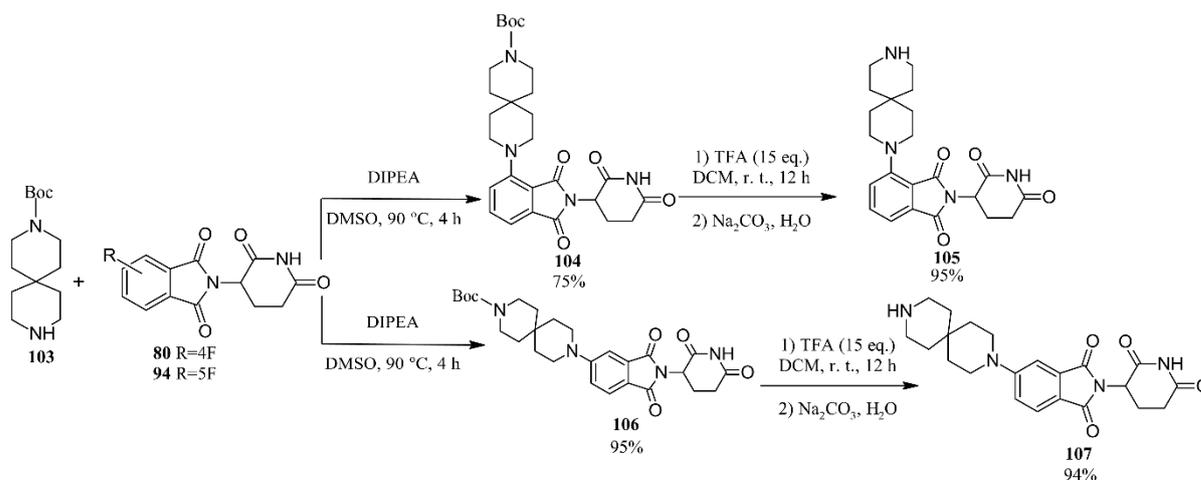


Далее полученные 4- и 5-фторталидомиды были введены в реакцию нуклеофильного замещения с Вос-пиперазином **98** в DMSO, в качестве основания использовали DIPEA. Спустя 4 часа при 90 С° были синтезированы соответствующие пиперазинозамещенные производные с выходами 36% и 68%. Выделение продуктов содержало в себе фильтрацию, экстракцию и очищение сырого вещества на сухой колонке под вакуумом. Далее проводилось удаление защитной группы амина, в нашем случае это третбутоксикарбонил (Вос). Процедура проходила по классической методике дебокирования [58]. К соединениям (**99**, **101**) добавляли TFA в DCM и оставляли на ночь при комнатной температуре, затем экстрагировали DCM и упаривали. Выходы составили 63% и 66% соответственно (схема 21).

Схема 21

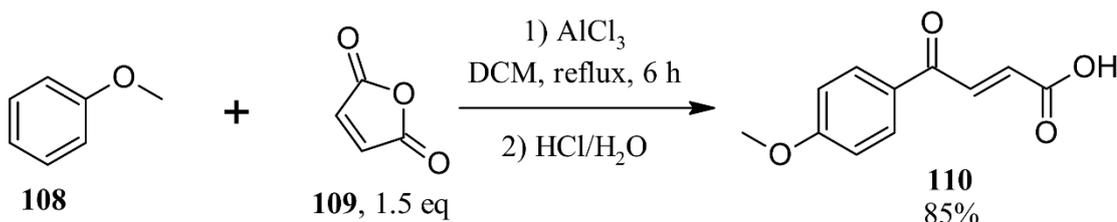


По аналогичной методике были синтезированы продукты реакции замещения фторталидомидов с трет-бутил-3,9-дiazаспиро[5,5]ундекан-3-карбоксилатом **103**, выходы продуктов составили 75% и 95% соответственно. Стоит заметить, что в случае спиропроизводных выходы и чистота соединений значительно выше, что весьма облегчило выделение, дополнительной очистки не проводилось. Процедура удаления защитной группы также аналогична (схема 22).



На данном этапе был завершен синтез боеголовок к CRBN, далее мы приступили к получению реактивных групп к RNF126 – карбоновых кислот для положительного и отрицательного контроля.

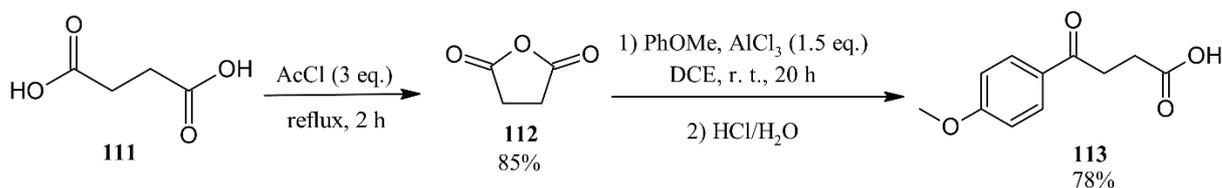
4-метоксифенилфумаровая кислота **110** была получена по классической реакции Фриделя-Крафтса – в нашем случае это ацилирование анизола **108** малеиновым ангидридом **109**. Превращение проводили в DCM, в качестве катализатора использовалась кислота Льюиса AlCl_3 . Реакционную смесь кипятили 6 часов, продукт фильтровали и пересаждали в $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, выход 85% (схема 23).



Одним из исходных соединений для отрицательного контроля является 4-(4-метоксифенил)-4-оксобутановая кислота **113**. В ее структуре отсутствует

двойная связь, в следствие чего ковалентное связывание с Cys32 в сайте RNF126 не может быть реализовано. На первой стадии синтеза был получен янтарный ангидрид **112** из коммерческой янтарной кислоты **111** и ацетилхлорида в результате двух часов кипячения (85%). Далее кислота была получена аналогично по реакции Фриделя-Крафтса из янтарного ангидрида **112** и анизола в DCE с дальнейшей фильтрацией. Выход составил 78% (схема 24).

Схема 24



Все целевые молекулы, а также соединения отрицательного контроля (рисунок 12) были получены по единой методике. Ключевой стадией в синтезе таких производных является реакция образования амида карбоновой кислоты при использовании специального активирующего реагента для карбоксильной группы. В роли аминов в этом превращении выступают полученные нами дебокированные производные (**100**, **102**, **105**, **107**). Важно заметить, что обязательным условием для успешного результата превращения является наличие инертной атмосферы. Наши более ранние попытки осуществить синтез без специализированных условий оказались неудачны. Атмосферу аргона в реакционной колбе создавали благодаря линии Шленка. В качестве растворителя использовали безводный DMF.

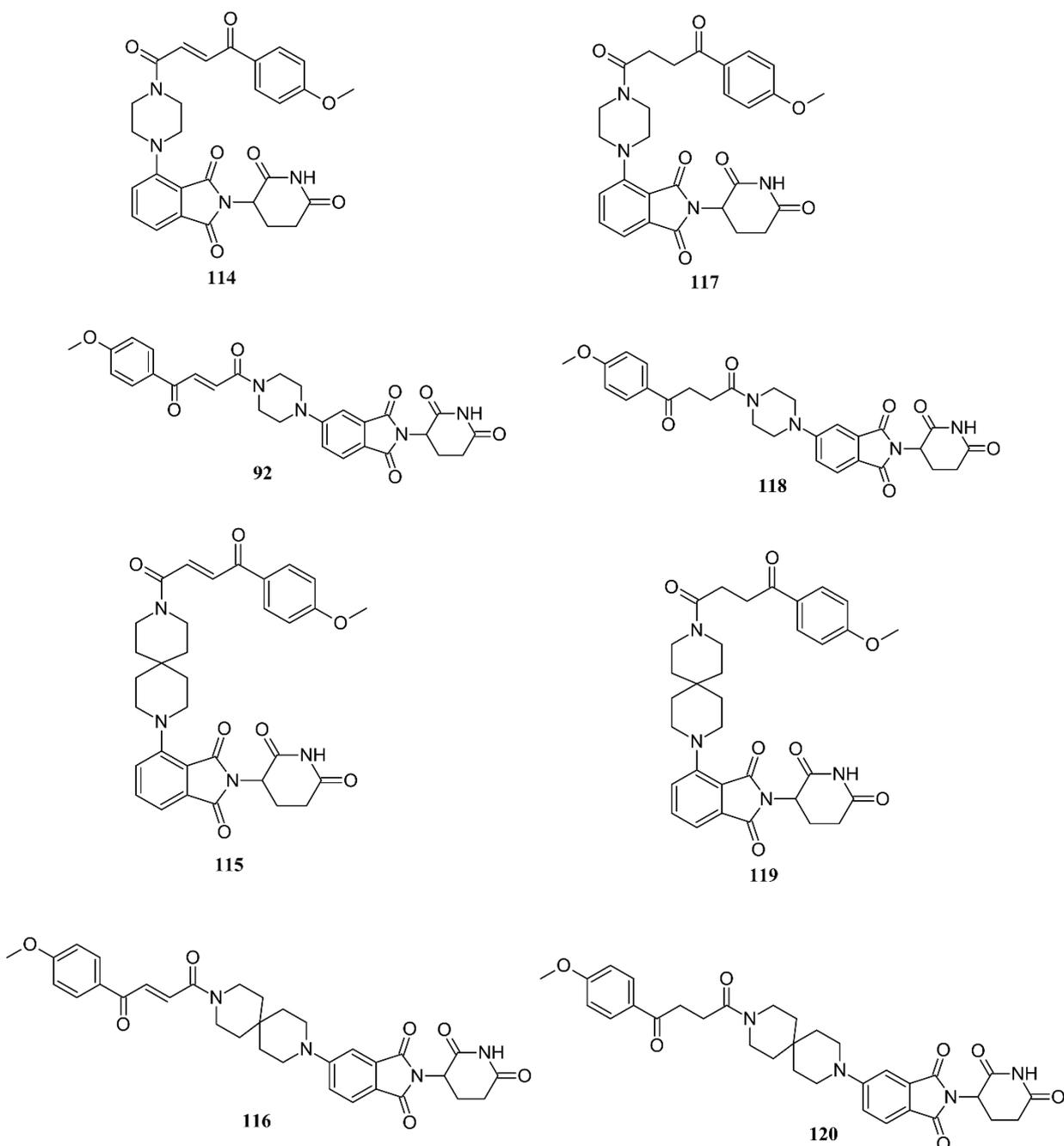
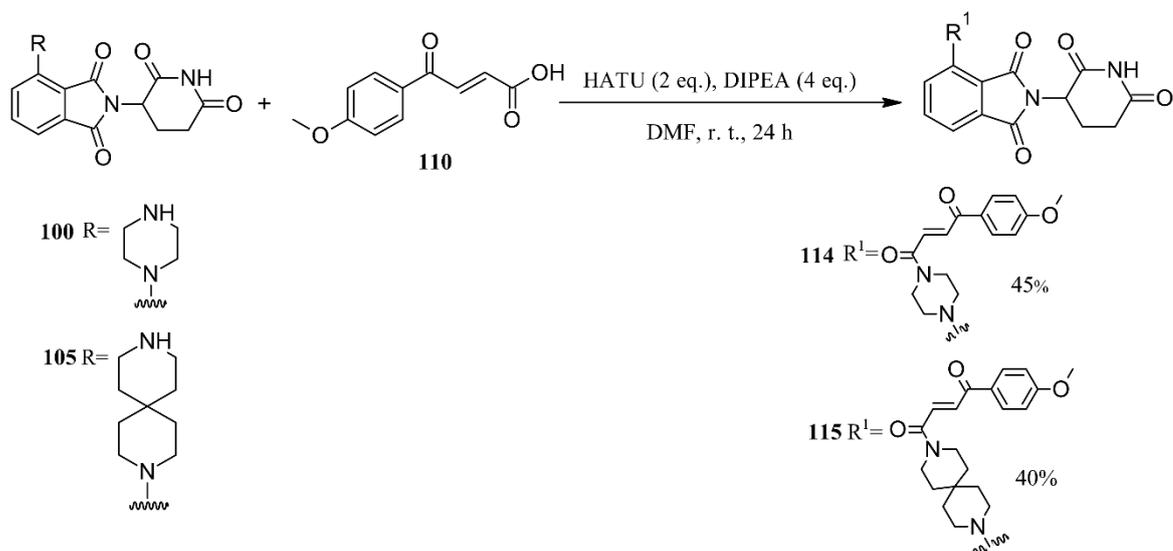


Рисунок 12 – Структуры целевых соединений

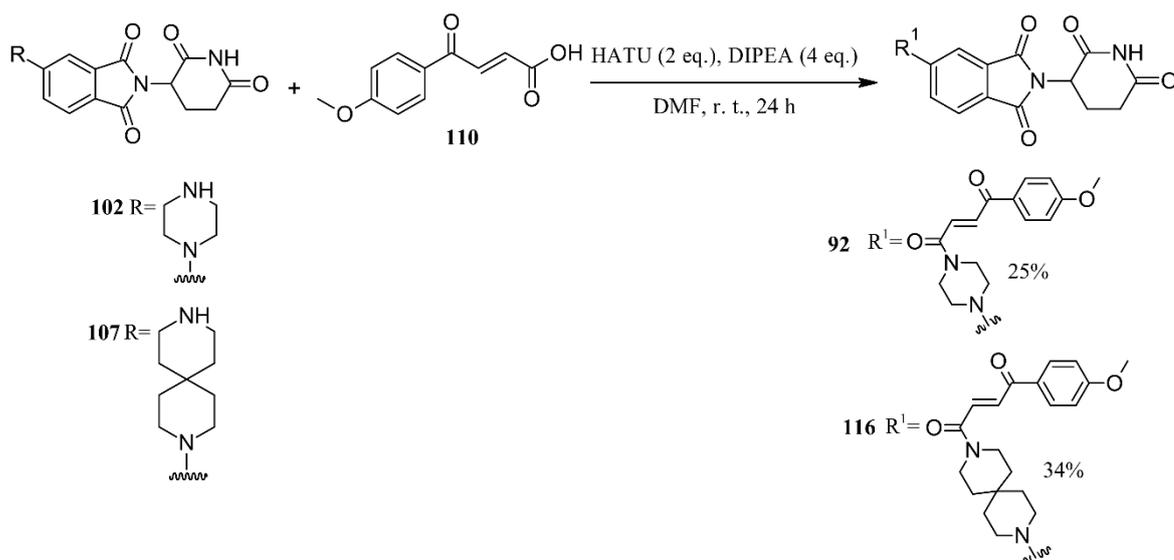
Активация карбоксильной группа осуществлялась при действии NATU и DIPEA в течение 30 минут, далее добавлялось заранее растворенное в DMF соответствующее дебокированное производное талидомида. Реакция протекала при комнатной температуре в течение 24 часов. Общий вид синтеза соединений положительного контроля представлен на схемах 25 и 26.

Схема 25



Органический слой отделяли и упаривали, в результате чего сырой продукт наносили на силикагель 500-800 mesh и очищали на сухой колонке под вакуумом.

Схема 26



Все структуры целевых соединений были подтверждены ЯМР-спектроскопией, на рисунке 13 приведен спектр ¹H ЯМР для соединения **116**.

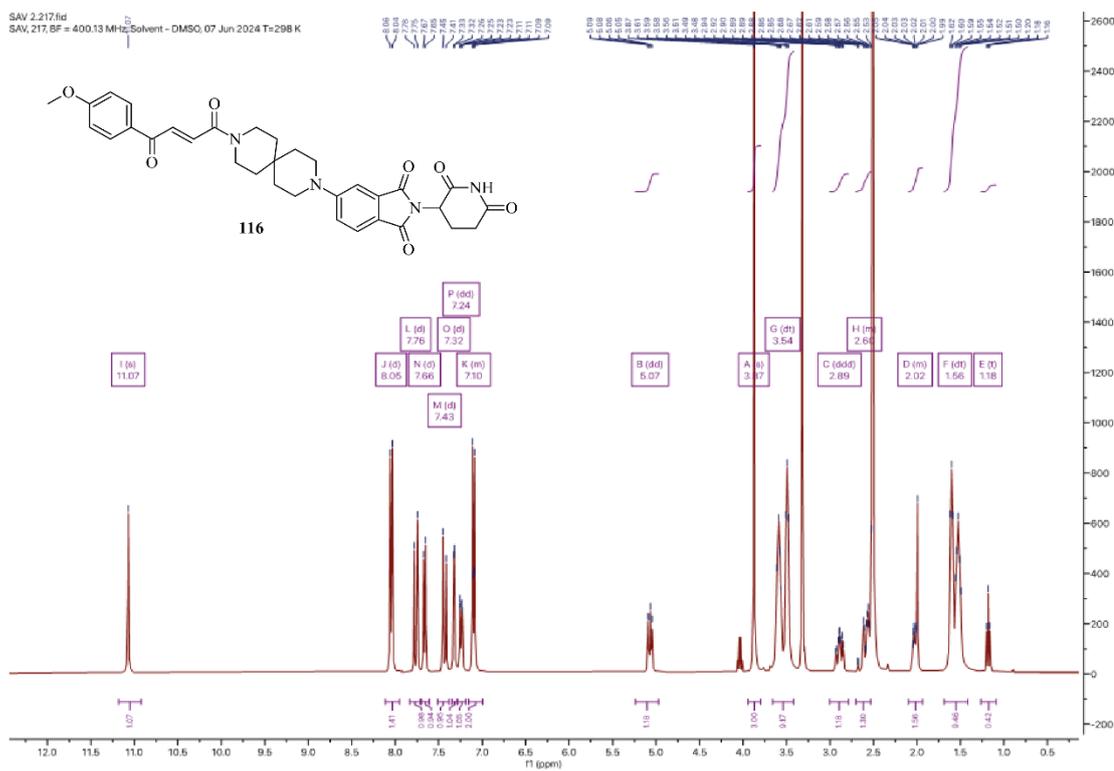
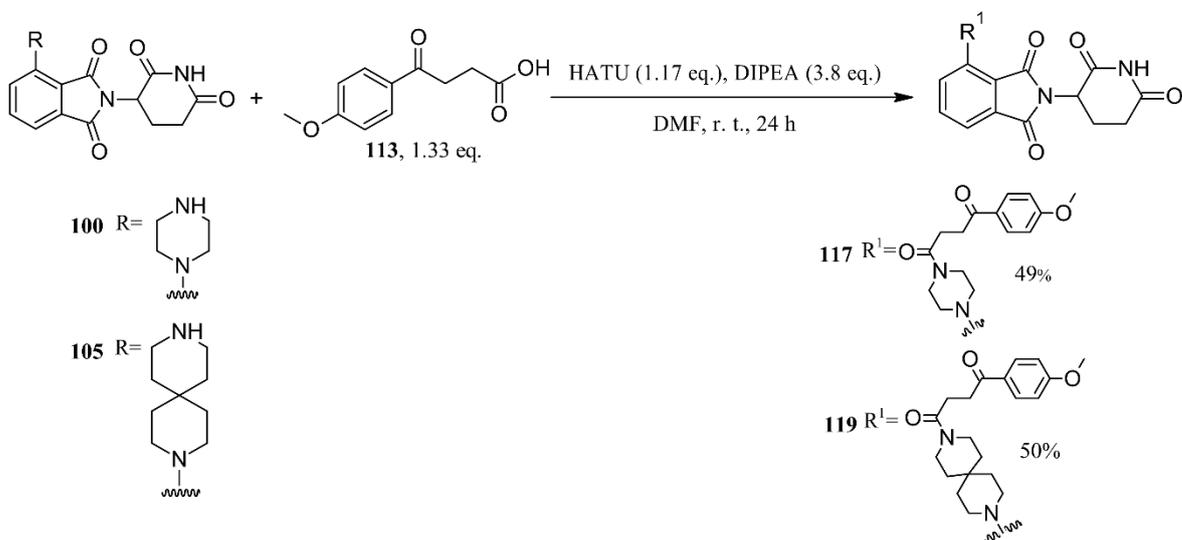


Рисунок 13 – Спектр ^1H ЯМР на примере соединения **116**

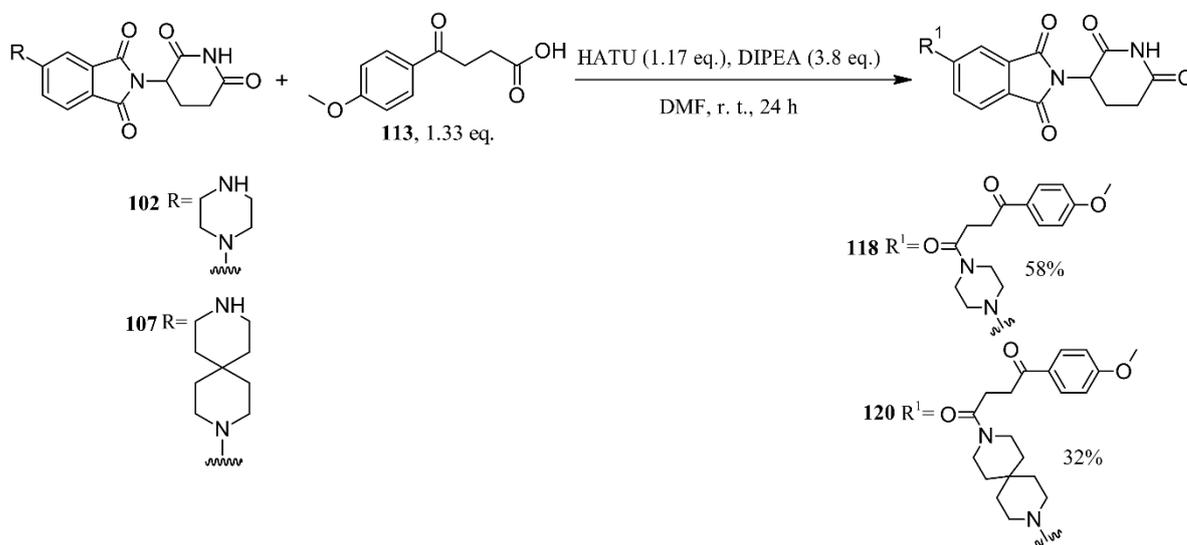
Соединения отрицательного контроля были получены, выделены и очищены аналогично (схемы 27 и 28).

Схема 27



Для синтеза данных молекул были взяты меньшие количества реагентов в других соотношениях.

Схема 28



Стоит заметить, что выходы продуктов оказались выше, чем у целевых соединений.

2.2 Компьютерное моделирование

Для всех исследуемых соединений были предсказаны значения следующих физико-химических параметров: LogP, площади полярной поверхности и свободной энергии встраивания молекулы в клеточную мембрану [59, 60, 61]. Исходя из полученных данных, можно сказать, что все структуры отвечают требованиям для перорально-биодоступных лекарственных препаратов (таблица 2).

Таблица 2 – Физико-химические параметры исследуемых соединений

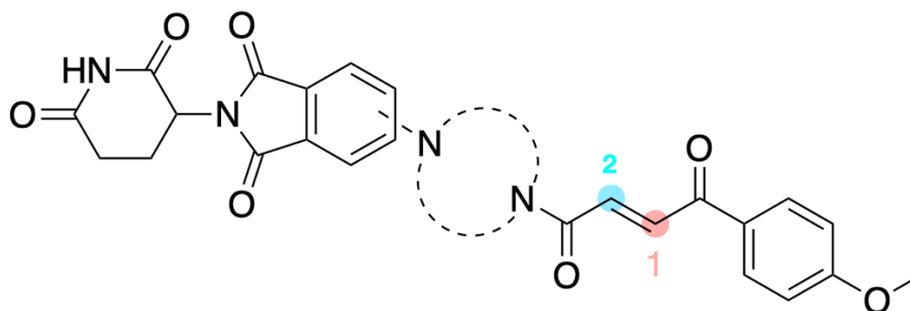
Номер соединения	QPLogP _{o/w}	MM-GBSA ΔG_{insert} , ккал/моль	PSA, Å ²
114	2.128	19.89	191.292
117	1.678	18.66	191.322
115	3.430	18.40	192.592
119	3.046	17.63	189.337
116	3.285	19.31	195.694
120	2.732	18.27	195.276
118	1.739	20.20	195.755
92	2.036	21.03	195.861

Для подтверждения возможности связывания исследуемых соединений с E3-лигазой RNF126 проводился ковалентный докинг. Структура белка (PDB ID: 2N9O [62]), определенная с помощью ЯМР, была загружена из PDB (*англ.* Protein Data Bank [63]) и подготовлена согласно протоколу, описанному в экспериментальной части. Ион цинка, участвующий в координации, в том числе, реактивного остатка Cys32, был удален. Структуры лигандов были подвергнуты стыковке с помощью реализованного в ПО Shcrodinger алгоритма Covalent Docking [64]. Дополнительно проводился расчет ΔG_{bind} с использованием энергетической модели Prime по методу MM-GBSA [60, 61].

С учетом того, что структуры исследуемых соединений содержат два неэквивалентных реакционных атома, были представлены результаты для обоих региоизомеров, образующихся в ходе реакции, ведущей к ковалентному связыванию (таблица 3).

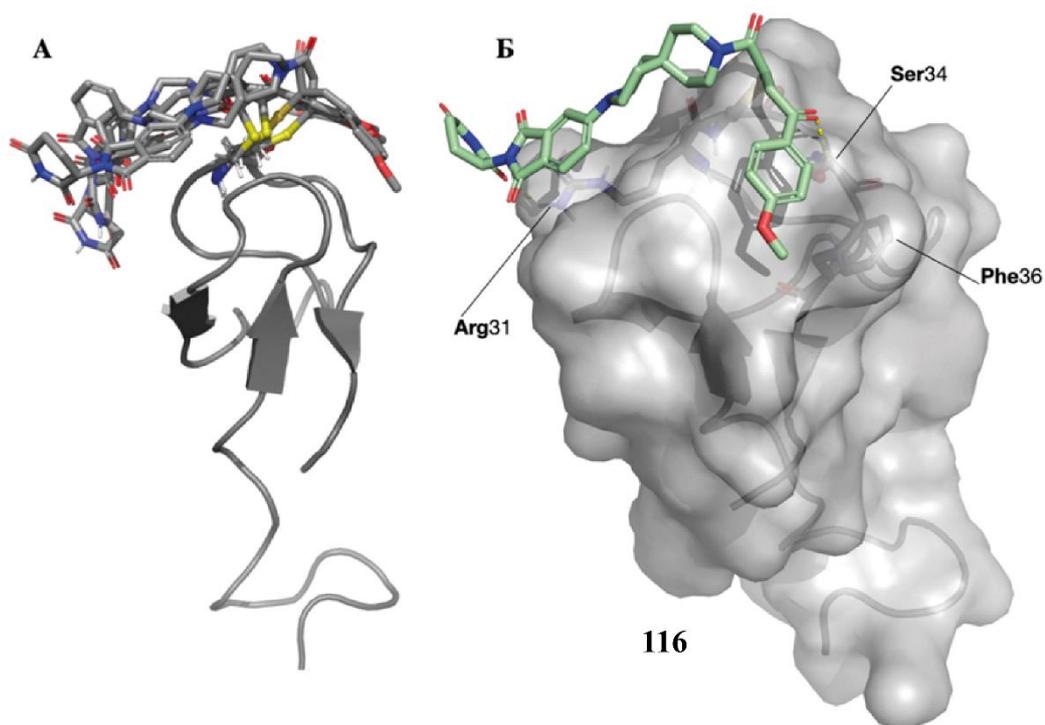
Таблица 3 – Результаты ковалентного докинга исследуемых соединений

Номер соединения	Реактивный атом	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
116	2	-30.76	-2.06
115	1	-29.02	-1.86
115	2	-24.33	-1.84
114	2	-30.07	-1.84
114	1	-29.65	-1.78
92	1	-28.88	-1.69
92	2	-26.63	-1.66
116	1	-25.51	-1.50



Важно отметить, что алгоритм обнаружил позы для всех исследуемых соединений, закономерно проигнорировав структуры из группы отрицательного контроля, не содержащие акцептора Михаэля. Также стоит заметить, что все остальные соединения характеризуются удовлетворительными параметрами скоринга как по значению внутренней оценочной функции алгоритма докинга CDock Affinity, так и по Prime MM-GBSA.

Анализируя способы связывания, стоит обратить внимание на консервативность укладки лигандов на поверхность мишени (рисунок 14).



А — Способы связывания всех исследуемых соединений; Б — укладка на поверхность белка соединения **116**; желтый пунктир – водородные связи.

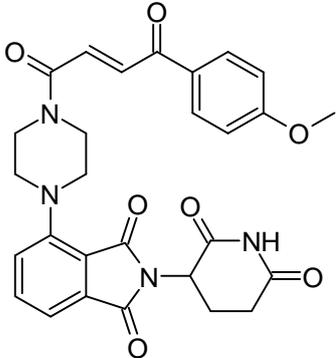
Рисунок 14 – Способы связывания исследуемых соединений

Связывание *para*-метоксифенильного фрагмента происходит в небольшой ложбинке около Phe36, а ближайший к нему карбонильный кислород участвует в образовании водородной связи с остатком Ser34, что видно на примере лучшего по скорингу соединения – **116**. Независимо от положения заместителя во фталимидной системе и типа гетероциклического мотива в линкере, CRBN-связывающая часть исследуемых соединений как бы «огибает» поверхность RNF126 и взаимодействует с остатком Arg31.

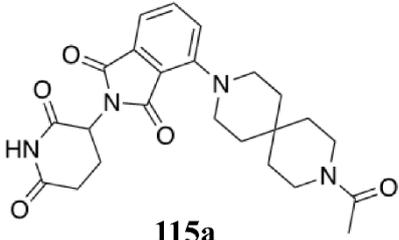
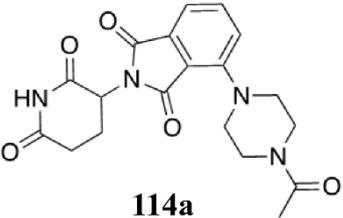
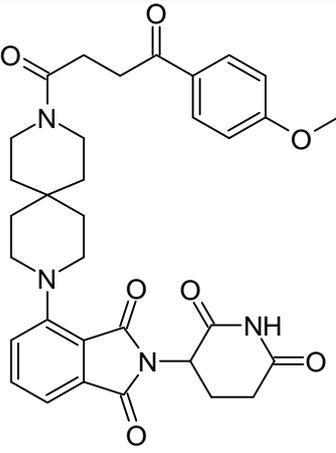
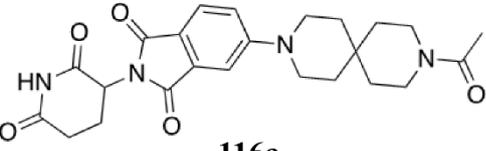
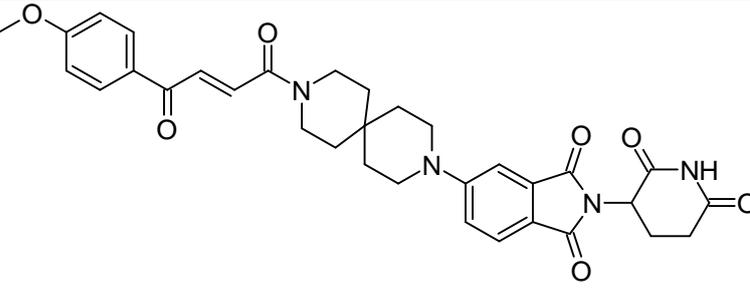
Очевидно, что подобная укладка структуры соединения должна исключать возможность связывания с CRBN. Однако, при проведении молекулярно-динамической симуляции, результаты которой не будут представлены в этой работе, отмечается, что мотив, отвечающий за рекрутирование цереблona, свободно колеблется в области растворителя, а фенилфумаровый фрагмент по-прежнему сохраняет свой способ связывания.

Дополнительно мы оценили влияние включения в структуру лигандов пиперазинового и диазаспирундекановых выходных векторов на связывание с цереблоном. Для этого из PDB был загружен, а затем подготовлен комплекс помалидомида с человеческим CRBN (PDB ID: 4CI3 [65]). На основе позы кристаллического лиганда был сгенерирован грид-бокс, и структуры исследуемых соединений подверглись стыковке с помощью модуля Glide [66] в режиме повышенной точности XP (*англ.* Extra Precession [67]). Однако из-за размеров молекул и отсутствия возможности учета данным алгоритмом эффектов индуцированной подгонки, не было обнаружено ни одной связывающей позы. Тогда параметр масштабирования радиусов Ван-дер-Ваальса был изменен со стандартных 80% до 75%, а также заново рассчитан файл сетки потенциалов, в котором область стыковки была увеличена с 20 до 25 Å. Лиганды были дополнительно модифицированы путем обрезки структуры (**92a**, **114a**, **115a**, **116a**) и пристыкованы вновь. Тем не менее, по-прежнему не было получено поз для соединения, со спироциклом в пятом положении (таблица 4).

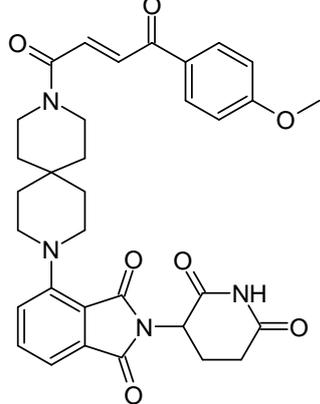
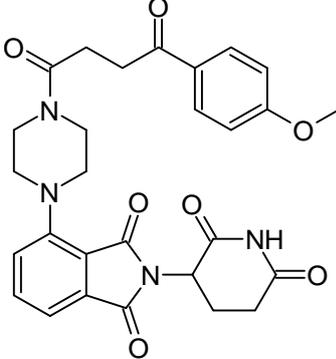
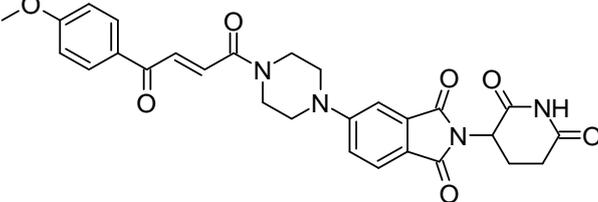
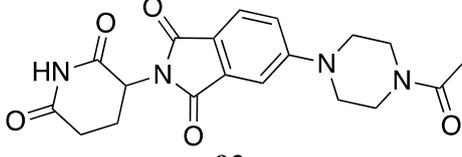
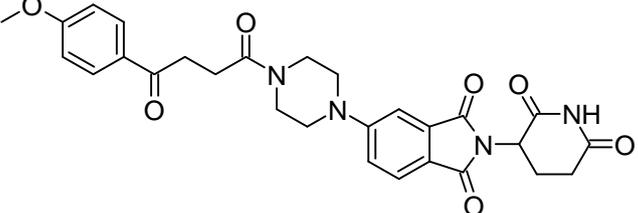
Таблица 4 – Результаты докинга исследуемых соединений (CRBN, PDB ID: 4CI3)

Структура/номер соединения	XP GScore, ккал/моль	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль
 <p style="text-align: center;">114</p>	-11.895	-79.89

Продолжение таблицы 4

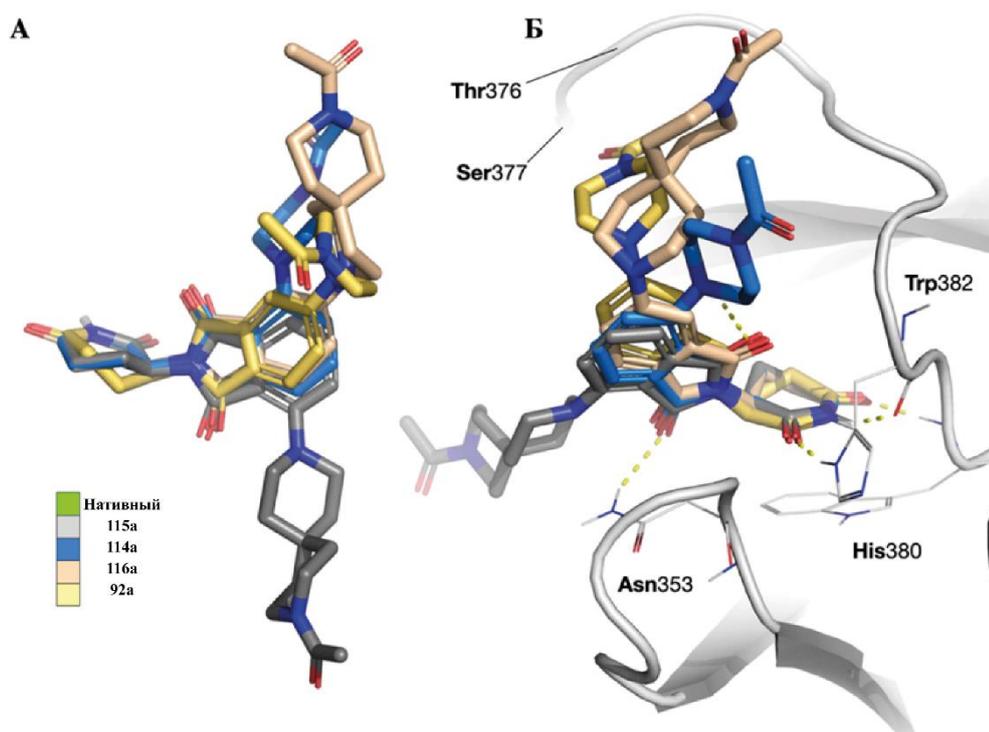
Структура/номер соединения	XP GScore, ккал/моль	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль
 <p style="text-align: center;">115a</p>	-11.856	-73.93
Помалидомид 5	-11.437	-63.38
 <p style="text-align: center;">114a</p>	-11.425	-67.74
 <p style="text-align: center;">119</p>	-10.868	-70.55
 <p style="text-align: center;">116a</p>	-10.702	-66.24
 <p style="text-align: center;">116</p>	-10.669	-69.21

Продолжение таблицы 4

Структура/номер соединения	XP GScore, ккал/моль	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль
 <p style="text-align: center;">115</p>	-10.104	-84.16
 <p style="text-align: center;">117</p>	-9.814	-80.91
 <p style="text-align: center;">92</p>	-9.300	-60.49
 <p style="text-align: center;">92a</p>	-9.273	-60.58
 <p style="text-align: center;">118</p>	-8.738	-68.68

Соединения **114** и **115** оказались лучше нативного помалидомида по значениям как XP GScore, так и ΔG_{bind} . В остальном лиганды показали сопоставимый скоринг.

Анализируя полученные позы для модифицированных лигандов **92a**, (**114a-116a**), можно заметить, что способ связывания глутаримидного фрагмента не претерпел изменений. Удалось сохранить все ключевые взаимодействия с остатками His380 и Trp382. Ориентация гетероциклических фрагментов у всех соединений схожа – они располагаются у петли, сформированной остатками Thr376 и Ser377. Только в случае **115a**, содержащего *N*-Ас-дiazаспирундекан, данный мотив направлен в противоположную область (рисунок 15).



А — Наложение соединений **92a**, **114a-116a** в связывающих конформациях; Б — способы связывания соединений **92a**, **114a-116a**

Рисунок 15 – Способы связывания соединений (**92a**, **114a-116a**) в активном сайте CRBN

Стыковка целевых соединений данной работы показала схожие результаты – фталимидно-глутаримидная часть молекул полностью повторяет геометрию кристаллического помалидомида. При этом, ориентация фрагментов молекул, отвечающих за рекрутирование RNF126 не консервативна между лигандами (рисунок 16).

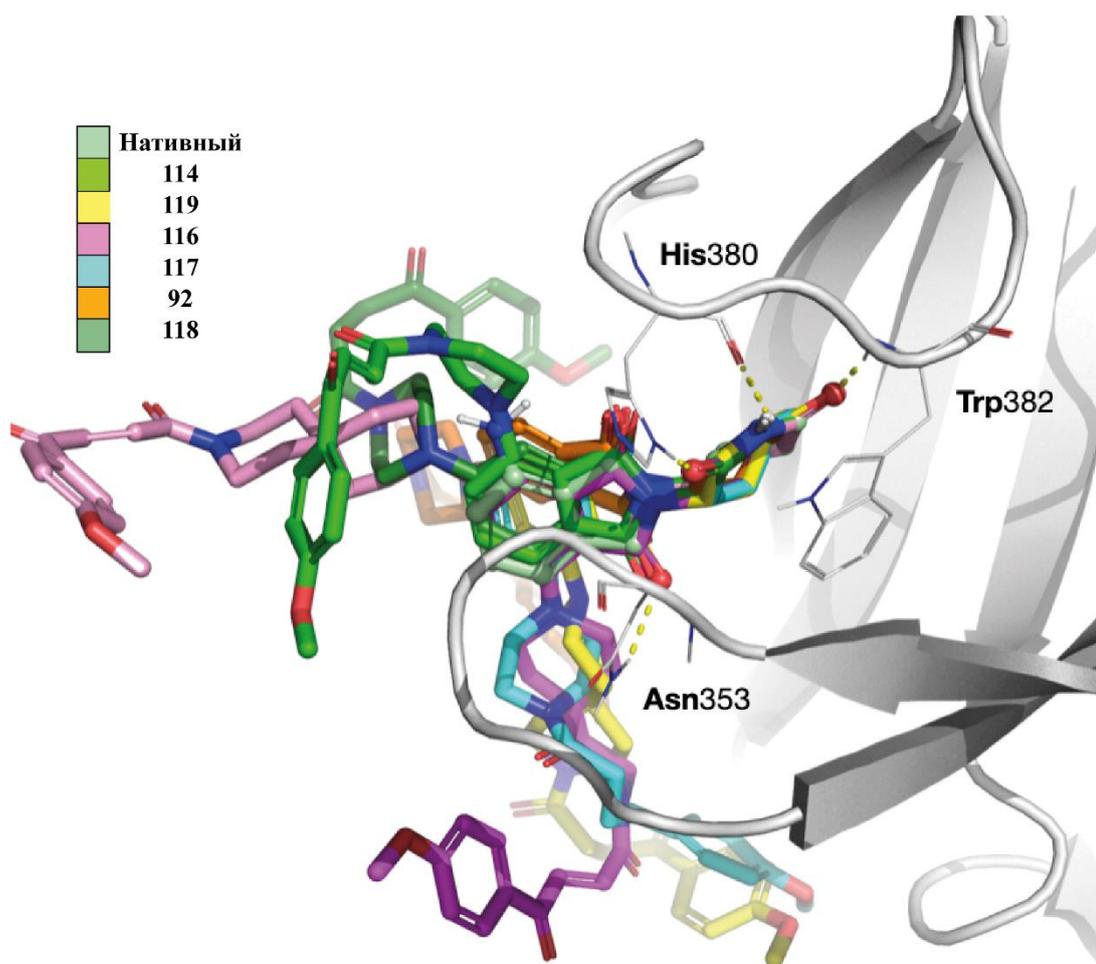


Рисунок 16 — Способы связывания соединений (92, 114, 116-118)

Кроме того, симуляция молекулярной динамики, результаты которой не представляются в данной работе, показывает, что обсуждаемый выше мотив свободно колеблется в области, доступной для растворителя, что указывает на вполне успешную возможность рекрутирования CRBN.

2.3 Биологические испытания

Активность полученных деградеров проверяли действием на клеточную линию HEK293. Ее часто используют в лабораторной практике ввиду простоты проведения культивирования и трансфекции.

В качестве первичного теста проводился анализ конкурентного связывания с CRBN на основе NanoLuc-BRD4. В качестве конкурентного агента для активного сайта CRBN был использован PROTAC dBET6 (**121**) (рисунок 17).

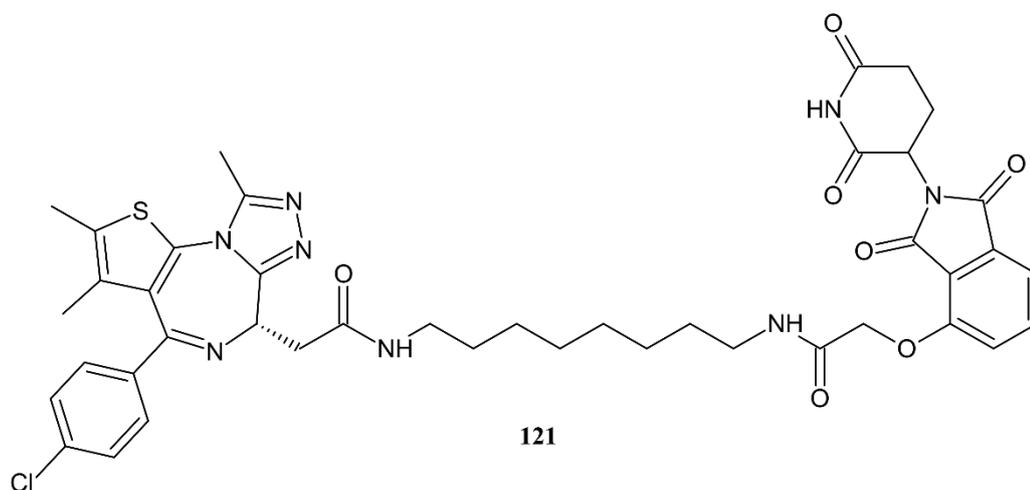


Рисунок 17 – Структура PROTAC dBET6

NanoLuc представляет собой небольшой высокостабильный АТФ-независимый белок, обеспечивающий надежную и высокочувствительную систему скрининга, а также значительно расширяет поле билюминесценции для проведения анализов биологически активных молекул [76]. В нашем случае был проведен люминесцентный анализ с инкубированием клеток HEK293 с dBET6 (**121**) и RSF-213 (**114**) в разных концентрациях, в качестве контроля использовали DMSO (рисунок 18).

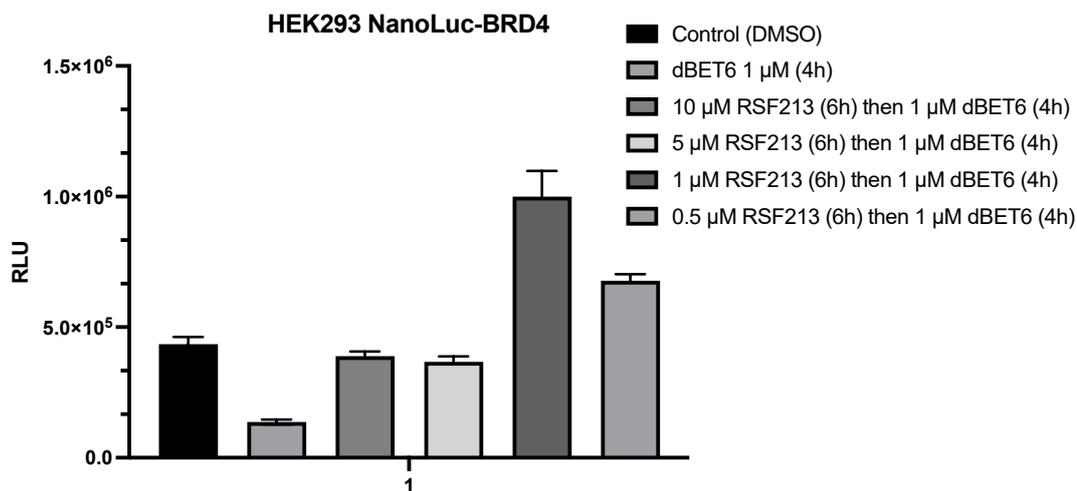


Рисунок 18 – Диаграмма снижения уровня CRBN

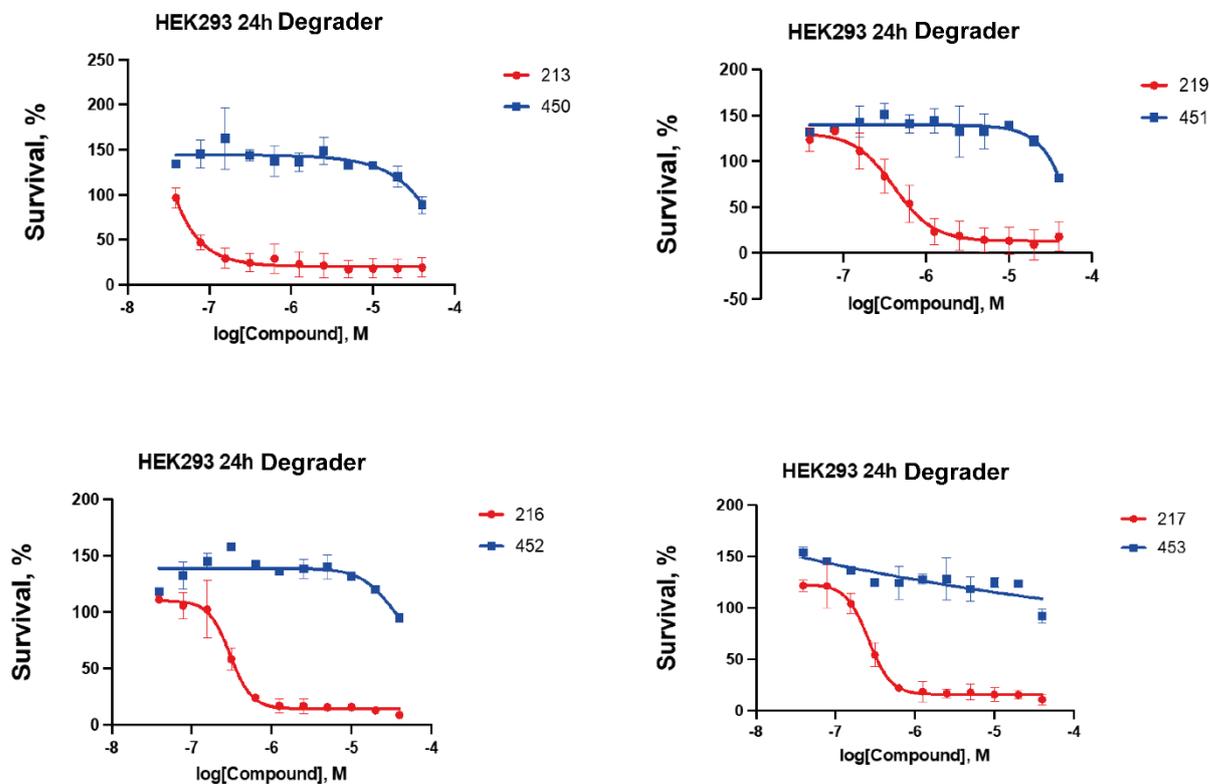
На основании результатов можно заметить, что добавление RSF-213 вызывает деградацию CRBN, при этом стоит отметить, что в случае концентрации 5 μM наблюдается вытеснение dBET6, что указывает на явную работу деградера в сторону CRBN.

Также нами был проведен анализ жизнеспособности клеток, представляющий собой классический МТТ-тест. Метод весьма удобен и довольно часто применяется в современное время. Он основан на способности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз восстанавливать краситель МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) до нерастворимой формы – формазана, что вызывает окрашивание живых клеток (рисунок 19).



Рисунок 19 – Восстановление МТТ

На цитотоксичность исследовались 4 целевых соединения и 4 соответствующие молекулы отрицательного контроля. Результаты представлены на кривых для каждой пары образцов (рисунок 20).



Красный – целевые соединения: RSF-213 (**114**), RSF-216 (**115**), RSF-217 (**116**), RSF-219 (**92**). Синим – образцы отрицательного контроля: RSF-450 (**117**), RSF-451 (**118**), RSF-452 (**119**), RSF-453 (**120**)

Рисунок 20 – Кривые доза-эффект

Исходя из полученных данных важно заметить, что все целевые соединения проявляют цитотоксичность и отправляют клетки в апоптоз, тогда как соединения отрицательного контроля не оказывают эффекта на RNF126 ввиду отсутствия в структуре двойной связи. Наибольшей активностью обладает соединение **116** (RSF-217), что подтверждает результаты проведения ковалентного докинга в структуру RNF126.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Протекание реакций контролировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках с закрепленным слоем силикагеля марки «Сорбфил». Обнаружение веществ проводилось п

ри проявлении пластин в УФ, йодной камере и концентрированном растворе перманганата калия.

Чистоту получаемых соединений оценивали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Aglient1220м» снабженным спектрофотометрическим детектором. Колонка ZORBAX C-18, элюент MeCN:H₂O 80:20 v/v % + 0.1% TFA, скорость потока элюента 1 мл/мин. Данные обрабатывались в программе OpenLab.

Все реагенты и растворители приобретались из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

3.2 Синтез исходных соединений

3.2.1 Синтез аминопроизводных талидомида

Синтез трет-бутил-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)карбамата (32)

К раствору Вос-глутамина **95** (70.00 г, 284 ммоль) в 200 мл THF добавляли DMAP (200 мг, 1.637 ммоль) и CDI (50.00 г, 308 ммоль), полученную смесь кипятили 12 часов. Далее охлаждали до кристаллизации вещества, фильтровали и промывали полученный осадок холодным THF (3×50 мл). Выход: 47 г, 72%, белые кристаллы, т. пл. 208-210 °С.

Типовая методика синтеза 4- и 5-фторозамещенных производных талидомида

Навеску соответствующего фторозамещенного фталевого ангидрида (**96, 97**) (3.08 г, 18.6 ммоль) и 3-(Вос-амино)глутаримида **32** (2.83 г, 12.4 ммоль)

растворяли в 60 мл уксусной кислоты, затем вносили KOAc (2.43 г, 24.8 ммоль) и кипятили 12 часов. Далее раствор охлаждали и добавляли 15 мл воды. Выпавший осадок фильтровали и сушили.

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-фтор-1H-изоиндол-1,3(2H)-диона (80)

Выход: 2.43 г, 71%, серые кристаллы, т. пл. 238-240 °С (236-238 °С [68]). R_f 0.38 (EtOAc:Hex 1:1). ВЭЖХ (289 нм, t_{уд.} 1.68) (100%).

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-фтор-1H-изоиндол-1,3(2H)-диона (94)

Выход: 2.85 г, 83%, серые кристаллы, т. пл. 258-260 °С (254-256 °С [69]). R_f 0.33 (EtOAc:Hex 1:1). ВЭЖХ (289 нм, t_{уд.} 1.73) (100%).

Типовая методика синтеза пиперазинозамещенных производных талидомида

В сосуд для проведения реакций под давлением последовательно вносили Вос-пиперазин **98** (1.34 г, 7.2 ммоль), соответствующий фторталидомид (2.00 г, 7.2 ммоль), 20 мл DMSO, DIPEA (1.4 мл, 1.02 г, 7.29 ммоль) и нагревали при температуре 90 °С в течение 4 часов. После чего добавляли 150 мл брайна, фильтровали и экстрагировали EtOAc (5×100 мл), органический слой сушили над Na₂SO₄. Смесь упаривали. Сырой продукт очищали хроматографией на сухой колонке под вакуумом.

Синтез трет-бутил-4-[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-ил]пиперазин-1-карбоксилата (99)

Выход: 1.15 г, 36%, желтые кристаллы, т. пл. 158-160 °С. R_f 0.15 (EtOAc:Hex 1:1). ВЭЖХ (389 нм, t_{уд.} 1.17) (100%). DVCC (Hex:EtOAc) (0→100%).

Синтез трет-бутил-4-[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]пиперазин-1-карбоксилата (101)

Выход: 2.16 г, 68%, желтые кристаллы, т. пл. 145-148 °С. R_f 0.27 (EtOAc:Hex 1:1). ВЭЖХ (389 нм, t_{уд.} 1.29) (100%). DVCC (Hex:EtOAc) (0→60%).

Типовая методика синтеза диазаспироундеканозамещенных производных талидомида

В сосуд для проведения реакций под давлением последовательно вносили соответствующий фторталидомид (1.00 г, 3.62 ммоль), трет-бутил-3,9-диазаспиро[5,5]ундекан-3-карбоксилат **103** (0.92 г, 3.62 ммоль), 10 мл DMSO и DIPEA (693 мкл, 0.52 г, 3.98 ммоль). Смесь нагревали при температуре 90 °С в течение 4 часов. После чего добавляли 100 мл дистиллированной воды и выпавший осадок фильтровали.

Синтез трет-бутил-9-[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-ил]-3,9-диазаспиро[5.5]ундекан-3-карбоксилата (104)

Выход: 1.33 г, 72%, желтые кристаллы, т. пл. 147-149 °С. R_f 0.35 (EtOAc:Hex 1:1). ВЭЖХ (289 нм, t_{уд.} 1.76) (95%).

Синтез трет-бутил-9-[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-3,9-диазаспиро[5.5]ундекан-3-карбоксилата (106)

Выход: 1.14 г, 61%, желтые кристаллы, т. пл. 156-158 °С. R_f 0.2 (EtOAc:Hex 1:1). ВЭЖХ (289 нм, t_{уд.} 1.76) (95%).

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-(пиперазин-1-ил)-1H-изоиндол-1,3(2H)-диона (100)

К раствору соответствующего Вос-амина (1.14 г, 2.60 ммоль) в 10 мл DCM добавляли TFA (1.93 мл, 2.96 г, 26 ммоль) и оставляли на 12 часов при комнатной температуре. В реакционную смесь добавляли 50 мл дистиллированной воды и 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, после чего экстрагировали DCM (3×100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Выход: 0.57 г, 63%, желтые кристаллы, т. пл. 265-267 °С. R_f 0.38 (DCM:MeOH 10:1).

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-(пиперазин-1-ил)-1H-изоиндол-1,3(2H)-диона (102)

К раствору соответствующего Вос-амина (2.16 г, 4.9 ммоль) в 15 мл DCM добавляли TFA (3.64 мл, 5.59 г, 49 ммоль) и оставляли на 12 часов при комнатной температуре. В реакционную смесь добавляли 50 мл дистиллированной воды и 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, после чего экстрагировали DCM (3×100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Выход: 1.12 г, 66%, желтые кристаллы, т. пл. 260-262 °С. R_f 0.14 (DCM:MeOH 10:1).

Синтез 4-[3,9-дiazаспиро[5,5]ундекан-3-ил]-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (105)

К раствору соответствующего Вос-амина (1.31 г, 2.58 ммоль) в 3 мл DCM добавляли TFA (2.87 мл, 4.41 г, 38.7 ммоль) и оставляли на 12 часов при комнатной температуре. В реакционную смесь добавляли 50 мл дистиллированной воды и 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, после чего экстрагировали DCM (3×100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Выход: 1.00 г, 95%, желтые кристаллы, т. пл. 235-237 °С. R_f 0.48 (DCM:MeOH 4:1). ВЭЖХ (280 нм, t_{уд.} 1.34) (86%).

Синтез 5-[3,9-дiazаспиро[5,5]ундекан-3-ил]-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (107)

К раствору соответствующего Вос-амина (1.29 г, 2.20 ммоль) в 3 мл DCM добавляли TFA (2.45 мл, 3.76 г, 33 ммоль) и оставляли на 12 часов при комнатной температуре. В реакционную смесь добавляли 50 мл дистиллированной воды и 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, после чего экстрагировали DCM (3×100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Выход: 846 мг, 94%, желтые кристаллы, т. пл. 265-267 °С. R_f 0.41 (DCM:MeOH 4:1). ВЭЖХ (263 нм, t_{уд.} 1.32) (88%).

3.2.2 Синтез карбоновых кислот

Синтез E-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еновой кислоты (110)

В двугорлую колбу, содержащую 55.5 мл DCM вносили, AlCl₃ (18.49 г, 138 ммоль) и малеиновый ангидрид **109** (13.60 г, 158 ммоль) до полного растворения. К полученной смеси по каплям добавляли анизол **108** (10.1 мл,

10.00 г, 92 ммоль). Кипятили 6 часов, после чего выливали на лед и обрабатывали концентрированным раствором HCl (1.00 мл) и промывали (200 мл DCM + 100 мл EtOAc), органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали под вакуумом. Далее растворяли в 50 мл H₂O и 50 мл насыщенного раствора Na₂CO₃, высаживали концентрированным раствором HCl, после чего выпавший осадок фильтровали. Выход: 16.28 г, 85%, бледно-желтые кристаллы, т. пл. 185-187 °C (180-182 °C [70]).

Синтез тетрагидрофуран-2,5-диона (112)

Ацетилхлорид (107 мл, 117.00 г, 1500 ммоль) добавляли к бутан-1,4-дикарбоновой кислоте **111** (59.00 г, 500 ммоль) и нагревали до полного растворения. Реакционную смесь охлаждали и фильтровали выпавший осадок. Выход: 42.24 г, 85%, белые кристаллы, т. пл. 120-122 °C (119-120 °C [71]).

Синтез 4-(4-метоксифенил)-4-оксобутановой кислоты (113)

К раствору янтарного ангидрида **112** (10.00 г, 99 ммоль) в 167 мл DCE добавляли AlCl₃ (14.65 г, 110 ммоль), после растворения по каплям вносили анизол **108** (10.9 мл, 10.8 г, 99 ммоль) и перемешивали 20 часов при комнатной температуре. Далее выливали на лед и обрабатывали концентрированным раствором HCl (1.00 мл), полученный осадок фильтровали. Выход: 16.38 г, 78%, белые кристаллы, т. пл. 148-150 °C (148-150 °C [72]).

3.3 Синтез целевых соединений

3.3.1 Синтез деградеров CRBN-RNF126

Типовая методика синтеза деградеров с тиреразиновым линкером

В колбу на 50 мл вносили *E*-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еновую кислоту **110** (120 мг, 0.584 ммоль), HATU (444 мг, 1.17 ммоль), 10 мл DMF и DIPEA (407 мкл, 302 мг, 2.34 ммоль) и перемешивали 30 минут в атмосфере аргона. Далее добавляли раствор исходного амина (200 мг, 0.584 ммоль) в 10 мл DMF и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. В полученную смесь добавляли 100 мл брайна и экстрагировали 100 мл EtOAc, промывали

трижды водой (3×50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали под вакуумом. Сырой продукт очищали хроматографией на сухой колонке под вакуумом.

Синтез 2-(2,6-диоксипиперидин-3-ил)-4-(4-[(2E)-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еноил]пиперазин-1-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (114)

Выход: 141 мг, 45%, ярко-желтые кристаллы, т. пл. 203-205 °С. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.10 (с, 1H), 8.06 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.82 (д, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.74 (дд, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.47 (д, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.39 (дд, *J* = 17.6, 7.8 Hz, 2H), 7.10 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.13 (дд, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 0H), 3.88 (с, 3H), 3.80 (к, *J* = 5.8 Hz, 4H), 3.41 – 3.33 (м, 4H), 3.00 – 2.81 (м, 1H), 2.67 – 2.55 (м, 1H), 2.13 – 1.96 (м, 1H), 1.32 – 1.11 (м, 1H). R_f 0.65 (EtOAc 100 %). ВЭЖХ (383 нм, t_{уд.} 1.80) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→80%).

Синтез 2-(2,6-диоксипиперидин-3-ил)-5-(4-[(2E)-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еноил]пиперазин-1-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (92)

Выход: 78 мг, 25%, ярко-желтые кристаллы. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (с, 1H), 8.12 – 8.02 (м, 2H), 7.83 (д, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.72 (д, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.46 (д, *J* = 15.1 Hz, 1H), 7.37 (д, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.27 (дд, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.14 – 7.06 (м, 2H), 5.09 (дд, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.88 (с, 3H), 3.77 (дт, *J* = 14.2, 5.0 Hz, 4H), 3.58 (к, *J* = 5.5 Hz, 4H), 2.99 – 2.80 (м, 1H), 2.67 – 2.54 (м, 1H), 2.10 – 1.94 (м, 1H), 1.28 – 1.07 (м, 1H). R_f 0.36 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (375 нм, t_{уд.} 2.96) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

Типовая методика синтеза деградеров с диазаспироундекановым линкером

В колбу на 50 мл вносили *E*-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еновую кислоту **110** (100 мг, 0.488 ммоль), NATU (371 мг, 0.98 ммоль), 10 мл DMF и DIPEA (340 мкл, 252 мг, 1.95 ммоль) и перемешивали 30 минут в атмосфере аргона. Далее добавляли раствор исходного амина (20 мг, 0.488 ммоль) в 10 мл DMF и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Полученную смесь экстрагировали 100 мл EtOAc и промывали водой (5×50 мл), органический

слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали под вакуумом. Сырой продукт очищали хроматографией на сухой колонке под вакуумом.

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-(9-[(2E)-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еноил]-3,9-диазаспиро[5.5]ундекан-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (115)

Выход: 116 мг, 40%, ярко-желтые кристаллы. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (с, 1H), 8.05 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.77 (д, *J* = 15.1 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.5, 7.1 Hz, 1H), 7.44 (д, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.34 (дд, *J* = 12.6, 7.8 Hz, 2H), 7.14 – 7.06 (м, 2H), 5.09 (дд, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.88 (с, 3H), 3.59 (д, *J* = 9.3 Hz, 4H), 3.38 – 3.23 (м, 4H), 2.89 (тд, *J* = 15.3, 5.3 Hz, 1H), 2.66 – 2.53 (м, 1H), 2.13 – 1.98 (м, 1H), 1.69 (т, *J* = 5.6 Hz, 4H), 1.60 – 1.46 (м, 4H), 1.26 – 1.08 (м, 1H). R_f 0.44 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (404 нм, t_{уд.} 3.55) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-(9-[(2E)-4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еноил]-3,9-диазаспиро[5.5]ундекан-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (116)

Выход: 100 мг, 34%, желтые кристаллы, т. пл. 283-285 °С. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.07 (с, 1H), 8.05 (д, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.76 (д, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.66 (д, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.43 (д, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.32 (д, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.24 (дд, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.16 – 7.00 (м, 2H), 5.07 (дд, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.54 (дт, *J* = 39.1, 6.8 Hz, 8H), 2.89 (ддд, *J* = 17.3, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.70 – 2.53 (м, 1H), 2.10 – 1.94 (м, 2H), 1.56 (дт, *J* = 32.5, 6.4 Hz, 8H), 1.18 (т, *J* = 7.1 Hz, 1H). R_f 0.35 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (390 нм, t_{уд.} 3.37) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

3.3.2 Синтез деградеров CRBN-RNF126 – отрицательный контроль

Типовая методика синтеза соединений отрицательного контроля с типеразиновым линкером

Навески 4-(4-метоксифенил)-4-оксобутановой кислоты **113** (122.00 мг, 0.584 ммоль) и NATU (194 мг, 0.512 ммоль) растворяли в 10 мл DMF, после чего добавляли DIPEA (293 мкл, 217 мг, 1.68 ммоль) и перемешивали 30 минут

в атмосфере аргона. Далее вводили раствор исходного амина (150 мг, 0.438 ммоль) в 10 мл DMF и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. В полученную смесь добавляли 100 мл брайна и экстрагировали 100 мл EtOAc, промывали водой (4×50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали под вакуумом. Сырой продукт очищали хроматографией на сухой колонке под вакуумом.

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-(4-[4-(4-метоксифенил)-4-оксобутаноил]пиперазин-1-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (**117**)

Выход: 113 мг, 49%, ярко-желтые кристаллы. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.09 (с, 1H), 7.98 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.74 (дд, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.39 (дд, *J* = 13.4, 7.8 Hz, 2H), 7.06 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.12 (дд, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.74 (т, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.64 (с, 2H), 3.36 (т, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.27 (д, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.21 (т, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.89 (ддд, *J* = 17.2, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.75 (т, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.67 – 2.54 (м, 1H), 2.12 – 2.00 (м, 0H), 1.35 – 1.07 (м, 2H). R_f 0.43 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (267 нм, t_{уд.} 3.03) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-(4-[4-(4-метоксифенил)-4-оксобутаноил]пиперазин-1-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (**118**)

Выход: 118 мг, 50%, желтые кристаллы. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (с, 1H), 7.98 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.71 (д, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.36 (д, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.26 (дд, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.05 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.09 (дд, *J* = 12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.77 – 3.40 (м, 8H), 3.22 (т, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.90 (ддд, *J* = 17.2, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.74 (т, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.66 – 2.53 (м, 1H), 2.13 – 1.93 (м, 1H), 1.26 – 1.09 (м, 1H). R_f 0.29 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (262 нм, t_{уд.} 2.91) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

Типовая методика синтеза соединений отрицательного контроля с диазаспироундекановым линкером

Навески 4-(4-метоксифенил)-4-оксобутановой кислоты **113** (101.00 мг, 0.486 ммоль) и HATU (162 мг, 0.428 ммоль) растворяли в 10 мл DMF, затем добавляли DIPEA (293 мкл, 181 мг, 1.40 ммоль) после чего перемешивали 30

минут в инертной атмосфере. Далее вводили раствор исходного амина (150 мг, 0.365 ммоль) в 10 мл DMF и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Смесь экстрагировали 100 мл EtOAc и промывали водой (5×50 мл), органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали под вакуумом. Сухой продукт очищали хроматографией на сухой колонке под вакуумом.

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-(9-[4-(4-метоксифенил)-4-оксобутаноил]-3,9-диазаспиро[5.5]ундекан-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (**119**)

Выход: 129 мг, 58%, желтые кристаллы. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (с, 1H), 7.97 (д, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.69 (т, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.34 (дд, *J* = 11.8, 7.8 Hz, 2H), 7.14 – 6.96 (м, 2H), 5.10 (дд, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.49 (дт, *J* = 19.5, 6.0 Hz, 4H), 3.39 – 3.23 (м, 3H), 3.17 (т, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.89 (ддд, *J* = 18.2, 13.9, 5.5 Hz, 1H), 2.69 (к, *J* = 4.2 Hz, 2H), 2.64 – 2.52 (м, 1H), 2.02 (д, *J* = 22.1 Hz, 2H), 1.67 (т, *J* = 5.2 Hz, 4H), 1.49 (дт, *J* = 48.5, 6.0 Hz, 4H), 1.18 (т, *J* = 7.1 Hz, 1H). R_f 0.31 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (404 нм, t_{уд.} 3.52) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-(9-[4-(4-метоксифенил)-4-оксобутаноил]-3,9-диазаспиро[5.5]ундекан-3-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1,3-диона (**120**)

Выход: 68 мг, 32%, ярко-желтые кристаллы. ¹H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 11.13 – 10.98 (м, 1H), 7.97 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.66 (д, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.33 (д, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.25 (д, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.05 (д, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.07 (дд, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.48 (д, *J* = 18.2 Hz, 8H), 3.17 (т, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.88 (д, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.65 (д, *J* = 27.7 Hz, 3H), 2.01 (д, *J* = 14.9 Hz, 1H), 1.69 – 1.35 (м, 8H), 1.24 – 1.09 (с, 1H). R_f 0.49 (EtOAc 100%). ВЭЖХ (395 нм, t_{уд.} 3.35) (100%). DVCC (DCM:EtOAc) (0→100%).

3.4 Компьютерное моделирование

Все расчеты в рамках выполненной выпускной квалификационной работы проводили с использованием программного пакета Schrodinger Suite 2022-4 на рабочей станции, снабженной 64 процессорами AMD Epyc 7513 (тактовая частота 2.6 ГГц) и двумя графическими картами NVIDIA GA102GL (RTX A5000), под управлением ОС Ubuntu 22.04.

3.4.1 Подготовка белков

Трехмерные структуры RNF126 (PDB ID: 2N9O [62]) и CRBN (PDB ID: 4CI3 [65]) были загружены из Protein Data Bank [63]. Подготовка белков проводилась с помощью модуля Protein Preparation Workflow [73]. При необходимости были добавлены отсутствующие атомы в боковых цепях, уточнены некоторые порядки связей, предсказаны состояния протонирования для гетероатомов с помощью алгоритма Epik [74] $pH = 7.4 \pm 0.2$, а также были добавлены атомы водорода. Комплекс был подвергнут минимизации, все молекулы воды удаляли. Из структуры RNF126 дополнительно был удален ион цинка.

3.4.2 Подготовка лигандов

Структуры исследуемых соединений были созданы с использованием модуля 2D-Sketcher и подготовлены с помощью LigPrep [73]. Хиральность определялась на основании 3D-представления, состояния протонирования гетероатомов определялись с помощью алгоритма Epik [74] $pH = 7.4 \pm 0.2$. Значения физико-химических свойств были рассчитаны с помощью QikProp [59] и Prime [61].

3.4.3 Ковалентный докинг

После проведения подготовки все структуры библиотеки были подвергнуты процедуре ковалентной стыковки с помощью модуля CovalentDocking [64]. В качестве реактивного аминокислотного остатка был выбран Cys32; область стыковки была определена как куб с ребром 20 Å, центр

которого совпадал с положением Cys. Тип реакции был выбран как «Присоединение по Михаэлю». Стыковка проводилась в режиме точности «Pose Prediction» с дополнительной оценкой свободной энергии связывания методом MM GBSA [60, 61]. Остальные настройки модуля стыковки были установлены по умолчанию и не изменялись.

3.4.4 Молекулярный докинг и расчет свободной энергии связывания MM-GBSA

Грид-боксы были рассчитаны с помощью модуля Receptor Grid Generation. Область стыковки определялась как куб с ребром 25 Å, центр которого совпадал с центром масс нативного лиганда. Параметр масштабирования радиусов Ван-дер-Ваальса был установлен как «0.75», а параметр отсечки значений частичных зарядов был установлен по умолчанию и не изменялся. Дополнительно были указаны остатки, с которыми нативный лиганд образовывал водородные связи. Всем тиольным или гидроксильным группам аминокислот сайта было позволено вращение.

Структуры всех исследуемых соединений, а также кристаллического лиганда были подвергнуты гибкой стыковке с помощью модуля Ligand Docking в режиме точности Glide XP [67]. Дополнительно с помощью модуля Prime [61] на основе полученных поз был проведен расчет свободной энергии связывания методом MM-GBSA [75], все остальные параметры устанавливались по умолчанию и не изменялись.

3.5 Биологические испытания

3.5.1 Культивирование клеточной линии

Клеточная линия HEK293 была получена из ATCC. Клетки HEK293 поддерживали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, GlutaMax (2 мМ) и антибиотиков: пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл). Клеточную линию культивировали во влажной атмосфере 95 % воздуха/ 5 % CO₂ при 37 °С. Субконфлюэнтный

монослой в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере (PBS) и трижды промывали полной питательной средой DMEM. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

3.5.2 Исследование жизнеспособности клеток

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток анализировали с помощью колориметрического МТТ-теста. Подготовка клеток включала в себя проведение трипсинизации и подсчета. Исследуемые клетки разбавляли питательной средой до количества 5×10^3 клеток/лунку в 96-луночном прозрачном планшете (Eppendorf). Через 24 ч клетки обрабатывали целевыми соединениями по отдельности в различных концентрациях и инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Затем клетки обрабатывали раствором МТТ (40 мкл) и инкубировали в течение 4 часов при аналогичных условиях. Затем содержимое лунок удаляли и добавляли DMSO (150 мкМ) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность каждой лунки определяли при 560 нм на планшетном ридере Promega. Полученные данные обрабатывались в приложении GraphPad Prism для анализа и визуализации результатов в виде графиков.

Заключение

По итогам проведения данной исследовательско-синтетической работы можно сделать следующие выводы:

– получена библиотека потенциальных деградеров для убиквитин-протеасомной системы CRBN-RNF126, основанных на ковалентном рекрутировании E3-лигазы RNF126, а также соответствующие соединения отрицательного контроля;

– проведен ковалентный докинг полученных соединений, в результате чего был определен способ связывания молекул на поверхности RNF126, а также выявлено лучшее по скорингу соединение – **116** (RSF-217). Также с помощью молекулярного докинга была выполнена стыковка всех полученных производных в активном сайте CRBN, в результате чего было установлено, что все целевые соединения, в том числе и молекулы отрицательного контроля, сохраняют ключевые взаимодействия (His380, Trp382);

– проведены биологические испытания исследуемых молекул на клетках HEK293, а именно, первичный анализ истощения CRBN на примере соединения **114** (RSF-213). В результате чего уровень CRBN снижался при конкурентном инкубировании с dBET6 (**121**). Тестирование деградеров на цитотоксичность показало, что все соединения вызывают угнетение клеток, связанное с деградацией RNF126.

Список используемой литературы

1. Li J. Targeted protein degradation in cancers: Orthodox PROTACs and beyond / J. Li, X. Chen, A. Lu et. al. // *The Innovation*. – 2023. – Vol. 4. - №. 3. – P. 1004113-1004126.
2. Rational chemical design of molecular glue degraders / E. S. Toriki, J. W. Papatzimas, K. Nishikawa et. al. // *ACS Central Science*. – 2023. – Vol. 9. – №. 5. – P. 915-926.
3. Hershko A. The ubiquitin pathway for protein degradation // *Trends in biochemical sciences*. – 1991. – Vol. 16. – P. 265-268.
4. Metzger M. B. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance / M. B. Metzger, V. A. Hristova, A. M. Weissman. // *Journal of cell science*. – 2012. – Vol. 125. – №. 3. – P. 531-537.
5. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly / M. Koegl, T. H. Schlenker, H. D. Ulrich et. al. // *Cell*. – 1999. – Vol. 96. – №. 5. – P. 635-644.
6. Cho S. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity / S. Cho, G. Dreyfuss. // *Genes & development*. – 2010. – Vol. 24. – №. 5. – P. 438-442.
7. Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – №. 22. – P. 12142-12149.
8. Ju D. Identification of the preferential ubiquitination site and ubiquitin-dependent degradation signal of Rpn4 / D. Ju, Y. Xie. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – №. 16. – P. 10657-10662.
9. Tian C. PROTAC compatibilities, degrading cell-surface receptors, and the sticky problem of finding a molecular glue / C. Tian, K. Burgess. // *ChemMedChem*. – 2021. – Vol. 16. – №. 2. – P. 316-318.
10. The CDK inhibitor CR8 acts as a molecular glue degrader that depletes cyclin K / M. Słabicki, Z. Kozicka, G. Petzold et. al. // *Nature*. – 2020. – Vol. 585. – №. 7824. – P. 293-297.

11. Schreiber S. L. Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways // *Cell*. – 1992. – Vol. 70. – №. 3. – P. 365-368.
12. Banaszynski L. A. Characterization of the FKBP. Rapamycin. FRB ternary complex / L. A. Banaszynski, C. W. Liu, T. J. Wandless. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – №. 13. – P. 4715-4721.
13. Large FK506-binding proteins shape the pharmacology of rapamycin / A. M. März, A. Fabian, C. Kozany et. al. // *Molecular and cellular biology*. – 2013. – Vol. 33. – №. 7. – P. 1357-1367.
14. Chamberlain P. P. Development of targeted protein degradation therapeutics / P. P. Chamberlain, L. G. Hamann. // *Nature chemical biology*. – 2019. – Vol. 15. – №. 10. – P. 937-944.
15. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity / S. Khan, X. Zhang, D. Lv et. al. // *Nature medicine*. – 2019. – Vol. 25. – №. 12. – P. 1938-1947.
16. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito, H. Ando, T. Suzuki et. al. // *Science*. – 2010. – Vol. 327. – №. 5971. – P. 1345-1350.
17. Knight R. IMiDs: a novel class of immunomodulators // *Seminars in oncology*. – WB Saunders, 2005. – Vol. 32. – P. 24-30.
18. McBride W. G. Thalidomide and congenital abnormalities // *Lancet*. – 1961. – Vol. 2. – №. 1358. – P. 90927-90928.
19. Normal embryonic development and neonatal digit regeneration in mice overexpressing a stem cell factor, Sall4 / K. Chen, A. Anderson, H. Kawakami et. al. // *PloS one*. – 2022. – Vol. 17. – №. 4. – P. 1-14.
20. CC-122, a pleiotropic pathway modifier, mimics an interferon response and has antitumor activity in DLBCL / P. R. Hanger, H. Man, C. Fontanillo et. al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2015. – Vol. 126. – №. 6. – P. 779-789.
21. A cereblon modulator (CC-220) with improved degradation of Ikaros and Aiolos / M. E. Matyskiela, W. Zhang, H. Man et. al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – №. 2. – P. 535-542.

22. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4CRBN ubiquitin ligase / M. E. Matyskiela, G. Lu, T. Ito et. al. // *Nature*. – 2016. – Vol. 535. – №. 7611. – P. 252-257.

23. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone / D. Heintel, A. Rocci, H. Ludwig et. al. // *British journal of haematology*. – 2013. – Vol. 161. – №. 5. – P. 695-700.

24. Expression of cereblon protein assessed by immunohistochemical staining in myeloma cells is associated with superior response of thalidomide- and lenalidomide-based treatment, but not bortezomib-based treatment, in patients with multiple myeloma / S. Y. Huang, C. Lu, H. Lin et. al. // *Annals of hematology*. – 2014. – Vol. 93. – P. 1371-1380.

25. Structure of the human Cereblon–DDB1–lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs / P. P. Chamberlain, A. Lopez-Girona, K. Miller et. al. // *Nature structural & molecular biology*. – 2014. – Vol. 21. – №. 9. – P. 803-809.

26. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells / J. Kronke, N. D. Udeshi, A. Narla et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – №. 6168. – P. 301-305.

27. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4CRBN / A. K. Gandhi, J. Kang, C. G. Havens et. al. // *British journal of haematology*. – 2014. – Vol. 164. – №. 6. – P. 811-821.

28. Activity of 129 single-agent drugs in 228 phase I and II clinical trials in multiple myeloma / K. M. Kortuem, K. Zidich, S. R. Schuster et. al. // *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. – 2014. – Vol. 14. – №. 4. – P. 284-290.

29. Zheng N. Structure of a c-Cbl–UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases / N. Zheng, P. Wang, P. D. Jeffrey et. al. // *Cell*. – 2000. – Vol. 102. – №. 4. – P. 533-539.

30. Ring finger protein 126 (RNF126) suppresses ionizing radiation–induced p53-binding protein 1 (53BP1) focus formation / N. S. Lee, H. R. Chang, S. Kim et. al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293. – №. 2. – P. 588-598.
31. E3 ubiquitin ligase RNF126 promotes cancer cell proliferation by targeting the tumor suppressor p21 for ubiquitin-mediated degradation / X. Zhi, D. Zhao, Z. Wang et. al. // *Cancer research*. – 2013. – Vol. 73. – №. 1. – P. 385-394.
32. The ERK signaling target RNF126 regulates anoikis resistance in cancer cells by changing the mitochondrial metabolic flux / S. Yoshino, T. Hara, H. J. Nakaoka et. al. // *Cell discovery*. – 2016. – Vol. 2. – №. 1. – P. 1-19.
33. Solubility-based genetic screen identifies RING finger protein 126 as an E3 ligase for activation-induced cytidine deaminase / R. K. Delker, Y. Zhou, A. Strikoudis et. al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – №. 3. – P. 1029-1034.
34. RNF126 as a biomarker of a poor prognosis in invasive breast cancer and CHEK1 inhibitor efficacy in breast cancer cells / X. Yang, Y. Pan, Z. Qiu et. al. // *Clinical Cancer Research*. – 2018. – Vol. 24. – №. 7. – P. 1629-1643.
35. RNF126 quenches RNF168 function in the DNA damage response / L. Zhang, Z. Wang, R. Shi et. al. // *Genomics, proteomics & bioinformatics*. – 2018. – Vol. 16. – №. 6. – P. 428-438.
36. Smith C. J. The E3 ubiquitin ligases RNF126 and Rabring7 regulate endosomal sorting of the epidermal growth factor receptor / C. J. Smith, D. M. Berry, C. J. McGlade. // *Journal of cell science*. – 2013. – Vol. 126. – №. 6. – P. 1366-1380.
37. HSF1 phosphorylation by ERK/GSK3 suppresses RNF126 to sustain IGF-IIR expression for hypertension-induced cardiomyocyte hypertrophy / C. Huang, F. Lee, S. Peng et. al. // *Journal of cellular physiology*. – 2018. – Vol. 233. – №. 2. – P. 979-989.
38. Rational chemical design of molecular glue degraders / E. S. Toriki, J. W. Papatzimas, K. Nishikawa et. al. // *ACS Central Science*. – 2023. – Vol. 9. – №. 5. – P. 915-926.

39. Lenz W. The history of thalidomide //TVAC: Thalidomide Victims Association of Canada, September 01, 1999.
40. Muller G. W. A concise two-step synthesis of thalidomide / G. W. Muller, W. E. Konnecke, A. M. Smith et. al. // Organic Process Research & Development. – 1999. – Vol. 3. – №. 2. – P. 139-140.
41. Chang M. Y. A synthesis of thalidomide / M. Y. Chang, C. Chang, S. Chen et. al. // Journal of the Chinese Chemical Society. – 2002. – Vol. 49. – №. 3. – P. 383-385.
42. Xiao Z. Solid-phase synthesis of thalidomide and its analogues / Z. Xiao, K. Schaefer, S. Firestine et. al. // Journal of Combinatorial Chemistry. – 2002. – Vol. 4. – №. 2. – P. 149-153.
43. Vu B. D. Facile Synthesis of Thalidomide / B. D. Vu, N. M. Ho Ba, D. C. Phan. // Organic Process Research & Development. – 2019. – Vol. 23. – №. 7. – P. 1374-1377.
44. Enantioselective inhibition of TNF- α release by thalidomide and thalidomide-analogues / S. Wnendt, M. Finkam, W. Winter et. al. // Chirality. – 1996. – Vol. 8. – №. 5. – P. 390-396.
45. Suzuki E. Three-step synthesis of (R)-and (S)-thalidomides from ornithine / E. Suzuki, N. Shibata. // Enantiomer. – 2001. – Vol. 6. – №. 5. – P. 275-279.
46. Scalable and green process for the synthesis of anticancer drug lenalidomide / Y. Ponomaryov, V. Krasikova, A. Lebedev et. al. // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2015. – Vol. 51. – P. 133-138.
47. Ivanova M. A multi-step continuous flow synthesis of pomalidomide / M. Ivanova, J. Legros, T. Poisson et. al. // Journal of flow chemistry. – 2022. – Vol. 12. – №. 4. – P. 383-387.
48. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: Rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action / B. Donarska, A. Slawinska-Brych, M. Mizerska-Kowalska et. al. // Bioorganic Chemistry. – 2023. – Vol. 138. – P. 106608-106629.

49. Discovery of new Lenalidomide derivatives as potent and selective GSPT1 degraders / Y. Wei, X. Xu, M. Jiang et. al. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – P. 115580-115592.

50. Selective degradation of GSPT1 by cereblon modulators identified via a focused combinatorial library / C. E. Powell, G. Fu, J. Che et. al. // ACS chemical biology. – 2020. – Vol. 15. – №. 10. – P. 2722-2730.

51. Design, synthesis and biological evaluation of novel quinazolinone derivatives as CRBN E3 ligase modulators / L. Liu, R. Sun, H. Liu et. al. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – Vol. 247. – P. 115016-115021.

52. In pursuit of a selective hepatocellular carcinoma therapeutic agent: Novel thalidomide derivatives with antiproliferative, antimigratory and STAT3 inhibitory properties / M. J. Nutt, Y. S. Yee, A. Buyan et. al. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 217. – P. 113353-113362.

53. Synthesis and biological evaluation of thalidomide derivatives as potential anti-psoriasis agents / K. Tang, Z. Lin, Y. Chen et. al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19. – №. 10. – P. 3061-3077.

54. Replacing the phthalimide core in thalidomide with benzotriazole / M. Krasavin, A. Bubyrev, A. Kazantsev et. al. // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2022. – Vol. 37. – №. 1. – P. 527-530.

55. Accessing three-branched high-affinity cereblon ligands for molecular glue and protein degrader design / R. Kuchta, C. Heim, A. Herrmann et. al. // RSC chemical biology. – 2023. – Vol. 4. – №. 3. – P. 229-234.

56. Rapid synthesis of pomalidomide-conjugates for the development of protein degrader libraries / D. K. Brownsey, B. C. Rowley, E. Gorobets et. al. // Chemical Science. – 2021. – Vol. 12. – №. 12. – P. 4519-4525.

57. Roles of RNF126 and BCA2 E3 ubiquitin ligases in DNA damage repair signaling and targeted cancer therapy / R. Zhang, W. Liu, J. Sun et. al. // Pharmacological Research. – 2020. – Vol. 155. – P. 104748-104755.

58. Lawrence S. A. Amines: synthesis, properties and applications. – Cambridge University Press – 2004. – P. 371.

59. Jorgensen W. L., Duffy E. M. Prediction of drug solubility from structure / W. L. Jorgensen, E. M. Duffy. //Advanced drug delivery reviews. – 2002. – Vol. 54. – №. 3. – P. 355-366.

60. Schrödinger, статья о Prime MM/GBSA.
URL: <https://www.schrodinger.com/kb/1647/> (дата обращения: 03.12.2023).

61. The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling / J. Li, R. Abel, Y. Cao et. al. //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2011. – Vol. 79. – №. 10. – P. 2794-2812.

62. Structural and functional insights into the E3 ligase, RNF126 / E. M. Krysztofinska, S. Martínez-Lumbreras, A. Thapaliya et. al. //Scientific reports. – 2016. – Vol. 6. – №. 1. – P. 26433.

63. Банк белковых данных (англ. Protein Data Bank, PDB).
URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 09.11.2023).

64. Docking covalent inhibitors: a parameter free approach to pose prediction and scoring / K. Zhu, Kenneth, W. Borrelli, J. Greenwood et. al. //Journal of chemical information and modeling. – 2014. – Vol. 54. – №. 7. – P. 1932-1940.

65. Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide / E. S. Fischer, K. Bohm, J. R. Lydeard et. al. //Nature. – 2014. – Vol. 512. – №. 7512. – P. 49-53.

66. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy / R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy et. al. //Journal of medicinal chemistry. – 2004. – Vol. 47. – №. 7. – P. 1739-1749.

67. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes / R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky et. al. //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – Vol. 49. – №. 21. – P. 6177-6196.

68. Homo-PROTACs for the chemical knockdown of cereblon / C. Steinebach, S. Lindner, N. D. Udeshi et. al. //ACS chemical biology. – 2018. – Vol. 13. – №. 9. – P. 2771-2782.

69. Translation termination factor GSPT1 is a phenotypically relevant off-target of heterobifunctional phthalimide degraders / M. Ishoey, S. Chorn, N. Singh et. al. //ACS Chemical Biology. – 2018. – Vol. 13. – №. 3. – P. 553-560.

70. Microwave-assisted synthesis of 4-oxo-2-butenoic acids by aldol-condensation of glyoxylic acid / M. Uguen, C. Gai, L. J. Sprenger et. al. //RSC advances. – 2021. – Vol. 11. – №. 48. – P. 30229-30236.

71. McLean. Succinic- α -d₂, α' -d₂ Acid and its Derivatives / A. McLean, R. Adams. //Journal of the American Chemical Society. – 1936. – Vol. 58. – №. 5. – P. 804-810.

72. Srinivas C. A simple procedure for the isolation of γ -oxobenzenebutanoic acid derivatives: application to the synthesis of fenbufen / C. Srinivas, C. M. Haricharan Raju, P. V. R. Acharyulu. //Organic process research & development. – 2004. – Vol. 8. – №. 2. – P. 291-292.

73. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments / G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day et. al. //Journal of computer-aided molecular design. – 2013. – Vol. 27. – P. 221-234.

74. Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules / J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye et. al. //Journal of computer-aided molecular design. – 2007. – Vol. 21. – P. 681-691.

75. Feig M. Implicit solvation based on generalized Born theory in different dielectric environments / M. Feig, W. Im, C. L. Brooks III. //The Journal of chemical physics. – 2004. – Vol. 120. – №. 2. – P. 903-911.

76. NanoLuc luciferase—a multifunctional tool for high throughput antibody screening / N. Boute, P. Lowe, S. Berger et. al. //Frontiers in pharmacology. – 2016. – Vol. 7. – P. 172259-172270.