

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, специальности)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль) / специализация)

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Химерные молекулы, ориентированные на протеолиз

Студент

А.Ю. Кудинов

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Консультант

Р. Э. Гасанов

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Тольятти 2022

Аннотация

Целью данного исследования стал дизайн тест-системы, направленной на детектирование протеолитической деградации РІЗК. Разработка данной платформы является мощным фундаментом для дальнейших исследований, направленных на разработку серии деградеров РІЗК PROTAC (Proteolysis targeting chimera), которые в данный момент ведутся в Центре медицинской химии.

Бифункциональные деградеры PROTAC в настоящий момент являются мощными и перспективными терапевтическими агентами, способными оказывать действие на многие «неуловимые» мишени, а также избегать проблем, связанных с мутациями и лекарственной резистентностью.

В литературном обзоре описаны общие принципы функционирования убиквитин-протеосомной системы деградации, дизайна и синтеза бифункциональных молекул. Большое внимание уделено различным PROTACs, разработанным за последние 10 лет.

В экспериментальной части описаны методика проведения синтетических операций, посвященных получению известного PROTAC-РІЗК в качестве положительного контроля. Описаны протоколы сборки тест-системы на основе NanoGlo HiBiT.

На основе проведенных экспериментов удалось получить и провести валидацию фундаментальной платформы, способной оценивать уровни истощения РІЗК. Данная система будет использована в будущих исследованиях.

Работа изложена на 95 страницах, содержит 25 рисунков и 25 схем химических реакций.

Abstract

The title of the graduation work is Bifunctional molecules targeting proteolysis.

The graduation work consists of an explanatory note, an introduction, three parts on 95 pages, 25 figures, the list of 161 references including foreign sources.

The aim of this graduation project is to design a test-system aimed at detecting proteolysis degradation of PI3K.

The object of the graduation work is the concept of targeting proteolysis as perspective and promising therapeutic strategy.

The subject of the graduation work is analytical methods directed to detecting PROTAC-mediated proteolysis degradation of PI3K.

The first part describes in details the mechanism of proteolysis system action, approaches to design and synthesis of PROTAC molecules.

The second part considers the base methodology of PROTAC-mediated degradation detecting system development and general aspects of positive control synthesis. The experimental results are also given.

The third part consist deals with biological and chemical assay and synthesis protocols, characteristic data about each compound and some NMR (Nuclear magnetic resonance) spectra.

Based on the data obtained, we can conclude that a powerful analytical platform has been successfully created. This test-system has been approved by validation positive control assay and can be used in further studies aimed at PROTAC design.

Содержание

Введение	9
1 Литературный обзор.....	12
1.1 Убиквитин-протеосомная система деградации белков	12
1.2 Строение E3-комплекса на основе CRBN.....	13
1.3 Специфичность убиквитинилирования. Дегроны.....	15
1.4 Механизм узнавания протеосомой и протеосомальная деградация	17
1.5 Подходы к рациональному дизайну и синтезу PROTAC	18
1.5.1 Рекрутеры E3 лигаз, подходы к синтезу и оптимизация	18
1.5.2 Линкеры. Дизайн, оптимизация и синтез	32
1.5.3 Ингибиторы PI3K в роли лигандов POI.....	47
2 Результаты и их обсуждение	55
2.1 Синтез PROTAC на основе ZSTK474 в качестве положительного контроля	55
2.1.1 Синтез PI3K-связывающей боеголовки PROTAC	56
2.1.2 Синтез CRBN-связывающей боеголовки PROTAC.....	59
2.1.3 Синтез PROTAC.....	61
2.2 NanoGlo-HiBiT lytic system.....	62
3 Экспериментальная часть	66
3.1 Реагенты и оборудование	66
3.2 Синтез исходных соединений	67
3.4 Синтез целевых соединений.....	71
Заключение	76
Список используемых источников	77

Определения, обозначения и сокращения

В данной работе используются следующие термины с соответствующими определениями:

АТФ	аденозинтрифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ММ	множественная миелома
AIBN	азобис(изобутиронитрил)
АКТ	серин/треонин-протеинкиназа вируса саркомы мышей (RAC- α)
ALK	киназа анапластической лимфомы
АМРК	5'аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
AR	адреногеновый рецептор
BINAP	— 2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил
BRAF	серин/треониновая протеинкиназа быстро прогрессирующей фибросаркомы В (B-Raf)
BRD4	бромдоменсодержащий белок 4
BTK	тирозинкиназа Брутона
β-TRCP	белок, кодируемый геном, содержащим β -трансдукцин повторы
CADD	компьютерный дизайн лекарств
Cbz	бензилхлорформат
CDI	карбонилдиимидазол
CDK6	циклинзависимая киназа 6
cIAP	белок-ингибитор апоптоза
СК	казеинкиназа

CRL	Е3 убиквитинлигазный комплекс, содержащий домен реально интересного нового гена (RING) и белок куллинового семейства
Ct	карбоксильный конец аминокислотной последовательности белка
CUL	куллин
DC₅₀	концентрация полумаксимальной деградации
DCE	1,2-дихлорэтан
DCM	дихлорметан
DDB1	белок, связывающий повреждения дезоксирибонуклеиновой кислоты 1
DHT	дегидротестостерон
DIPEA	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
DMAP	4,4- <i>N,N</i> -диметиламинопиридин
DMF	<i>N,N</i> -диметилформаид
DMSO	диметилсульфоксид
dppf	1,1'- <i>бис</i> (дифенилфосфино)ферроцен
Dsk2	белок, содержащий домен связывания убиквитина
DSS	<i>бис</i> (2,5-диоксопирролидин-1-ил)октандиоат
DUB	деубиквитинилирующий фермент
EDCI	1-этил-3-(3,3- <i>N,N</i> -диметиламинопропил)карбодиимид
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
Esp	белок стимулирующий активность эукариотического фактора транскрипции 2 (eIF2)
FKBP	белок, связывающий макролид FK506
GPCR	G-белок-связанный рецептор
HATU	1-[<i>бис</i> (диметиламино)метилен]-1 <i>H</i> -1,2,3-триазоло[4,5- <i>b</i>]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат
HDAC	деацетилазы гистонов

HECT	домен, гомологичный карбоксильному концу E6-ассоциированного белка (E6-AP)
HOAt	1-гидрокси-7-азабензотриазол
IDO1	индоламин 2,3-диоксигеназа
IκBα	ядерный фактор, ингибитор фактора транскрипции энхансера гена κ-легкой цепи активированных В-клеток α
IKK	киназа, фосфолирирующая ингибитор энхансера гена κ-легкой цепи активированных В-клеток
IKZF	содержащий домен цинкового пальца белок Икарос, связывающий дезоксирибонуклеиновую кислоту
IL	интерлейкин
IMiD	иммуномодулирующий имидный препарат
IRAK	киназа, ассоциированная с рецепторами интерлейкина
MDM2	мышинный гомолог фрагментов двойной минуты 2
mTOR	мишень рапамицина млекопитающих
NBS	<i>N</i> -бромсукцинимид
NFκB	фактор транскрипции энхансера гена κ-легкой цепи активированных В-клеток
NMM	<i>N</i> -метилморфолин
NMP	1-метил-2-пирролидон
Nt	амино-конец аминокислотной последовательности белка
P450 CYP1B1	Цитохром-P450-зависимая монооксигеназа 1B1
PD	фармакодинамика
PDB	банк данных белковых структур
PDK	киназа пируватдегидрогеназы
PEG	полиэтиленгликоль
PI3K	фосфатидилинозитол-3-киназа

PIP2	фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат
PIP3	фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
PK	фармакокинетика
PLIC	белок, связывающий белковый ингибитор апоптоза (IAP) с цитоскелетом
POI	белок интереса
PTEN	фосфатаза с двойной субстратной специфичностью
RAD23A	гомолог А белка эксцизионной репарации дезоксирибонуклеоновой кислоты 23
Ras	мышинный вирус саркомы
RING	домен реально интересного нового гена
Rpn1	долихил-дифосфоолигосахарид субъединица 1 протеингликозил трансферазы
Rpr1	рибонуклеаза Р, рибонуклеопротеина 1
RTK	рецепторная тирозин-протеинкиназа
SALL	Splat-подобный белок
Skp1	белок, ассоциированный с киназой S-фазы клеточного цикла 1
STAB	триацетоксиборгидрид натрия
TBAB	бромид тетрабутиламмония
TBAHS	гидросульфат тетрабутиламмония
TFA	трифторуксусная кислота
TFE	трифторэтанол
TFSI	<i>бис</i> (трифторметан)сульфонимид
Ub	убиквитин
UBR1	компонент E3-убиквитинлигазного комплекса, опосредующий узнавание белка интереса
WD40	структурный мотив: β-пропеллерный домен, оканчивающийся триптофанил(W)-аспаргаиновой кислотой(D)

Введение

Среди всех механизмов деградации белков в клетке отдельно можно выделить убиквитин-протеосомальную систему, принцип действия которой основан на селективном тэгировании белков комплексом лигаз с помощью убиквитинилирования — ковалентного присоединения нескольких единиц убиквитина [1,2].

Такой тэг способствует узнаванию протеосомой — белковой машиной, способной разлагать белки, связанные с цепочкой из нескольких убиквитинов [1].

Благодаря такой системе в структуре белков удается распознавать те изменения, которые были вызваны мутацией, нарушением работы либо успешным завершением функционального цикла, и разлагать такие «нежелательные» белки [1].

В основе концепции PROTAC (англ. *PRO*teolysis *T*argeting *C*himerа) лежит принцип создания индуцированной близости лигазного комплекса и POI таким образом, чтобы между ними возникли протеин-протеиновые взаимодействия, опосредующие акты убиквитинилирования и последующую протеосомальную деградацию.

Таким образом, любой PROTAC должен включать в себя три принципиально важные части — мотив, ответственный за связывание POI, рекрутер E3-лигазы и линкер между ними. На рисунке 1 сверху — принципиальная схема структуры PROTAC, снизу — пример реальной бифункциональной молекулы, направленной на протеолиз PI3K [3]).

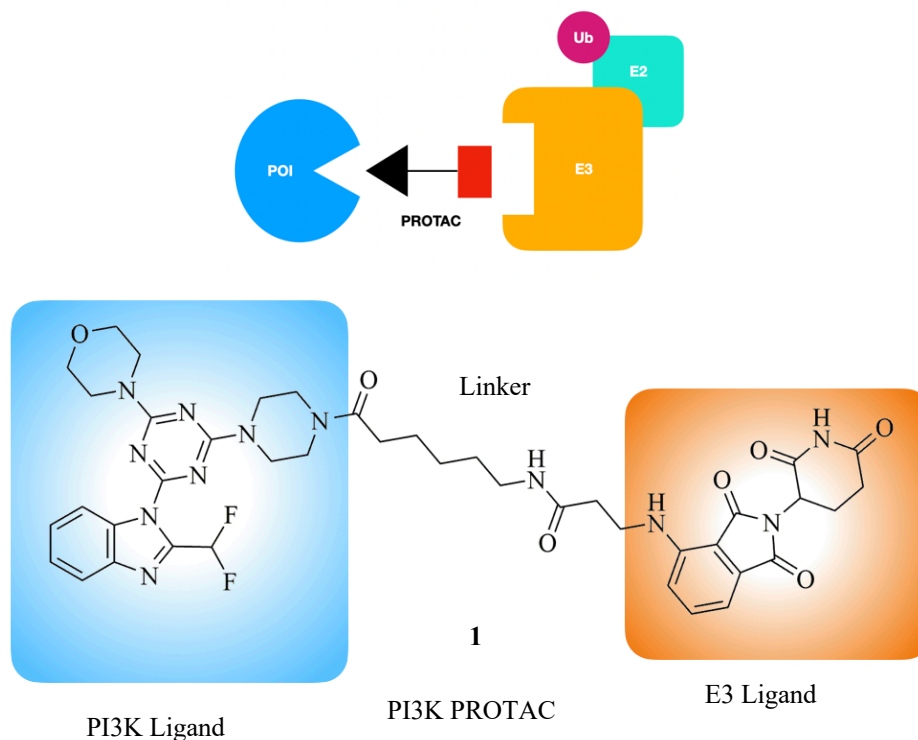


Рисунок 1 — Принципиальное строение (сверху) и реальный пример PROTAC, направленный на деградацию PI3K (снизу).

Также стоит отметить, что стратегия PROTAC развивалась параллельно с другой методологией направленного протеолиза — концепцией молекулярных клеев, которая подразумевала использование малой молекулы, связывающейся с E3 и облегчающей взаимодействие последней с POI [2].

Использование PROTAC подразумевает множество положительных аспектов.

Во-первых, отпадает необходимость использования лигандов к белку интереса с высоким сродством или модулирующими свойствами, так как концепция PROTAC подразумевает лишь связывание целевого белка, но не обязательно воздействие на функциональность [4].

Во-вторых, в связи с возможностью использования аллостерических сайтов связывания, удастся избежать проблем, связанных с резистентностью, опосредованной мутациями аминокислотного состава активного сайта мишени.

В-третьих, механизм действия бифункциональных молекул обычно требует гораздо меньших концентраций биоактивного агента, так как после осуществления акта мечения белка убиквитинлигазой комплекс POI-PROTAC-E3 распадается и регенерированный PROTAC вновь может связываться с белковой мишенью [5].

Данная стратегия представляет большой интерес с точки зрения мощной терапевтической стратегии в отношении большого числа заболеваний, активно разрабатывается и исследуется в последнее время [6, 7]

Цель работы:

Дизайн и сборка тест-системы, способной качественно и воспроизводимо детектировать протеолитическую деградацию P13K, которая затем будет использована для тестирования серии PROTAC, направленных на разрушение P13K CRBN-зависимым образом.

Задачи:

- 1) синтез PROTAC-P13K-CRBN в качестве положительного контроля;
- 2) конструирование и создание тест-системы на основе NanoGlo HiViT для оценки уровней деградации P13K;
- 3) валидация тест-системы;

1 Литературный обзор

1.1 Убиквитин-протеосомная система деградации белков

Протеосомальная деградация белка — это сложный, многоступенчатый и согласованный процесс, требующий нескольких ферментативных реакций [8]. Стоит отметить, что протеосомальная деградация является процессом, требующим затраты энергии, несмотря на то, что само разложение белка в протеосоме протекает с выделением энергии [9]. Функционирование системы мечения (рисунок 2) осуществляется за счет работы трех ферментов, относящихся к классу лигаз, и убиквитина — белка, опосредующего узнавание протеосомой.

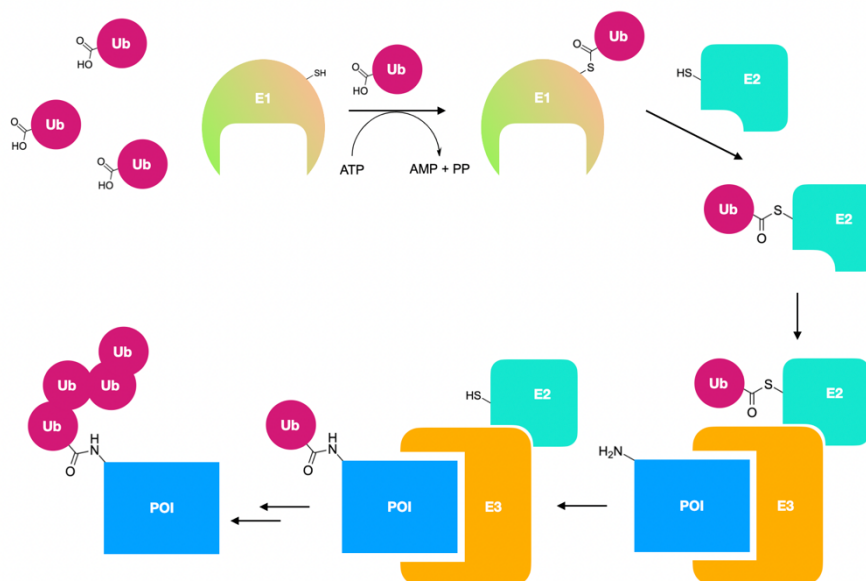


Рисунок 2 – Тэгирование белков системой убиквитинлигаз

Изначально Ub, небольшой и повсеместно встречающийся белок, подвергается активации E1 лигаз — Ub-активирующего фермента, который связывает АТФ в виде хелата Mg^{2+} , в свою очередь связанного с убиквитином, а затем катализирует процесс образования прочного высокоэнергетического интермедиата, представляющего из себя аденилат убиквитина с образованием

связи между С-концевым глицином Ub и α -фосфатом [11]. Затем путем нуклеофильной атаки цистеина E1 происходит ковалентное связывание Ub с активирующей лигазой. Все E1 ферменты обладают высоким сродством к E2 убиквитинконъюгирующей лигазе. В ходе образования комплекса Ub-E1-E2 происходит реакция транстиолирования – осуществляется перенос Ub на E2 с образованием новой тиоэфирной связи. Аминолитическое расщепление связи E2-Ub катализируется E3 лигазами [11].

Комплекс лигазы E3 выполняет функции связывания как E2-Ub, так и белка интереса [9]. E3 обычно состоит из каркаса, ROI-специфичного белка и мотива, взаимодействующего с Ub-конъюгирующим ферментом [9].

1.2 Структура E3-комплекса на основе CRBN

Так как в разрабатываемом нами PROTAC в качестве рекрутируемой лигазы выбран цереблон, рассмотрим немного подробнее строение такого лигазного комплекса (рисунок 3).

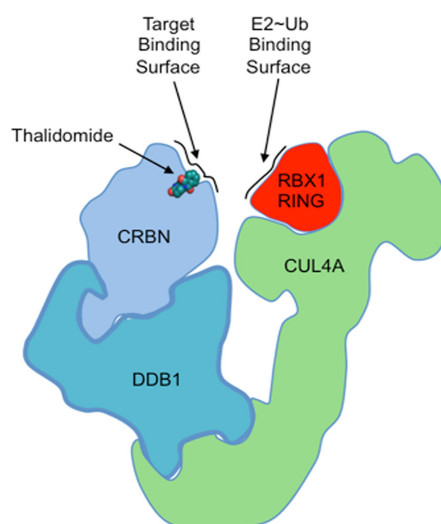


Рисунок 3 – белковый комплекс CRBN-E3 (CRL4), включающий каркас CUL4A (зеленый), адаптер DDB1 (салатовый), RING-белок (красный), субстратспецифичный CRBN (голубой) с талидомидом в активном сайте

В роли каркасного белка выступает CUL4, который принадлежит к куллиновому семейству убиквитинлигаз и может быть представлен двумя

изоформами CUL4A и CUL4B, которые обладают высокой гомологией, как и в целом семейство куллинов. На рисунке 4 — CUL4A — зеленым цветом [10, 12].

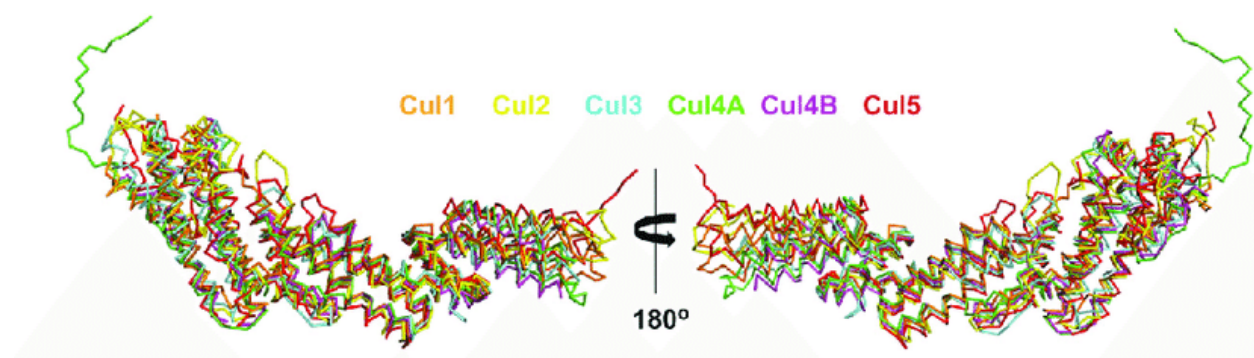
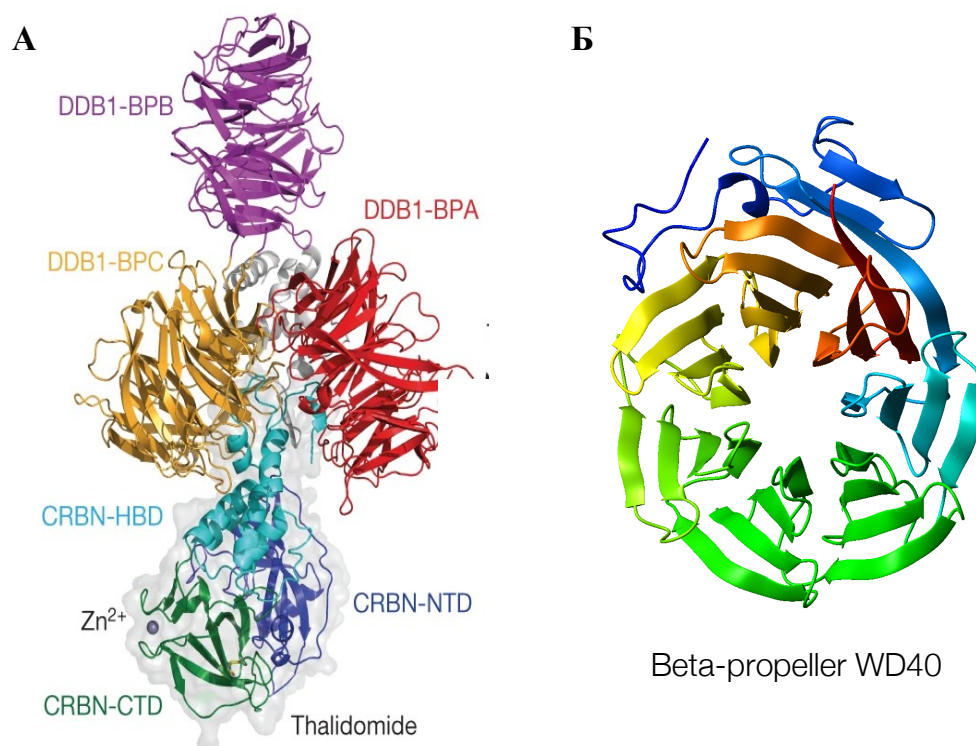


Рисунок 4 – Белки семейства Cullin

CUL4A состоит в основном из α -спиралей, через С-конец CUL4A связывается с белком RBX1 с помощью RING домена, образуя комплекс CRL4; через N-конец происходит взаимодействие с DDB1. CUL4A может свободно вращаться до 150° вокруг DDB1, что значительно расширяет зону убиквитинилирования [12]. Куллины также выполняют много других функций в клетке — репарация ДНК, регуляция клеточного цикла или ремоделирование хроматина [10].

Белок RING-бокса RBX1 обладает поверхностью с высокой специфичностью к E2-лигазам и может рекрутировать их в комплекс CRL4 [12].

Белок DDB1 (рисунок 5 - слева) является своеобразным адаптером между куллином и непосредственно E3-лигазой, ответственной за распознавание субстрата. Через пропеллерный домен (рисунок 5 - справа) на С-конце происходит связывание с каркасным белком [13].



А – Строение комплекса DDB1-CRBN; Б – структура пропеллерного домена WD-40

Рисунок 5 – Комплекс DDB1-CRBN

Сам цереблон (примерно 200 кДа) является рецептором субстрата в комплексе E3 [9] и состоит из трёх структурных мотивов [13]. С- и N-концевые домены представлены в основном β -листами (при этом С-домен содержит сайты ориентации ионов цинка и связывания рекрутеров), а спирально-пучковый HBD домен, состоит из семи α -спиралей и обладает поверхностью, аффинной к DDB1 [13].

1.3 Специфичность убиквитинилирования. Дегроны

Лигаза призвана обладать высокой специфичностью и селективностью к тому белку, который необходимо подвергнуть убиквитинилированию. Избирательность действия E3 позволяют обеспечить определенные «сигналы деградации» — дегроны.

Дегрон — это минимальный структурный элемент в белке, который необходим и достаточен для распознавания и последующего связывания лигазой [12]. Некоторые из E3 лигаз обладают сайтами, способными высокоаффинно связывать белки, имеющие на своем Nt строго определенную пептидную последовательность [14]. Такой набор Nt-аминокислот белок может получить, если в ходе его синтеза трансляция не была завершена до конца или была завершена с ошибками (обычно такие белки в принципе не могут покинуть ER, образовать функциональный комплекс [15]), часто Nt-дегрон обнажается в ходе частичного расщепления белка каспазами или экзопептидазами, а также в ходе иных модификаций, например, *N*-аргинилирования, *N*-ацетилирования и другие [16]. Как пример E3 — лигаза UBR1, узнающая последовательности Arg(Nt)-Lys-His (рисунок 6). Кроме этого выделяют несколько других дегронов, которые представляют из себя конформационные изменения белков, обнажающие пептидные последовательности, узнаваемые лигазами [19-21]. Также для тэгирования убиквитином обязательно наличие у белка внешнего или внутреннего лизина, который будет служить сайтом прикрепления убиквитина [22].

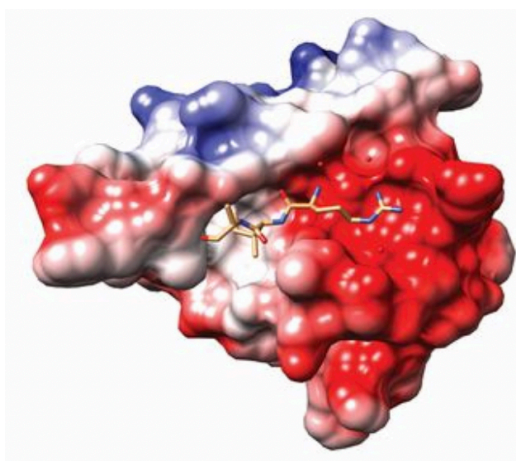
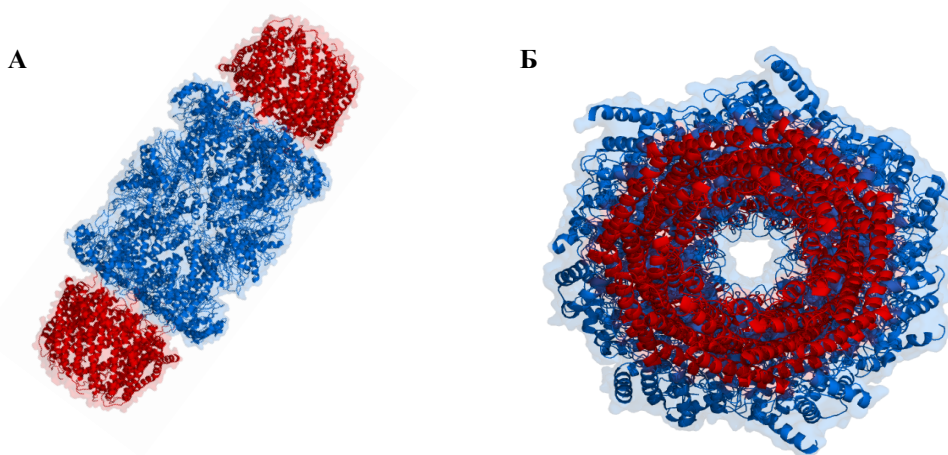


Рисунок 6 — Arg-Lys-His дегрон в сайте связывания лигазы UBR

1.4 Механизм узнавания протеосомой и протеосомальная деградация

Протеосома 26S - белковая машина массой около 2,5 МДа и размером примерно 150 на 113 Å, при этом внутренняя полость имеет диаметр около 50 Å, а «вход» — всего 13 Å [23]. Этот комплекс состоит из трех субъединиц — 20S — также называемой ядерной частицей (CP) — и одной или нескольких регуляторных частиц (RP) 19S (рисунок 7).



А - Боковая проекция; Б - верхняя проекция

Рисунок 7 — Структура протеосомы:

Первый акт прикрепления Ub к белку служит сигналом для E3-лигаз, которые катализируют последовательное присоединение других Ub к первому и затем друг к другу через свои боковые цепи лизина в позиции 48, образуя полиубиквитиновые цепочки [24], которые имеют высокое сродство к Ub-рецепторам Rpn1, 10 и 13, локализованным на RP 19S протеосомы. В качестве альтернативы белок может быть доставлен в 26S с помощью Ub-связывающих белков Rad23, Dsk2/PLIC/Ubiquilin и Ddi1, которые стыкуются с Ub-рецепторами с помощью своих Ub-подобных доменов [25].

После связывания с 19S тег Ub освобождается под действием деубиквитилирующих ферментов DUB и снова может быть активирован E1 [24]. Белок «разворачивается» под действием минимум шести различных АТФаз, локализованных в регуляторной субъединице и подвергается транслокации в ядерный сегмент.

После попадания во внутреннюю полость 20S происходит протеолиз развернутого белка по химотрипсин-, трипсин- и каспазноподобным протеолитическим механизмам [26].

Протеосома не разлагает белки до аминокислот, а производит смесь пептидов, которые, в частности, служат сырьем для адаптивного клеточного иммунитета или строительным материалом для других клеточных структур [27].

1.5 Подходы к рациональному дизайну и синтезу PROTAC

В данном разделе будут рассмотрены методы дизайна и синтеза различных бифункциональных агентов.

Часто встречающимся в литературе сценарием является включение в состав PROTAC уже верифицированных лигандов POI и E3, конструирование линкера и последующая общая оптимизация структуры с учетом организации мишени и/или лигазы, фармакокинетических и фармакодинамических параметров.

Также в последнее время активно разрабатываются направления, фокусирующиеся на разработке новых хемотипов линкерных мотивов или на поиске новых рекрутеров лигаз [6, 10, 7, 28].

1.5.1 Рекрутеры E3 лигаз, подходы к синтезу и оптимизация

В настоящий момент геномом человека кодируется около 600 E3 лигаз [28].

Отметим, что все известные E3 лигазы можно условно разделить на два основных класса в зависимости от их структурной организации и

механизма переноса Ub на субстрат. Лигазы, которые связываются с E2-конъюгирующим ферментом посредством домена RING образуют первый и самый многочисленный класс [29, 30]; RING E3 катализируют прямой перенос Ub на субстрат [31]. Также выделяют HECT-лигазы, первоначально сами связывающие убиквитин с образованием тиоэфирной связи, а уже потом убиквитинилирующие субстрат [33, 34].

1.5.1.1 Первый пример рекрутинга E3, направленного на деградацию

Пионерскими в области направленного протеолиза по праву можно считать работы Craig Martin Crews и, в частности, работу [37]. В качестве мишени, которую необходимо было подвергнуть деградации, коллегами была выбрана метионинаминопептидаза-2 (MetAP-2), которая является цитозольным металлоферментом, катализирующим гидролитическое элиминирование остатка метионина из различных белков. Данная мишень играет важную роль в процессах ангиогенеза: ее ингибирование приводит к замедлению опухолевого роста [38]. Для связывания с мишенью авторами был выбран верифицированный агент овалицин **2**

В качестве рекрутируемой лигазы в данной работе представлен комплекс Skp1-Cullin-F-box (SCF), который состоит из скаффолда на основе члена семейства Cullin CUL1, адаптерного белка SKP1, связанного с ним белками F-box и RING-H2 (также известного как Roc1 или Rbx1).

Данный комплекс вовлечен в процесс регуляции фактора транскрипции NFκB, который контролирует экспрессию широкого круга генов, ответственных за жизнедеятельность клетки. В нормальных условиях NFκB неактивен за счет связывания с белком-ингибитором IκBα, однако в случае действия соответствующих стимулов (в том числе цитокинов, вирусных продуктов) происходит запуск сигнального пути, опосредованного киназой IKK, которая фосфолирует IκBα, при этом ингибиторный белок становится легко узнаваем белком F-Box β-TRCP. За узнавание ответственен небольшой пептидный мотив длиной всего в

10 аминокислот (DRHDSGLDSM). Упомянутая выше ИКК фосфолирует этот фрагмент в положения обоих серинов [39]. Авторы решили использовать данный фосфопептид для нацеливания SCF E3 на MetAP-2. На рисунке 8 представлена структура овалицина **2** и MetAP-2-SCF PROTAC **3**.

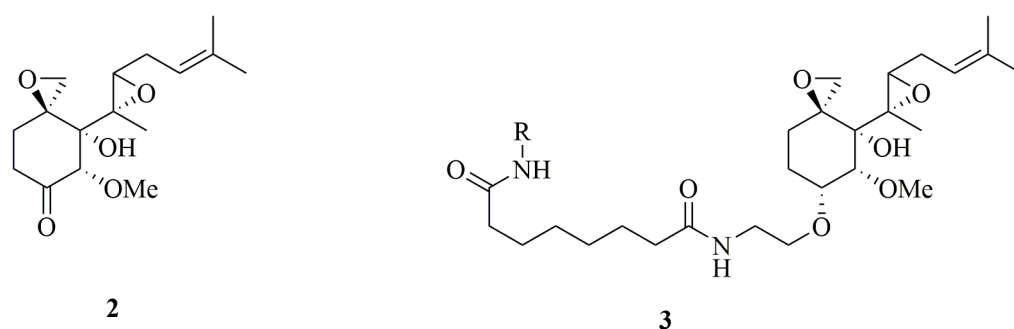
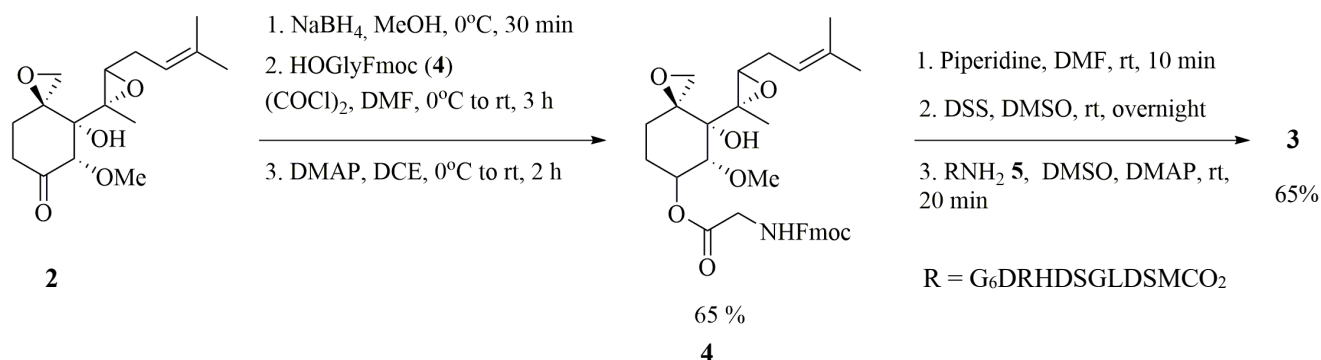


Рисунок 8 — Структуры лиганда POI и конечного PROTAC

На схеме 1 представлен синтез соединения **3**. **2** подвергают *O*-ацилированию; ацилирующий агент генерируют *in situ* с использованием защищенного по аминогруппе глицина и оксалилхлорида; линкерный фрагмент получается при снятии защиты с аминогруппы глицина и действии дисукцинимидилсуберата, данная реакция эквивалентна реакции амидирования. Замещение в получившемся продукте затем сукцинимидного фрагмента на пептид **R** приводит к желаемому **3** с выходом в 70% [37].

Авторы не пояснили выбор линкерного мотива и не провели оптимизацию структуры **3** с целью улучшения эффекта деградации, однако данная работа имеет знаковое значение с точки зрения доказательства возможности Ub-E3-опосредованной деструкции белков на основе индуцированного сближения POI и лигазы [39].

Схема 1



Группа исследователей во главе с профессором Crews затем также продемонстрировали биоагенты, направленные на деградацию рецептора эстрогенов (hERR) и AR человека [40]. Данные соединения были названы Protac-2 и Protac-3 и были синтезированы на основе, соответственно, эстрадиола и ДНТ.

Структура линкерного мотива и фрагмента для рекрутирования лигазы не были изменены [40].

По мнению авторов, и это очевидно, что соединения, содержащие в своем составе массивные пептидные мотивы будут обладать чрезвычайно плохими PK-PD характеристиками с точки зрения их мембранной проницаемости [41].

1.5.1.2 CRBN-лиганды. Дизайн и оптимизация.

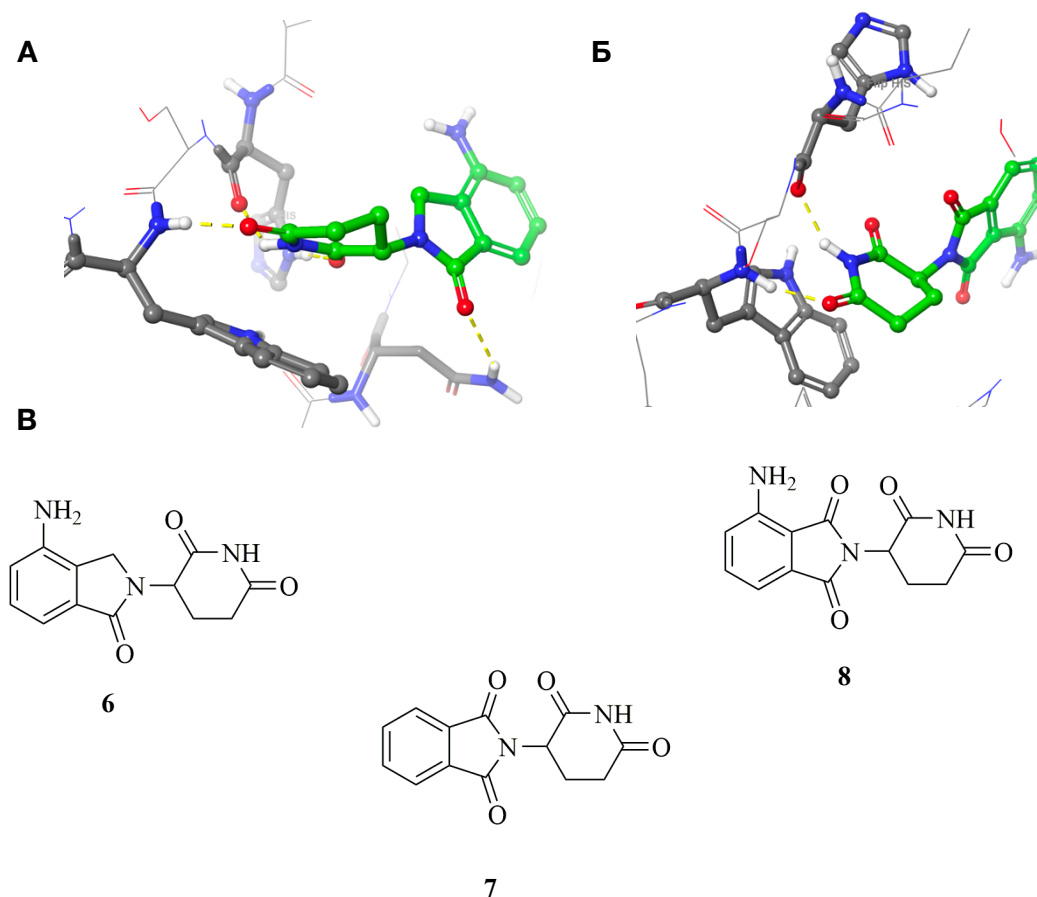
Первоначально одноименный ген, кодирующий CRBN, рецептор субстрата для комплекса CRL4, ассоциировали с развитием легкой умственной отсталости [42]. CRBN, находясь в комплексе с другими компонентами лигазы, регулирует функцию ионных каналов [43], подавляет индукцию производства АТФ, связываясь с АМПК [44], отвечает за отрицательную регуляцию Т-клеток [45], играет роль посредника для IMiD-агентов в процессах иммуномодуляции и подавления ангиогенеза; о последних процессах речь подробнее пойдет ниже.

Путь открытия лигандов, специфически связывающих данную лигазу, начинается с открытия такого препарата как талидомид **7**. Разработанный в начале 1950-х он использовался в качестве легкого успокоительного для беременных [46] однако позже был запрещен из-за чрезвычайной токсичности для плода [47].

Несмотря на это, клинический потенциал талидомида исследовался далее; было выяснено, что искомое соединение помогает эффективно бороться против лепрозной эритемы [48] и множественной миеломы [49]. Затем были синтезированы несколько аналогов, также успешно оказывающих должный цитотоксический эффект на ММ – леналидомид **6** и памолидомид [50].

На тот момент механизм, опосредующий данные эффекты, был неизвестен. В 2010 году группа исследователей под руководством Ito и коллег идентифицировала CRBN в качестве прямой мишени для талидомида [51]. Тогда же стало возможно объяснить молекулярный механизм тератогенности талидомида, равно как и его анти-ММ свойства. Такие же выводы были сделаны и оказались справедливы для его ближайших аналогов [52, 53] (рисунок 9). Характеристики связывания всех IMiDs схожи [13, 54].

Взаимодействие с IMiDs индуцирует конформационные изменения на поверхности CRBN, что приводит к связыванию ряда других белков, названных неосубстратами [55]. При связывании талидомида CRL4-лигаза специфически убиквитинирует SALL4, что приводит к его протеосомальной деградации [55].



А — Связывание леналидомида с CRBN (PDB ID: 4CI2 [13]); Б — связывание помалидомида с CRBN (PDB ID: 4TZU [13]); В — структуры IMiDs

Рисунок 9 — Модели связывания и структуры IMiDs

SALL4 является эмбриональным фактором транскрипции, участвующим в процессах развития конечностей плода. Леналидомид и помалидомид позволяют узнавать факторы транскрипции Ikaros и Aiolos (кодированные генами *IKZF1* и *IKZF3* соответственно). Деградация этих белков позволяет увеличить экспрессию IL-2 и других цитокинов, что опосредует анти-ММ эффект [52].

Также на основе лигандов CRBN разработано большое количество молекулярных клеев [56-59].

Возвращаясь к PROTAC, отметим работы Winter и Buckley, которые в 2015 впервые сообщили об успешной деградации важных с точки зрения терапии лейкозов коактиваторов транскрипции BRD4 и FKBP12

CRBN-зависимым образом [60]. Коллеги выбрали известный ранее ингибитор BRD4 JQ1 **9** [61] и создали на его основе эффективный бифункциональный агент **10**, PROTAC-FKBP12 **11** [62], как и PROTAC-BRD4, представлены на рисунке 10.

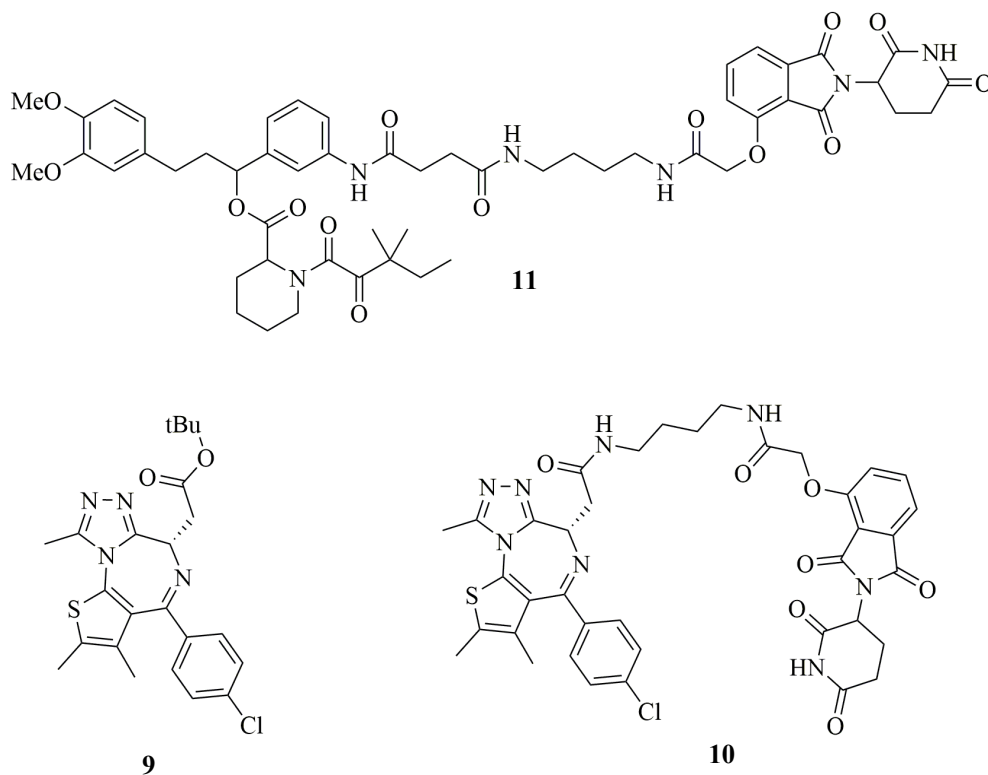
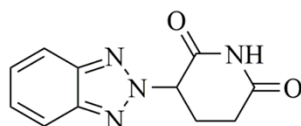


Рисунок 10 — Ингибитор BRD4 JQ1 (**9**), PROTAC для BRD4 (**10**) и FKBP12 (**11**)

Наряду с упомянутыми выше PROTAC в том же году Crews и коллеги также сообщили о химере для BRD4 [63] на основе CRBN.

В своей недавней работе Hartmann и коллеги продемонстрировали аналог талидомида, модифицированный путем замены центрального фталимидного мотива на бензотриазол (соединение **12** на рисунке 11). Авторам удалось увеличить показатели аффинности по сравнению с **7** при сохранении идентичного режима связывания [64].



12

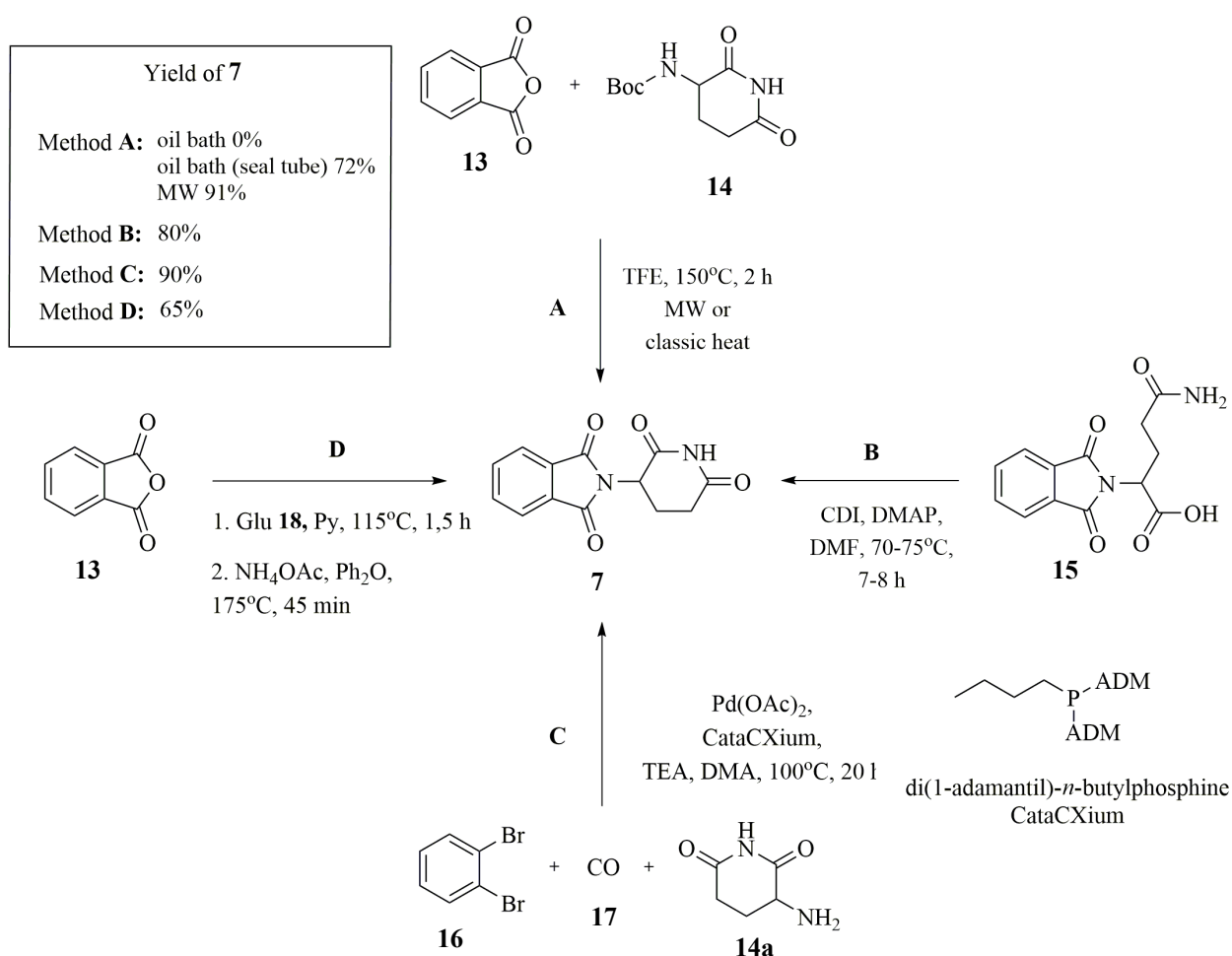
Рисунок 11 – Бензотриазоловый аналог талидомида

Сейчас же лигаза CRBN (наряду с VHL) является одной из самых часто рекрутируемых лигаз [64]; среди Cereblon-PROTAC, направленных на деградацию киназ, известны химеры для CDK [65], EGFR [66], BTK [67], ALK [68] IRAK 3 и 4 [69], СК [70]. Среди PROTACs, разработанных для убиквитинилирования других мишеней, можно выделить соединения для гистон деацетилазы HDAC6 [71, 72], α 1A-адренергического рецептора [73], индоламин диоксигеназы IDO1 [74], цитохрома P450 CYP1B1 [75], а также Тау-белка [76]

В настоящий момент практически все IMiDs доступны в различных модификациях в большинстве коммерческих каталогов, часто можно встретить какой-либо CRBN-лиганд, уже конъюгированный с различными линкерами [77], однако необходимость в полном синтезе рекрутеров все же остается.

Все IMiDs синтезируются похожим образом. Методы сборки талидомида представлены на схеме 2.

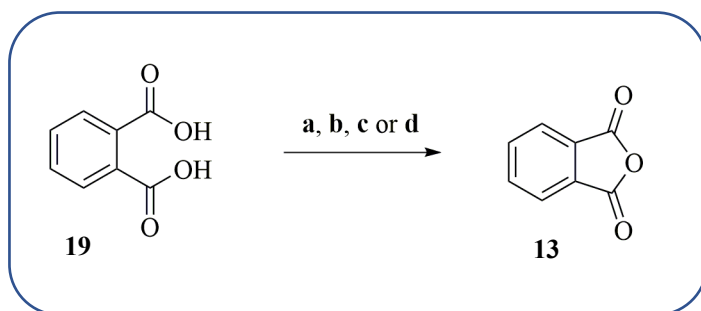
Метод **A** включает конденсацию фталевого ангидрида **13** и glutarimida **14**[78], который может быть введен в виде алифатического глутамина и лишь потом подвергнут циклизации (метод **B**) [79, 80].



Интересный способ синтеза талидомида путем двойного карбонилирования дибромбензола **16** в присутствии различных аминов, а конкретно 3-аминопиперидин-2,6-диона **14a** (метод **C**) представлен в работе [81]. Реакция проводится в присутствии каталитического комплекса Pd. Стратегия, заключающаяся в конденсации **13** и глутаминовой кислоты **18** и циклизации реализована в работе [82]; конденсация осуществляется в присутствии пиридина (Метод **D**).

Фталевый ангидрид **13**, а также его замещенные аналоги, часто генерируют из фталевой кислоты или ее производных реакцией с уксусным ангидридом [83], оксалилхлоридом [84], и другими реагентами дегидратации [85-87] (схема 3).

Схема 3

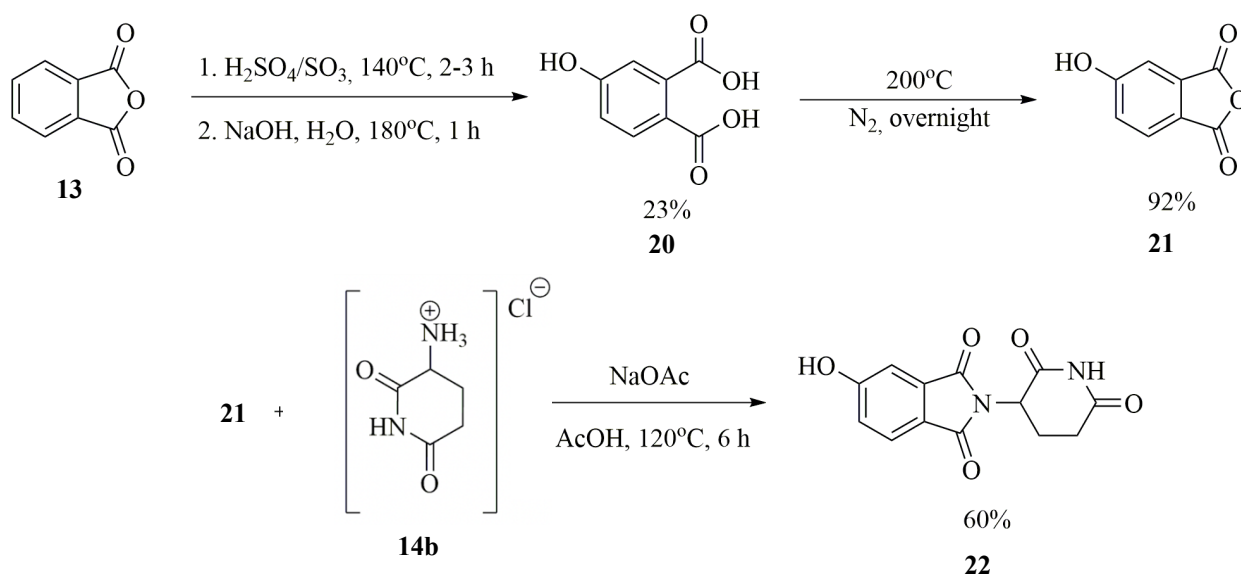


- a.** Ac₂O, reflux, 10 min 90%
- b.** (COCl)₂, DMF, reflux, 3 h 93%
- c.** PPh₃/CBrCl₃, TEA, reflux, 8-9 h 97%
- d.** Cl₃CCN, TEA, THF, rt, 1 h 78%

Получение 3 и 4-замещенных производных талидомида, включая леналидомид **6** и памолидомид **8**, во всех случаях включает конденсацию соответствующего производного фталевого ангидрида с глутаримидным мотивом по любому из методов, представленному на схеме 2 [88]

Сборка 4-гидроксизамещенного фталевого ангидрида представлена на схеме 4 и заключается во внутримолекулярной циклизации коммерчески доступной 4-гидроксифталевой кислоты [78, 89, 90]. В литературе описан метод приготовления **21** путем сульфирования **13** [91] с последующим щелочным гидролизом [92]. Нагревание без растворителя позволяет получить **21** с отличным выходом [90]. Дальнейший ввод гидрохлорида глутаримида **15b** приводит к 4-гидрокситалидомиду **22**.

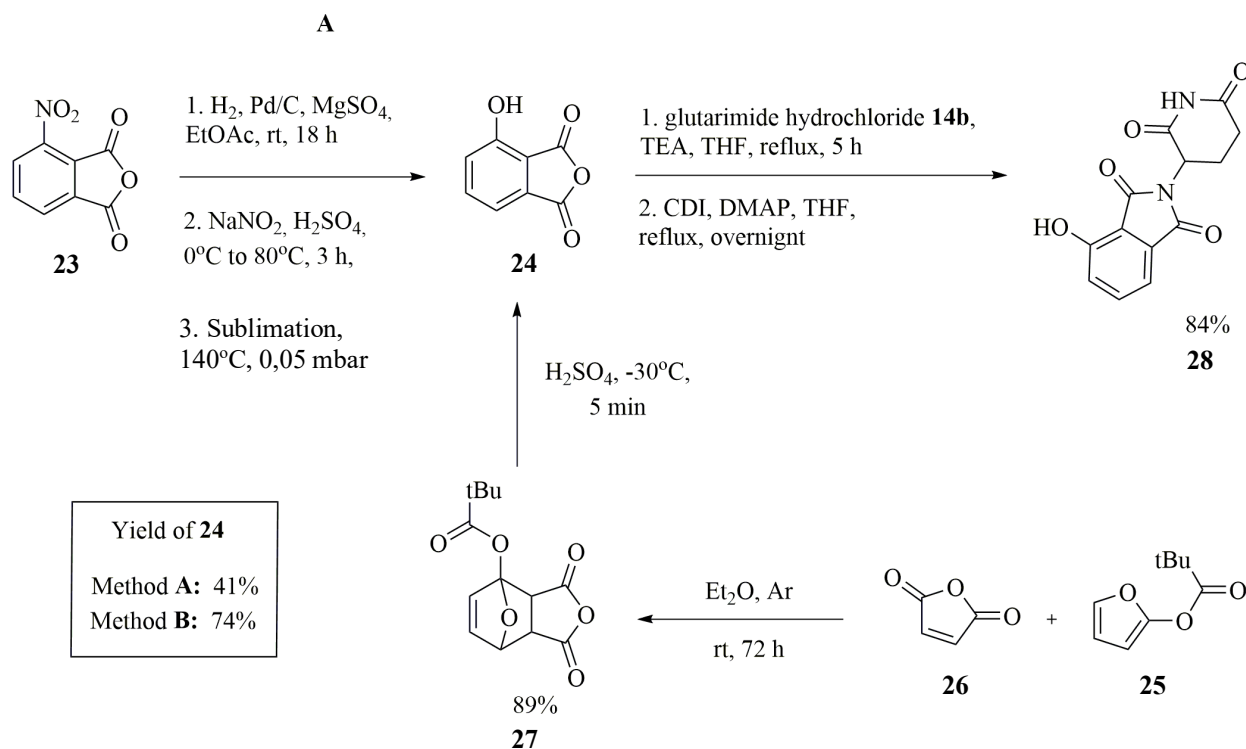
Схема 4



Генерация 3-гидроксифталевого ангидрида **24** может осуществляться путем восстановления соответствующего нитропроизводного **23**, его диазотирования и дальнейшего замещения диазогруппы на гидроксил (метод **A** на схеме 5) [88].

Интересный вариант (метод **B** на схеме 5), включающий реакцию циклоприсоединения малеинового ангидрида **26** и фурана **25**, продемонстрирован в работе [93], где авторы также предлагают получить 3-гидроксизамещенный аналог талидомида классической конъюгацией с глутаримидом, сопровождающейся выходом **28** в 84%.

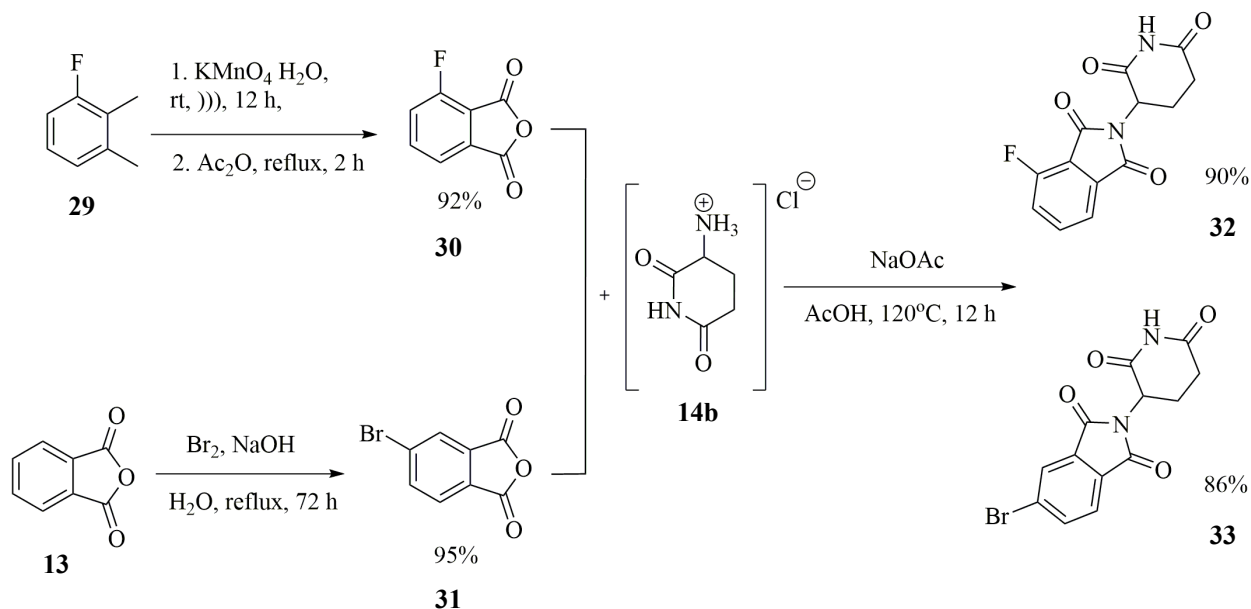
Схема 5



На схеме 6 представлены синтезы галогензамещенных аналогов **7** [94, 95]. Синтез 3-фторталидомида **32** на первых этапах предполагает окисление соответствующего фторированного *o*-ксилола **29** действием перманганата калия и последующую циклизацию с получением ангидрида **30** [95]. Синтез 4-бром аналога предполагает прямое бромирование фталевого ангидрида [94] с превосходным выходом **31**. В

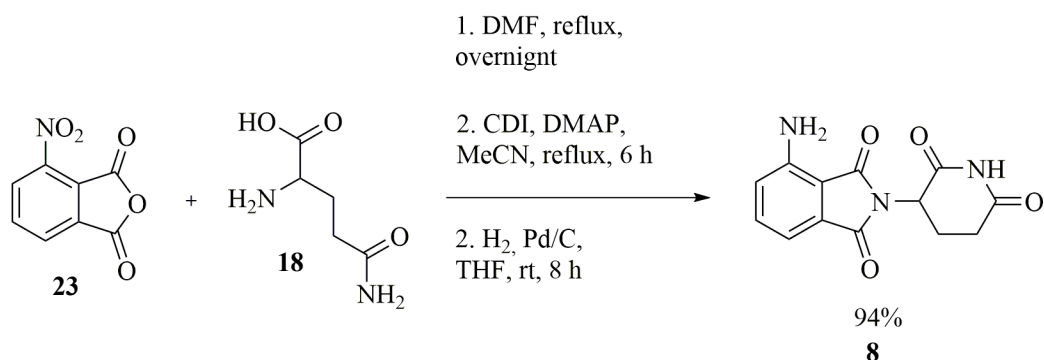
обоих случаях дальнейшая конъюгация с **14b** ведет к желаемым **32** и **33** с отличными выходами [96].

Схема 6



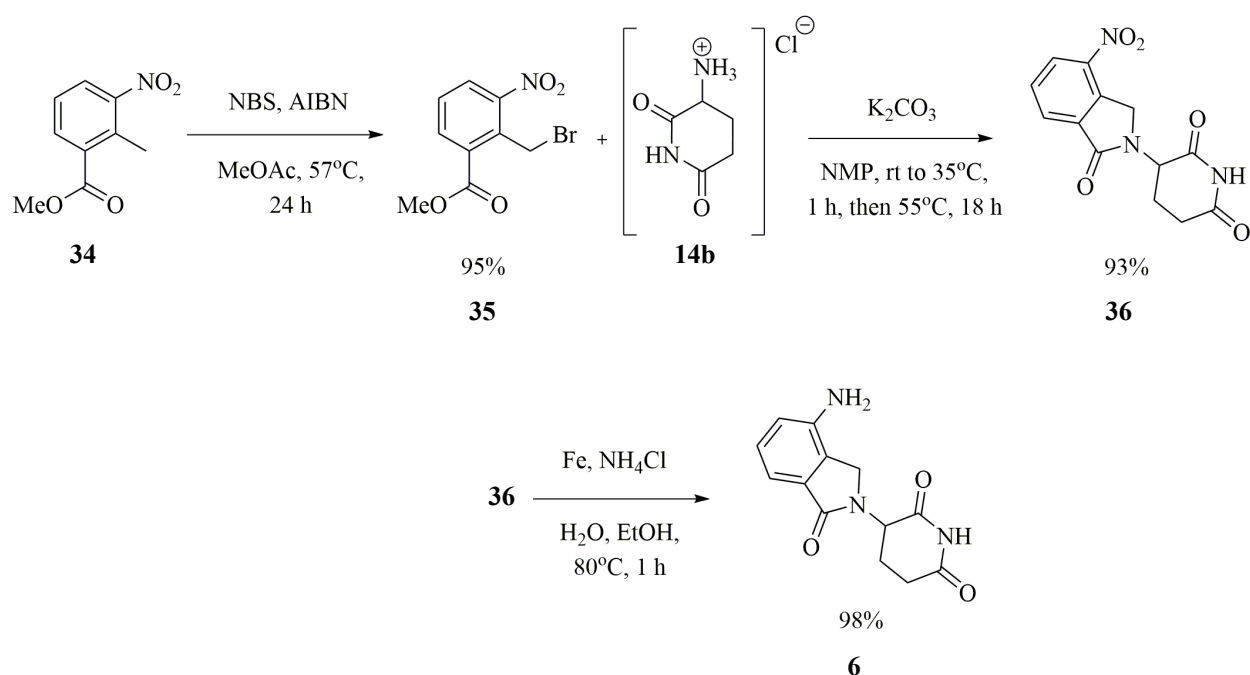
Суть получения помалидомида **8** заключается в использовании всех вышеописанных синтетических методов (схема 2) по отношению к 3-нитрофталевому ангидриду, который легко нитруется. Нитро-группа затем подвергается восстановлению [97]. (схема 7).

Схема 7

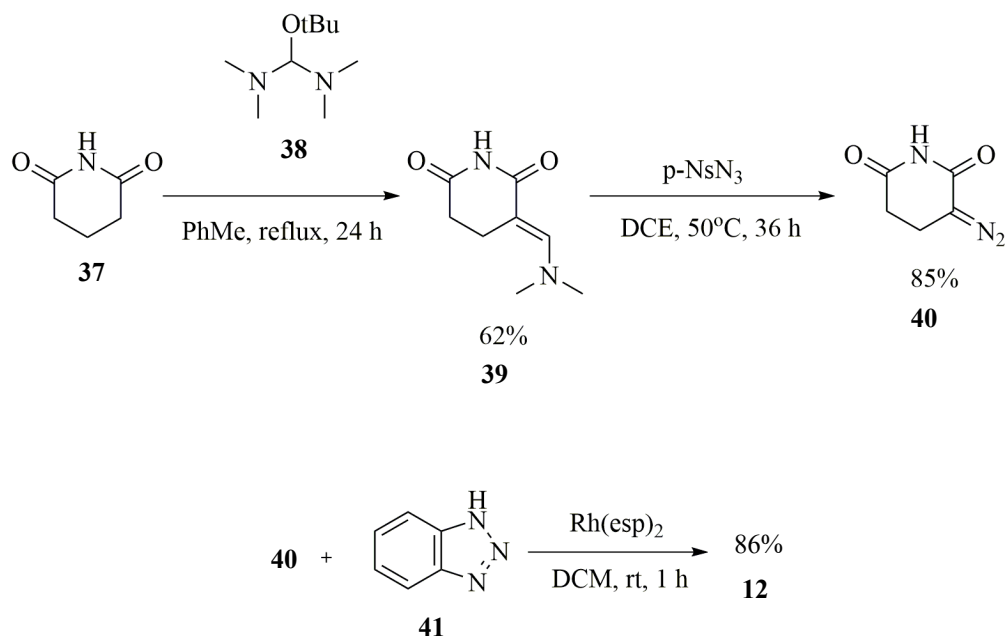


Методы приготовления леналидомида **6**, содержащего только один карбонил в изоиндолиноновом фрагменте, основываются на внутримолекулярной конденсации 5-нитро-2-карбокситолуола **34**, который подвергается галогенированию по своему метильному заместителю действием NBS, циклизации с глутаримидом **14b** и восстановлению нитро-группы [98] (схема 8).

Схема 8



На схеме 9 представлен синтез триазолсодержащего аналога талидомида, описанного в работе Hartmann и коллег [64]. На первом этапе глутаримид **37** подвергали метиленированию в α -положение цикла с помощью реагента Бредерика **38** [99]. Полученный **39** вступал в реакцию Регица, представляющую перенос диазогруппы от 4-нитрофенилсульфониазида (NsN₃) на активную метиленовую группу, с получением **40**. Алкилирование бензотриазола по N² при активации комплексом родия позволило получить желаемый продукт **12** с отличным выходом [64].



1.5.1.3 Некоторые другие рекрутеры

Наряду с CRBN существует еще одна часто используемая в контексте PROTAC — конъюгат элонгинов В и С, Rbx1, Cul2 (VBC-Cul2), в состав которого входит белок-супрессор опухоли фон Хиппеля-Линдау (VHL) [100]. Структура **40**, используемая в качестве рекрутера VHL [101] — на рисунке 12.

Еще в попытках создать непептидный лиганд для SCF и VHL исследовательская группа Crews обратила внимание на онкосупрессор p53, который инактивируется путем связывания с комплексом MDM2 [102]. Ранее были разработана серия конкурентных антагонистов MDM на основе *цис*-имидазолина (**42**) [103]. На их основе Crews и коллеги смогли синтезировать PROTAC, успешно примененный для деградации AR [58]. Известны химеры, направленные на MDM2-опосредованный протеолиз BRD4 [60].

Лигаза E3 cIAP1, cIAP2 и cIPX являются негативными регуляторами апоптоза. Разработка ингибиторов IAP представляет собой перспективную терапевтическую стратегию [61]. Natio и коллегами было

показано, что активность cIAP1 может модулироваться с помощью метилбестатина и его эфиров (**41**): при их действии cIAP1 подвергается аутоубиквитинированию и деградации [64, 65].

Также известны ковалентные рекрутеры E3. Лиганд лигазы RNF4 (белок, содержащий домен цинкового пальца и домен RING 4) CCW 16, ковалентно связывающийся с Cys (**43**), также изображенный на рисунке 12, использован для синтеза химер против BRD [65].

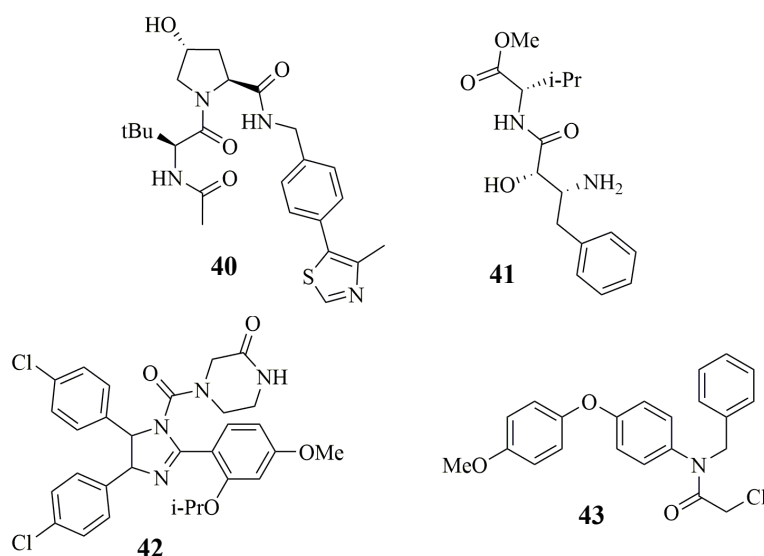


Рисунок 12 — Нековалентные рекрутеры VHL (**40**), cIAP1 (**41**), MDM2 (**42**), ковалентный рекрутер RNF4 (**43**)

1.5.2 Линкеры. Дизайн, оптимизация и синтез

Линкерный мотив является важным структурным элементом молекулы PROTAC и служит хорошим плацдармом для оптимизации структуры. От длины и состава линкера зависит стабильность тройного комплекса POI-PROTAC-E3, эффективность деградации [104]. В данном разделе рассмотрены основные мотивы, используемые в качестве соединительных, подходы к их выбору и оптимизации, методы синтеза.

1.5.2.1 Многообразие использующихся линкеров

В настоящий момент не существует какого-либо общепринятого набора правил проектирования эффективного PROTAC для любой пары ROI-E3 с точки зрения дизайна линкера [105]. Для выбора оптимального связующего мотива требуется достаточно большое число проб и ошибок, многочисленный синтез массивных библиотек соединений [69, 106-110]. Распространёнными мотивами для сопряжения боеголовок PROTAC являются алкильные и PEG цепи различной длины; в соответствии с базой опубликованных химер PEG является единственным мотивом в 54% соединений, алифатический метиленовый линкер — в 31% [105, 111]. На рисунке 13 — пример PROTAC CRBN-EGFR **44** [111], содержащий алкильный соединительный мотив, PROTAC CRBN-BRAF **45**, содержащий PEG-линкер [112].

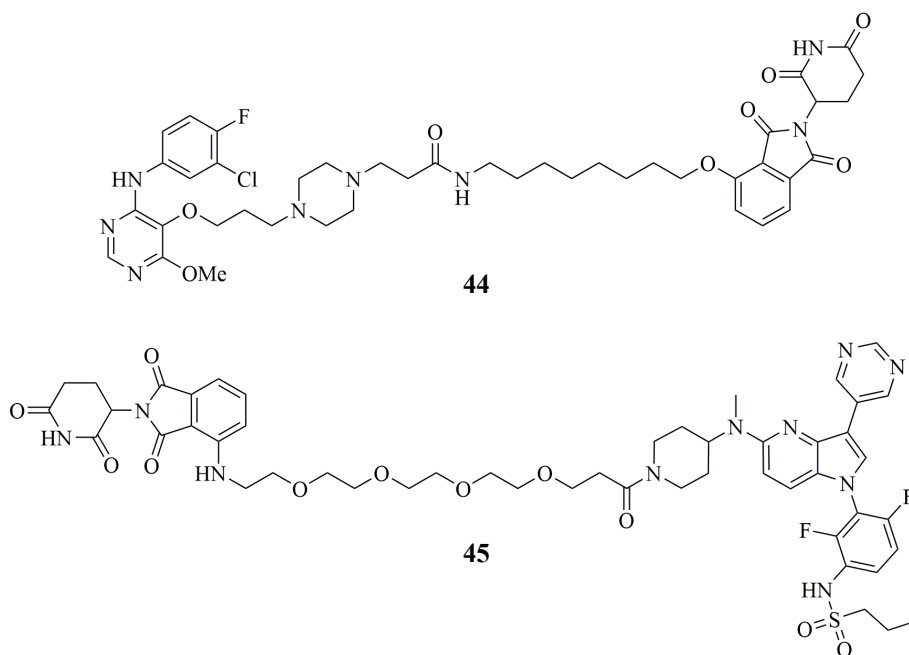


Рисунок 13 — PROTAC против EGFR **44**, содержащий метиленовый линкер. PROTAC против BRAF **45**, содержащий PEG-линкер

Метиленовые линкеры из-за высокой подвижности позволяют боеголовкам легко приобретать нужную для связывания с белками первичную ориентацию [96]. PEG-мотивы менее лабильны, однако

позволяют улучшить липофильность PROTAC [113]. PEG-звенья часто можно встретить в линкерах комбинированного типа [114].

Одно из последних достижений в области дизайна PROTAC – использование триазолсодержащих «клик»-линкеров [105]. Авторы нескольких работ подчеркивают чрезвычайную легкость сборки с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Такие линкеры облегчают конструирование объемных библиотек соединений [70, 114-116] На рисунке 14 — одна из химерных молекул, направленных на деградацию CDK6 [114] **46** (алкиновый фрагмент придает конформационную жесткость конструкции линкера, однако может быть восстановлен).

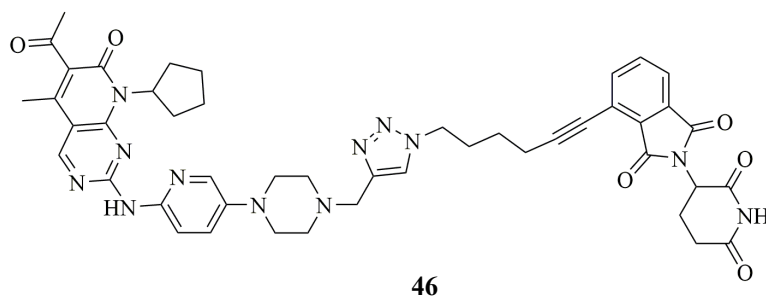


Рисунок 14 — PROTAC против CDK6 **46**

Стоит упомянуть также концепцию сопряжения боеголовки CLIP-TAC (PROTACs, способные к клик-конъюгации *in vivo*), предложенную Lebraud и коллегами [17]. В рамках данной стратегии предлагается повысить клеточную проницаемость деградеров за счет ввода двух тегированных фрагментов будущей химеры и биортогональной сборки полноценного PROTAC *in vivo* [105]. Методология базируется на реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEDDA). На рисунке ниже CLIP-TAC, направленный на деградацию BRD4 (рисунок 15).

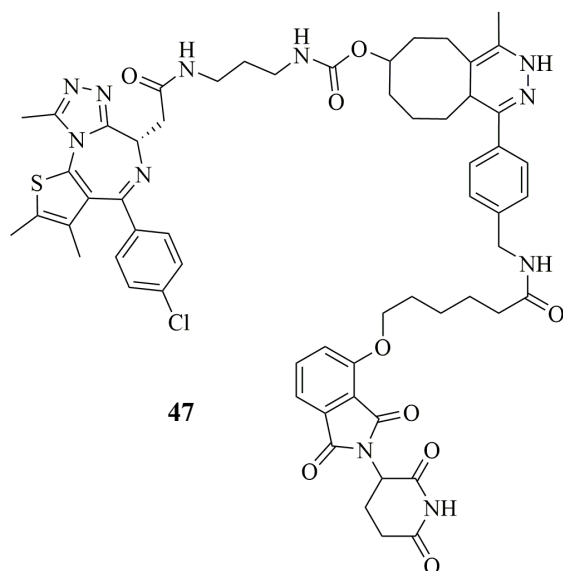


Рисунок 15 — CLIPTAC, направленный на деградацию BRD4 (47)

Не менее важны т. н. «жесткие» конструкции, включающие в свой состав гетероциклические (пиперазиновые [118] или пиперидиновые [119]) или алкиновые мотивы [120, 121]. Примеры некоторых PROTAC [118, 119] изображены на рисунке ниже (рисунок 16)

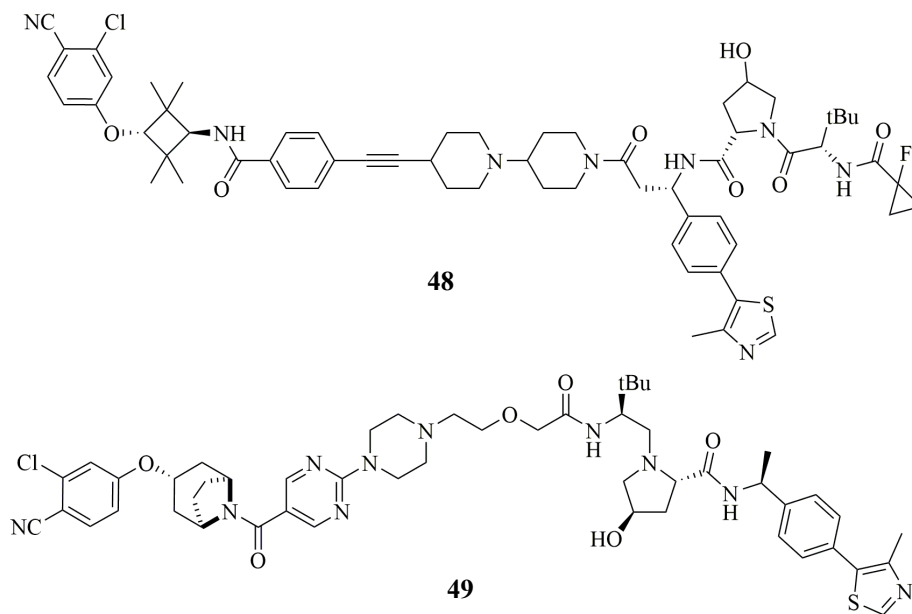


Рисунок 16 — PROTACs 48 и 49, направленные на деградацию AR, содержащие жесткие гетероциклические и/или алкиновые линкеры

1.5.2.2 Подходы к дизайну линкеров

Как уже упоминалось ранее, стратегии подбора линкерного мотива в универсальном формате не существует. Тем не менее, можно выделить определенные стадии с точки зрения пошагового рационального дизайна линкерных мотивов.

Первый этап — определение точек конъюгации линкера и боеголовок с помощью *in silico* анализа комплексов POI-лиганд и рекуртер-ЕЗ.

В работе [121], посвященной ALK PROTAC, *in silico* анализ X-Ray структуры ALK (PDB ID: 3AOX [122]), закристаллизованный с верифицированным лигандом алектинибом [122] показал, что морфолин ориентирован в область, доступную для растворителя и лучше всего подходит для конъюгации с линкером (рисунок 17).

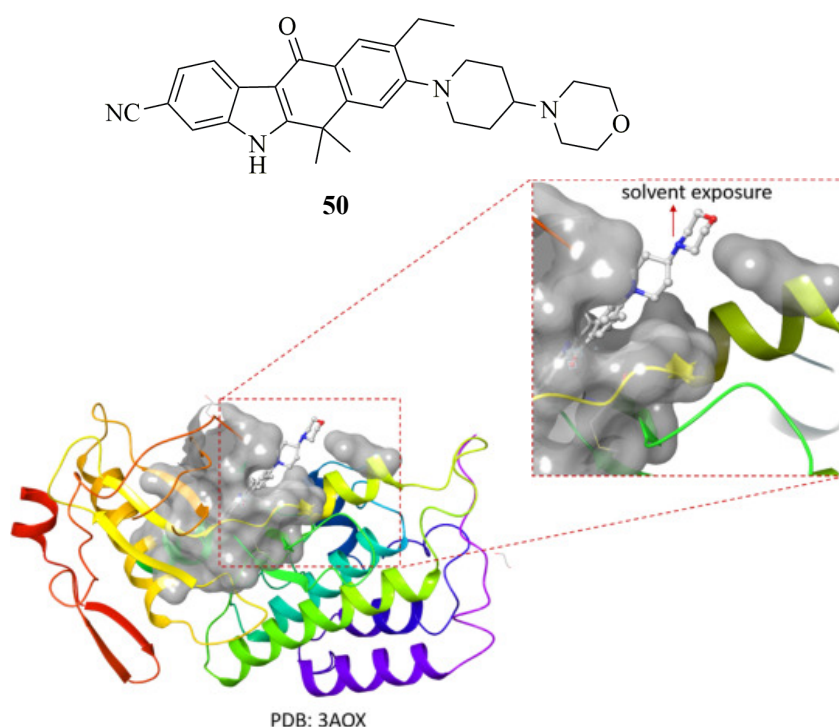


Рисунок 17 — Соединение **50** в активном сайте ALK (PDB ID: 3AOX [122])

Анализ связывания ингибитора фосфатидилинозитол-3 киназы ZSTK474 с активным сайтом PI3K в работе [3] (рисунок 18 — комплекс ZSTK474-PI3K; PDB ID: 2WXL [123]) показал, что один из морфолиновых заместителей триазольного ядра не обременен какими-либо взаимодействиями и подходит для прикрепления связующего мотива. Данная точка и была использована авторами после превращения морфолинового заместителя в пиперазиновый для конъюгации [3].

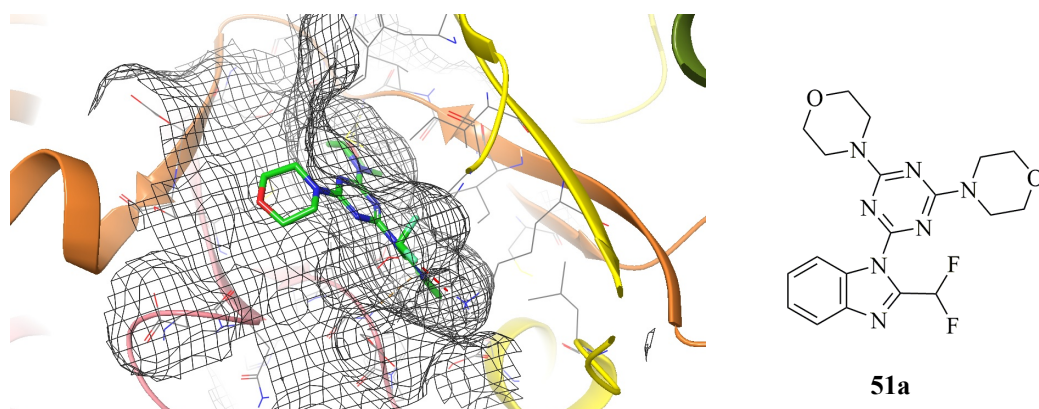


Рисунок 18 — Связывание **51** в сайте PI3K (PDB ID: 2WXL [123])

Важность выбора точки конъюгации была продемонстрирована в работе [124]. Разрабатывая PROTAC, ориентированный на деградацию ВТК, авторы первоначально присоединили POI-линкер к **6** через аминогруппу в 4 позиции изоиндолинового ядра и удовлетворительная деградация была показана при 1 мкМ, однако конъюгация через 5-аминогруппу привела к самому эффективному соединению — деградация наступала при 100 нМ [124]. Авторы предполагают, что такая модификация структуры химеры опосредует увеличение стабильности комплекса POI-PROTAC-CRBN за счет оптимизации геометрии [124].

Вторым шагом после идентификации точек конъюгации линкеров является определение диапазона оптимальной длины [105, 106, 125]

Например, в предыдущем кейсе [124] авторы на основе простых алифатических линкеров определили оптимальный диапазон длины в районе 8-12 атомов, при чем уменьшение концентрации оптимальной деградации происходило при уменьшении длины от 12 до 8 атомов, а дальше концентрация резко увеличивалась [124].

Авторы работы [126], посвященной разработке PROTAC против p38 α , синтезировали объемную библиотеку соединений с помощью реакции азид-алкинового циклоприсоединения, варьируя длину цепи линкера метиленовыми вставками по обе стороны от триазолового ядра. Коллеги выяснили, что соединительные мотивы в 15-17 атомов обуславливает оптимальную деградацию, уровни которой резко падают при уменьшении длины [126].

Коллеги в работе [127] отмечают, что SAR, сопровождающееся систематическим уменьшением длины является наиболее оптимальной стратегией.

Заключительным этапом после установления векторов конъюгации и определения необходимой длины является SAR-исследование, направленное на улучшение PK/PD-свойств PROTAC, увеличение стабильности тройного комплекса путем оптимизации межбелковых контактов и т. д.

Farnaby и коллеги в работе [128], посвященной направленному протеолизу активатора транскрипции ATFазы SNF2L2 (SMARCA2/4), первоначально разработали серию PROTAC, имеющих различные PEG-линкеры, установили оптимальную длину, однако столкнулись с плохой клеточной проницаемостью, обусловленной, по мнению авторов, подвижностью такого типа линкеров [127, 128]. Коллеги увеличили жесткость структуры путем введения бензольного кольца в область соединительного мотива, что также позволило образовать новое стэкинговое взаимодействие, дополнительно повышающее стабильность.

В ходе разработки PROTAC, направленного на деградацию AR VHL-зависимым образом [119] также выяснилось, что введение в состав линкера жестких группировок (алкиновые фрагменты, пиридиновые и пиперазиновые вставки) позволяет увеличить показатели деградации мишени по сравнению с использованием классических PEG/метиленовых звеньев [119].

В замечательном обзоре [129] отмечается, что более жесткие конструкции химер позволяют увеличить стабильность тройного комплекса путем уменьшения возможного числа благоприятных конформаций.

В заключение отметим, что, несомненно, серьезнейший вклад в развитие рационального дизайна PROTAC вносят методы компьютерного моделирования. Все вышеперечисленные примеры основываются в основном на концепциях CADD. В работах [129-131] описываются перспективные способы *in silico* дизайна молекул PROTAC, позволяющих оптимально сконструировать состав линкера с помощью процедур молекулярной стыковки, межбелкового докинга, методов конформационного анализа и молекулярной динамики.

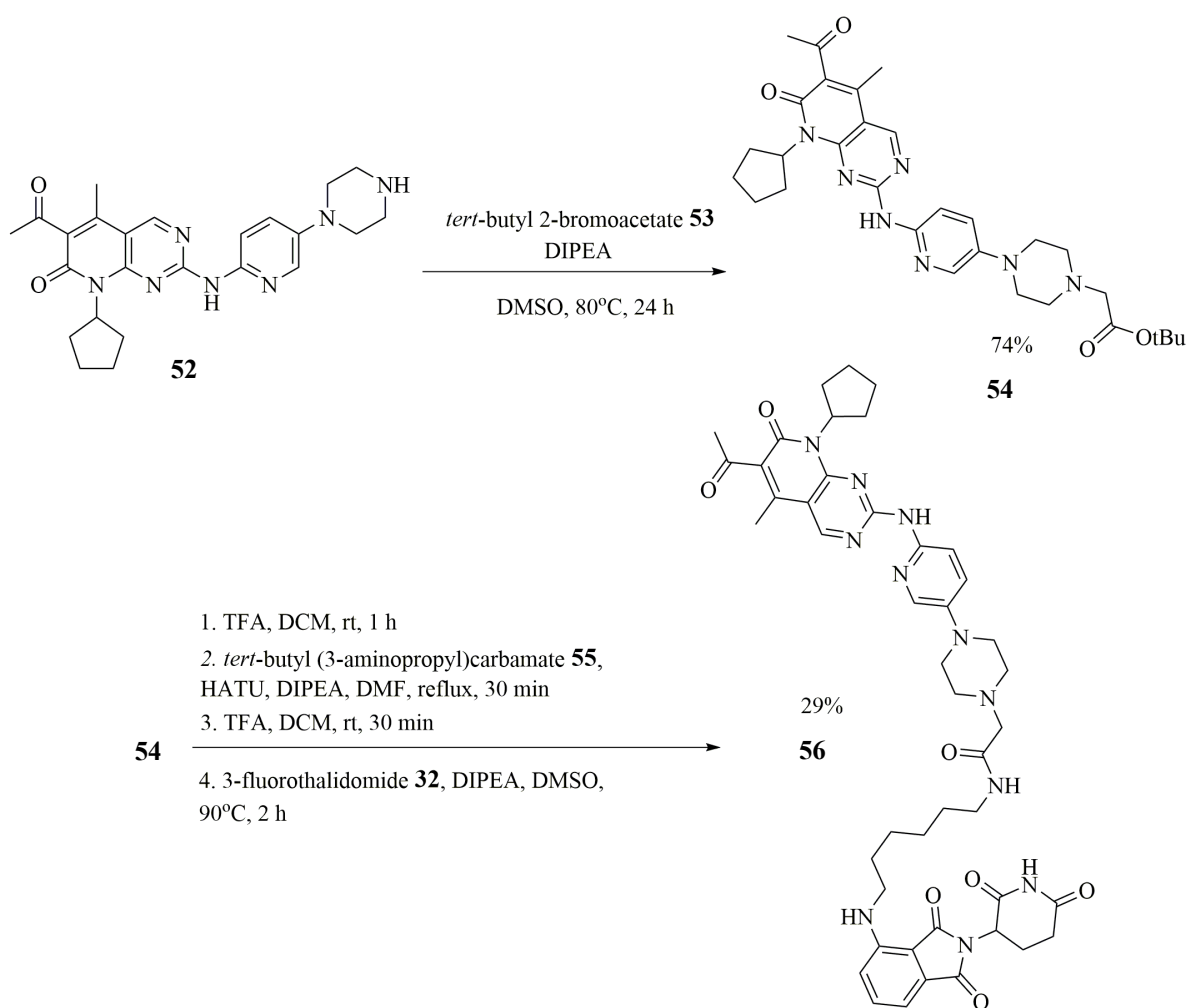
1.5.2.3 Синтез линкеров PROTAC

В подавляющем большинстве работ не представлен синтез метиленовых соединительных мотивов [105]; используются коммерчески доступные амино- или галогенкислоты с нужной длиной цепи. Большинство прекурсоров для соединительных мотивов (в частности, PEG и метиленовых линкеров) являются коммерчески доступными веществами, часто присутствующими в каталогах уже в виде конъюгатов с различными рекрутерами E3 лигаз [105, 127].

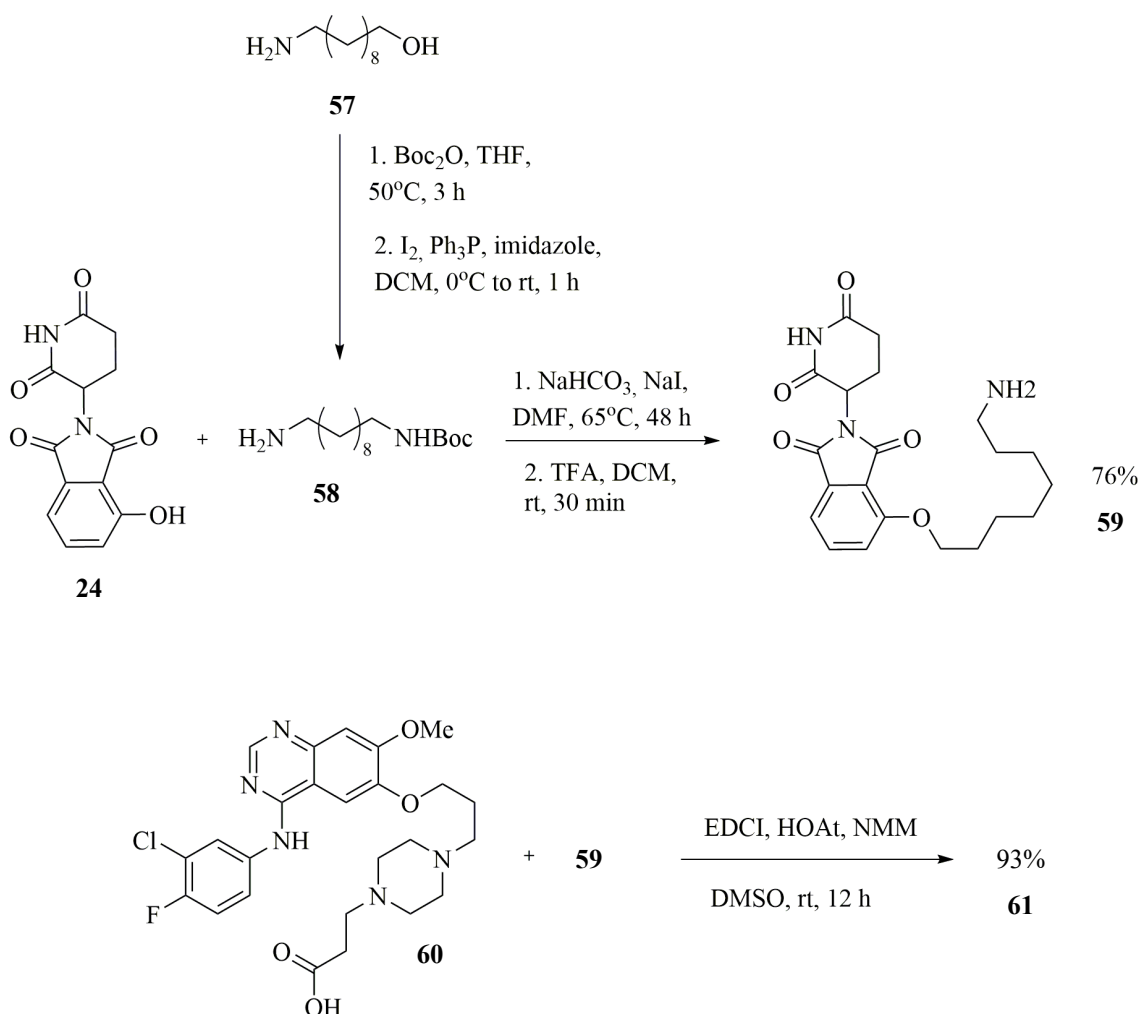
Конъюгация боеголовок PROTAC при использовании метиленовых линкеров осуществляется с помощью галогенкислот, аминокислот, их ангидридов или амидов с линейным углеродным скелетом нужной длины [113, 132, 3]. Как продемонстрировано на схеме 10,

нуклеофильное замещение защищенной бромуксусной кислоты с пиперазиновым фрагментов лиганда ROI обеспечивает первую точку конъюгации линкера, который вводится в виде линейного алифатического диамина, затем легко взаимодействующего с фторталидомидом [132].

Схема 10



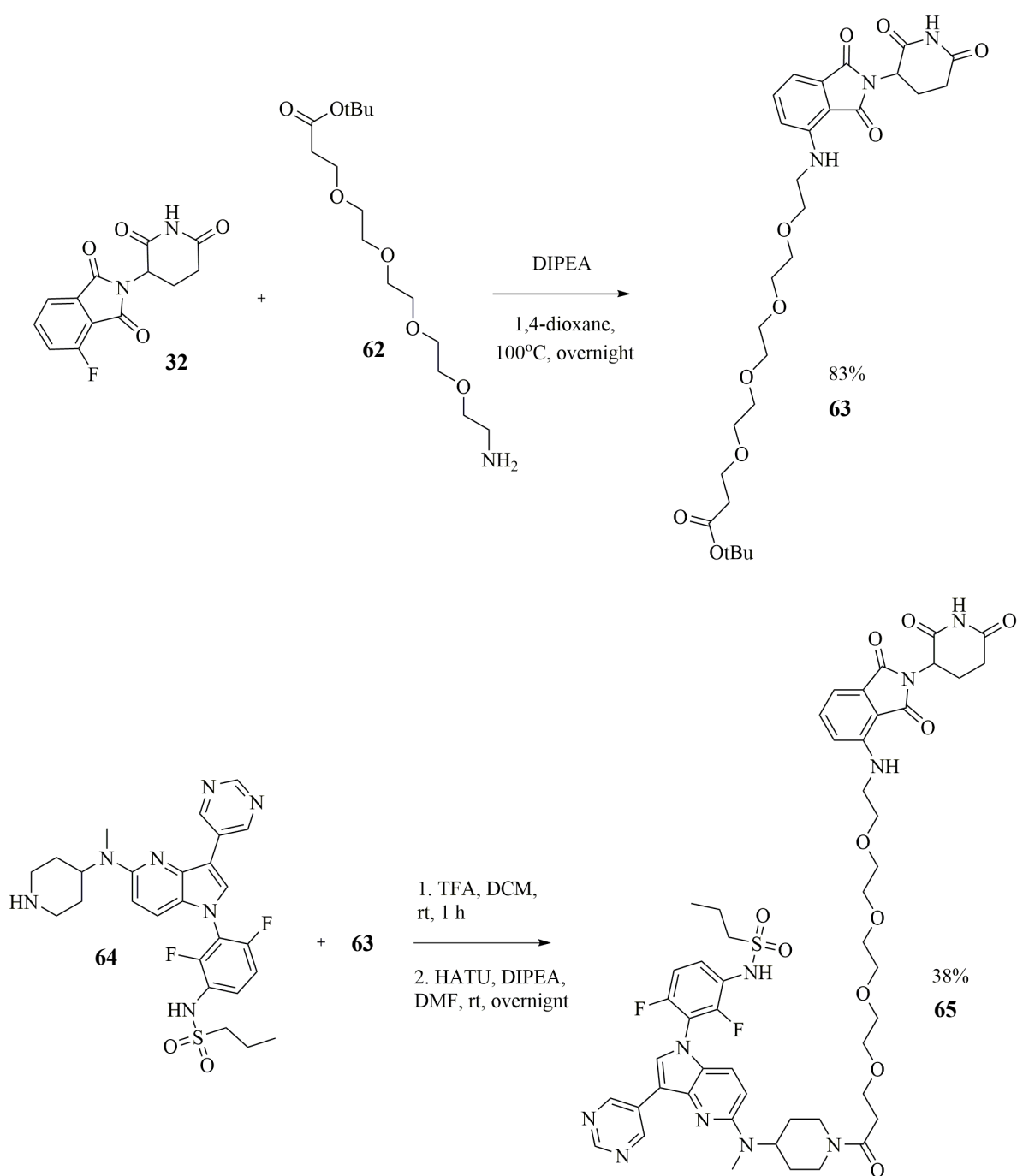
Иной вариант предполагает ввод линкера в виде защищенного галогенамида (схема 11), связывающего гидрокситалидомид, и амидирующего лиганд ROI по карбоксилу [111]. Подготовка линкера к конъюгации происходит путем замещения гидроксида на галоген и защиты NH₂ в соответствующем аминспирте [134]



Ввод PEG линкеров достигается за счет реакций амидирования, *N*-алкилирования или нуклеофильного замещения.

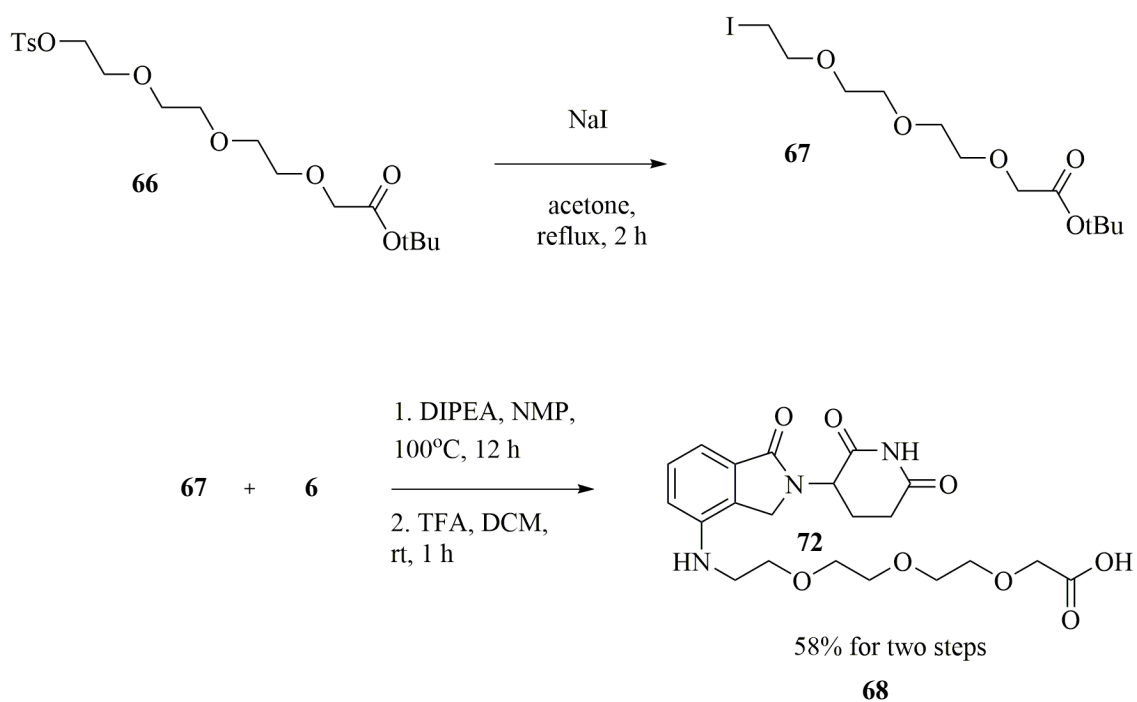
Первый вариант реализуется в работе, посвященной синтезу и оптимизации BRAF PROTAC **60** [112]: коммерчески доступная PEG₄-аминокислота **57** сначала нуклеофильно замещает фтор в **56**, а после образует амид с рекрутером BRAF **59** (схема 12).

Схема 12



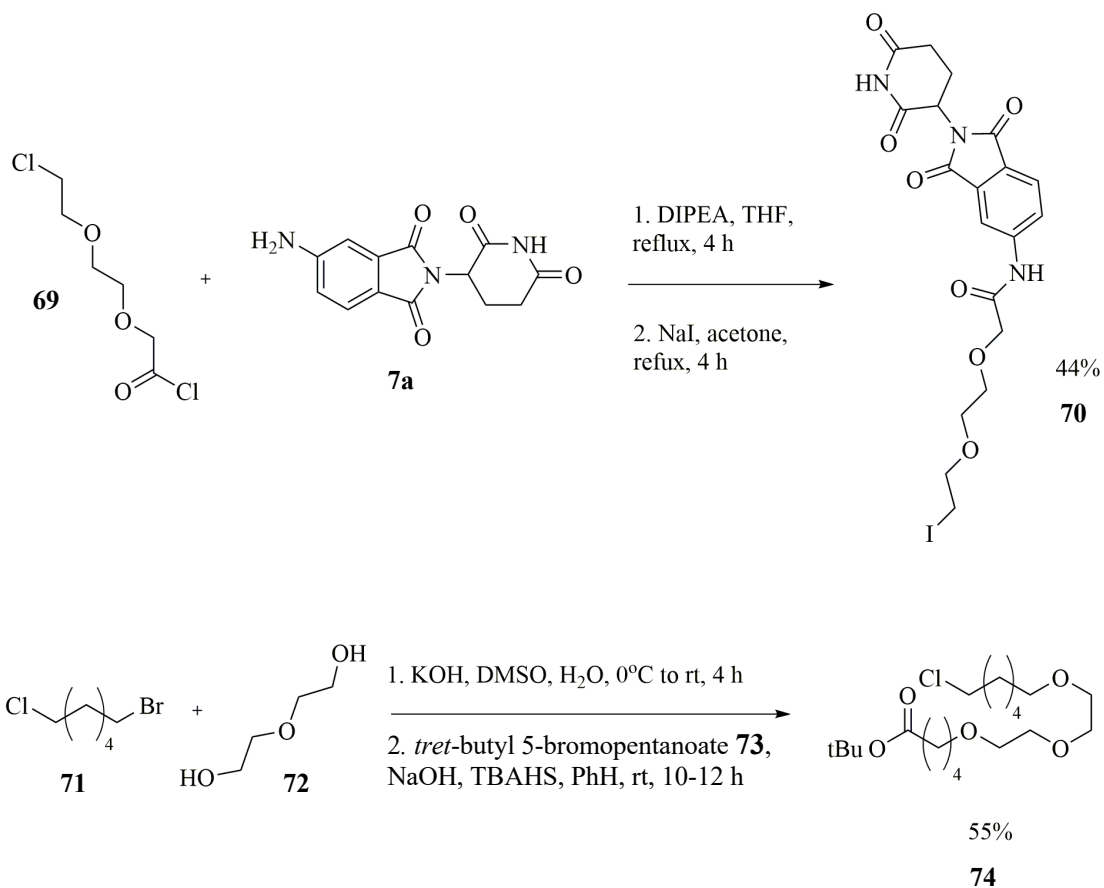
N-алкилирование – редкий способ конъюгации с CRBN-лигандами из-за сильного акцепторного влияния карбонильных групп, однако данная стратегия реализуема для леналидомида [136] (схема 13).

Схема 13



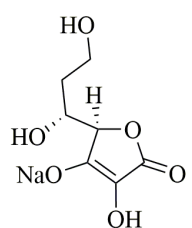
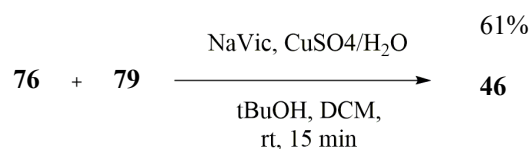
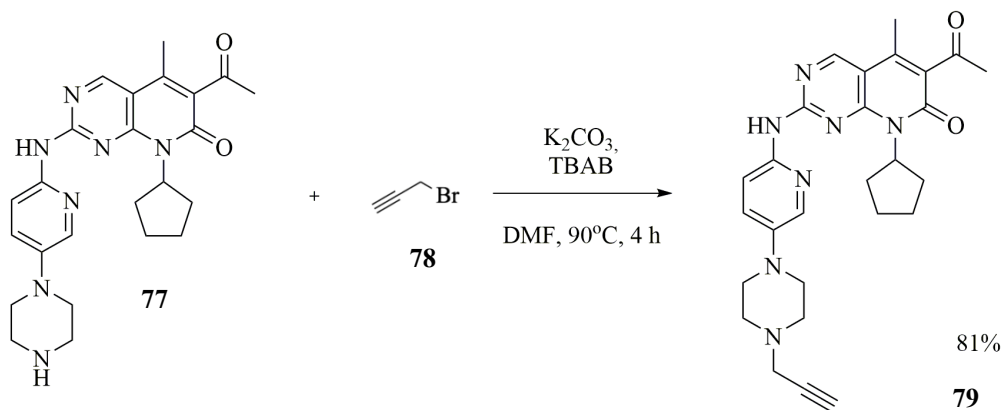
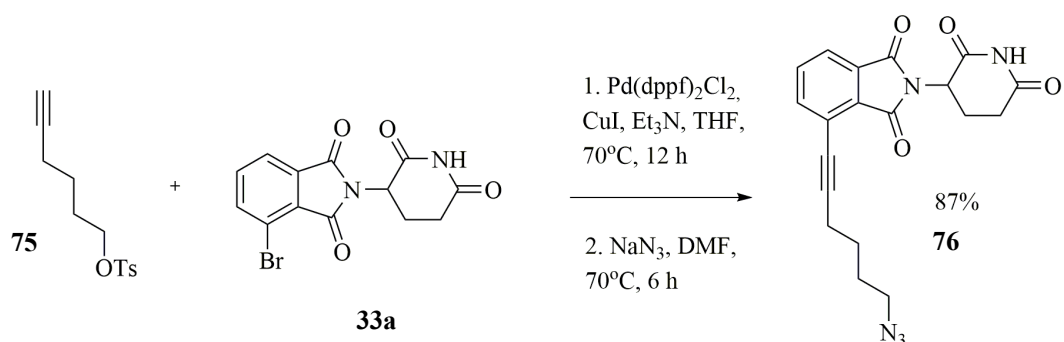
В работе [124] конъюгация **69** с рекрутером E3 **7a** осуществляется амидированием с использованием галогенангидрида. (схема 15) [124]. Основу для линкера получают через генерирование алкоголятов K или Na с этиленгликолем или его олигомерными аналогами сначала с соответствующим алкилдигалогенидом, затем с эфиром галоген-кислоты (схема 14) [137].

Схема 14



Основная методология синтеза триазоловых линкеров представлена в [70]. На первом этапе реализуется реакция Соногиширы, затем – получение азида. (схема 15). Приготовление второго компонента для 1,3-диполярного циклоприсоединения осуществляется путем алкилирования аминных центров, этерификации или амидирования кислотных [144]. Дальнейшая реакция представляет из себя непосредственно реакцию азид-алкинового циклоприсоединения, характеризующуюся высокими степенями конверсии и простотой [105] (схема 15)

Схема 15

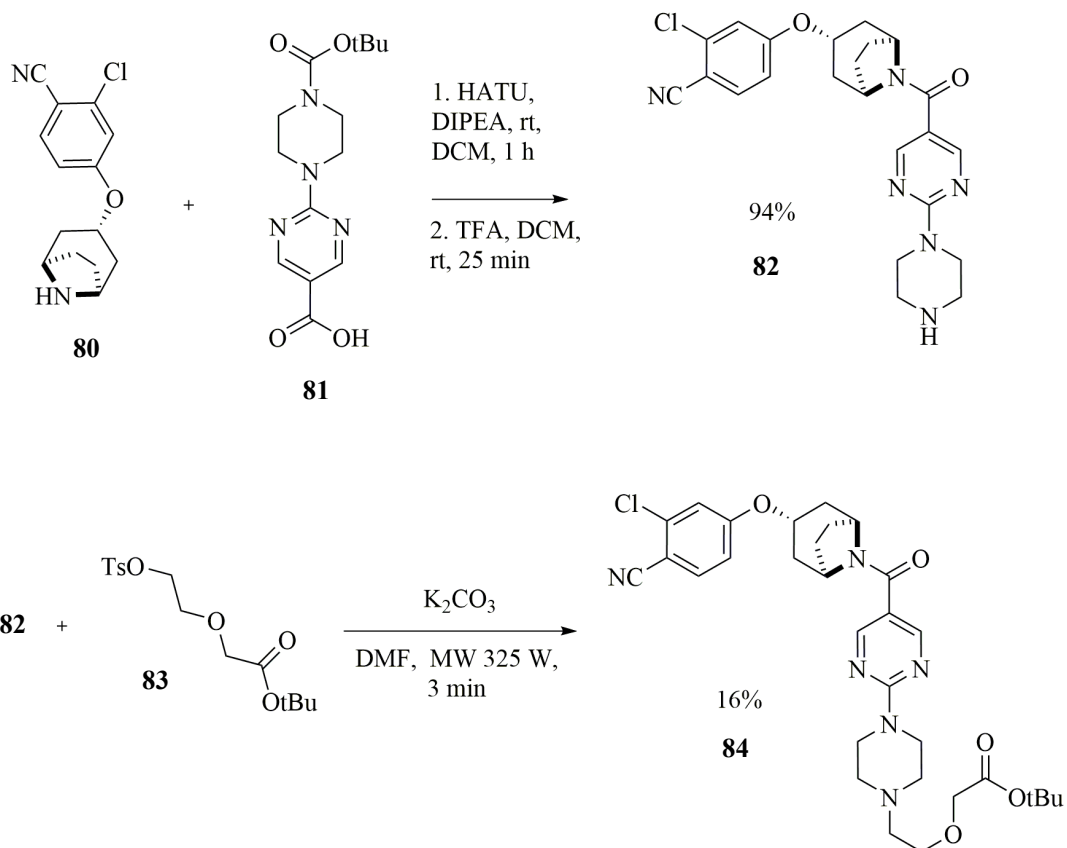


Sodium ascorbate
NaVic

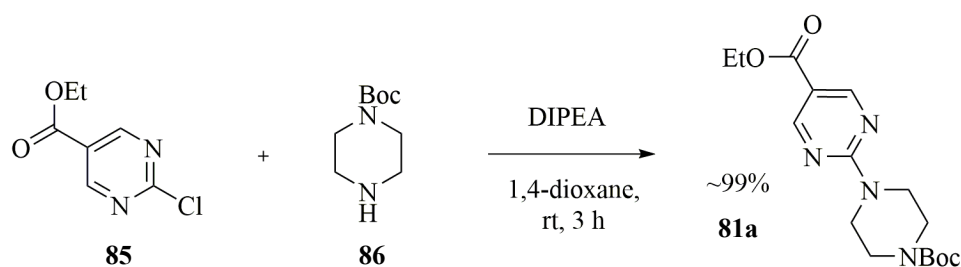
Авторы работы [118] предлагают получать деградер AR, содержащий жесткий гетероциклический линкер, амидированием коммерчески доступной кислотой аминного центра в молекуле агониста AR; последующее снятие

защиты с пиперазина, его S_N2 алкилирование коммерческим эфиром и гидролиз позволяют амидировать лиганд VHL (схема 16 — без стадии конъюгации с лигандом VHL) [118].

Схема 16



Авторы работы [118] не представили методологию синтеза соединения **85**, однако способ получения был продемонстрирован в публикации [138]. На первом этапе реализуется синтез производного пиримидона по методу Пиннера из этилового эфира 3-этоксипропионовой кислоты и мочевины, который затем действием оксихлорида фосфора превращается в хлорзамещенное **89**; (стадия не представлена на схеме 17) [138] этап включает нуклеофильное замещение с защищенным пиперазином (схема 18).



1.5.3 Ингибиторы PI3K в роли лигандов ROI

1.5.3.1 PI3K и рак

Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR контролирует очень большое число важных клеточных процессов, таких как регуляция клеточного цикла и пролиферация, апоптоз, аутофагия, метаболизм и дифференцировка липидов [139, 140]. Показано, что нарушения регуляции данного пути имеют место быть в подавляющем большинстве видов рака, например, при раке молочной железы и головного мозга, раке прямой кишки и желудка, раке легких, простаты [140]. Также данный каскад опосредует индукцию ангиогенеза. Уровни важного вторичного мессенджера PI3K/AKT/mTOR почти всегда повышены при протекании онкогенеза [139, 141].

Сигнальный каскад представлен на рисунке 19. Действие внеклеточных стимулов на такие мембранные рецепторы как RTK или GPCR активирует PI3K, который, в свою очередь, катализирует перенос фосфатной группы с АТФ на 3D положение инозитольного кольца фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата PIP2 с получением, соответственно, 3,4,5-трифосфата PIP3. Данный мессенджер является важным переносчиком сигнала во многих киназных путях передачи [142]. Ингибирование фосфолирования PIP2 осуществляет онкосупрессор PTEN; отмечается, что при процессах опухолевого роста часто наблюдается инактивация данного фермента [143]. PIP3 затем

связывается АКТ или активирует PDK1, также конвергентно активирующий АКТ путем фосфолирования. Нижележащие белки (например, mTOR) уже непосредственно влияют на множество регуляторов — факторы транскрипции, инициации трансляции, другие киназы [143].

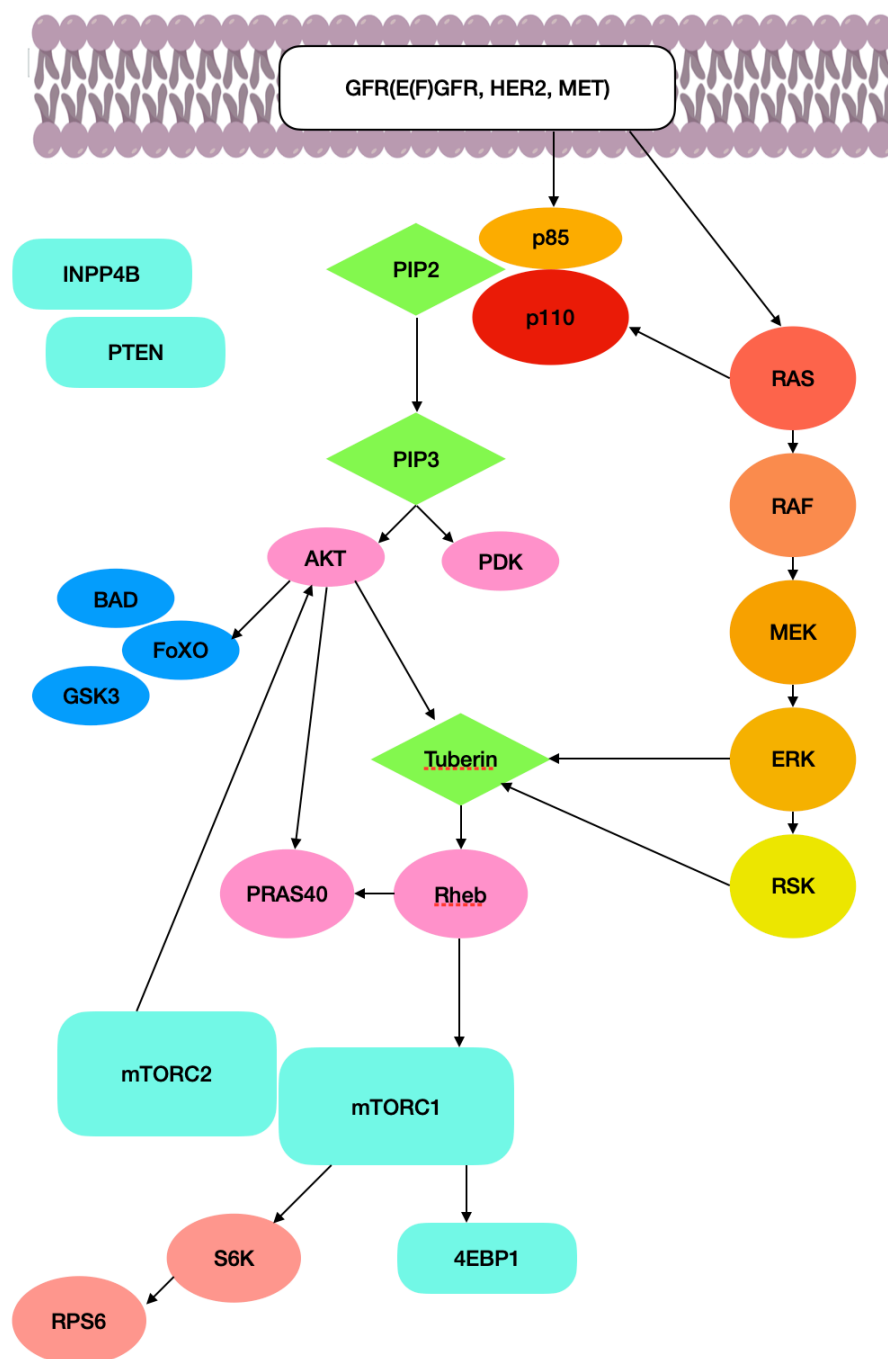


Рисунок 19 — Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR

Повсеместно экспрессирующиеся белки РІЗК, представляющие собой липидкиназы, можно разделить на три класса в соответствии со строением и субстратной специфичностью, среди которых наиболее изучен класс I. РІЗК I представлены четырьмя довольно гомологичными изоформами (α , β , δ — IA и γ — IB). IA являются гетеродимерами, состоящими из регуляторной p85 и каталитических α -, β - или δ -p110 субъединиц. В общем случае регуляторная субъединица содержит 5 или 6 доменов, где в N-области расположен участок, взаимодействующий с PTEN, и Ras-белками, в C-области располагается домен-p110-адаптер. Субъединица p85 содержит каталитический сайт [142, 143].

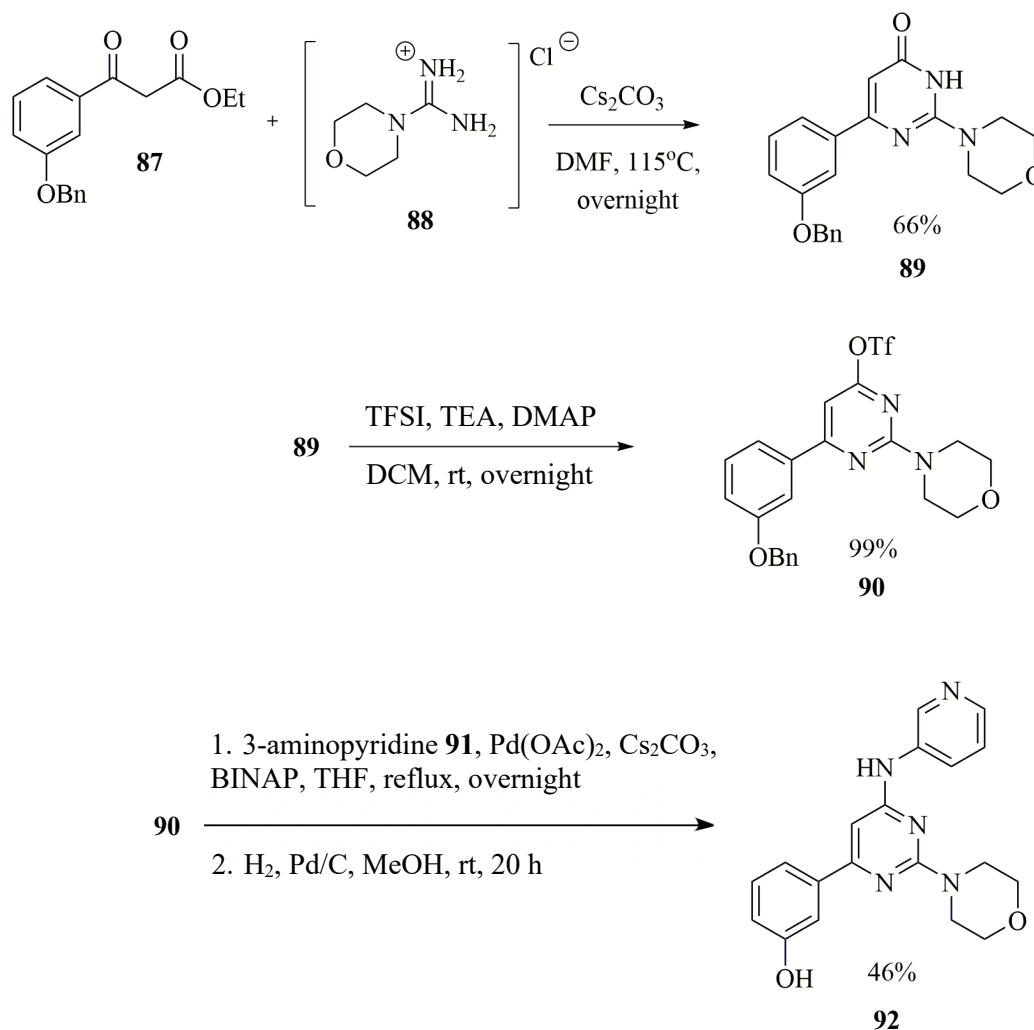
1.5.3.2 Ингибиторы РІЗК

Ингибирование РІЗК представляет собой мощную терапевтическую стратегию. Некоторые биоактивные агенты достаточно хорошо показывают себя уже на стадии клинических испытаний.

В общем случае ингибиторы РІЗК конкурируют с АТФ за связывание в каталитическом сайте, по этой причине можно сказать, что такие биоагенты являются миметиками АТФ [140].

Ингибиторы РІЗК α представляют собой соединения, несущие пуриновое, триазиновое или пиримидиновое ядро, позволяющее обеспечить плоскую ориентацию заместителей в сайте. Такие соединения иначе еще называют ингибиторами пропеллерного типа. На схеме 18 представлен синтез селективного РІЗК α ингибитора **92**, содержащего морфолин [144].

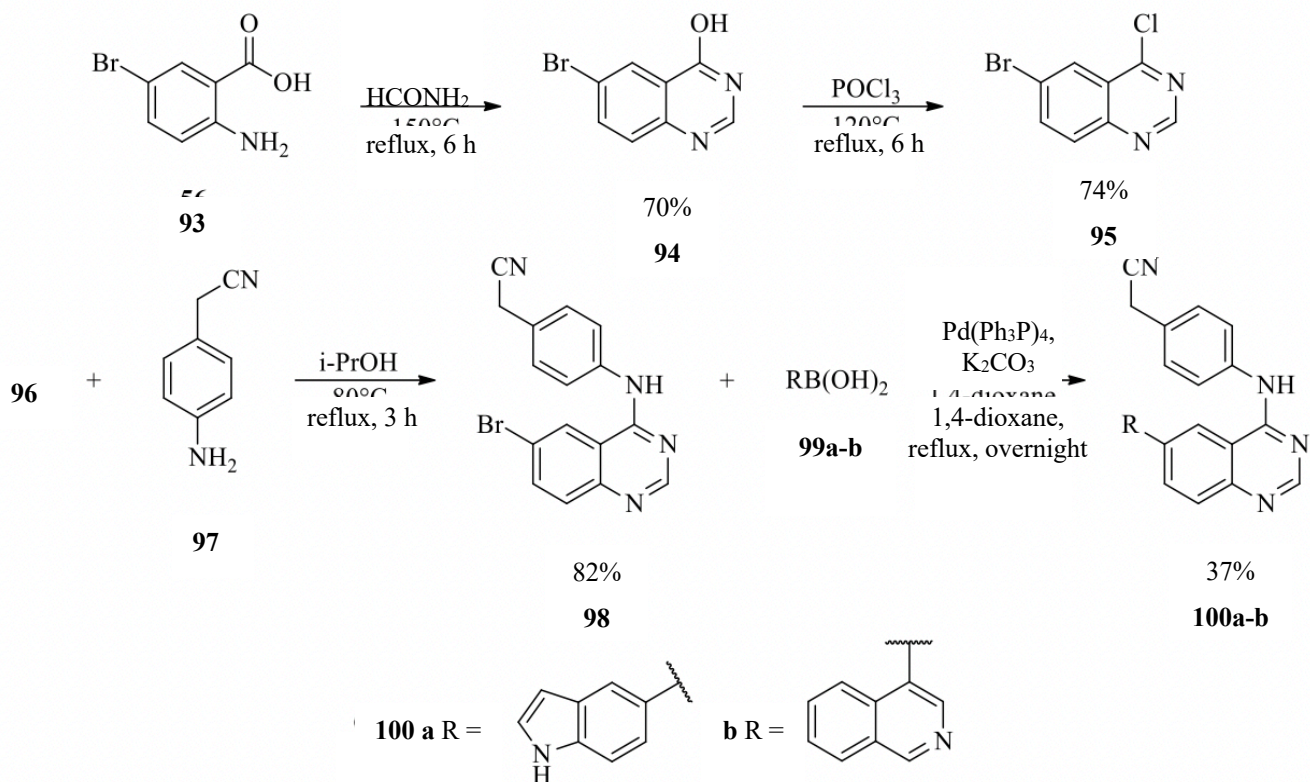
Схема 18



Коллеги использовали синтез Пиннера для сборки пиримидинового остова и затем в присутствии BINAP присоединяли соответствующий амин **91** в 4 положение **90** [144].

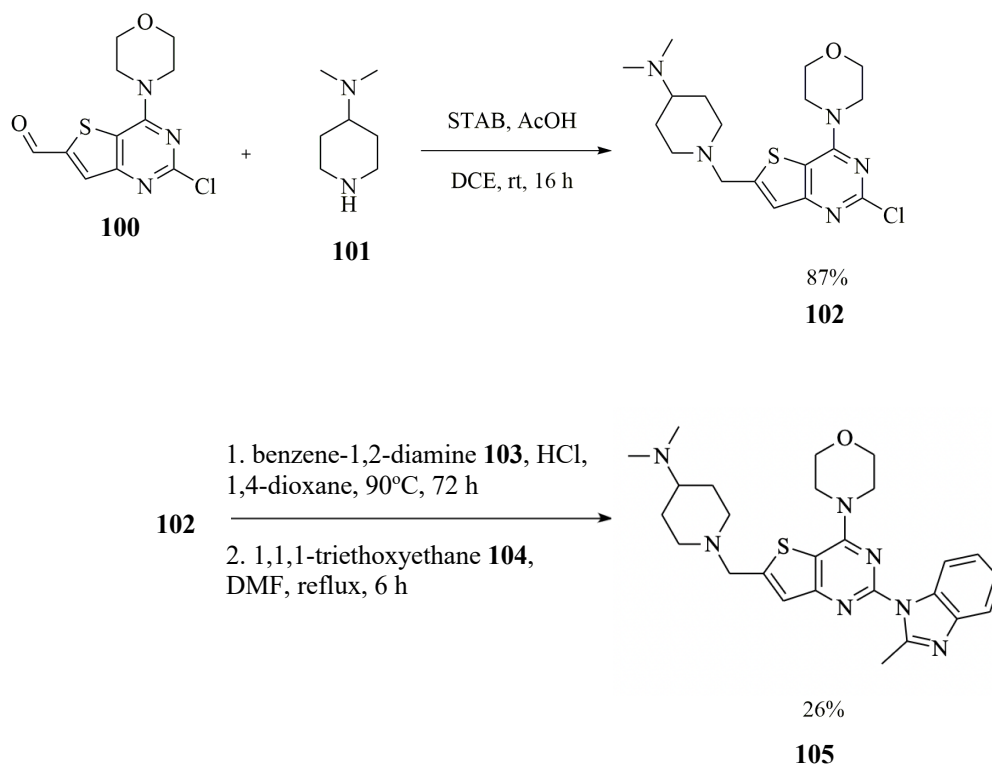
Также синтез селективного ингибитора Р13К α **100** на основе хиназолина представлен на схеме 19 и предполагает конденсацию антраниловой кислоты **93** и формамида, нуклеофильное замещение под действием аминопроизводного бензонитрила **97** и реакцию Сузуки для присоединения **99a-b** [145].

Схема 19



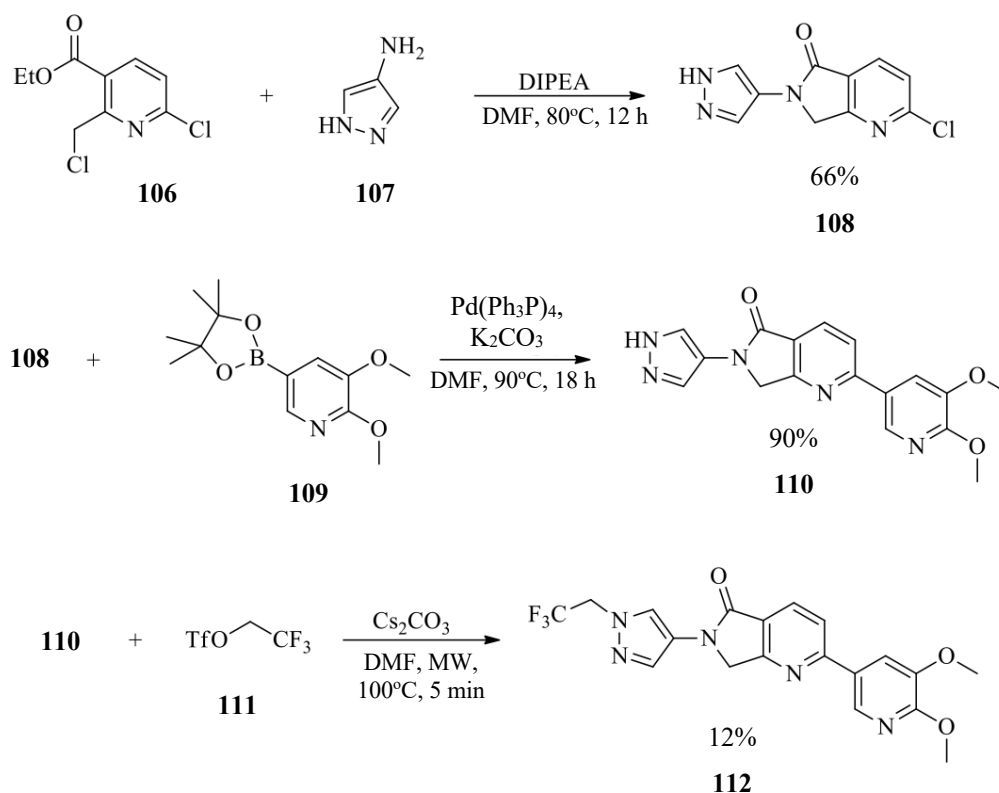
Ингибитор РІЗКδ **105** описан авторами в работе [170] (схема 20)

Схема 20

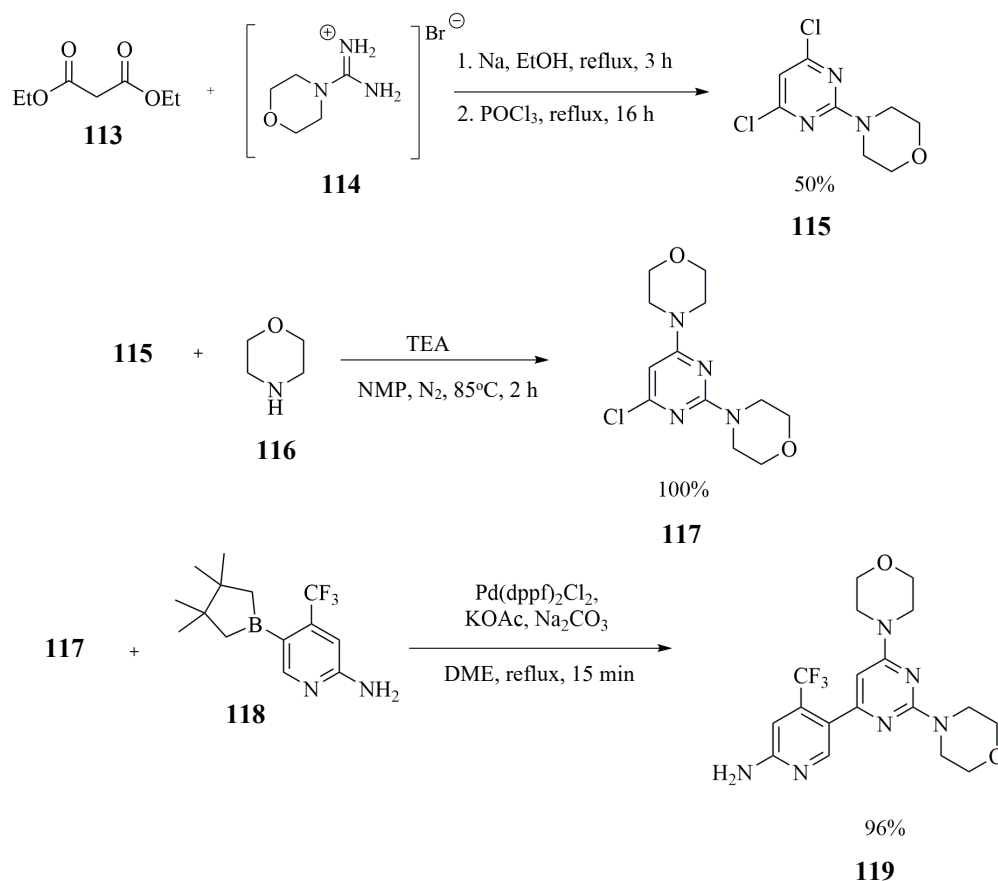


Синтез селективного ингибитора гамма-изоформы **112** изображен на схеме 21 ниже и представлен в работе [147].

Схема 21



Среди пан-ингибиторов Р13-киназы хотелось бы отметить ВКМ-120 **119**, который относится к миметику АТФ пропеллерного типа. Синтез представлен на схеме 22 [148]. Сборка **115** осуществляется путем конденсации Пиннера; селективный ввод морфолинового заместителей **114** на первом этапе и реакция Сузуки с соответствующим трифторпроизводным пиримидна на втором позволяет получить **119** с почти количественным выходом [148].



В заключение ко всем предыдущим разделам хотелось бы отметить отсутствие сомнений в том, что концепция направленного протеолитического расщепления различных мишеней является крайне перспективной в качестве мощной терапевтической стратегии [1, 2, 6].

Для обеспечения эффективной деятельности бифункциональных молекул, направленных на протеолиз, обычно требуется меньшее количество вещества — после отметки POI полиубквитиновым тэгом и его транслокации в протеосому 26S PROTAC снова способен связываться с белком интереса [1, 10, 23, 24].

С учетом того, что для связывания белка POI-боеголовке PROTAC не требуется обладать высоким сродством или специфичностью относительно локализации связывания, химеры, направленные на протеолиз, могут стать эффективной стратегией действия на т. н. «неуловимые мишени»; более того, многие из уже существующих малых молекул, обладающих модулирующими

свойствами по отношению к тому или иному белку, могут быть использованы для создания PROTAC [1, 40, 61].

Несмотря на все описанные выше преимущества данной концепции, в данный момент существует много направлений для ее модификации и улучшения.

В частности, любой PROTAC априори не является «drug-like» структурой из-за большой молекулярной массы, огромного количества потенциальных доноров и акцепторов водородной связи, часто плохой клеточной проницаемости [38-40].

Кроме прочего, из-за отсутствия универсальной стратегии дизайна бифункциональной молекулы для любой пары POI-E3, разработка PROTAC требует длительного времени, сложного процесса оптимизации структуры с точки зрения создания стабильного тройного комплекса POI-PROTAC-E3 [105, 106].

Также внимания заслуживает направление, посвященное поиску новых лигандов к E3 лигазам [113].

Тем не менее, научными коллективами по всему миру прилагаются большие усилия, направленные на дальнейшую разработку, модификацию и развитие данной концепции.

2 Результаты и их обсуждение

PI3K является важным компонентом внутриклеточных путей передачи сигналов. В частности, данная киназа является компонентом пути PI3K/AKT/mTOR, который регулирует пролиферацию, ангиогенез, аутофагию и индукцию апоптоза [139, 140]. Аномальная регуляция данного каскада, опосредованная гиперактивацией PI3K, наблюдается в большинстве видов рака [140]. Также данный каскад опосредует индукцию ангиогенеза. Уровни важного вторичного мессенджера PI3K почти всегда повышены при протекании онкогенеза [139, 141]. Наряду с классическим ингибированием киназной активности, использование PROTAC, направленных на протеолитическую деградацию онкогенно PI3K-киназы в перспективе может стать новой мощной и перспективной терапевтической стратегией [3]

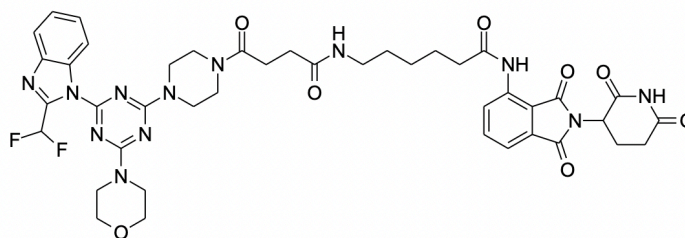
Наше исследование было направлено на разработку и создание тест-системы, способной адекватно оценивать уровень протеолиза PI3-киназы, а также синтез бифункционального агента на основе верифицированного ингибитора данной киназы в качестве положительного контроля.

Данная тест-система в дальнейшем позволит нам оценивать эффективность других PROTAC, направленных на деградацию PI3K.

2.1 Синтез PROTAC на основе ZSTK474 в качестве положительного контроля

В работе [3], посвященной разработке эффективного PROTAC PI3K CRBN-26S-зависимым образом, сообщается о соединении **120**, способном эффективно снижать уровни PI3K-киназы, при этом демонстрируя приемлемые значения PK/PD-свойств [3].

Данный раздел посвящен синтезу **120**, структура которого представлена на рисунке ниже (рисунок 20).



120

Рисунок 20 — Структура PROTAC **120**, направленного на деградацию РІЗК

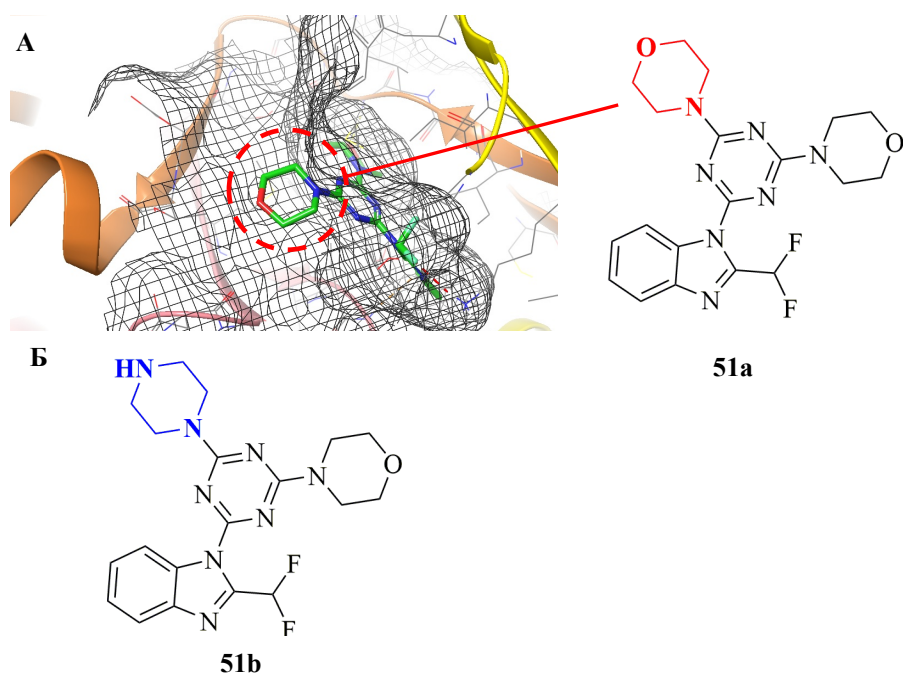
2.1.1 Синтез РІЗК-связывающей боеголовки PROTAC

Малые молекулы, которые потенциально могут быть использованы в качестве POI-конъюгирующего мотива PROTAC должны обладать набором некоторых свойств, принципиально важных для эффективности всего химерного агента. В частности, ингибитор РІЗК должен иметь «удобную» структуру, которая при связывании в активном сайте РІЗК-киназы будет демонстрировать наличие приемлемых точек конъюгации боеголовки с линкером.

Следуя примеру коллег [3] мы использовали ZSTK474 (**51a**) [149] — ингибитор РІЗК т. н. «пропеллерного» типа. Стоит отметить, что ZSTK474 в настоящий момент проходит клинические испытания [150].

Как уже упоминалось, один из морфолиновых заместителей **51a** не обременен какими-либо взаимодействиями и может быть без последствий заменен на пиперазин для конъюгации с линкером.

На рисунке ниже (рисунок 21) представлена структуры **51a** в активном сайте РІЗК, а также пиперазинзамещенное производное **51b**.



А — связывание ZSTK474 (**51a**) в активном сайте PI3K (PDB ID: 2WXL [123]); Б — моделирование связывания пиперазинового аналога **51b** в активном сайте PI3K (PDB ID: 2WXL [123])

Рисунок 21 — Связывание ингибитора PI3K ZSTK 474 **51a** в активном сайте данной киназы

Для получения **51b** (в виде гидрохлорида **51c**) на первом этапе согласно методике [151] нами было осуществлено нуклеофильное замещение хлора в коммерчески доступном 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазине **121** на морфолин при -78°C в присутствии Et_3N в DCM с получением искомого 2,4-дихлор-6-морфолино-1,3,5-триазина **122** в виде белого порошка с выходом 86%.

Соединение **122** затем было введено в реакцию с 2-дифторметилбензимидазолом **123**, перемешивание в ДМФА при комнатной температуре в течение 4 часов в присутствии K_2CO_3 приводило нас к **124** с выходом 80% [152].

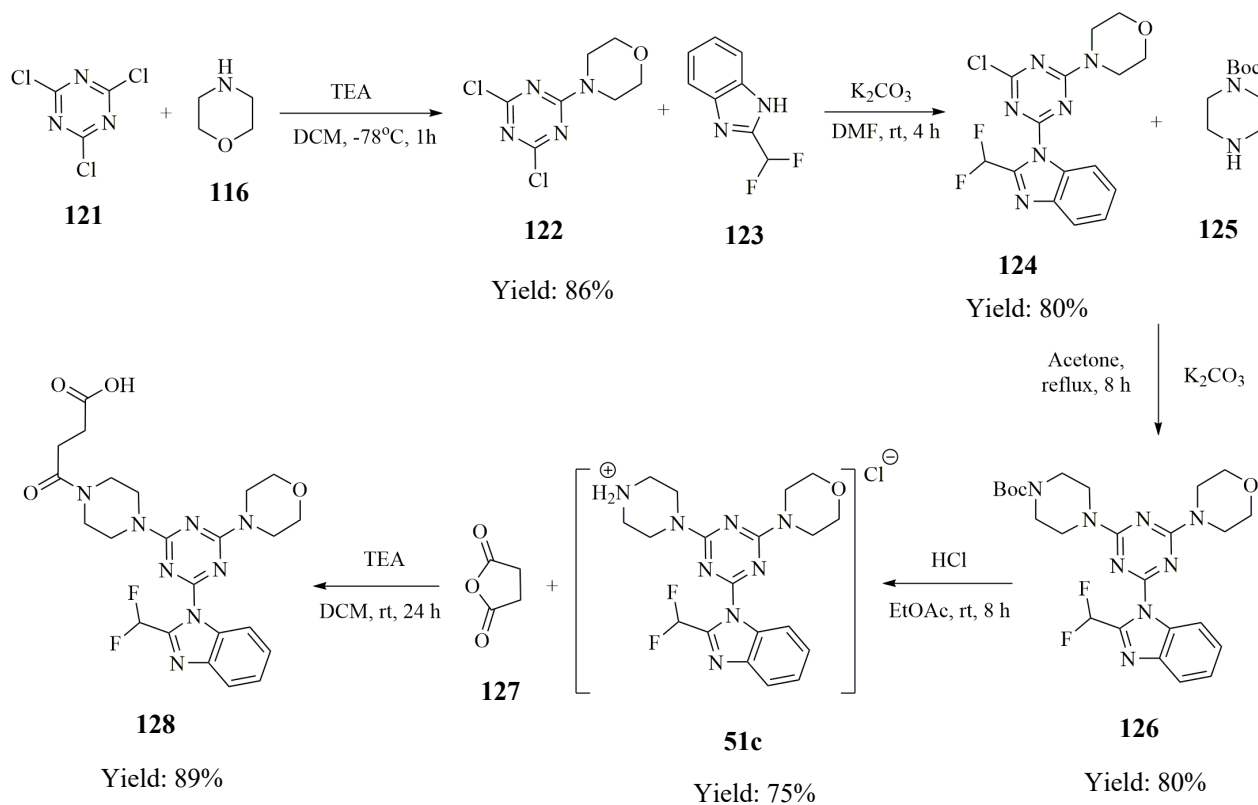
На следующей стадии продукт **124** затем был подвергнут замещению последнего хлора действием *N*-Вос-пиперазина **125** в

присутствии K_2CO_3 в ацетоне с получением защищенного **126** с выходом в 80%.

Снятие Boc-группы происходило действием системы HCl/EtOAc на **126**, что позволило нам получить желаемый и готовый к присоединению линкера POI-связывающий мотив в виде гидрохлорида (выход 75%) [152].

На финальной стадии нами проводилось ацилирование **51c** янтарным ангидридом **127** в дихлорметане в присутствии триэтиламина, что позволило получить **128** с выходом в 89% (схема 23) [3, 151, 152].

Схема 23



2.1.2 Синтез CRBN-связывающей боеголовки PROTAC

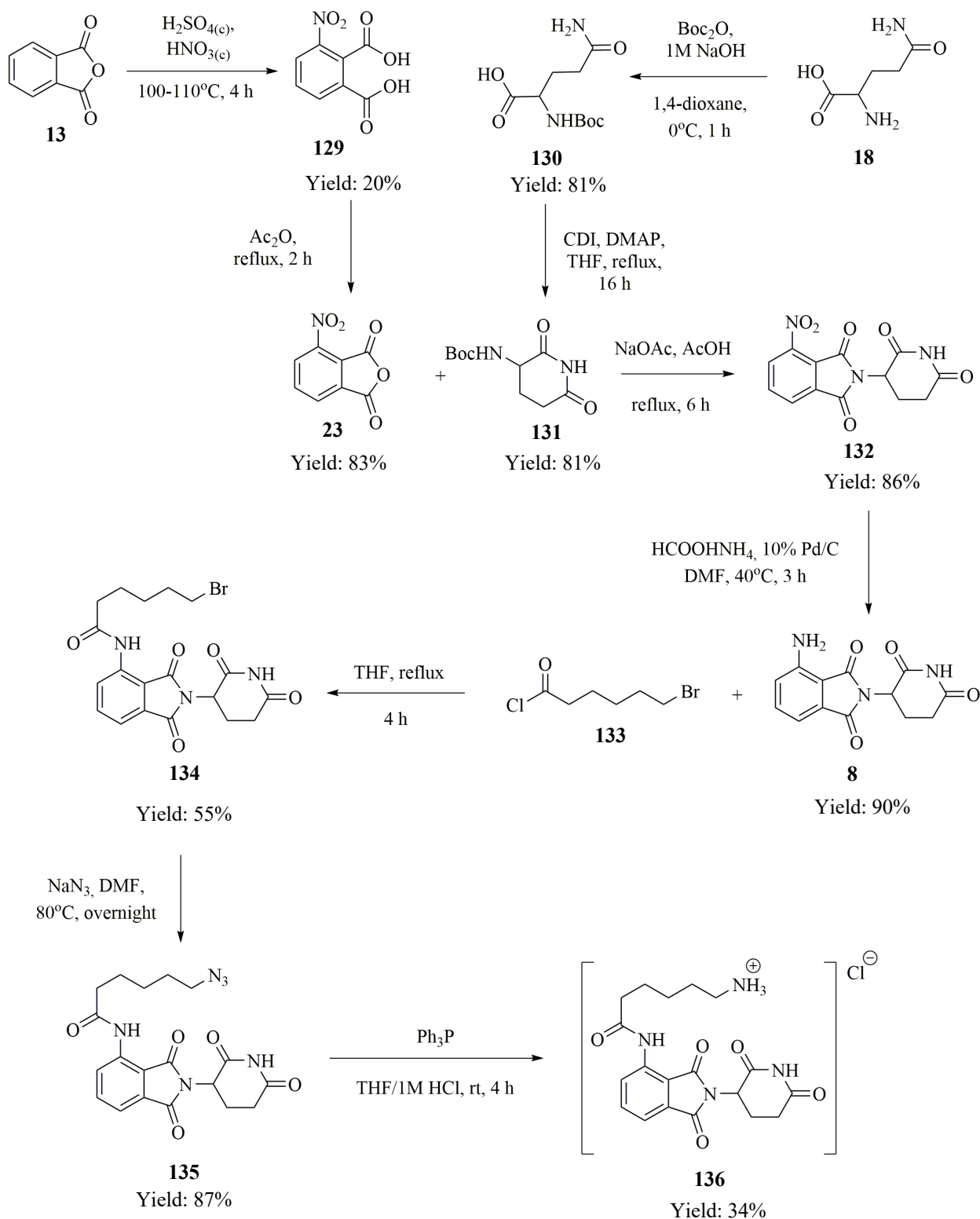
В качестве рекрутера CRBN E3 лигазы нами использовался помалидомид **8**, синтез которого был осуществлен согласно следующей последовательности превращений.

На первом этапе нами было проведено нитрование фталевого ангидрида **13** с получением 3-нитрофталевой кислоты **129** с выходом 20% [153]. Продукт нитрования **129** затем подвергали дегидратации действием Ac_2O , обеспечив доступ к 3-нитрофталевому ангидриду **23** с выходом 83% [154]

Глутаримид был синтезирован в соответствии с методиками [78,155]. Глутамин **18** подвергался бокированию, что позволило нам получить *N*-Woc-Glu **130** с выходом 81% [155]. Соединение **130** затем претерпевало внутримолекулярную циклизацию в присутствии CDI и DMAP в ТГФ в ходе продолжительного кипячения (16 часов). Продукт **131** наблюдался с выходом 88% [78].

Финальные стадии получения помалидомида **8** проводились нами по методикам [156, 157]. Ацилирование **131** действием **23** в присутствии ацетата натрия при 6-ти часовом кипячении в ледяной уксусной кислоте приводило нас к 4-нитроталидомиду **132** с выходом 86% [156]. Восстановление **132** действием 10% Pd/C и формиата аммония в DMF позволяло получить помалидомид **8** с выходом 90%.

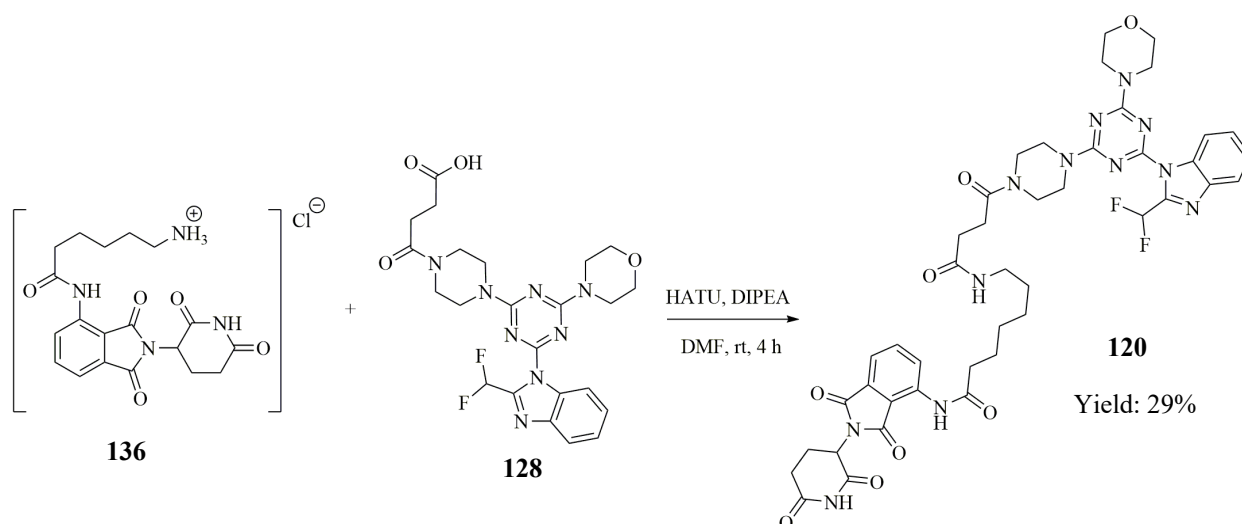
Прикрепление линкерного мотива к помалидомиду **8** выполнялось путем амидирования **8** добавлением хлорангидрида 6-бромгексановой кислоты **133** в ТГФ, что приводило нас к **134** с выходом 55%. Амид **134** затем подвергался нуклеофильному замещению под действием NaN_3 в ДМФА и нагревании до 80°C в течение ночи с получением соответствующего азиды **135** с 87%-ым выходом, который затем был превращен в амин **136** действием системы $\text{Ph}_3\text{P}/\text{HCl}$ в ТГФ при перемешивании без нагревания 4 часа с выходом 34% (схема 24) [3, 78, 153-157].



2.1.3 Синтез PROTAC

Синтез конечного PROTAC выполнялся нами путем простого амидирования карбоновой кислоты **128** с амином **136** в присутствии основания Хюнига, активатора карбоксильных групп HATU в ДМФА при комнатной температуре в течение 4 часов, что позволяло получить после выделения искомый PROTAC **120** с выходом в 29% (схема 25) [3].

Схема 25



Ниже представлен спектр ЯМР ^1H для соединения **120** (рисунок 22).

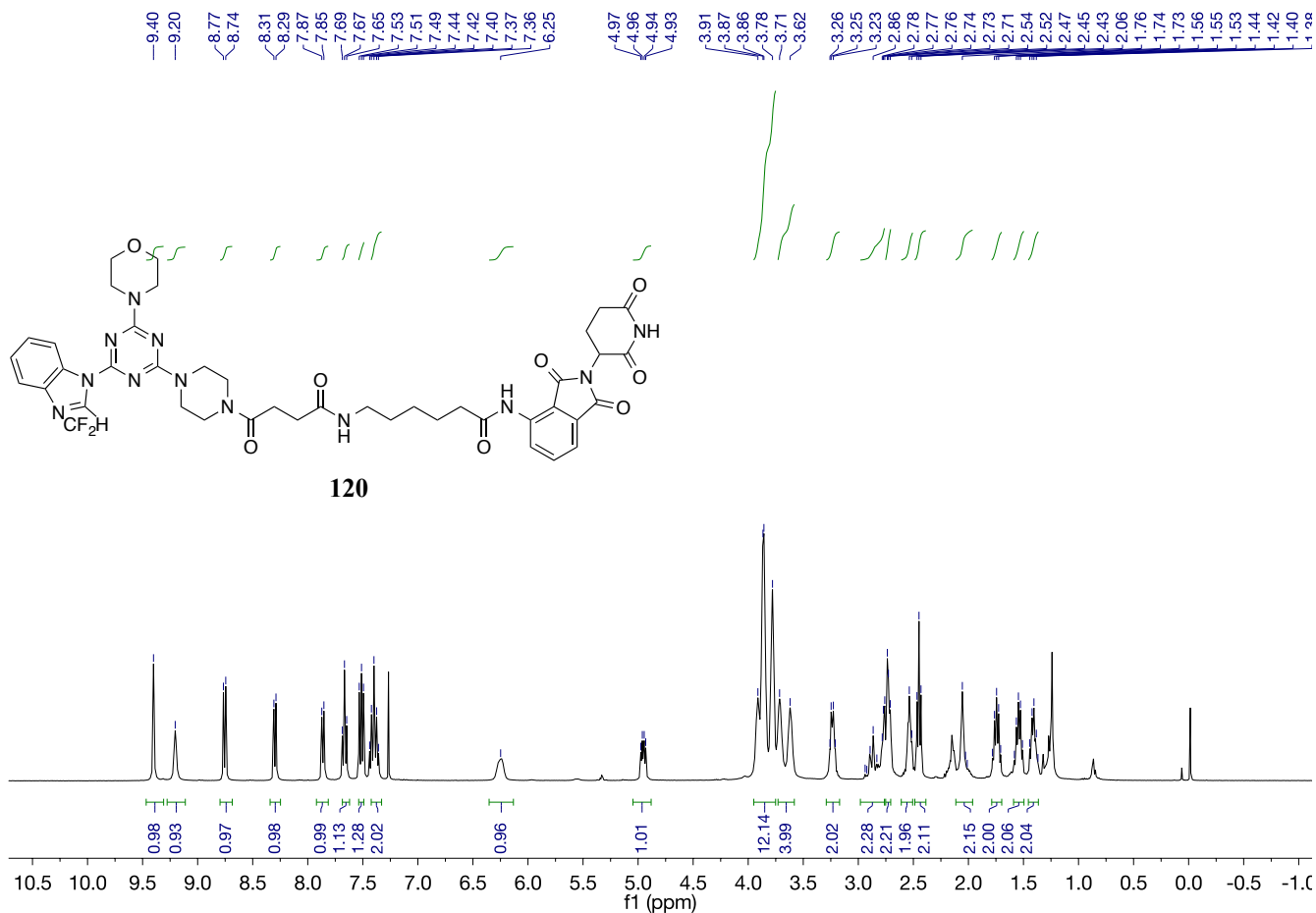


Рисунок 22 – Спектр ЯМР ^1H соединения **120**

2.2 NanoGlo-HiBiT lytic system

В качестве метода оценки уровня деградации РІЗК нами была выбрана платформа Nano-Glo HiBiT, позволяющая точно и производительно оценить количество белка в лизате клетки на основе люминисценции.

Метод основан на биолюминесценции NanoLuc – фермента, обладающего люциферазной активностью при связывании с субстратом фуримазином **137** (рисунок 23). В результате расщепления имидазолонового фрагмента в присутствии NLuc и молекулярного кислорода **137** превращается в соответствующий амид **138** с выделением углекислого газа и квантов голубого света [158]

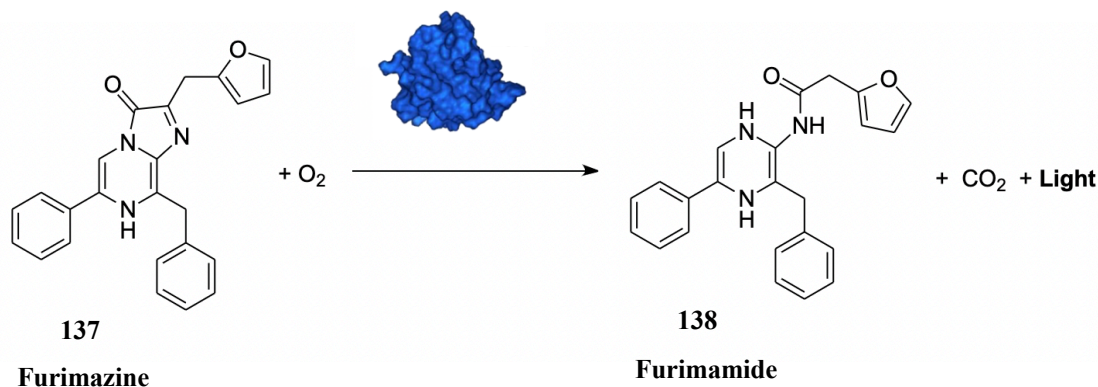


Рисунок 23 – Превращение фуримазина **137** в фуримамид **138** с выделением квантов света

Сама по себе люцифераза NanoLuc состоит из двух субъединиц: малой (HiViT) и большой (LgViT).

Суть метода заключается в добавлении последовательности, кодирующей небольшой репортерный пептид HiViT (11 аминокислот, 1.3 КДа), в геномную последовательность белка интереса, таким образом заставляя клетку производить протеин, отмеченный данным тегом. HiViT обладает высоким сродством к крупному пептиду LgViT, который при связывании с первым образует комплекс упомянутой выше люциферазы NanoLuc. LgViT и его субстрат **137** добавляется в лизат клеток после наработки тегированного HiViT белка. В ходе протекания люциферазной реакции люминесценция может быть считана [159]

Отмечается, что протокол Nano-Glo HiViT имеет ряд преимуществ перед другими методами оценки уровней экспрессии или количества протеина на основе люминесценции. Во-первых, отметка небольшим пептидом HiViT позволяет избежать проблем, связанных с нарушениями естественной функциональности белка интереса; также отмечается, что вставка репортера HiViT в последовательность гена относительно проста, эффективна и требует лишь одноцепочечного олигонуклеотида. Во-вторых, сама люцифераза NanoLuc обладает гораздо более высокими показателями люминесценции при

низких концентрациях самого фермента по сравнению с другими известными платформами. Наконец, репортерная система Nano-Glo HiBiT позволяет работать с эндогенными белками, уровни экспрессии и концентрации которых в клетке малы [159].

Нами была сконструирована плазида, несущая тег HiBiT, слитый с N-концом PI3KCA (рисунок 24). С помощью полученной плазмиды мы трансфицировали клеточную линию НЕК293, и после селекции с применением антибиотика G418 мы получили три клональные линии (клоны 2,4,11) с разными уровнями экспрессии PI3KCA.

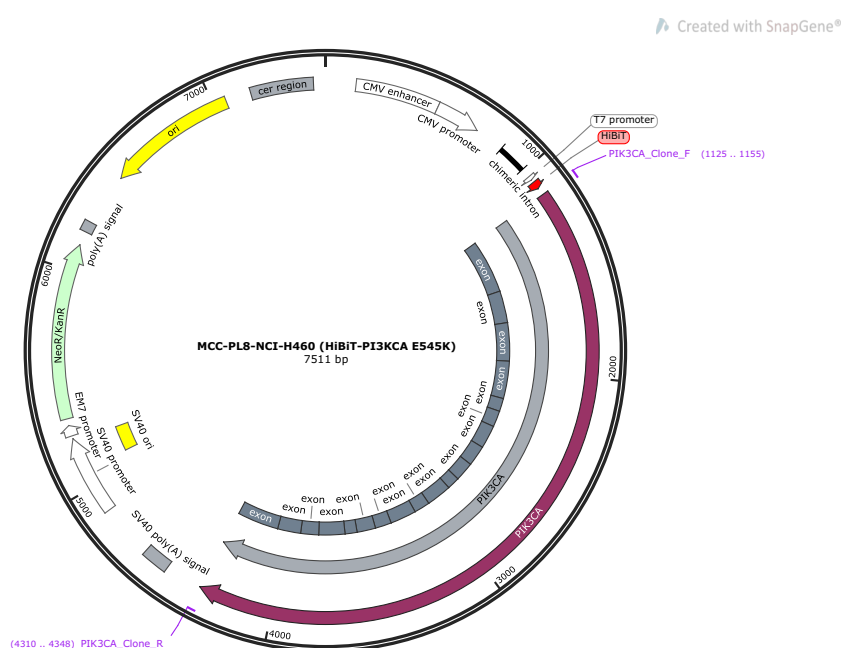


Рисунок 24 – Плазида HiBiT-PI3KCA E545K

На рисунке 25 приведены кривые доза-эффект для синтезированного PROTAC **120**. Как видно на представленном графике, соединение **120** вызывает доза-зависимую деградацию целевого белка. DC₅₀ лежит в диапазоне от 479 нМ до 588 нМ в зависимости от клона соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Значения DC_{50} для соединения **120**

Клон НЕК293 HiViT-PI3KCA	DC_{50} , нМ
Клон 2	479 ± 245
Клон 4	573 ± 258
Клон 11	588 ± 151

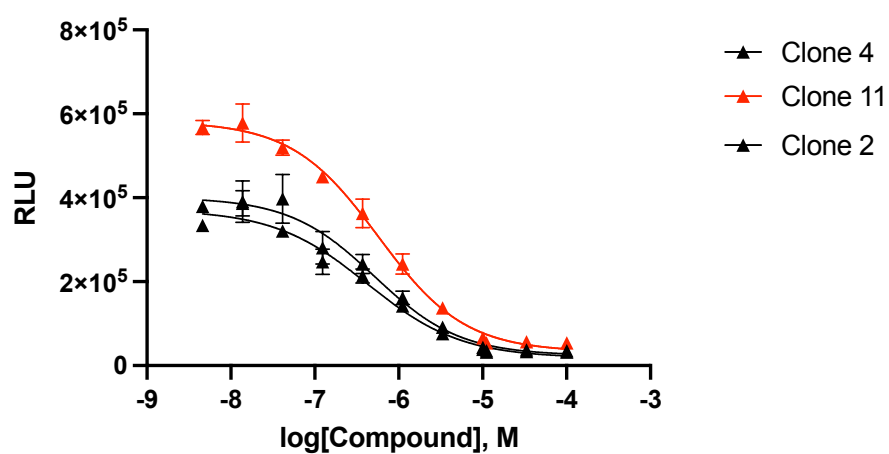


Рисунок 25 – Доза-зависимая деградация PI3KCA-HiViT после инкубации с соединением **120** в течение 5 часов

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Ход реакций синтеза исходных соединений оценивали с помощью тонкослойной хроматографии с применением пластинок с закрепленным слоем марки «Силуфол». В качестве элюентов применялась смесь растворителей следующего состава: гексан:этилацетат 3:7. Обнаружение веществ (проявление пятен) проводили в парах йода, в концентрированном растворе перманганата калия.

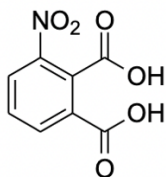
Контроль за ходом реакций и чистоту полученных соединений оценивали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent1220м» со спектрофотометрическим детектором. Колонка ZORBAX C-18, элюент: MeCN:H₂O в соотношении 8:2; скорость потока элюента 1 мл/мин. Обработка данных на выходе проводилась с применением программы OpenLab фирмы Agilent.

Данные ЯМР спектроскопии получены при комнатной температуре в дейтерированном диметилсульфоксиде (DMCO-*d*6) на спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой 600 и 150 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно. Сигналы химических сдвигов ядер ¹H и ¹³C приведены в миллионных долях относительно сигнала тетраметилсилана.

Температуры плавления определены на нагревательном столике Voetius.

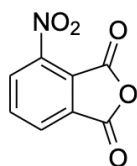
Все реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников и использовались без дальнейшей очистки.

3.2 Синтез исходных соединений



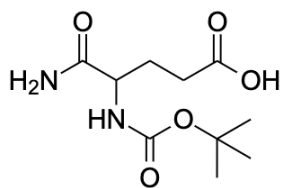
3-Нитрофталева́я кислота (**129**) [153]

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником и якорем магнитной мешалки внесли фталевый ангидрид **13** (140 г, 0.94 моль) и серную кислоту (182 мл, 335 г, 3.41 моль). Смесь перемешивали, а затем осторожно прикапывали с помощью капельной воронки дымящую азотную кислоту (60 мл, 89 г, 1.42 моль), в ходе чего наблюдали бурную реакцию, сопровождающуюся выделением бурого газа, выпадением желтого осадка. Через 2 часа внесли 250 мл концентрированной азотной кислоты. Реакционную смесь перемешивали еще 2 часа при 100°C, после чего отфильтровали осадок и дали ему просохнуть на воздухе. После просушки до постоянной массы осадок дважды подвергали водной перекристаллизации с получением **130**. Выход: 39 г, 20%, т. пл. 205-206°C (т. пл. 205-210°C [153]).



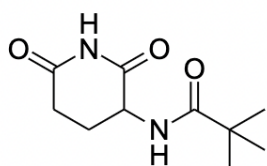
4-Нитроизобензофуран-1,3-дион (**23**) [154]

3-Нитрофталевою кислоту **129** (33 г, 156 ммоль) и уксусный ангидрид (32 г, 29.5 мл, 312 ммоль) кипятили без перемешивания в течение 2 часов. Далее, смесь еще горячей вылили в фарфоровую чашку. После охлаждения смесь растерли и отфильтровали. Ангидрид сушили в вакууме. Выход: 25 г, 83%, т. пл. 160-161°C (т. пл. 163-164°C [154]).



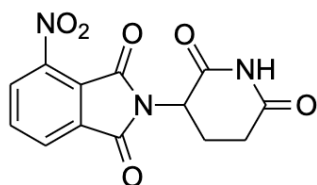
5-Амино-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-оксопентановая кислота (**130**) [155]

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, ледяной баней и якорем магнитной мешалки, внесли глутамин **18** (55 г, 376 ммоль) и 550 мл 1М водного раствора NaOH. Далее при охлаждении прикапывали ди-*трет*-бутилдикарбонат (Boc₂O) (90 г, 95 мл, 413 ммоль) в 1,4-диоксане (540 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. Затем диоксан был отогнан на роторном испарителе. Водный слой отделяли и промывали диэтиловым эфиром (2x50 мл), затем подкисляли добавлением насыщенного водного раствора KHSO₄ до pH 2-3. Продукт экстрагировали EtOAc (3x300 мл). Органические слои объединяли, сушили над Na₂SO₄ и упаривали с получением в виде белого порошка соединения **130**. Выход: 75.1 г, 81%, белый порошок, т. пл. 114-115°C с разл. (т. пл. 115-116°C с разл. [160]).



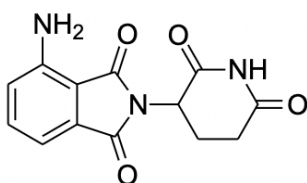
Трет-бутил-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-карбамат (**131**) [78]

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником и якорем магнитной мешалки, внесли *N*-Boc-Glu **130** (74 г, 300 ммоль), CDI (48.73 г, 300 ммоль) и DMAP (0.21 г, 1.72 ммоль), ТГФ (200 мл). Смесь кипятили при перемешивании 16 часов. После охлаждения отфильтровали. Осадок на фильтре промыли ТГФ (2x10 мл) и дали просохнуть до постоянной. Выход: 60.4 г, белый порошок, 88%, т. пл. 209-210°C (т. пл. 209-211°C [161])



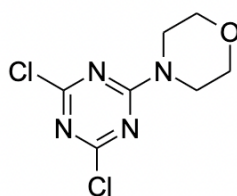
2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-4-
нитроизоиндолин-1,3-дион(**132**) [156]

В круглодонную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки и обратным холодильником, внесли фталевый ангидрид **23** (22.2 г, 115 ммоль), glutarimid **131** (22.82 г, 100 ммоль) и NaOAc (10 г, 122 ммоль), предварительно растворенный в AcOH (270 мл). Смесь кипятили 6 часов. После охлаждения смесь разбавили холодной водой (1.8 л), образовавшийся осадок отфильтровали, промыли водой (3x50 мл) и петролевым эфиром (3x50 мл), затем высушили до постоянной массы. Выход: 26.07 г, серый порошок 86%, т. пл. >250°C (т. пл. >250°C [156])



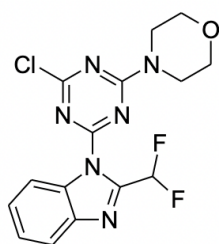
2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-4-
аминоизоиндолин-1,3-дион (**8**)

3-Нитропомалидомид (15.16 г, 50 ммоль), HCOONH₄ (31.50 г, 500 ммоль), DMF (150 мл) и 10% Pd/C (4 г) нагревали при 40°C в течение часов. Затем смесь отфильтровывали, фильтрат разбавляли водой, выпавший осадок отфильтровывали еще раз и сушили до постоянной массы. Выход 13.66 г, желтый порошок, 90%, т. пл. >250°C (т. пл. 314-315°C [157])



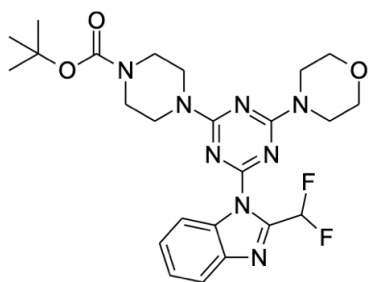
4-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-морфолин (**122**)
[151]

В круглодонную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки, добавляли триазин **121** (2 г, 10.9 ммоль), DCM (45 мл), затем смесь охлаждали до -78°C . Смесь морфолина **116** (0.945 г, 1.9 ммоль), Et_3N (1.51 мл, 10.9 ммоль) и DCM (5 мл) добавляли по каплям в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 часа, затем нагревали до -30°C в течение 30 минут. После смесь обрабатывали насыщенным водным раствором хлорида аммония (70 мл). Водный слой экстрагировали DCM (4x75 мл), объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Выход: 2.3 г, белый порошок, 86%, т. пл. $153\text{-}154^{\circ}\text{C}$ (т. пл. $152\text{-}155^{\circ}\text{C}$ [151])



4-(4-хлор-6-(2-(дифторметил)-1H-бензо[*d*]имидазол-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)-морфолин (**124**) [152]

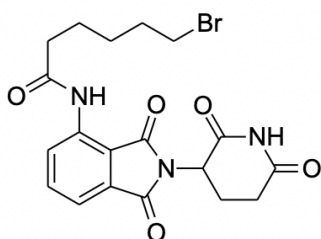
В круглодонную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки, внесли триазин **122** (2 г, 8.51 ммоль), замещенный бензимидазол **123** (1.43 г, 8.51 ммоль), K_2CO_3 (1.18 г, 8.51 ммоль), ДМФА (25 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, после чего содержимое колбы разбавили водой (80 мл). Выпавший осадок отфильтровали и дважды промыли водой. Выход: 2.5 г, белый порошок, 80%, т. пл. $242\text{-}244^{\circ}\text{C}$ (т. пл. $244\text{-}247^{\circ}\text{C}$ [152]).



Трет-бутил-4-(4-(2-(дифторметил)-1*H*-бензо[*d*]имидазол-1-ил)-6-морфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-пиперазин-1-карбоксилат (**126**) [152]

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником и якорем магнитной мешалки, внесли моноклорзамещенный триазин **124** (2.49 г, 6.79 ммоль), *N*-Вос-пиперазин **125** (1.33 г, 7.13 ммоль), K₂CO₃ (1.41 г, 10.18 ммоль), ацетон (50 мл). Смесь кипятили при перемешивании 8 часов. Затем растворитель отогнали на роторном испарителе, остаток обработали DCM (50 мл) и водой (50 мл). Органический слой отделили, промыли насыщенным раствором NaCl (20x50 мл) и сушили над Na₂SO₄ в течение ночи, затем упарили на роторном испарителе. Выход: 2.81 г, белый порошок, 80%, т. пл. 184-185°C (т. пл. 184-187°C [152]).

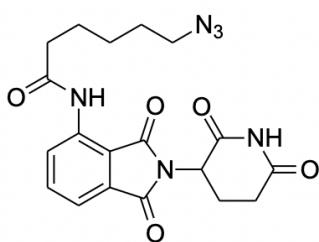
3.4 Синтез целевых соединений



6-Бром-*N*-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-гексанамида (**134**) [3]

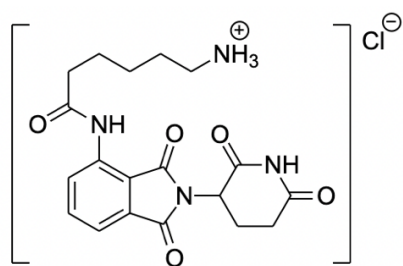
В грушевидную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки и обратным холодильником, внесли помалидомид **8** (270 мг, 1 ммоль), ТГФ (25 мл), а затем хлорангидрид **133** (640 мг, 260 мкл, 3 ммоль) с помощью автоматической пипетки. Смесь кипятили в течение 4 часов. После охлаждения содержимое колбы упарили на роторном испарителе. Продукт экстрагировали DCM (2x50 мл), промыли его насыщенным раствором NaHCO₃ и сушили над MgSO₄. После упаривания осадок был очищен с помощью

колончатой хроматографии (элюент: DCM/MeOH 50:1) с получением **134** в виде желтого порошка. Выход: 247 мг, 55%, т. пл. 185-187°C (т. пл. 184-185°C [3]). ЯМР ^1H (CDCl_3) δ , м. д. (J , Гц): 9.41 (с, 1H), 8.81 (1H, $J=8.5$ Гц, 1H), 8.60 (с, 1H), 7.74–7.66 (м, 1H), 7.54 (д, $J=7.2$ Гц, 1H), 5.00–4.91 (м, 1H), 3.42 (т, $J=6.7$ Гц, 2H), 3.00–2.80 (м, 2H), 2.77 (д, $J=11.0$ Гц, 2H), 2.48 (т, $J=7.4$ Гц, 2H), 1.95–1.88 (м, 2H), 1.79 (д, $J=7.6$ Гц, 2H), 1.54 (т, $J=7.7$ Гц, 2H). ЯМР ^{13}C (CDCl_3) δ , м. д.: 172.0, 171.0, 169.2, 168.0, 166.7, 137.8, 136.5, 131.1, 125.4, 118.5, 115.4, 49.3, 37.6, 33.4, 32.41, 31.4, 27.7, 24.3, 22.7.



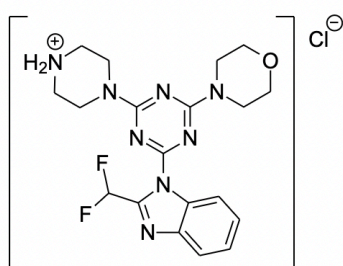
6-Азидо-*N*-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-гексанамид (**135**) [3]

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли бромид **134** (240 мг, 0.532 ммоль) и ДМФА (10 мл), затем NaN_3 (690 мг, 1.07 ммоль). Смесь нагрели при 80°C при перемешивании в течение ночи. После охлаждения органический слой экстрагировали EtOAc , упарили на роторном испарителе. Выход: 191 мг, 87%, т. пл. 164-165°C (т. пл. 166-167°C [3]). ЯМР ^1H (CDCl_3) δ , м. д. (J , Гц): 9.43 (с, 1H), 8.83 (д, $J=8.5$ Гц, 1H), 8.42 (с, 1H), 7.74 (д, $J=7.6$ Гц, 1H), 7.55 (с, 1H), 4.97 (дд, $J=12.3, 5.3$ Гц, 1H), 3.32 (т, $J=6.8$ Гц, 2H), 3.01–2.83 (м, 2H), 2.79 (м, 2H), 2.50 (т, $J=7.4$ Гц, 2H), 1.82–1.77 (м, 2H), 1.76-1.79 (м, 2H), 1.52–1.46 (м, 2H). ЯМР ^{13}C (CDCl_3) δ , м. д.: 172.0, 169.2, 167.9, 166.7, 137.8, 136.5, 131.1, 125.3, 118.5, 115.4, 51.2, 49.3, 37.7, 31.4, 28.6, 26.3, 24.7, 22.7.



6-амино-*N*-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-гексанами́д гидрохлорид (**136**) [3]

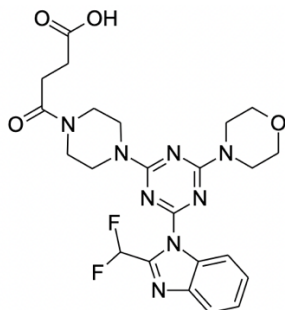
В круглодонную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки и обратным холодильником, внесли азид **135** (190 мг, 0.46 ммоль), смесь ТГФ/1М НСl (4:1, 3 мл), затем Rh₃P (182 мг, 0.69 ммоль). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 4 часа, затем отгоняли ТГФ на роторном испарителе. Водный слой экстрагировали EtOAc (20x50 мл) и упарили. Выход: 61 мг, 34%, т. пл. 153-154°C (т. пл. 150-151°C [3]). ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆) δ, м. д. (*J*, Гц): 9.77 (с, 1H), 8.43 (д, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.83 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 7.61 (д, *J* = 7.2 Гц, 1H), 5.15 (дд, *J* = 12.8, 5.4 Гц, 1H), 2.90 (тд, *J* = 16.4, 13.8, 5.2 Гц, 2H), 2.78–2.65 (м, 2H), 2.65–2.51 (м, 2H), 2.45 (т, *J* = 7.3 Гц, 2H), 1.66–1.59 (м, 4H), 1.40–1.32 (м, 2H). ЯМР ¹³C (DMCO-*d*₆) δ, м. д.: 173.2, 172.3, 170.3, 168.1, 167.2, 137.0, 136.6, 132.0, 127.0, 118.9, 117.7, 60.2, 49.4, 36.8, 31.4, 26.0, 24.8, 22.5, 21.3.



4-(4-(2-(Дифторметил)-1*H*-бензо[*d*]имидазол-1-ил)-6-морфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-пиперазин гидрохлорид (**51c**) [152]

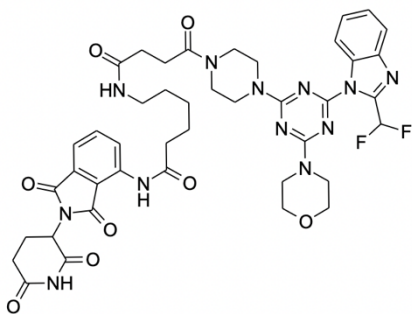
В грушевидную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки и обратным холодильником, внесли соединение **126** (2.8 г, 5.44 ммоль), EtOAc (15 мл), затем смесь НСl/EtOAc (10 мл, 1:1). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 8 часов. Осадок отфильтровали и промыли EtOAc с получением гидрохлорида **51c**. Выход: 1.84 г, 75%, т. пл.

229-230°C (т. пл. 230-232°C [152]). ЯМР ^1H (CDCl_3) δ , м. д. (J , Гц): 8.36 (д, $J = 7.3$ Гц, 1H), 7.91 (д, $J = 7.1$ Гц, 1H), 7.59 (т, $J = 53.7$ Гц, 1H), 7.49–7.39 (м, 2H), 3.98–3.87 (м, 8H), 3.81 (с, 4H), 3.02 (с, 4H).



4-(4-(4-(2-(Дифторметил)-1*H*-бензо[*d*]имидазол-1-ил)-6-морфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-пиперазин-1-ил)-4-оксобутановая кислота (**128**) [3]

В круглодонную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки и обратным холодильником, внесли гидрохлорид **51c** (1 г, 2.2 ммоль), янтарный ангидрид **127** (0.22 г, 2.2 ммоль), DCM (9 мл), затем Et_3N (0.33 г, 461 мкл, 3.3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем упарили. Осадок промыли насыщенным раствором NaCl (3x15мл), сушили над Na_2SO_4 , повторно упарили. Выход: 1.01 г, 89%, т. пл. 205-206°C (т. пл. 206-207°C [3]). ЯМР ^1H (CDCl_3) δ , м. д. (J , Гц): 8.31 (д, $J = 7.7$ Гц, 1H), 7.89 (д, $J = 7.4$ Гц, 1H), 7.53 (с, 1H), 7.48–7.32 (м, 2H), 3.94-3.63 (м, 16H), 2.82–2.53 (м, 4H). ЯМР ^{13}C (CDCl_3) δ , м. д.: 176.4, 170.6, 165.0, 162.0, 146.0, 141.7, 133.5, 125.9, 124.5, 121.3, 115.9, 110.8, 108.5, 106.1, 66.6, 45.0, 44.1, 41.6, 29.3, 28.0.



5-(4-(4-(4-(2-(Дифторметил)-1*H*-бензо[*d*]имидазол-1-ил)-6-морфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-пиперазин-1-ил)-4-оксобутанамидо)-*N*-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-пентанамид
(**120**) [3]

В круглодонную колбу, снабженную якорем магнитной мешалки, внесли **128** (52 мг, 0.1 ммоль), НАТУ (57 мг, 0.15 ммоль), ДМФА (2 мл), **136** (39 мг, 0.1 ммоль) и основание Хюнига (46 мг, 62 мкл, 0.4 ммоль). Смесь перемешивали без нагревания 4 часа, после чего органический слой экстрагировали EtOAc, сушили над MgSO₄ и упарили на роторном испарителе. Осадок был очищен колоночной хроматографией (элюент: DCM/MeOH 20:1) с получением искомого PROTAC **120**. Выход: 25 мг, 29%, т. пл. 176-177°C (т. пл. 176-177°C [3]). ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆) δ, м. д. (*J*, Гц): 9.40 (с, 1H), 9.20 (с, 1H), 8.76 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 8.34 – 8.25 (д, 1H), 7.86 (д, *J* = 7.6 Гц, 1H), 7.66 (т, *J* = 8.1 Гц, 1H), 7.54 – 7.49 (т, 1H), 7.42 – 7.33 (м, 2H), 6.25 (с, 1H), 4.95 (дд, *J* = 12.2, 5.4 Гц, 1H), 3.95 – 3.75 (м, 12H), 3.67 (м, 4H), 3.29 – 3.17 (м, 2H), 2.98 – 2.76 (м, 2H), 2.75 – 2.71 (м, 2H), 2.54-2.47 (м, 2H), 2.45 (т, *J* = 7.3 Гц, 2H), 2.43-2.06 (м, 2H), 1.76-1.73 (м, 2H), 1.56-1.53 (м, 2H), 1.44-1.38 (м, 2H). ЯМР ¹³C (DMCO-*d*₆) δ, м. д.: 167.5, 167.4, 166.2, 164.5, 163.6, 161.9, 160.3, 157.3, 141.4, 141.2, 140.9, 137.2, 131.6, 121.1, 120.6, 119.7, 116.6, 113.7, 111.1, 110.7, 106.1, 103.7, 72.0, 61.9, 44.6, 40.3, 39.3, 36.7, 34.6, 33.0, 26.7, 26.6, 24.5, 23.9, 21.6, 20.1, 18.0.

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- проведен многоступенчатый синтез известного PROTAC, направленного на деградацию РІЗК CRBN-зависимым образом, в качестве положительного контроля. Отдельные соединения, полученные в ходе основного синтеза (помалидомид и его предшественники, монозамещенный триазол), могут быть использованы в ходе дальнейших проектов, направленных на синтез серии PROTAC;
- получены клональные клеточные линии HEK293, стабильно экспрессирующие РІЗК-NiViT;
- проведена валидация тест-системы, подтверждена ее работоспособность и воспроизводимость результатов. Действие PROTAC **120** вызывает доза-зависимую деградацию РІЗК на всех клонах. Данная платформа в последствии будет использована в текущем проекте Центра медицинской химии, направленном на дизайн и оптимизацию серии РІЗК-PROTAC.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. PROTACs: great opportunities for academia and industry / X. Sun, H. Gao, Y. Yang et al. // *Sig. Transduct. Target. Ther.* — 2019. — Vol. 4, № 64. P. — 1-33.
2. Besten W. Prospecting for molecular glues / W. Besten, J. R. Lipford // *Nature Chem. Biol.* — 2020. — Vol 16. — P. 1157–1158.
3. Phthalimide conjugations for the degradation of oncogenic PI3K / W. Li, C. Gao, L. Zhao et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 10. — P. 237-247.
4. Paiva S.-L. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design / S.-L. Paiva, C. Crews // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2019. — Vol. 50. — P. 111-119.
5. Zou Y. The PROTAC technology in drug development / Y. Zou, D. Ma, Y. Wang // *Cell Biochem. Funct.* — 2019. — Vol. 37, № 1. — P. 21-30.
6. Li X. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy / X. Li, Y. Song // *J. Hemat. Oncol.* — 2020. — Vol. 13. — P. 620-634.
7. PROTAC: A promising technology for cancer treatment / X. Zhou, R. Dong, J.-Y. Zhang // *Eur. J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 203. — P. 111-120.
8. Nakatsukasa K. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum / K. Nakatsukasa, J. L. Brodsky J. // *Traffic.* — 2008. — Vol. 9, № 6. — P. 861-870.
9. Zheng N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation / N. Zheng, N. Shabek // *Ann. Rev. Biochem.* — 2017. — Vol. 86. — P. 129-157.
10. Ocaña A. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy / A. Ocaña, A. Pandiella // *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* — 2020. — Vol. 39.
11. Streich F. C. Jr. Activation of ubiquitin and ubiquitin-like proteins / F. C. Jr. Streich, A. L. Haas // *Subcell. Biochem.* — 2010. — Vol. 54. — P. 1-16.
12. Ravid T. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system / T. Ravid, M. Hochstrasser // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* — 2008. — Vol. 9. — P. 679-690.

13. Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide / E. Fischer, K. Böhm, J. Lydeard et al. // *Nature*. — 2014. — Vol. 512. — P. 49–53.
14. Varshavsky A. Naming a targeting signal / A. Varshavsky // *Cell*. — 1991. — Vol. 64, № 1. — P. 13-15.
15. Tomita T. Substrate selection by the proteasome through initiation regions / T. Tomita, A. Matouschek // *Protein Sci*. — 2019. — Vol. 28, № 7. — P. 1222-1232.
16. Varshavsky A. *N*-degron and *C*-degron pathways of protein degradation / A. Varshavsky // *Proc Nat. Acad. Sci. USA*. — 2019. — Vol. 116, № 2. — P. 358-366.
17. Keiler K. C. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA / K. C. Keiler, P. R. Waller, R. T. Sauer // *Sci*. — 1996. — Vol. 271, № 5251. — P. 990-993.
18. *C*-Terminal end-directed protein elimination by CRL2 ubiquitin ligases / H. C. Lin, C. W. Yeh, Y. F. Chen et al. // *Mol. Cell*. — 2018. — Vol. 70, № 4. — P. 602-613.
19. Nakatsukasa K. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum / K. Nakatsukasa, J. L. Brodsky // *Traffic*. — 2008. — Vol. 9, № 6. — P. 861-870.
20. Thrower J. S. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal / J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner et al. // *EMBO J*. — 2000. — Vol. 19, № 1. — P. 94-102.
21. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death/ A. Ciechanover, A. L. Schwartz // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95, № 6. — P. 2727-2730.
22. Jang H. H. Regulation of protein degradation by proteasomes in cancer / H. H. Jang // *J. Cancer. Prev.* — 2018. — Vol. 23, № 4. — P. 153-161.
23. Nandi D. The ubiquitin-proteasome system / D. Nandi, P. Tahiliani, A. Kumar et al. // *J. Biosci.* — 2006. — Vol. 31. — P. 137-155.

24. Hoeller D. How the proteasome is degraded / D. Hoeller, I. Dikic // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2016. — Vol. 113, № 47. — P. 13266-13268.
25. Collins G. A. The logic of the 26S Proteasome / G. A. Collins, A. L. Goldberg // *Cell.* — 2017. — Vol. 169, № 5. — P. 792-806.
26. Chen S.-J. Evolution of substrates and components of the Pro/N-Degron pathway / S.-J. Chen, A. Melnykov, A. Varshavsky // *ACS Biochem.* 2020. — Vol. 59, № 4. — P. 582–593.
27. Voges D. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis / D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister // *Ann. Rev. Biochem.* — 1999. — Vol. 68. — P. 1015-1068.
28. Bricelj A. E3 ligase ligands in successful PROTACs: an overview of syntheses and linker attachment points / A. Bricelj, C. Steinebach, R. Kuchta et al. // *Front. Chem.* — 2021. — Vol. 9. — P. 1-46.
29. Lumpkin R. J. Structure and dynamics of the ASB9 CUL-RING E3 Ligase / R. J. Lumpkin, R. W. Baker, A. E. Leschziner, E. A. Komives // *Nature Comm.* — 2020. — Vol. 11.
30. Deshaies R. J. RING domain E3 ubiquitin ligases / R. J. Deshaies, C. A. Joazeiro // *Ann. Rev. Biochem.* — 2009. — Vol. 78. — P. 399-434.
31. Pan Z.-Q. Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7 in growth control and cancer / Z.-Q. Pan // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2020. — № 1217. — P. 285-296.
32. Wang P. RBR E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis / P. Wang, X. Dai, W. Jiang et al. // *Semin. Canc. Biol.* — 2020. — Vol. 67. — P. 131-144.
33. Bernassola F. HECT-Type E3 ubiquitin ligases in cancer / F. Bernassola, G. Chillemi, G. Melino // *Trends. Biochem. Sci.* — 2019. — Vol. 44, № 12. — P. 1057-1075.
34. Sluimer J. Regulating the human HECT E3 ligases / J. Sluimer, B. Distel // *Cell. Mol. Life. Sci.* — 2018. — Vol. 75. — P. 3121-3141.
35. Qian H. structure and function of HECT E3 ubiquitin ligases and their role in oxidative stress / H. Qian, Y. Zhang, B. Wu et al. // *J. Transl. Int. Med.* — 2020. — Vol. 8, № 2. — P. 71-79.

36. Uchida C. RING-, HECT-, and RBR-type E3 ubiquitin ligases: involvement in human cancer / C. Uchida, M. Kitagawa // *Curr. Cancer. Drug. Targets.* — 2016. — Vol. 16, № 2. — P. 157-174.
37. PROTACs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation / K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98, № 15. — P. 8554-8559.
38. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2 // N. Sin, L. Meng, Q. W. M. Wang et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94, № 12. — P. 6099-6103.
39. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase / A. Yaron, A. Hatzubai, M. Davis et al. // *Nature.* — 1998. — Vol. 396. — P. 590-594.
40. Development of PROTACs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation / K. M. Sakamoto, K. B. Kim, R. Verma et al. // *Mol. Cell. Proteomics.* — 2003. — Vol. 2, № 12. — P. 1350-1358.
41. Chemical genetic control of protein levels: selective in vivo targeted degradation / J. S. Schneekloth, F. N. Fonseca, M. Koldobskiy et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — Vol. 126, № 12. — P. 3748-3754.
42. Higgins J. J. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation / J. J. Higgins, J. Pucilowska, R. Q. Lombardi, et al. // *Neurol.* — 2004. — Vol. 63, № 10. — P. 1927–1931.
43. CRL4A(CRBN) E3 ubiquitin ligase restricts BK channel activity and prevents epileptogenesis / J. Liu, J. Ye, X. Zou et al. // *Nature Comm.* — 2014. — Vol. 5.
44. Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon / K. M. Lee, S. Jo, H. Kim et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — Vol. 1813, № 3. — P. 448-455.
45. Epigenetic regulation of Kcna3-encoding Kv1.3 potassium channel by cereblon contributes to regulation of CD4⁺ T-cell activation / J. A. Kang, S. H. Park,

C. R. Lee et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2016. — Vol. 113, № 31. — P. 8771-8876.

46. Mellin G.W. The saga of thalidomide. Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies / G. W. Mellin, M. Katzenstein // N. Engl. J. Med. — 1962. — Vol. 267. — P. 1184–1193.

47. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. Birth defects / N. Vargesson // Embr. Today: Rev. — 2015. — Vol. 105, № 2. — P. 140–156.

48. Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions / J. Sheskin // Clin. Pharmac. Ther. — 1965. — Vol. 6, № 3. — P. 303–306.

49. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma / S. Singhal, J. Mehta, R. Desikan et al. // N. Engl. J. Med. — 1999. — Vol. 341. — P. 1565–1571.

50. First thalidomide clinical trial in multiple myeloma: a decade / F. Rhee, M. Dhodapkar, J. D. Shaughnessy et al. // Blood. — 2008. — Vol. 112, № 4. — P. 1035-1038.

51. Ito T. et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito, H. Ando, T. Suzuki et al. // Sci. — 2010. — Vol. 327. — P. 1345–1350.

52. Gandhi K. A. 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 CRL4-CRBN / K. A. Gandhi, J. Kang, C. G. Havens et al. // Brit. J. Hemat. — 2014. — Vol. 164, № 6. — P. 811-821.

53. Shi Q. Cereblon: a protein crucial to the multiple functions of immunomodulatory drugs as well as cell metabolism and disease generation / Q. Shi, L. Chen // Immun. Res. — 2017. — Vol. 2017.

54. Evolution of cereblon-mediated protein degradation as a therapeutic modality / P. P. Chamberlain, L. A. D'Agostino, J. M. Ellis et al. // ACS Med. Chem. Lett. — 2019. — Vol. 10, № 12. — P. 1592-1602.

55. SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate / M. E. Matyskiela, S. Couto, X. Zheng et al. // *Nature Chem. Biol.* — 2018. — Vol. 14. — P. 981-987.
56. Alabi S. Novel mechanisms of molecular glue-induced protein degradation / S. Alabi // *ACS Biochem.* — 2021. — Vol. 60, № 31. — P. 2371-2373.
57. Simple structural modifications converting a Bona fide MDM2 PROTAC degrader into a molecular glue molecule: a cautionary tale in the design of PROTAC degraders / J. Yang, Y. Li, A. Aguilar et al. // *J. Med. Chem.* — 2019. — Vol. 62, № 21. — P. 9471-9487.
58. A Cereblon modulator (CC-220) with improved degradation of Ikaros and Aiolos / M. E. Matyskiela, W. Zhang, H.-W. Man et al. // *J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 61, № 2. — P. 535-542.
59. Dong G. Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery / G. Dong, Y. Ding, S. He et al. // *J. Med. Chem.* — 2021. — Vol. 64, № 15. — P. 10606–10620.
60. Selective Target Protein Degradation via Phthalimide Conjugation / G. E. Winter, D. L. Buckley, J. Paulk et al. // *Sci.* — 2015. — Vol. 348. — P. 1376-1381.
61. Selective inhibition of BET bromodomains / P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud et al. // *Nature.* — 2010. — Vol. 468. — P. 1067-1073.
62. Creating diverse target-binding surfaces on FKBP12: synthesis and evaluation of a rapamycin analogue library / X. Wu, L. Wang, Y. Han et al. // *ACS Comb. Sci.* — 2011. — Vol. 13, № 5. — P. 486-495.
63. Hijacking the E3 ubiquitin ligase Cereblon to efficiently target BRD4 / J. Lu, Y. Qian, M. Altieri et al. // *Chem. Biol.* — 2015. — Vol. 22, № 6. — P. 755-763.

64. Replacing the phthalimide core in thalidomide with benzotriazole / M. Krasavin, A. Bubyrev, A. Kazantsev et al. // *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* — 2022. — Vol. 37, № 1. — P. 527-530.
65. Development of selective mono or dual PROTAC degrader probe of CDK isoforms / F. Zhou, L. Chen, C. Cao et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 187.
66. Discovery of potent Epidermal growth factor receptor (EGFR) degraders by proteolysis targeting chimera (PROTAC) / H. Zhang, H.-Y. Zhao, X.-X. Xia et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 189.
67. Protein degradation through covalent inhibitor-based PROTACs / G. Xue, J. Chen, L. Liu et al. // *RCS Chem. Biol.* — 2021. — Vol. 56. — P. 725-742.
68. Chemically induced degradation of Anaplastic lymphoma kinase (ALK) / C. E. Powell, Y. Gao, Li.Tan et al. // *J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 61, № 9. — P. 4249-4255.
69. Discovery of proteolysis-targeting chimera molecules that selectively degrade the IRAK3 Pseudokinase / S. L. Degorce, O. Tavana, E. Banks, // *J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 63, № 18. — P. 10460-10473.
70. Chen H. Chemically induced degradation of CK2 by proteolysis targeting chimeras based on a ubiquitin-proteasome pathway / H. Chen, F. Chen, N. Liu et al. // *Bioorg. Chem.* — 2018. — Vol. 81. — P. 536-544.
71. Development of the first small molecule Histone deacetylase 6 (HDAC6) degraders / K. Yang, Y. Song, H. Xie et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2018. — Vol. 28, № 14. — P. 2493-2497.
72. Development of multifunctional Histone deacetylase 6 degraders with potent antimyeloma activity / H. Wu, K. Yang, Z. Zhang et al. // *J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 28, № 14. — P. 2493-2497.
73. First small-molecule PROTACs for G protein-coupled receptors: inducing α 1A-adrenergic receptor degradation / Z. Li Z, Y. Lin, H. Song et al. // *Acta. Pharm. Sin. B.* — 2020. — Vol. 10, № 9. — P. 1669-1679.

74. Discovery of the first potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 / M. Hu, W. Zhou, Y. Wang et al. // *Acta. Pharm. Sin. B.* — 2020. — Vol. 10, № 10. — P. 1943-1953.
75. Design and synthesis of α -naphthoflavone chimera derivatives able to eliminate cytochrome P450 (CYP)1B1-mediated drug resistance via targeted CYP1B1 degradation / L. Zhou, W. Chen, C. Cao et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. — Vol. 189.
76. Targeted degradation of aberrant Tau in frontotemporal dementia patient-derived neuronal cell models / M C. Silva, F. M. Ferguson, C. Quan et al. // *eLife.* — 2019. — Vol. 8.
77. Design and synthesis of selective degraders of EGFR L858R/T790M mutant / X. Zhang, F. Xua, L. Tong et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 192.
78. Efficient synthesis of immunomodulatory drug analogues enables exploration of structure–degradation relationships / G. M. Burslem, P. Ottis, S. Jaime-Figueroa et al. // *Chem. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 13, № 15. — P. 1508-1512.
79. Пат. 2011/154739 Всемирная организация интеллектуальной собственности, МКИЗ С 7 D 401/04, А 61 К 31/454, А 61 Р 29/00, А 61 Р 37/00. Crystalline forms of thalidomide and processes for their preparation / V. G. Gore & Co. - № PCT/GB2011/051078. Заявлено 09.06.2010; Опубл. 15.12.2011. 105 с.
80. Пат. 2008/082601 Всемирная организация интеллектуальной собственности, МКИЗ А 1 N 43/04, А 61 К 31/70, С 7 Н 19/04, С 7 Н 19/10, С 7 Н 19/20. С 7 Н 19/048. Compounds and pharmaceutical compositions for the treatment of viral infections / S. Peyrottes & Co. - № PCT/US2007/026408. Заявлено 28.12.2006; Опубл. 28.12.2007. 104 с.

81. Efficient palladium-catalyzed double carbonylation of *o*-dibromobenzenes: synthesis of thalidomide / J. Chen, K. Natte, A. Spannenberg et al. // *Org. Biomol. Chem.* — 2014. — № 30. — P 5578-5581.
82. Vu B. D. Facile synthesis of Thalidomide / B. D. Vu, N. M. H. Ba, D. C. Phan // *Org. Process Res. Dev.* — 2019. — Vol. 23, № 7. — P. 1374–1377.
83. Chemical modifications induced by phthalic anhydride, a respiratory sensitizer, in reconstructed human epidermis: a combined HRMAS NMR and LC-MS/MS proteomic approach / M.-T. Khong, V. Berl, L. Kuhn et al. // *Chem. Res. Toxicol.* — 2021. — Vol. 34, № 9. — P. 2087-2099.
84. Kantin G. Efficient cyclodehydration of dicarboxylic acids with oxalyl chloride / G. Kantin, E. Chupakhin, D. Dar'in et al. // *Tet. Lett.* — 2017. — Vol. 58, № 32. — P. 3160-3163.
85. The use of BrCCl₃-PPh₃ in Appel type transformations to esters, *O*-acyloximes, amides, and acid anhydrides / M. Al-Azania, M. al-Sulaibia, N. Sooma et al. // *Comptes. Rendus. Chimie.* — 2016. — Vol. 19, № 8. — P. 921-932.
86. Hu Y. L. Efficient and convenient synthesis of symmetrical carboxylic anhydrides from carboxylic acids with sulfated zirconia by phase transfer catalysis / Y. L. Hu, X. E. Zhao, M. Lu // *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* — 2011. — Vol. 25, № 2. — P. 255-262.
87. ПАТЕНТ 10800770 США, МКИЗ А 61 Р 35/00, С 7 D 405/14, С 7 D 413/14. Chroman derivatives having estrogen receptor degradation activity and uses thereof / K. Liu & Co. - № PCT/US2021/015944. Заявлено 12.12.2019; Опубли. 13.10.2021. 101-110 с.
88. Lohbeck J. L. Practical synthesis of a phthalimide-based Cereblon ligand to enable PROTAC development / J. L. Aubry, K. Miller // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2016. — Vol. 26, № 21. — P. 5260-5262.
89. Mono- and dihydroxylated metabolites of thalidomide: synthesis and TNF- α production-inhibitory activity / T. Nakamura, T. Noguchi, H.

Kobayashi et al. // Chem. Pharm. Bull. — 2006. — Vol. 52, № 12. — P. 1709-1712.

90. Wang R. Naphthalimide/benzimide-based excited-state intramolecular proton transfer active luminogens: aggregation-induced enhanced emission and potential for chemical modification / R. Wang, J. Dinga, Y. Zhang // New J. Chem. — 2019. — Vol. 43, № 23. — P. 9152-9161.

91. Solid-phase synthesis and catalytic sweetening performance of sulfonated cobalt phthalocyanine from sulfonated phthalic anhydride mixture / L. Zhu, X. Jing, L. Song et al. // New J. Chem. — 2014. — Vol. 38, № 2. — P. 663-668.

92. Product-oriented chemical surface modification of a levansucrase (SacB) via an ene-type reaction / M. E. Ortiz-Soto, J. Ertl, J. Mut et al. // Chem. Sci. — 2018. — Vol. 9, № 24. — P. 5312-5321.

93. Bemis T. A. Traceless staudinger ligation enabled parallel synthesis of proteolysis targeting chimera linker variants / T. A. Bemis, J. J. L. Clair, M. D. Burkart // Chem. Comm. — 2021. — Vol. 57, № 8. — P. 1026-1029.

94. Synthesis and biological evaluation of chemokine receptor ligands with 2-benzazepine scaffold / S. Thum, A. K. Kokornaczyk, T. Seki et al. // Eur. J. Med. Chem. — 2017. — Vol. 135. — P. 401-413.

95. PROTAC-mediated crosstalk between E3 ligases / C. Steinebach, H. Kehm, S. Lindner et al. // Chemical Communications. — 2019. — Vol. 55, № 19. — P. 1821-1824.

96. Influence of linker attachment points on the stability and neosubstrate degradation of Cereblon ligands / A. Bricelj, Y. L. Dora, D. Ferber et al. // ACS Med. Chem. Lett. — 2021. — Vol. 12, № 11. — P. 1733-1738.

97. Discovery of Wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving antitumor activity / J. Bian, J. Ren, Y. Li et al. // Bioorg. Chem. — 2018. — Vol. 81. — P. 373-381.

98. Scalable and green process for the synthesis of anticancer drug lenalidomide / Y. Ponomaryov, V. Krasikova, A. Lebedev et al. // Chem. Het. Comp. — 2015. — Vol. 51. — P. 133-138.
99. Rosso G. *Tert*-butoxy-*bis*(dimethyl-amino)methane (Bredereck's Reagent) / G. Rosso // Synlett. — 2006. — Vol. 5. — P. 809–810.
100. Zhang J. VHL and hypoxia signaling: beyond HIF in cancer / J. Zhang, Q. Zhang // Biomed. — 2018. — Vol. 6, № 1.
101. Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with in vitro nanomolar affinities / C. Galdeano, S. M. Gadd, P. Soares et al. // J. Med. Chem. — 2014. — Vol. 57, № 20. — P. 8657-8663.
102. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain / P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal et al. // Sci. — 1996. — Vol. 274. — P. 948-953.
103. Schneekloth A. R. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: route to chemical proteomics / A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2008. — Vol. 18, № 22. — P. 5904-5908.
104. Nicholas C. A. Assessment of the regioselectivity in the condensation reaction of unsymmetrical *o*-phthaldialdehydes with alanine / C. A. Nicholas, J. Westwood // Tet. — 2018. — Vol. 74, № 2. — P. 224-239.
105. Troup R. I. Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review / R. I. Troup, C. Fallan, M. G. J. Baud // Explor. Target. Antitumor. Ther. — 2020. — Vol. 1. — P. 273-312.
106. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges / S. Zeng, W. Huang, X. Zheng et al. // Eur. J. Med. Chem. — 2021. — Vol. 210.

107. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) of Anaplastic lymphoma kinase (ALK) / C. Zhang, X.-R. Han, X. Yang // *Eur. J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 151. — P. 304-314.
108. PROTAC-mediated degradation reveals a non-catalytic function of Aurora-A kinase / B. Adhikari, J. Bozilovic, M. Diebold et al. // *Nature Chem. Biol.* — 2020. — Vol. 16. — P. 1179-1188.
109. Development of a novel B-Cell lymphoma 6 (BCL6) PROTAC to provide insight into small molecule targeting of BCL6 / W. McCoull, T. Cheung, E. Anderson // *ACS Chem. Biol.* — 2018. — Vol. 13, № 11. — P. 3131-3141.
110. Developing degraders: principles and perspectives on design and chemical space / H. J. Maple, N. Clayden, A. Baron et al. // *Med. Chem. Comm.* — 2019. — Vol. 10, № 10. P. 1755-1764.
111. Discovery of potent and selective Epidermal growth factor receptor (EGFR) bifunctional small-molecule degraders / M. Cheng, X. Yu, K. Lu et al. // *J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 63, № 3. — P. 1216-1232.
112. Functional characterization of a PROTAC directed against BRAF mutant V600E / G. Posternak, X. Tang, P. Maisonneuve et al. // *Nature Chem. Biol.* — 2020. — Vol. 16. — P. 1170–1178.
113. Ishida T. E3 ligase ligands for PROTACs: how they were found and how to discover new ones / T. Ishida, A. Ciulli // *SLAS Discov.* — 2021. — Vol. 26, № 4. — P. 484-502.
114. Potent and preferential degradation of CDK6 via proteolysis targeting chimera degraders / S. Su, Z. Yang, H. Yang et al. // *J. Med. Chem.* — 2019. — Vol. 62, № 16. — P. 7575-7582.
115. Degradation of Bruton's tyrosine kinase mutants by PROTACs for potential treatment of ibrutinib-resistant non-Hodgkin lymphomas / Y. Sun, N. Ding, Y. Song et al. // *Leukemia.* — 2019. — Vol. 33. — P. 2105-2110.

116. Moses J. E. The growing applications of click chemistry / J. E. Moses, A. D. Moorhouse // *Chem. Soc. Rev.* — 2007. — Vol. 36, № 8. — P. 1249-1262.
117. Lebraud H. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras / H. Lebraud, D. J. Wright, C. N. Johnson et al. // *ACS Cent. Sci.* — 2016. — Vol. 2, № 12. — P. 927-934.
118. Discovery of A031 as effective proteolysis targeting chimera (PROTAC) androgen receptor (AR) degrader for the treatment of prostate cancer / L. Chen, L. Han, S. Mao et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2021. — Vol. 216.
119. Discovery of ARD-69 as a highly potent Proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of Androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer / X. Han, C. Wang, C. Qin et al. // *J. Med. Chem.* — 2019. — Vol. 62, № 2. — P. 941-964.
120. Discovery of QCA570 as an exceptionally potent and efficacious Proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of the Bromodomain and extra-terminal (BET) proteins capable of inducing complete and durable tumor regression / C. Qin, Y. Hu, B. Zhou et al. // *J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 61, № 15. — P. 6685-6704.
121. Structure-based discovery of SIAIS001 as an oral bioavailability ALK degrader constructed from Alectinib / C. Ren, N. Sun, Y. Kong et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2021. — Vol. 217.
122. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant / H. Sakamoto, T. Tsukaguchi, S. Hiroshima // *Cancer Cell.* — 2011. — Vol. 19, № 5. P. 679-690.
123. The p110 δ structure: mechanisms for selectivity and potency of new PI(3)K inhibitors / A. Berndt, S. Miller, O. Williams et al. // *Nature.* — 2010. — Vol. 6. — P. 117-124.
124. Targeting the C481S ibrutinib-resistance mutation in Bruton's tyrosine kinase using PROTAC-mediated degradation / A. D. Buhimschi, H.

A. Armstrong, M. Toure // ACS Biochem. — 2018. — Vol. 57, № 26. — P. 3564-3575.

125. Wang C. Developments of CRBN-based PROTACs as potential therapeutic agents / C. Wang, Y. Zhang, Y. Wu et al. // Eur. J. Med. Chem. — 2021. — Vol. 225. — P. 113749.

126. Linker length for small molecule PROTACs that selectively target p38 α and p38 β for degradation / C. Donoghue, M. Cubillos-Rojas, N. Gutierrez-Prat et al. // Eur. J. Med. Chem. — 2020. — Vol. 201.

127. Bemis T. A. Unraveling the role of linker design in proteolysis targeting chimeras / T. A. Bemis, J. J. L. Clair // J. Med. Chem. — 2021. — Vol. 64, № 12. — P. 8042-8052.

128. BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design / W. Farnaby, M. Koegl, M. J. Roy et al. // Nature Chem. Biol. — 2019. — Vol. 15. — P. 672-680.

129. Strategies for designing Proteolysis targeting chimaeras (PROTACs) / S. He, G. Dong, J. Cheng et al. // Med. Res. Rev. — 2022.

130. Zaidman D. PRosettaC: Rosetta based modeling of PROTAC mediated ternary complexes / D. Zaidman, J. Prilusky, N. London // J. Chem. Inf. Model. 2020. — Vol. 60, № 10. — P. 4894-4903.

131. Drummond M. L. *In silico* modeling of PROTAC-mediated ternary complexes: validation and application / M. L. Drummond, C. I. Williams // J. Chem. Inf. Model. — 2019. — Vol. 59, № 4. — P. 1634-1644.

132. Development of dual and selective degraders of Cyclin-dependent kinases 4 and 6 / B. Jiang, E. S. Wang, K. A. Donovan et al. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. — 2019. — Vol. 58, № 19. — P. 6321-6326.

133. Aublette M. C. Selective Wee1 degradation by PROTAC degraders recruiting VHL and CRBN E3 ubiquitin ligases / M. C. Aublette, T. A. Harrison, E. J. Thorpe et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2022. — Vol. 64.

134. Synthesis of fluorescent molecular probes based on cis-cinnamic acid and molecular imaging of lettuce roots / H. Fukuda, K. Nishikawa, Y. Fukunaga et al. // *Tet.* — 2016. — Vol. 72, № 41. — P. 6492-6498.
135. Discovery of PROTAC BCL-XL degraders as potent anticancer agents with low on-target platelet toxicity / X. Zhang, D. Thummuri, X. Liu et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 192. — P. 1-8.
136. Chemoselective synthesis of lenalidomide-based PROTAC library using alkylation reaction / X. Qiu, N. Sun, Y. Kong et al. // *Org. Lett.* — 2019. — Vol. 21, № 10. — P. 3838-3841.
137. Modular PROTAC design for the degradation of oncogenic BCR-ABL / A. C. Lai, M. Toure, D. Hellerschmied et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2016. — Vol. 55, № 2. — P. 807-810.
138. Пат. 109970745 КНР, МКИЗ А 61 К 31/53; А 61 Р 35/00; А 61 Р 35/02; С 7 D 487/04. Substituted pyrrole triazine compound, pharmaceutical composition thereof and application of substituted pyrrole triazine compound and pharmaceutical composition / Y. Wang, H. Li & Co. - № CN201910297549. Заявлено 16.04.2018; Опубли. 15.04.2019.
139. Lien E.C. PI3K signaling in cancer: beyond AKT / E.C Lien, C.C Dibble, A. Toker // *Curr. Opin. Cell Bio.* — 2017. — Vol. 45. — P. 62-71.
140. Fruman D. A. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities / D. A. Fruman, C. Rommel // *Nature Rev. Drug Discov.* — 2014. — Vol. 13. — P. 140-156.
141. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials / J. Yang, J. Nie, X. Ma et al. // *Mol. Cancer.* — 2019. — Vol. 18. — P. 1-26.
142. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior / N. Jiang, Q. Dai, X. Su et al. // *Mol. Biol. Rep.* — 2020. — Vol. 47. — P. 4587-4629.

143. Britten C. D. PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types / C. D. Britten // *Cancer. Chemother. Pharmacol.* — 2013. — Vol. 71. — P. 1395-1409.
144. Identification and structure–activity relationship of 2-morpholino-6-(3-hydroxyphenyl)pyrimidines, a class of potent and selective PI3 kinase inhibitors / S. Pecchi, P.A. Renhowe, C. Taylor et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2010. — Vol. 20, № 23. — P. 6895-6898.
145. 6-Aryl substituted 4-(4-cyanomethyl) phenylamino quinazolines as a new class of isoform-selective PI3K- α inhibitors / R.R. Yadav, S.K. Guru, P. Joshi et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2016. — Vol. 122. — P. 731-743.
146. Discovery of novel PI3-Kinase δ specific inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis: taming CYP3A4 time-dependent inhibition / B.S. Safina, S. Baker, M. Baumgardner et al. // *J. Med. Chem.* — 2012. — Vol. 55, № 12. — P. 5887-5900.
147. Design and synthesis of a novel series of orally bioavailable, CNS-penetrant, isoform selective phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) inhibitors with potential for the treatment of Multiple sclerosis (MS) / J.H. Come, P.N. Collier, J.A. Henderson et al. // *J. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 61, № 12. — P. 5245-5256.
148. Identification of NVP-BKM120 as a potent, selective, orally bioavailable class I PI3 Kinase inhibitor for treating cancer / M. T. Burger, S. Pecchi, A. Wagman et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* — 2011. — Vol. 2, № 10. — P. 774–779.
149. Synthesis and biological evaluation of novel analogues of the pan class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor 2-(difluoromethyl)-1-[4,6-di(4-morpholinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]-1*H*-benzimidazole (ZSTK474) / G. W. Rewcastle, S. A. Gamage, J. U. Flanagan et al. // *J. Med. Chem.* — 2011. — Vol. 54, № 20. — P. 7105-7126.
150. A safety study of oral ZSTK474 in patients with cancer. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01280487> (дата обращения 13.04.2022)

151. Shultz Z. A modular approach for the installation of functionalized phosphonates to heterocycles / Z. Shultz, C. Shan, L. Wojtas et al. // *Arkivoc.* — 2021. — Vol. 5. — P. 73-96.
152. Discovery of novel PARP/PI3K dual inhibitors with high efficiency against BRCA-proficient triple negative breast cancer / J. Wanga, G. Heb, H. Li et al. // *Eur. J. Med. Chem.* — 2021. — Vol. 213. — P. 1-12.
153. Culhane P. J. 3-Nitroptalic acid / P. J. Culhane, G. E. Woodward // *Org. Synth. Coll.* — 1927. — Vol. 7. — P. 70.
154. Nicolet B. H. 3-Nitroptalic anhydride / B. H. Nicolet, J. A. Bender // *Org. Synth. Coll.* — 1927. — Vol. 7. — P. 74.
155. Bhingardev P. C γ (S/R)-bimodal peptide nucleic acids (C γ -bm-PNA) form coupled double duplexes by synchronous binding to two complementary DNA strands / P. Bhingardev, B. R. Madhanagopal, K. N. Ganesh // *J. Org. Chem.* — 2020. — Vol. 85, № 21. — P. 13680-13693.
156. Homo-PROTACs for the chemical knockdown of Cereblon / C. Steinebach, S. Lindner, N. D. Udeshi et al. // *ACS Chem. Biol.* — 2018. — Vol. 3, № 9. — P. 2771-2782.
157. Selective degradation of CDK6 by a palbociclib based PROTAC / S. Rana, M. Bendjennat, S. Kour et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2018. — Vol. 29, № 11. — P. 1375-1379.
158. England C. G. NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence // C. G. England, E. B. Ehlerding, W. Cai // *Bioconjug. Chem.* — 2018. — Vol. 27, № 5. — P. 1175-1187.
159. CRISPR-mediated tagging of endogenous proteins with a luminescent peptide / M. K. Schwinn, T. Machleidt, K. Zimmerman et al. // *ACS Chem. Biol.* — 2018. — Vol. 13, № 2. — P. 467-474.
160. Bayer E. Untersuchungen zur totalsynthese des ferredoxins—I : Synthese der aminosäuresequenz von *C. pasteurianum* ferredoxin / E. Bayer, G. Jung, H. Hagenmaier. *Tetrahedron.* — 1968. — Vol. 24, № 13. — P. 4853-4860.

161. Capitosti S. M. Facile synthesis of an azido-labeled thalidomide analogue / S. M. Capitosti, T. P. Hansen, M. L. Brown // *Org. Lett.* — 2003. — Vol. 5, № 16. — P. 2865-2867.