

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»

*На правах рукописи*



Сачкова Анастасия Александровна

**Дизайн и синтез потенциальных противоопухолевых конъюгатов PROTAC  
для протеасомального расщепления киназ c-Met и ALK5**

1.4.3. Органическая химия (химические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, чл.-корр. РАН,  
заведующий кафедрой органической химии  
химического факультета  
ННГУ им. Н.И. Лобачевского  
Федоров Алексей Юрьевич

Нижний Новгород

2026 г.

## Содержание

Список сокращений и обозначений.....	4
Введение.....	6
Литературный обзор.....	6
1. Таргетное расщепление белков.....	14
2. Протеасомальное расщепление белков.....	20
2.1. Дизайн PROTAC-молекул.....	23
2.1.1. Арсенал E3-лигаз для направленной деградации белков.....	23
2.1.1.1. Использование белков-ингибиторов апоптоза (IAP) как E3-лигаз.....	26
<i>Общие сведения о белках IAP</i> .....	26
<i>Терапевтические агенты, действующие на IAP</i> .....	27
<i>Общие сведения о молекулах SNIPER</i> .....	31
2.1.2. Выбор линкера.....	33
2.1.2.2. Гибкие линкеры.....	34
2.1.2.3. Жесткие линкеры.....	36
<i>Введение жестких фрагментов в состав линкеров</i> .....	38
2.1.3. Выбор лиганда для целевого белка-мишени.....	40
2.2. Недостатки терапевтических агентов PROTAC.....	41
2.3. Новые типы PROTAC.....	42
2.3.1 Биоортогональная сборка PROTACs.....	44
2.3.2. Использование векторов направленной доставки в составе PROTAC.....	45
2.3.3. PROTAC, активируемые внешним воздействием.....	47
2.3.4. PROTAC, активируемые эндогенными стимулами.....	49
2.4. Сравнение различных классов протеасомальных деградеров.....	51
3. Расщепление белков с участием лизосом.....	53
3.1. Эндосома-лизосомный механизм.....	55
3.2. Аутофаголизосомный механизм.....	58
3.3. Шаперон-опосредованная аутофагия.....	61
4. Таргетное расщепление белков в контексте существующих терапевтических подходов.....	63
5. Агенты таргетного расщепления белков в клинических испытаниях.....	67
Заключение.....	70
Обсуждение результатов.....	71
1. Молекулы PROTAC на основе кабозантиниба, направленные на расщепление c-Met.....	71
1.1. Получение карбоксилатных производных кабозантиниба 104a-b, 106a-b, 112a-d.....	71
1.2. Синтез молекул PROTACs на основе кабозантиниба 121a-d, 122a-b, 123a-d.....	78
1.3. Изучение биологической активности молекул PROTAC 121a-d, 122a-b, 123a-d.....	80

2. Молекулы SNIPERs на основе кабозантиниба .....	84
2.2. Синтез лигандов для белков ингибиторов апоптоза (IAP) 125, 143, 144a-b, 145a-b, 162... 85	
2.1. Синтез алкилированных производных кабозантиниба 169-172 .....	92
2.3. Получение финальных молекул SNIPERs 173a-b, 174a-b, 175, 177 .....	95
2.4. Исследование биологической активности IAP-лигандов 143, 144a-b, 145a-b и молекул SNIPER 173a-b, 174a-b, 175, 177 .....	98
3. Потенциальные ингибиторы белка ALK5 .....	102
3.1. Выбор структуры потенциальных ингибиторов .....	102
3.2. Подход к синтезу целевых соединений по реакции гетеро-Дильса-Альдера .....	105
3.2.1. Получение дизамещенных алкинов .....	105
3.2.2. Реакция гетеро-Дильса-Альдера с дизамещенными алкинами .....	107
3.3. Подход к синтезу целевых соединений на основе реакции Бигинелли .....	109
3.4. Исследование антипролиферативной активности полученных пиримидинов .....	114
3.5. Проведение докинг-исследований .....	116
Экспериментальная часть .....	123
Получение кабозантиниба и его производных .....	124
Получение молекул PROTAC на основе кабозантиниба .....	144
Получение IAP-лигандов .....	154
Получение IAP-лигандов с фенольным фрагментом .....	157
Синтез молекул SNIPER .....	173
Синтез тризамещенных аминопиридинов .....	180
Биология .....	190
Выводы .....	194
Список литературы .....	196
Приложение .....	225

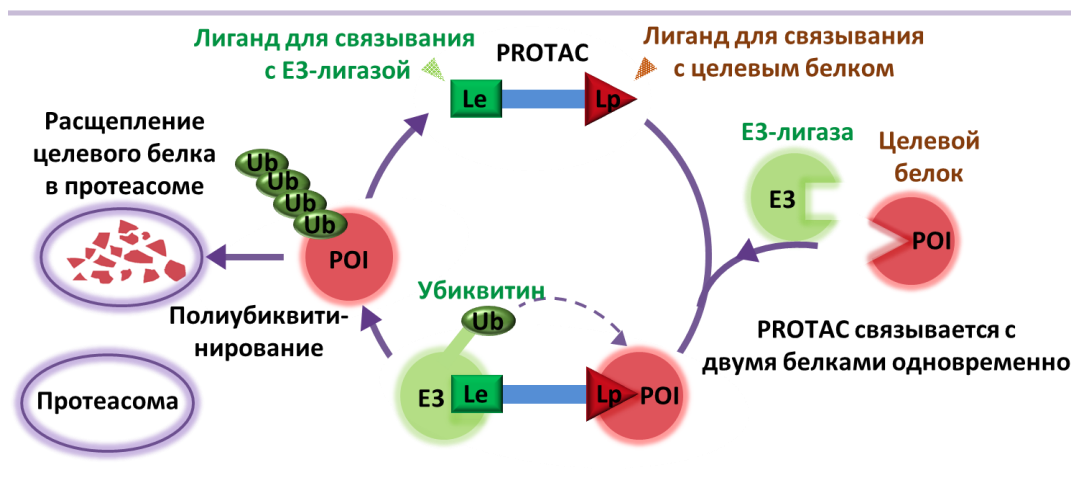
### Список сокращений и обозначений

1,4-diox	1,4-Диоксан
AR	Андрогеновый рецептор
AscNa	Аскорбат натрия
AcOH	Уксусная кислота
ALK5	Активин-подобная рецепторная киназа 5
BRD4 (9)	Бромдоменсодержащий белок 4 (9)
CRBN	Цереблон
DBU	1,8-Диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен
DCM	1,2-Дихлорметан
DDQ	2,3-Дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
DMF	<i>N,N</i> -Диметилформамид
Et	Этил
EtOH	Этиловый спирт
HATU	1-[Бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5- <i>b</i> ]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат
IAP	Белки-ингибиторы апоптоза
HEGFR	Рецептор фактора роста гепатоцитов
<i>i</i> Bu	Изобутил
Me	Метил
MeCN	Ацетонитрил
MeOH	Метанол
PMP	4-Метоксифенил
PROTAC	PROteolysis Targeting Chimera
SNIPER	Specific Non-genetic IAP-based Protein Eraser
TBTA	Трис(бензилтриазолил)амин
<i>t</i> Bu	<i>Трет</i> -бутил
TFA	Трифторуксусная кислота
THF	Тетрагидрофуран
Triton B	Гидроксид бензилтриметиламмония
TPD	Таргетная деградация белков
pTSA	Пара-толуолсульфоновая кислота
rt	Комнатная температура (англ. «room temperature»)
VHL	Белок фон Гиппеля-Линдау
KX	Колоночная хроматография

ПЭ	Петролейный эфир
ТСХ	Тонкослойная хроматография
ЭА	Этилацетат
ЯМР (NMR)	Ядерный магнитный резонанс
1,4-diox	1,4-Диоксан

## Введение

**Актуальность работы.** Таргетные деградеры белка — молекулы PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimeras) вызывают значительный интерес в современной противоопухолевой терапии. Действие PROTAC направлено на полное расщепление белков-мишеней, а не просто на блокирование их функций. Данные соединения имеют в составе два фрагмента, связанные линкером. Первый фрагмент взаимодействует с целевым белком, второй — с E3-лигазой, и как только эти белки оказываются связанными, лигаза запускает расщепление целевого белка.



Механизм действия молекул PROTAC близок к каталитическому. Они способны действовать на мутантные белки, проявлять большую селективность по сравнению с классическими ингибиторами, вследствие чего их применение вызывает меньше побочных эффектов и способствует преодолению лекарственной устойчивости опухолей.

Классические деградеры PROTAC в качестве вспомогательных белков, или E3-лигаз, как правило задействуют цереблон (CRBN) и белок фон-Гиппеля Линдау (VHL). В 2010 [1] году использование в качестве фрагмента для взаимодействия с E3-лигазами лигандов для белков-ингибиторов апоптоза (IAP) привело к созданию нового класса деградеров — соединений SNIPER (Specific and Non-genetic IAP-dependent Protein ERaser). Данный подход обеспечивает двойное действие: наряду с направленной деградацией патогенных белков происходит ингибирование активности IAP, что запускает апоптотическую гибель раковых клеток. Из литературы известно, что гиперэкспрессия в опухолевых тканях киназы c-Met (или HGFR — рецептор фактора роста гепатоцитов), приводит к их росту и метастазированию. Способный воздействовать на c-Met препарат кабозантиниб из группы ингибиторов

тирозинкиназ, одобренный FDA<sup>1</sup> в 2011 году для лечения рака почки и рака щитовидной железы, с 2019 применяется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы. Несмотря на высокий потенциал данного препарата, применению кабозантиниба сопутствует ряд побочных эффектов.

Создание молекул PROTAC и SNIPER на основе кабозантиниба, позволит минимизировать его побочные эффекты, уменьшить вероятность формирования лекарственной устойчивости и повысить эффективность противоопухолевой терапии с применением этого препарата.

Наряду с киназой c-Met, второй мишенью в рамках данной работы была выбрана активин-подобная рецепторная киназа 5 (ALK5). Нарушение функций ALK5 связано с тем, что опухолевые клетки становятся «невидимыми» для иммунной системы человека. В настоящее время отсутствуют примеры деградеров белка ALK5 на основе малых молекул, а использование пептидов в составе подобных конъюгатов может ухудшать их растворимость и способность проникать в клетки. Важной задачей является поиск потенциальных ингибиторов ALK5 на основе малых молекул, содержащих функциональные группы для конъюгирования с остальной частью деградера.

**Степень разработанности темы.** Концепция таргетного расщепления белков (или TPD, Target Protein Degradation) впервые была предложена в 2001 году в группе Крэйга Крюса (Craig Crews). Подходы и методы постепенно развивались, а начиная с 2010-х годов интерес исследователей к данной теме возрос. Первые терапевтические агенты, разработанные фармкомпанией Arvinas (США) для лечения рака молочной железы и рака предстательной железы, вступили в клинические испытания в 2019 году и уже показали большую эффективность по сравнению с классическими химиотерапевтическими препаратами. Среди зарубежных научных коллективов, занимающихся разработкой деградеров, стоит выделить группы под руководством проф. М. Ишикавы (*M. Ishikawa*, Университет Тохоку, Китай), проф. К. Сото (*C. Soto*, США), проф. А. Циули (*A. Ciulli*, университет Данди, Шотландия).

Среди российских научных коллективов стоит отметить группы под руководством проф. М.Ю. Красавина и Д.В. Дарьина (СПбГУ, г. Санкт-Петербург), проф. А.Е. Щекотихина (Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, г. Москва). Также в разработку

---

<sup>1</sup> Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США (FDA — Food and Drug Administration)

подобных препаратов вовлечено большое количество зарубежных фармацевтических компаний, среди которых Merck, MedChemExpress, Arvinas, Pfizer, Bayer.

**Целью диссертационного исследования** является дизайн, синтез и изучение биологической активности конъюгатов классов PROTAC и SNIPER и их активных компонентов, направленных на разложение онкогенных белков c-Met и ALK5.

**Объекты исследования.** В качестве белков-мишеней в данной работе были выбраны рецептор фактора роста гепатоцитов (c-Met) и активин-подобная рецепторная киназа 5 (ALK5). Синтезируемые в работе химерные молекулы представляют собой конъюгаты, содержащие фрагменты для связывания как с целевым белком, так и с E3-лигазой. В качестве лигандов для киназы c-Met были использованы производные мультикиназного ингибитора кабозантиниба. В состав полученных химерных молекул PROTAC вошли лиганды к таким E3-лигазам, как белок фон Гиппеля-Линдау (VHL) и цереблон (CRBN). Наряду с классическими PROTAC, проведен синтез SNIPER-конъюгатов, где для рекрутирования E3-лигаз применяются лиганды к белкам-ингибиторам апоптоза (IAP). В качестве таких соединений использовались предложенные нами новые пептидомиметики. Структура химерных молекул и блоков в их составе представлена ниже. Для взаимодействия с ALK5 были разработаны новые соединения на основе 2-аминопиримидинов.

## Строение целевых PROTAC-молекул

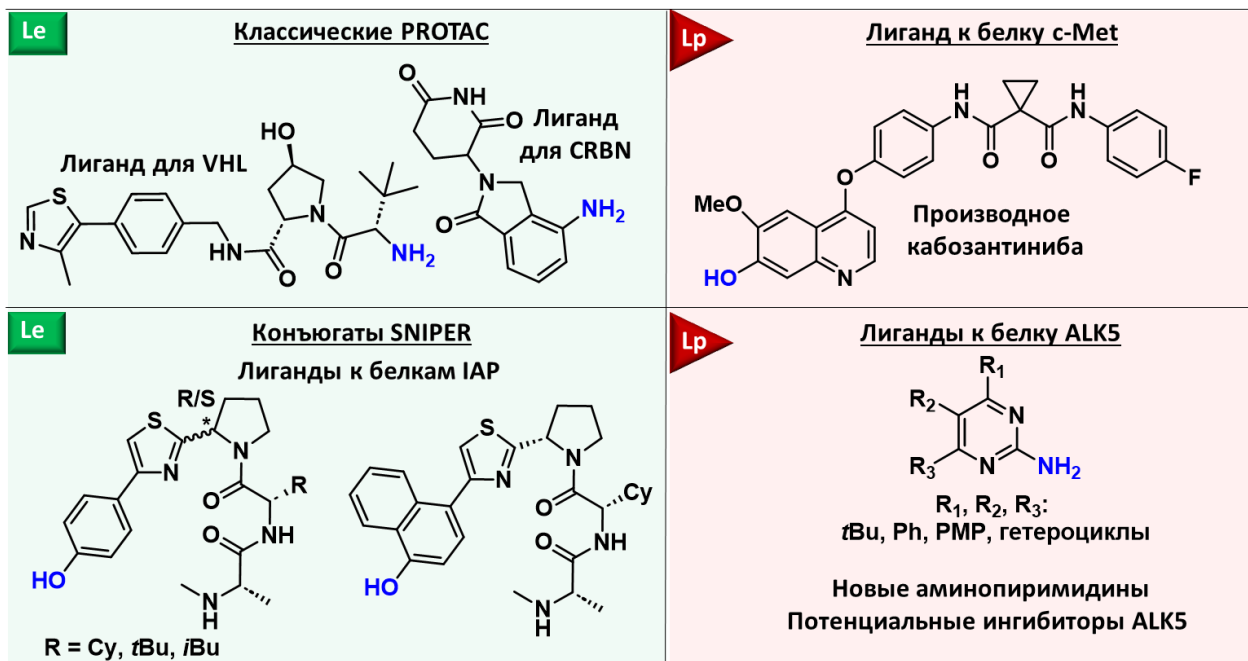
Le – лиганд для связывания  
с E3-лигазой



Lp – лиганд для связывания  
с белком-мишенью

PROTAC связывает два белка одновременно и расщепляет белок-мишень

### Блоки для сборки PROTAC-молекул



При проведении исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) Разработка подходов к синтезу химерных молекул PROTAC для направленного расщепления белка c-Met. Получение новых синтетических блоков на основе кабозантиниба, содержащих функциональные группы для конъюгирования с лигандом E3-лигазы.
- 2) Разработка методов получения конъюгатов SNIPER, нацеленных на белок c-Met. Синтез новых лигандов для белков IAP со свободной гидроксильной группой в качестве центра конъюгирования.
- 3) Дизайн и синтез новых потенциальных ингибиторов белка ALK5 на основе 2-аминопиримидинов с возможностью их дальнейшего использования в составе химерных молекул, направленных на расщепление ALK5.
- 4) Изучение биологической активности полученных соединений, включая антипролиферативный эффект, способность взаимодействовать с целевым белком и его фосфорилированной формой, влияние на клеточный цикл. Применение молекулярного докинга для оптимизации структур полученных соединений.

### **Научная новизна:**

- 1) Благодаря предложенным подходам к синтезу химерных молекул PROTAC для направленного расщепления белка c-Met, получены новые соединения на основе кабозантиниба, включая финальные молекулы и промежуточные синтетические блоки.
- 2) Впервые разработан и реализован подход к получению конъюгатов SNIPER, нацеленных на белок c-Met. Осуществлен синтез новых лигандов для белков IAP.
- 3) Осуществлен дизайн и синтез новых потенциальных ингибиторов белка ALK5 на основе 2-аминопиримидинов с возможностью их дальнейшего использования в составе химерных молекул, направленных на расщепление ALK5. Для оптимизации структур полученных соединений был использован молекулярный докинг.
- 4) Изучена биологическая активность полученных соединений, включая антипролиферативный эффект, способность взаимодействовать с целевым белком и его фосфорилированной формой, влияние на клеточный цикл.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Впервые получены химерные молекулы (PROTAC и SNIPER) на основе кабозантиниба. Проведен синтез новых лигандов для белков-ингибиторов апоптоза (IAP), использованных в качестве «строительных» блоков для получения SNIPER. При действии соединения-лидера SNIPER было достигнуто расщепление целевого белка c-Met при концентрациях 1  $\mu$ M. Дальнейшая оптимизация его структуры позволит расширить границы применения препарата кабозантиниба. Полученные результаты создают основу для разработки перспективных противоопухолевых препаратов, нацеленных на такие белки, как c-Met и IAP, что дополнительно подтверждается данными об индукции апоптоза в раковых клетках. Предложен подход к синтезу 2-аминопиримидинов, которые можно рассматривать как потенциальные ингибиторы белка ALK5.

**Методология и методы исследования.** В ходе выполнения работы были использованы современные подходы тонкого органического синтеза, в том числе реакции кросс-сочетания, медь-катализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения азидов к алкинам (*CuAAC*), многокомпонентные реакции, методы получения энантиомерно и диастереомерно чистых соединений. Работа с соединениями, чувствительными к влаге и кислороду, проводилась в инертной атмосфере. Структура полученных соединений была исследована комплексом физико-химических методов: ЯМР ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ), ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия (MALDI, HRMS-ESI); для финальных соединений перед проведением биологических исследований была определена степень чистоты – более 95% при помощи метода ВЭЖХ.

Очистка полученных соединений проводилась с использованием перекристаллизации, экстракции, колоночной хроматографии. Биологическая активность оценивалась при помощи стандартного МТТ-теста, вестерн-блоттинга, для анализа клеточного цикла был использован метод проточной цитометрии. Молекулярный докинг был проведен с использованием комплекса соответствующих программ (AutoDock, Vina, PyMOL, Avogadro).

**Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Синтез 31 новых производных кабозантиниба, в том числе 21 синтетических блоков, содержащих функциональные группы для конъюгирования, и 10 финальных PROTAC-конъюгатов.
- 2) Синтез 6 новых конъюгатов SNIPER, нацеленных на белок c-Met. Получение 6 новых лигандов для белков IAP со свободной гидроксильной группой в качестве центра конъюгирования.
- 3) Синтез 19 новых потенциальных ингибиторов белка ALK5 на основе 2-аминопиримидинов. Результаты молекулярного докинга для оптимизации структуры потенциальных ингибиторов ALK5.
- 4) Результаты исследования антипролиферативного эффекта полученных соединений и изучения способности конъюгатов PROTAC и SNIPER на основе кабозантиниба взаимодействовать с белком-мишенью c-Met и его фосфоформой.
- 5) Результаты изучения влияния на клеточный цикл соединения-лидера SNIPER и соответствующего ему лиганда для IAP-белков.

**Личный вклад автора.** Автор принимал активное участие в постановке задач и целей исследования, синтезе всех представленных в работе новых соединений, анализе данных физико-химических и биологических исследований; дизайн и подходы к синтезу представленных соединений были осуществлены автором совместно с научным руководителем; подготовка публикаций по результатам проведенного исследования осуществлялась диссертантом совместно с научным руководителем и соавторами.

**Степень достоверности полученных результатов.** Состав и строение представленных в работе новых соединений были подтверждены комплексом физико-химических методов (ЯМР, ИК-спектроскопия, Масс-спектрометрия, элементный анализ). Чистота финальных соединений перед проведением испытаний биологической активности была определена при помощи ВЭЖХ. Для определения антипролиферативной активности соединений был использован МТТ-тест, анализ клеточного цикла был проведен при помощи проточной

цитометрии. Активность по отношению к целевому белку c-Met и его фосфорилированной форме определена по протоколам метода вестерн блотт.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на конференциях различного уровня. Международная конференция: XII International Conference on Chemistry for Young Scientists "Mendeleev 2021" (РФ, г. Санкт-Петербург, 2021 г.). Всероссийские конференции: Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021 (РФ, г. Новосибирск, 2021 г., приз за лучший доклад); I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (РФ, г. Казань, 2023 г., приз за лучший доклад); Международная конференция по химии «Байкальские чтения-2023» (РФ, г. Иркутск, 2023 г.); Всероссийская конференция с международным участием «Идеи и наследие А.Е. Фаворского в органической химии» (РФ, г. Санкт-Петербург, 2023 г., приз за лучший доклад), 6-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2024» (РФ, г. Нижний Новгород, 2024 г.). По результатам работы было опубликовано 6 тезисов и 2 статьи в журналах *Pharmaceutics* (Q1) и *Russ. J. Org. Chem.* (Q4), а также получен 1 патент.

**Объем и структура научно-квалификационной работы.** В состав научно-квалификационной работы, изложенной на 225 страницах машинописного текста, входят введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальная часть, выводы, список литературы из 403 наименований. Работа включает в себя 44 рисунка, 39 схем, 19 таблиц.

**Соответствие диссертации паспорту специальности.** Изложенный материал соответствует пунктам: 1. «Выделение и очистка новых соединений», 3. «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», 7. «Выявление закономерностей типа «структура–свойство» паспорта специальности 1.4.3 – «Органическая химия».

**Благодарности.** Автор выражает благодарность к.х.н. Е.С. Щегравиной, Ю.Д. Рысиной и лаборанту-исследователю Е.А. Мамоновой за помощь в проведении работы по синтезу, к.б.н., сотруднику ИБХ РАН, Е.В. Свирщевской и к.б.н., сотруднику ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», А.М. Щербакову за исследование биологической активности полученных соединений, д.х.н. И.Д. Гришину за регистрацию масс-спектров, к.х.н. Ю.Б. Малышевой, м.н.с. И.И. Воробьеву за регистрацию ЯМР-спектров, м.н.с. Е.Н. Боронину, м.н.с. Е.С. Кудряшовой, м.н.с. М.В. Запеваловой за помощь в работе с ГХ-МС, Т.А. Гусейнову за изготовление использованных в синтезах установок, сотрудникам Научно-образовательного

центра инфохимии Университета ИТМО, О.О. Волковой и д.м.н. С.В. Шитякову за помощь в проведении докинг-исследований.

Диссертационное исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-23-00736 «Новые бифункциональные молекулы SNIPER для селективного убиквитинирования онкогенных белков»), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа УМНИК-2023, проект «Разработка молекул, направленных на разложение патогенных белков (PROTACs), для терапии онкологических заболеваний»), а также в рамках проекта «Дизайн и синтез новых противоопухолевых молекул: антимитотические агенты и PROTAC-химеры», реализуемого при программе повышения конкурентоспособности Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» среди ведущих мировых образовательных центров (программа 5-100).

Проводимые соискателем исследования были отмечены стипендией правительства Нижегородской области им. Академика Г.А. Разуваева (2023-2024 г.).

## Литературный обзор

Молекулы для таргетного расщепления белков представляют собой перспективный класс терапевтических агентов, способных избирательно удалять патогенные белки из клеток. Понимание механизмов их действия и факторов, влияющих на эффективность этих молекул необходимо для дизайна новых типов терапевтических агентов для лечения различных заболеваний. В литературном обзоре приведена информация об основных типах деградеров, обсуждаются механизмы их действия, методы доставки и клинический потенциал.

### 1. Таргетное расщепление белков.

Таргетная деградация белков (TPD – Target Protein Degradation), открытая в 2001 г, объединяет подходы, включающие целенаправленное расщепление определенных белков внутри клетки [2]. В настоящее время известны агенты TPD, задействующие убиквитин-протеасомальные, эндосом-лизосомные и аутофаголизосомные механизмы утилизации белков в клетке [3–6]. Стратегия направленной деградации белков имеет большие перспективы в терапии заболеваний, при которых происходит накопление или реализуется дисфункция определенных белков. К таким болезням относят рак и нейродегенеративные заболевания, исследуется возможность применения TPD при аутоиммунных нарушениях и воспалительных заболеваниях [7].

Направленное разложение белков имеет ряд существенных отличий от классического ингибирования протеинов. При использовании агентов TPD происходит не ингибирование белка или фермента (обратимое или необратимое), а полное расщепление белка-мишени с полной утратой его функций. Механизм действия TPD-агентов близок к каталитическому, что, в свою очередь, даёт возможность использовать меньшие количества действующего вещества. Технология TPD позволяет расширить диапазон возможных терапевтических мишеней и воздействовать на так называемые "*undruggable*" белки [8]. Данным термином обозначают мишени, на которые сложно воздействовать при помощи обычных низкомолекулярных препаратов, к примеру, из-за их структурных особенностей [9]. Более подробно преимущества технологии описаны в разделе 2 настоящего литобзора.

Начиная с 1970-х годов, израильские учёные Авраам Гершко и Аарон Чехановер в сотрудничестве с американским учёным Ирвином Роузом, исследовали убиквитин-протеасомальную деградацию белков [10]. Спустя годы исследований, в 2004 учёные были удостоены Нобелевской премии. Первая концепция направленной деградации белка была опубликована в 1999 году фармкомпанией Wellstat Biocatalysis LLC (США) [11], а уже в 2001

году Кэтлин Сакамото, Крейгом Крюсом и Реем Деше был предложен подход к таргетному расщеплению белков при помощи бифункциональных молекул PROTAC (PROteolysis Targeting Chimera), задействующих убиквитин-протеасомальную систему клетки [2]. Первый конъюгат, PROTAC-1 (1) (Схема 1А), был сконструирован для расщепления метионин аминокептидазы-2 (MetAP-2), одной из мишеней в противоопухолевой терапии [12,13].

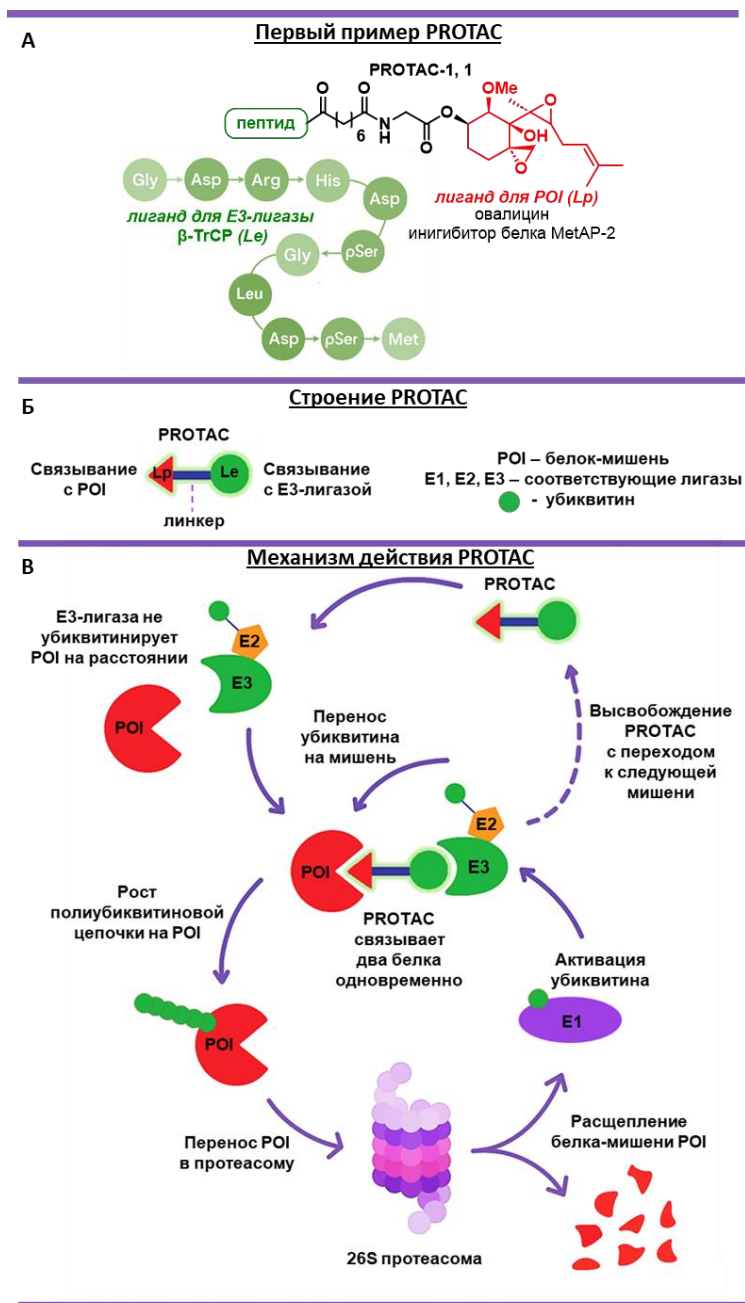


Схема 1. А: Первый пример протеасомального деградера; Б: Строение молекул PROTAC; В: Механизм действия молекул PROTAC.

PROTAC представляют собой гетеробифункциональные молекулы, состоящие из двух активных фрагментов *Lp* и *Le*, соединенных линкером. Один фрагмент (*Lp*) при этом связывает целевой белок (protein of interest, POI), в то время как другой (*Le*) способен взаимодействовать со «вспомогательным» белком – E3-убиквитин-лигазой (Схема 1Б). На примере PROTAC-1, в его структуре можно выделить два активных фрагмента: ингибитор овалицин для связывания с целевым белком (*Lp*) и пептид для взаимодействия с E3-лигазой  $\beta$ -TrCP<sup>2</sup> (*Le*) [2]. Попадая в клетку, молекула PROTAC образует тройной комплекс с POI и E3-лигазой. В подобном комплексе достигается определенная ориентация мишени относительно лигазы, а также реализуется их сближение на достаточное расстояние, что способствует эффективному переносу убиквитина на белок-мишень. Полиубиквитинирование целевого белка ведёт к его транспорту в протеасому с дальнейшим расщеплением. При этом происходит высвобождение молекулы PROTAC в неизменном виде, что дает возможность дальше связываться с очередной белковой мишенью и обуславливает механизм действия, близкий к каталитическому [14] (Схема 1В).

При этом в работе убиквитин-протеасомальной системы (UPS) участвует не только E3-лигаза. Убиквитинирование является многоэтапным процессом, в котором участвуют три типа ферментов: E1 (убиквитин-активирующие ферменты), E2 (убиквитин-конъюгирующие ферменты) и E3 (убиквитинлигазы) [15]. На первом этапе ферменты E1 активируют убиквитин (Ub) в АТФ-зависимом процессе посредством образования с ним тиоэфирной связи. При дальнейшей транстиоэтерификации убиквитин переносится на E2. И на последней стадии, субстрат-специфичные E3-лигазы связываются с E2 и целевым белком, облегчая присоединение убиквитина к целевым белкам. Данный процесс повторяется несколько раз в результате чего на целевом белке образуется полиубиквитиновая цепь, работающая как метка для протеасомы 26S, распознающей и расщепляющей убиквитинированные белки.

Стоит отметить, что направленное убиквитинирование белков не всегда ведет к их расщеплению. В зависимости от места присоединения убиквитина и его количества, существуют разные посттрансляционные модификации белков [16,17], например, такие как моно- и мульти- и полиубиквитинирование. Моноубиквитинирование – присоединение одной молекулы убиквитина к субстрату. При мультиубиквитинировании происходит одновременное присоединение убиквитина сразу по нескольким остаткам аминокислот. В

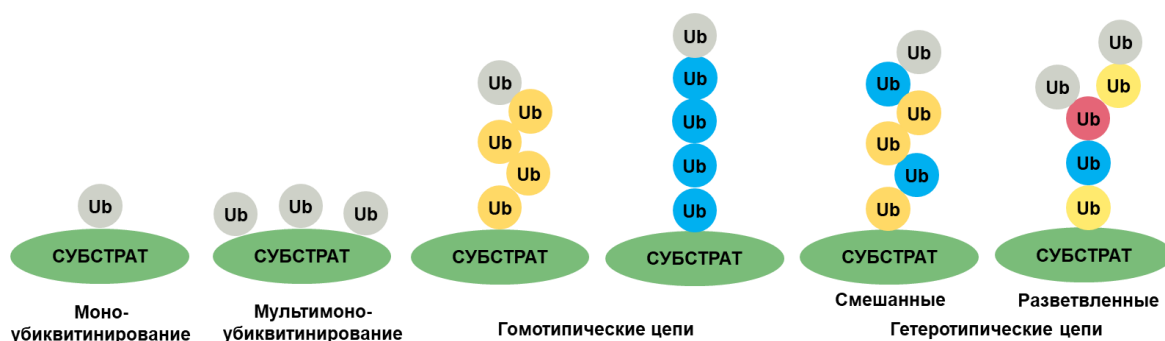
---

<sup>2</sup> Содержащая  $\beta$ -трансдукционный повтор убиквитин-протеинлигаза E3

обоих случаях присоединение убиквитина чаще всего проходит по остатку лизина в составе исходного белка, существенно реже к аминокислоте N-концевой  $\alpha$ -аминокислоты (например, метионина) и другим остаткам.

Моноубиквитинирование важно в таких клеточных процессах, как репарация ДНК, эпигенетическая регуляция гистонов, локализация (например, эндоцитоз рецепторов). Мультиубиквитинирование – важный этап в модификации гистонов, опухолевого супрессора p53 и рецепторов на поверхности клетки.

Полиубиквитинирование представляет собой присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепи, состоящей как минимум из 4 мономерных звеньев, связанных друг с другом через один из семи остатков лизина (K) или N-концевой метионин (M1) [18].

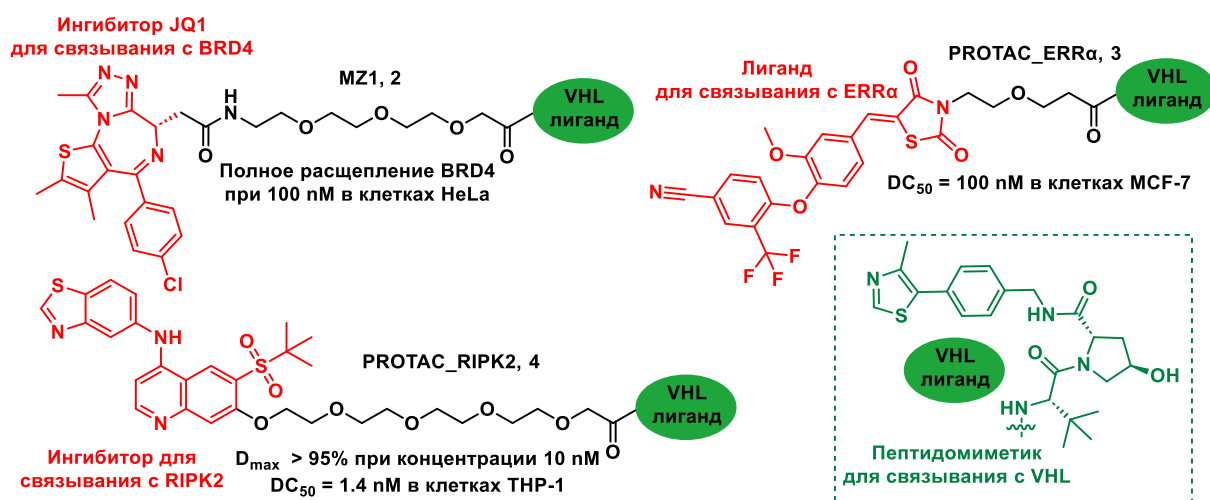


**Рисунок 1.** Основные типы убиквитиновых меток. Убиквитины, модифицированные в одном акцепторном участке, окрашены в синий или желтый цвет; красный - убиквитин, служащий точкой разветвления цепи; серый – немодифицированные, или "концевые" убиквитины [19].

Меткой, обеспечивающей протеасомальную деградацию мишени, чаще всего служат полиубиквитиновые цепи, где связывание осуществляется через остаток лизина K48 [20,21]. Также известны примеры деградации субстратов с метками K11 по механизму, ассоциированному с эндоплазматическим ретикуломом. Цепи убиквитина, где связывание проходит через K63, ассоциированы с контролем воспалительных процессов через фактор транскрипции NF- $\kappa$ B [22,23], также K63-полиубиквитиновые цепи служат маркерами белковых агрегатов, утилизирующихся в клетках посредством аутофагии в лизосомах [24]. Одними из часто встречающихся меток также являются разветвленные полиубиквитиновые цепи, связанные через остатки лизина K6, K27 и K48 [25,26].

Вслед за первыми деградерами были разработаны соединения, имеющие в своем составе пептид, но уже для рекрутирования другой лигазы - белка фон Гиппеля-Линдау (VHL) [6,27]. В качестве этого пептида выступал HIF-1 $\alpha$  – белок, который является  $\alpha$ -субъединицей гетеродимерного транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1) [28]. Возможность использовать новый тип E3-лигазы стала важным этапом в разработке ряда «ранних» молекул PROTAC, так как появилась возможность расширить ряд белков-мишеней. Молекулы PROTAC, имеющие в своем составе пептиды для связывания с E3-лигазами, носят название «био-PROTAC», так как они не являются низкомолекулярными структурами.

В дальнейшем разработка миметиков пептида HIF1- $\alpha$ <sup>3</sup> [29] позволила получить PROTAC, в основе которых были малые молекулы (рисунк 2). Одними из первых стали химерные структуры, содержащие в своем составе JQ1 – ингибитор бромодоменсодержащего белка 4 (BRD4) [30], а также химеры, направленные на расщепление эстроген-связанного рецептора альфа (ERR $\alpha$ ), и киназы RIPK2<sup>4</sup> [31]. Все указанные белки являются одними из мишеней в противоопухолевой терапии.



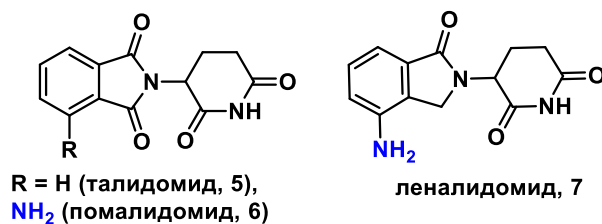
**Рисунок 2.** Примеры химерных молекул на основе лигандов для белка VHL

<sup>3</sup> HIF1- $\alpha$  — фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа (Hypoxia-inducible factor 1-alpha).

<sup>4</sup> RIPK2 — Рецептор-взаимодействующая серин/треониновая киназа 2 (Receptor-Interacting Serine/Threonine Kinase 2).

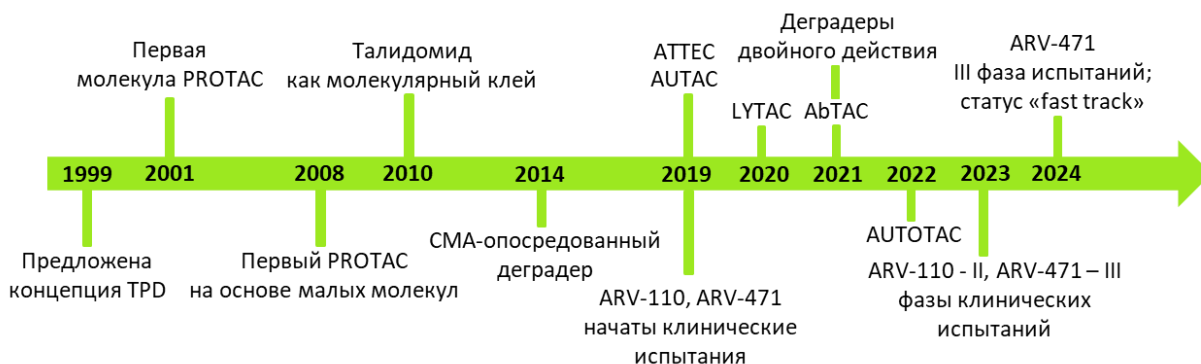
Следующим этапом стало открытие способности талидомида (5) и его аналогов помалидомида (6) и леналидомида (7) (рисунок 3) взаимодействовать с E3-лигазой cereblon (CRBN) [32], что сделало возможным создание PROTACs на их основе. Сами по себе данные соединения служат одними из первых примеров молекулярных клеев, являющихся одной из разновидностей агентов таргетной деградации белков.

**Соединения для связывания с E3-лигазой cereblon CRBN**



**Рисунок 3.** Лиганды, взаимодействующие с E3-лигазой cereblon (CRBN)

В последние годы технология развивается очень активно - на таймлайне (рисунок 4), отражающем основные события в развитии технологии TPD, точки становятся всё ближе друг к другу.



**Рисунок 4.** Развитие подходов TPD с течением времени [5,33–35]

Кроме новых типов лигаз, используемых протеасомальными деградерами, изучаются подходы к расщеплению белков с другими механизмами действия. Так, получила развитие лизосом-опосредованная утилизация мишеней (технологии LYTAC, CMA, ATTEC, AUTAC и др.) позволяющая воздействовать не только на белки, но и на другие структуры (поврежденные органеллы, белковые агрегаты, липидные капли). Все больше деградеров выходят на стадию клинических испытаний – в настоящее время исследуется терапевтический потенциал около 30 соединений [5,34].

## 2. Протеасомальное расщепление белков

Из литературы известны несколько классов соединений, использующих протеасомы для расщепления белковых мишеней: PROTAC, молекулярные клеи, AbTAC, KineTAC, Trim-Away и др. Их действие имеет те же закономерности, как и в случае агентов TPD (Схема 1А), задействующих лизосомальный механизм утилизации целевых белков. Молекулы PROTAC в своем составе содержат, соединенные линкером лиганды для POI и для E3-лигаз (Схема 2А) [36].

В отличие от большинства деградеров, молекулярные клеи не являются конъюгатами и представляют собой «моновалентные» соединения – молекулы, способные взаимодействовать только с одним белком, E3-лигазой или POI (Схема 2Б). Действие молекулярного клея не направлено на непосредственное связывание белков между собой. Молекулярный клей стабилизирует взаимодействие белков, что достигается изменением поверхности или конформации одного из них.

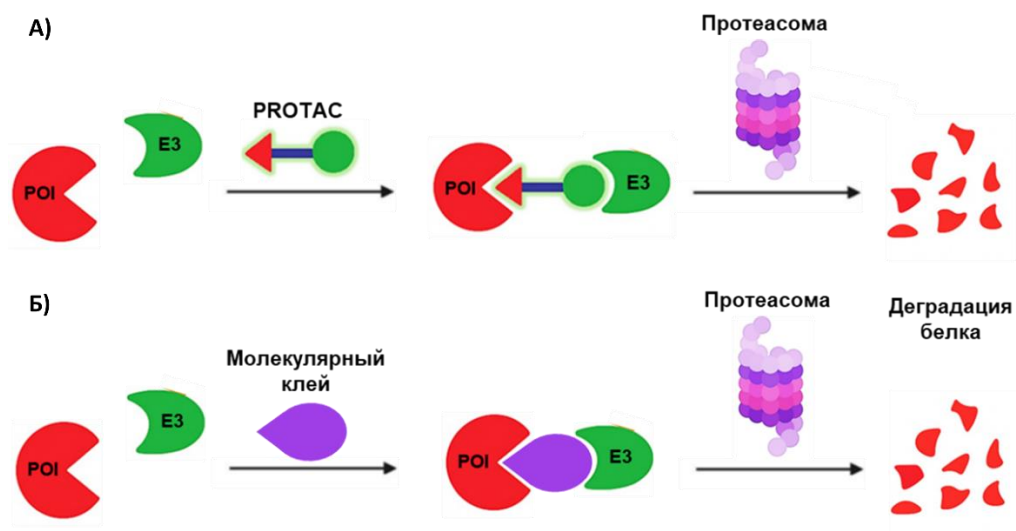
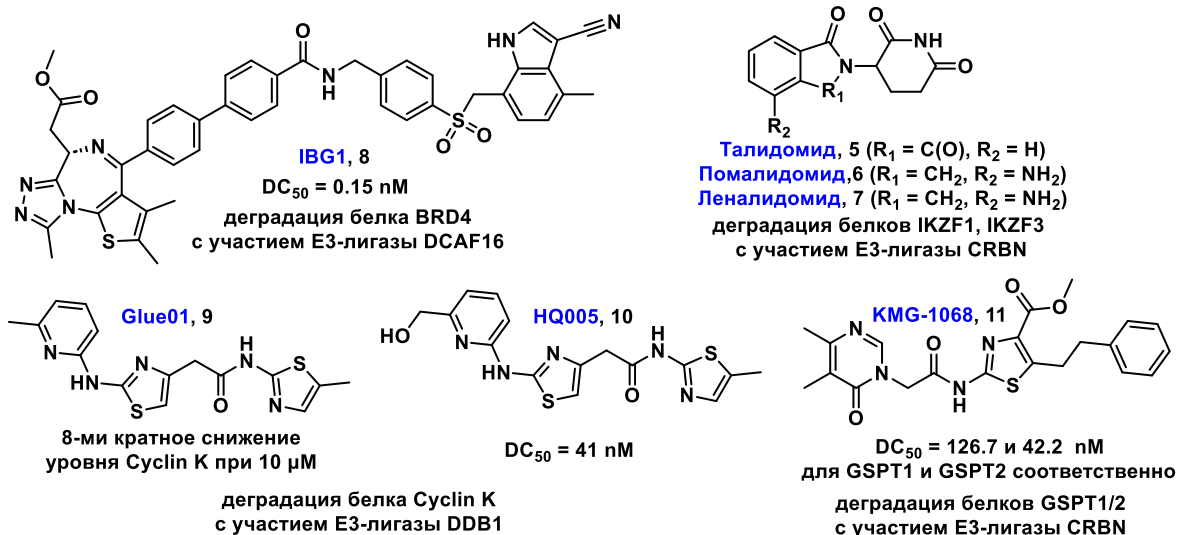


Схема 2. Сравнение механизма действия PROTAC (А) и молекулярных клеев (Б) [35]

Кроме талидомида (5) и его производных (6, 7), о которых ранее заходила речь (Рис. 3, стр. 19), были открыты и другие соединения со свойствами молекулярных клеев. На рисунке 5 приведены их примеры.

#### Примеры молекулярных клеев



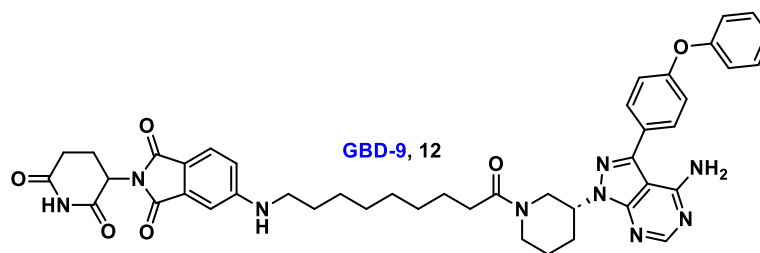
**Рисунок 5.** Примеры молекулярных клеев

Соединение IBG1 (8) [37] вызывает деградацию белка BRD4, что может быть использовано в терапии ряда онкологических заболеваний (острый миелоидный лейкоз, множественная миелома, рак молочных желез и др.), и воспалительных процессов. Белок Cyclin K, таргетируемый соединениями Glue01 (HQ461, 9) [38] и HQ005 (10) [39], также является одной из мишеней в противоопухолевой терапии.

Интересным примером служит KMG-1068 (11), направленный на расщепление факторов терминации трансляции GSPT1/2. Примечательно, что KMG-1068 не является родственным по структуре талидомиду, рекрутирующему CRBN, и не относится к классу иммуномодулирующих препаратов [40]. Это открывает возможность расширить ряд субстратов для действия CRBN и обойти резистентность некоторых опухолевых линий к действию иммуномодуляторов – аналогов талидомида.

В противоопухолевой терапии часто требуется таргетировать несколько белков-мишеней одновременно. Профессор Ю. Рао (Yu Rao) с коллегами [41] представили терапевтическую молекулу GBD-9 (12) (Рис. 6), способную действовать одновременно и как молекулярный клей, расщепляя GSPT1<sup>5</sup>, и как PROTAC, снижающий количество тирозинкиназы Брутона (BTK).

<sup>5</sup> Белок GSPT1, катализирующий переход из фазы G1 в S1, является фактором терминации трансляции [398].



**Рисунок 6.** Строение химеры GBD-9 двойного действия

Подобный эффект возможен благодаря гибкому линкеру в структуре GBD-9, и как следствие, достаточной конформационной подвижности терапевтической молекулы. При концентрации GBD-9, равной 100 nM, наблюдалось полное расщепление белков BTK и GSPT1 всего за 4 часа<sup>6</sup>.

Деградеры AbTACs (Antibody-based PROTAC), в состав которых входят антитела, способны расщеплять только мембранные белки, потому что в основе их действия лежит рекрутирование белка RNF43, связанного с мембраной. Преимуществом AbTAC является возможность убиквитинировать мишень напрямую. Новый этап в развитии AbTACs - появление KineTACs (CytoKine receptor-TArgeting Chimeras), способных расщеплять как мембранные, так и внеклеточные белки [42]. При создании агентов, таргетирующих PD-L1, применение KineTACs позволило снизить эндогенные уровни целевого белка на 90%, что существенно выше результата, достигнутого при помощи AbTAC: 63% от  $D_{\text{Max}}$  (максимальная степень деградации) [43]. В обоих случаях в составе терапевтических конъюгатов как фрагмент для связывания с PD-L1 был использован атезолизумаб. Мишенями действия KineTAC также являются белки клеточной поверхности (EGFR, PD-1, CDCP1 и TROP2), внеклеточные белки VEGFR и TNF- $\alpha$  [42].

Подход Trim-Away предполагает использование антител, взаимодействующих как с мишенью, так и с убиквитинлигазой TRIM21, инициирующей деградацию мишени. В отличие от RING-типа, TRIM-лигазы содержат в одном полипротеине как субстрат-таргетирующие, так и каталитические домены, при этом механизм убиквитинирования отличается от такового для PROTACs и молекулярных клеев, что расширяет диапазон возможных субстратов [44]. Технология Trim-Away позволяет эффективно разрушать белки, в которых отсутствуют остатки лизина, а также белки, ацетилированные на N-конце. Среди мишеней действия Trim-Away такие белки, как IKK $\alpha$  и mTOR [45].

<sup>6</sup> Исследования проводили клеточной линии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DOHH2).

Стоит отметить, что соединения из класса PROTAB (PROteolysis-TArgeting AntiBody) занимают промежуточное положение в данной классификации – они способны использовать такие E3-лигазы, как RNF43 и ZNRF3, чтобы инициировать расщепление белков на поверхности клетки как через лизосомальный, так и через протеасомальный механизмы [46–48].

Несмотря на преимущества и достаточно высокую селективность, агенты на основе антител имеют размеры, ограничивающие их способность проникать в клетки, а также антитела обладают иммуногенностью, т.е. способны вызывать нежелательный иммунный ответ со стороны организма пациента.

## **2.1. Дизайн PROTAC-молекул**

Конструирование бифункциональных молекул PROTAC представляет собой процесс, в основе которого лежит рациональный подбор активных компонентов молекулы и их конъюгирование посредством линкера.

Настоящий раздел литературного обзора включает в себя следующую информацию: (i) выбор лигандов для различных семейств E3-лигаз; (ii) принципы дизайна линкеров, определяющие эффективность образования тройного комплекса; (iii) особенности лигандов для взаимодействия с целевым белком, применяемых в составе PROTAC-молекул.

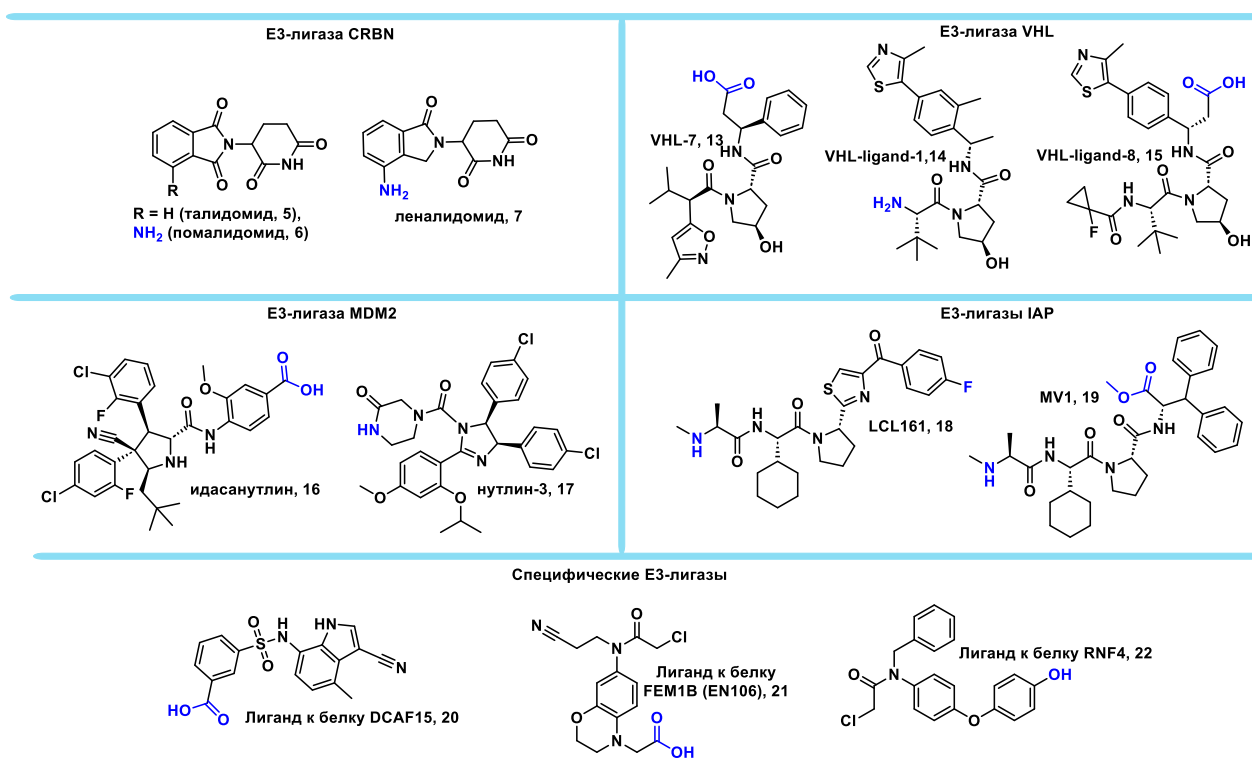
### **2.1.1. Арсенал E3-лигаз для направленной деградации белков**

От выбора лигандов к E3-лигазам во многом зависит успех создания PROTAC-конъюгатов. На рисунке 7 приведены основные типы E3-лигаз и примеры соответствующих им лигандов. Наибольшее распространение получили молекулы PROTAC, рекрутирующие «классические» лигазы CRBN и VHL. В литературе также описаны химеры, имеющие в своей структуре лиганды к белку MDM2 (Mouse Double Minute 2). Одними из причин поиска новых типов E3-лигаз являются необходимость охвата большего числа потенциальных мишеней (особенно в тканях, где VHL/CRBN слабо экспрессируются), а также возможность противостоять лекарственной устойчивости к уже существующим терапевтическим агентам. Исследуется возможность использовать лигазы с ограниченной экспрессией (например, KEAP1<sup>7</sup> в легких и печени [49], KLHDC2<sup>8</sup> [50] в ЦНС) для локализованной терапии.

---

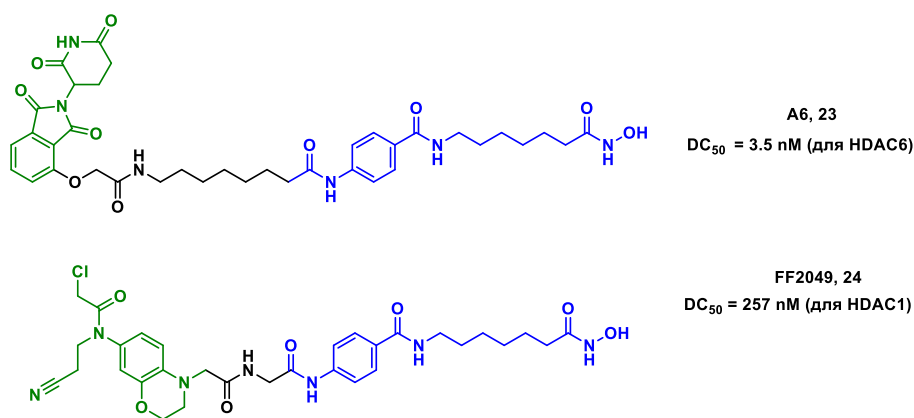
<sup>7</sup> KEAP1 - Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)

<sup>8</sup> KLHDC2 - белок, содержащий kelch-домен (Kelch Domain Containing 2)



**Рисунок 7.** Основные типы Е3-лигаз и лиганды к ним. Синим цветом отмечены возможные сайты конъюгирования. CRBN – белок цереблон; VHL – белок фон Гиппеля-Линдау; MDM2 - Mouse Double Minute 2; IAP – белки-ингибиторы апоптоза; DCAF15 – DDB1- And CUL4- Associated Factor 15/ Фактор 15, ассоциированный с DDB1 и CUL4; FEM1B – Fem-1 Homolog B; RNF4 – Recombinant Ring Finger Protein 4/ Рекомбинантный белок с RING-доменом 4 [4,51].

Использование лигаз различных типов также может влиять на селективность действия деградера. Авторами [52] предложены протеолитические химеры, нацеленные на гистондеацетилазы (HDAC), функции которых нарушены при различных нейродегенеративных и онкогенных процессах. Деградер FF2049 (**24**) (**Рис. 8**), полученный на основе лиганда для лигазы FEM1B, оказался более селективным по отношению к HDAC1-3 [52]. В то же время его аналог А6 (**23**) (**Рис. 8**), содержащий лиганд к CRBN, способен расщеплять HDAC6 [53].



**Рисунок 8.** Примеры деградеров, нацеленных на гистондеацетилазы [52,53]

Для некоторых опухолевых клеток характерны мутации или снижение экспрессии CRBN, что делает их устойчивыми к действию CRBN-рекрутирующих PROTAC [54,55]. Подобный эффект наблюдается у пациентов с онкологическими заболеваниями, получавших лечение иммуномодулирующими препаратами (IMiD) [56,57].

Случаи устойчивости к PROTAC, задействующим VHL, менее распространены, однако возможны, поскольку функционирование и уровень экспрессии VHL также варьируется в зависимости от типа клеток [51]. Так, примерно в 40% случаев светлоклеточного рака почки (ccRCC) из-за мутаций нарушаются функции белка VHL [58]. По данной причине при разработке PROTAC для терапии ccRCC используются другие типы лигаз [59,60].

В 2007 году было показано, что в качестве E3-лигаз могут выступать белки ингибиторы апоптоза (IAP) [61]. IAP-белки выполняют роль негативных регуляторов апоптоза в клетке и способны ингибировать данный процесс, блокируя действие активирующих апоптоз каспаз [62]. Это приводит к устойчивости опухолевых клеток к апоптозу, что способствует выживанию злокачественных клеток, накоплению мутаций и прогрессированию заболевания.

Класс молекул PROTAC, задействующих в качестве E3-лигаз белки IAP, получил название *SNIPERs* (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein ERasers) [63,64]. Использование таких молекул позволяет не только расщеплять белок-мишень, но и блокировать действие белков IAP, что вызывает гибель раковых клеток путём апоптоза.

При этом молекулы PROTAC (или SNIPER), задействующие белки IAP, как правило, активируют не одну E3-лигазу, а несколько, т.к. входящие в их состав пептидомиметики способны связываться с различными белками класса IAP. Возможность задействовать несколько E3-лигаз позволяет избежать привязки к одному конкретному белку и преодолеть

такие сложности, как низкая экспрессия конкретных лигаз в тканях. К примеру, использование IAP-зависимых деградеров белка BCL-XL в клетках Т-клеточной лимфомы (MyLa 1929) позволяет обойти устойчивость к CRBN-зависимым деградерам, возникающую из-за сниженного уровня CRBN [65].

#### 2.1.1.1. Использование белков-ингибиторов апоптоза (IAP) как E3-лигаз

Ввиду того, что диссертация посвящена, в том числе, дизайну SNIPER, текущий раздел посвящен белкам IAP в качестве E3-лигаз, а также IAP-рекрутирующим деградерам.

##### *Общие сведения о белках IAP*

Белки семейства IAP были впервые обнаружены в бакуловирусах<sup>9</sup> [66]. По структуре IAP характеризуются наличием одного или нескольких BIR-сайтов (так называемый бакуловирусный IAP-повтор), каждый из них представляет собой последовательность из 70-80 аминокислот [67,68]. Обычно IAP содержат BIR трёх типов, убиквитин-ассоциированный домен UBA и домен RING на С-конце белковой молекулы (**Рис. 9**).

При этом BIR-домены необходимы для связывания с каспазами. Наличие UBA и RING доменов катализирует формирование комплекса с убиквитином и полиубиквитинилирование целевого белка, что в итоге приводит к его протеолитической деградации [69].



**Рисунок 9.** Сайты связывания в IAP, принимающие участие в убиквитин-протеасомальном разложении патогенных белков с участием PROTAC [70]

В клетках человека было идентифицировано восемь белков IAP. Наиболее изученными являются с-IAP1, с-IAP2 (клеточные ингибиторы апоптоза 1 и 2 соответственно), и XIAP (X-связанный ингибитор белка апоптоза) [71]. Повышенная экспрессия IAP характерна

<sup>9</sup> ДНК-содержащие вирусы, в основном воздействующие на насекомых и играющие важную роль в биотехнологии как векторы для экспрессии белков

для различных типов опухолевых клеток. К примеру, повышенный уровень с-IAP1 (или BIRC2) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) коррелирует с ростом опухоли и распространением метастаз [72,73]. В случае панкреатической аденокарциномы было показано, что гиперэкспрессия с-IAP1 может приводить к устойчивости опухоли к химиотерапии [72,74]. Аналогичное действие белков IAP наблюдается при хроническом лимфолейкозе (CLL), где высокий уровень с-IAP2 (BIRC3) приводит к резистентности к действию препарата-цитостатика флударабина [74,75]. Описан случай, когда клетки глиобластомы приобрели устойчивость к радиотерапии под действием XIAP [76].

### ***Терапевтические агенты, действующие на IAP***

Как было отмечено ранее, белки семейства IAP играют ключевую роль в канцерогенезе, регулируя апоптоз, пролиферацию и устойчивость опухолевых клеток к терапии. Гиперэкспрессия при различных типах опухолей делает IAP самостоятельными терапевтическими мишенями [77]. В связи с этим актуальной задачей является разработка высокоселективных ингибиторов IAP-белков, которые могут выступать как индивидуальные противоопухолевые агенты, так и в качестве фрагментов в составе конъюгатов PROTAC.

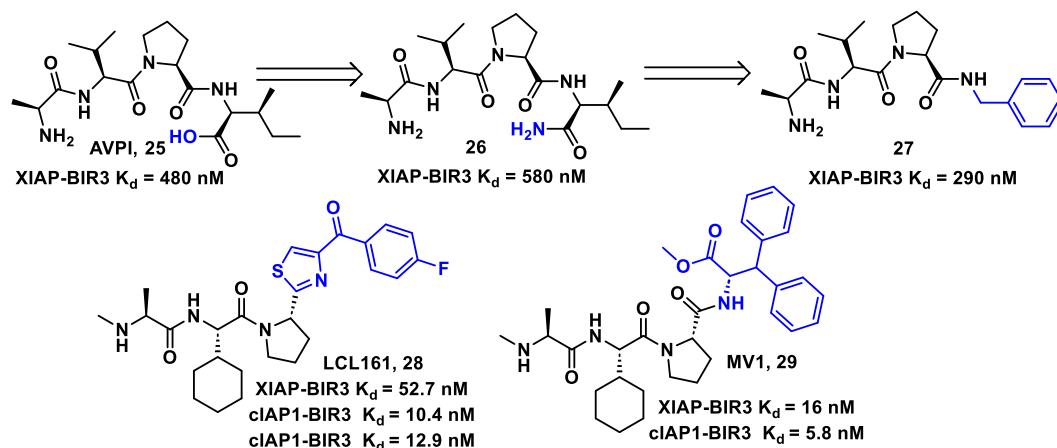
Первые разработанные антагонисты представляли собой длинные пептидные последовательности, однако с начала 2000-х годов им на смену пришли низкомолекулярные пептидомиметики [78,79]. Большинство существующих в настоящее время терапевтических агентов, блокирующих действие IAP, являются миметиками белка SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases), среди которых можно выделить четыре поколения.

### ***Первое поколение SMAC-миметиков***

Белок-активатор каспаз SMAC является природным антагонистом белков IAP [80,81]. Изначально стратегии создания лигандов для IAP основывались на синтезе миметиков концевой последовательности аминокислот SMAC. Расшифровка структуры его комплекса с белком XIAP позволила выделить ключевые для межбелкового взаимодействия остатки аминокислот, что легло в основу синтетических антагонистов IAP [68,82].

Антагонистом, ставшим основой для SMAC-миметиков как первого, так и последующих поколений, стало соединение AVPI (25) (Рис. 10), содержащее всего четыре аминокислотных остатка (А – аланин, V – валин, Р – пролин, I – изолейцин). Пептид AVPI связывается с BIR3-доменом ( $K_d = 480$  nM), тем самым блокируя взаимодействие IAP и каспаз,

что индуцирует апоптоз в опухолевых клетках. Нарушение взаимодействия с каспазами это общий принцип действия пептидомиметиков, направленных на IAP [71,78].



**Рисунок 10.** Примеры SMAC-миметиков первого поколения.

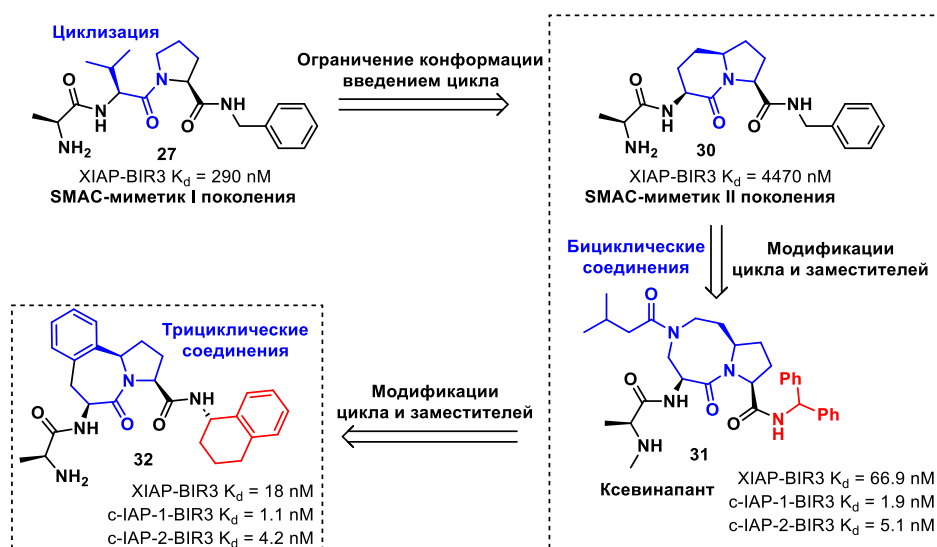
Особо важным в структуре AVPI (**25**) является фрагмент аланина, так как он участвует в гидрофобных взаимодействиях с BIR3, и его замена на фрагменты других аминокислот снижает способность лиганда связываться с белком.

Соединение LCL161 (**28**) (Рис. 10) получено при оптимизации структуры AVPI (**25**) и обладает лучшей способностью связываться с BIR3-доменами. По данным клинических испытаний, антагонист LCL161 показал многообещающие результаты в терапии миелофиброза [83], но оказался недостаточно эффективным при мелкоклеточном раке легкого [84]. В настоящее время клинические испытания данного препарата приостановлены, но изучается возможность его применения в комбинированной терапии. Было показано усиление противоопухолевого эффекта палбоциклиба, ингибитора CDK4/6, в клетках холангиокарциномы при совместном использовании с LCL161 [85]. Одним из распространенных аналогов LCL161 является соединение MV1 (**29**), производные которого находят применение при сборке PROTAC [61].

### **Второе поколение SMAC-миметиков**

Ко второму поколению SMAC-миметиков относятся низкомолекулярными ингибиторы, представляющие собой конформационно ограниченные «мономерные» соединения, которые связываются с доменами BIR3 в составе белков XIAP, с-IAP1 и с-IAP2, а также с единственным BIR-доменом в случае белков ливин (ML-IAP) и сурвивин (BIRC5) [76,78,86] Одним из подходов к созданию конформационно ограниченных соединений

послужило использование бициклических лактамов в структуре антагонистов IAP (соединение **27**, **Схема 3**), имитирующих структуру AVPI. Отправной точкой послужила работа 2004 года под руководством доктора Ванга (Wang) [87,88]. Оптимизация структуры подобных соединений, включающая расширение лактамного цикла и подбор заместителя у атома азота, позволила получить ряд антагонистов, вышедших на клинические испытания. Примечательным является антагонист ксевинапант (**31**) (**Схема 3**). Изучается возможность применения ксевинапанта в терапии рака головы и шеи в комбинации с радио- и химиотерапией (NCT06110195), а также в сочетании с цисплатином и лучевой терапией (NCT06145412) [89,90].



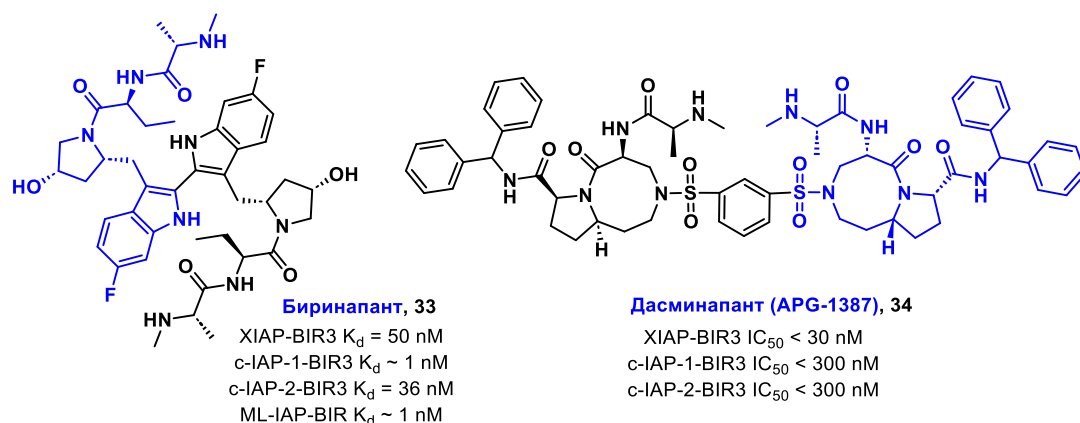
**Схема 3.** Основные модификации структуры SMAC-миметиков II поколения

Другой стратегией контроля конформации SMAC-миметиков является использование трициклов [91]. Соединение **32** (**схема 3**), содержащее в структуре тетралиновый фрагмент, имеет высокую аффинность к BIR3-домену в составе белков XIAP, c-IAP1, и c-IAP2 (значения  $K_d$  составили 18, 1.1, 4.2 nM соответственно) [91].

### *Третье поколение SMAC-миметиков*

Следующим этапом в разработке антагонистов IAP стали «димерные», или «бивалентные» соединения (**Рис. 11**). Бивалентные соединения способны связываться с двумя доменами одновременно. Было продемонстрировано их более высокое сродство к белкам IAP, содержащим домены BIR2–BIR3, по сравнению с «моновалентными» аналогами [61,92,93].

Для ряда подобных соединений была показана высокая способность индуцировать апоптоз, т.е. они являются мощными антагонистами белков IAP [61,93,94]. Это частично объясняется их способностью вызывать димеризацию c-IAP-1, либо c-IAP-2, с их последующей деградацией [61]. Более того, одновременное взаимодействие бивалентных соединений с BIR2 и BIR3 доменами белка XIAP приводит к выраженной отмене ингибирования каспазы, опосредованного XIAP [95,96]. Активация каспазы-3/7 также увеличивает проапоптотическую активность двухвалентных антагонистов по сравнению с моновалентными соединениями. Примером служит биринапант (**58**) (Рис. 11), который находится на I стадии клинических испытаний в терапии плоскоклеточного рака головы и шеи. Испытания проводятся в сочетании с лучевой терапией. Однако, эффективность биринапанта в качестве агента монотерапии ограничена [97,98].

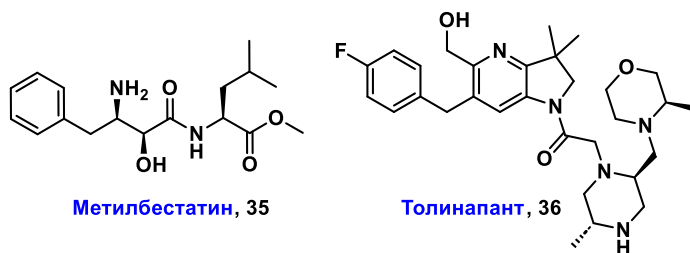


**Рисунок 11.** Структуры бивалентных SMAC-миметиков (II поколение антагонистов)

Препарат дасминапант (APG-1387, **59**) (Рис. 11) от Asieris Pharma – один из наиболее перспективных бивалентных SMAC-миметиков. Он имеет высокое сродство к BIR3-доменам белков XIAP и cIAP1/2 [99]. В настоящее время исследуется эффективность применения дасминапанта в сочетании с другими методами противоопухолевой терапии [100]. Препарат проходит клинические испытания для терапии аденокарциномы поджелудочной железы (NCT04643405), лечения солидных опухолей у пациентов с хроническим гепатитом В, получающих энтеркавир в качестве противовирусной терапии (NCT04568265) и терапии солидных опухолей совместно с препаратом торипалимаб (NCT04284488).

### *Ингибиторы IAP, не относящиеся к SMAC-миметикам*

Одним из подходов к индукции апоптоза в опухолевых клетках стало использование малых молекул, дестабилизирующих белки IAP. Отправной точкой стала работа 2008 года [101], посвященная взаимодействию метилбестатина (MeBS) (**35**) (Рис. 12) и белка cIAP1. Сам по себе бестатин обладает иммуномодулирующим действием [102,103] и одобрен в Японии для терапии острого миелоидного лейкоза (препарат убенимекс [104]). Метилбестатин не является SMAC-миметиком и принадлежит к классу аминопептидазных ингибиторов [101]. Группой Наито (Naito) [101] показано, что метилбестатин при взаимодействии с BIR3-доменом cIAP1 приводит к аутоубиквитинилированию данного белка и его последующей протеасомальной деградации. При этом, действие MeBS оказалось селективно и не затронуло прочие белки IAP, включая XIAP и cIAP2.



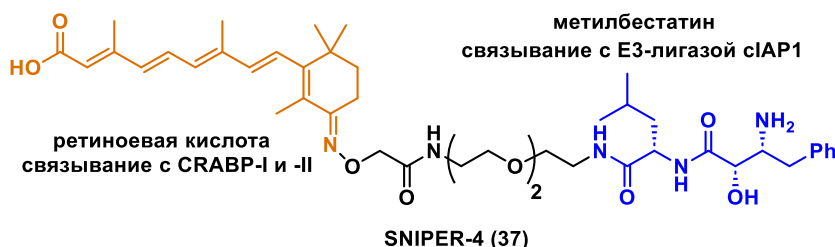
**Рисунок 12.** Структуры метилбестатина (**60**) и толинапанта (**61**)

Еще одним примером является толинапант (ASTX660, **36**) (Рис. 12), представляющий собой двойной антагонист белков IAP (cIAP1/2 и XIAP [105–107]). Данный препарат ингибирует BIR3-домены XIAP и cIAP1 с  $IC_{50} < 40$  и  $< 12$  нМ соответственно [108], блокируя взаимодействие со SMAC-пептидом и предотвращая деактивацию каспаз. Толинапант действует не только как антагонист IAP, индуцируя апоптоз, но и стимулирует иммунный ответ. В настоящее время изучается эффективность применения толинапанта в терапии опухолей различного типа в комбинации с препаратами пембролизумаб (NCT05082259), децитабин-цедазуридин (NCT05403450), а также в сочетании с радиотерапией (NCT05245682; NCT05912075).

### *Общие сведения о молекулах SNIPER*

Аутоубиквитинилирование cIAP1 [101] под действием метилбестатина показало способность данного белка выступать E3-лигазой и возможность использовать это при создании PROTAC-молекул. Юкихиро Ито (Yukihiro Itoh), Минору Исикава (Minoru Ishikawa), Микихико Наито (Mikihiko Naito) и Юичи Хашимото (Yuichi Hashimoto) [1,101] синтезировали

конъюгаты метилбестатина и ретиноевой кислоты, направленные на расщепление клеточных ретинол-связывающих белков (CRABP-I и -II). Снижение уровня CRABP-II наблюдалось при 3-10  $\mu\text{M}$  концентрациях **SNIPER-4 (37)** (**Рис. 13**), однако авторами [1,101] не было зафиксировано полного расщепления целевого белка.

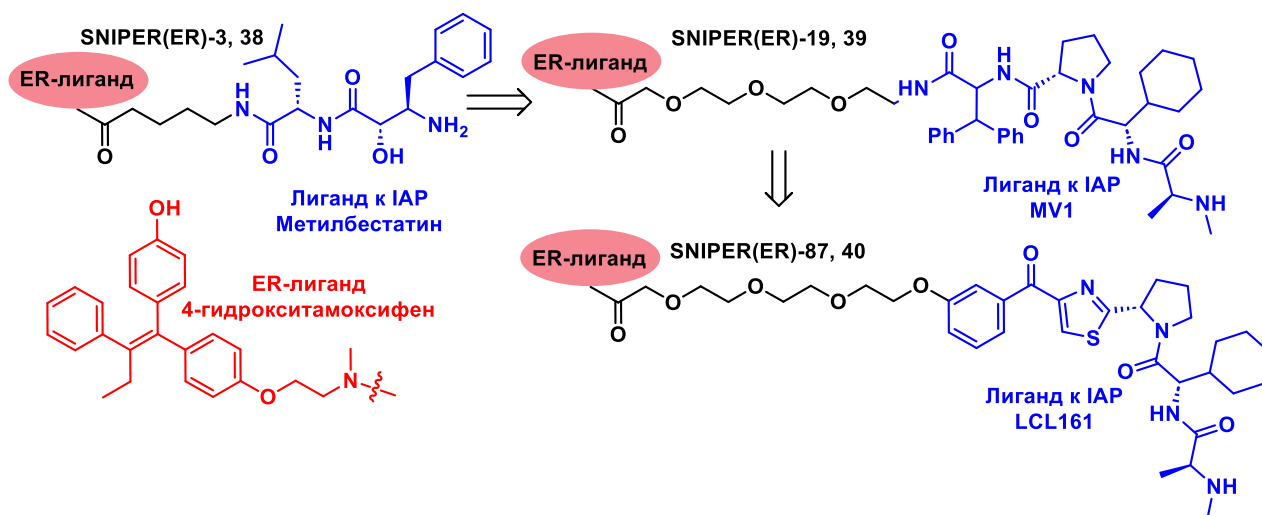


**Рисунок 13.** Структура конъюгата **SNIPER-4 (37)**

Применение SNIPER, рекрутирующих cIAP1, может приводить к аутоубиквитинированию и деградации самого cIAP1 [109,110], что снижает потенциал применения подобных конъюгатов [111,112], т.к. расщепление E3-лигазы ограничивает возможность SNIPER действовать каталитически.

Технология SNIPER постепенно развивается с появлением новых типов лигандов к белкам IAP. Большинство известных конъюгатов имеют в основе соединения LCL161 (**28**) (**Рис. 10**, стр. 28) и его производных. В отличие от метилбестатина (**35**) (**Рис. 12**, стр. 36), связывающегося избирательно с cIAP1, антагонист LCL161 и его аналоги, в т.ч. MV1 (**29**) (**Рис. 10**, стр. 36) способны взаимодействовать с несколькими белками класса IAP. Эволюцию молекул SNIPER можно проследить на примере деградеров, нацеленных на эстрогеновые рецепторы- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), разработанных группой профессора Наито (Naito) [113]. В качестве первого поколения деградеров белка ER- $\alpha$  Наито и Ко, использовались конъюгаты на основе 4-гидрокситамоксифена и метилбестатина [114]. Среди них наибольшую активность продемонстрировал конъюгат SNIPER(ER)-3, в присутствии которого в концентрации 10  $\mu\text{M}$  было отмечено снижение уровня ER- $\alpha$ . На базе структуры SNIPER(ER)-3 (**38**) (**Рис. 14**) были разработаны другие деградеры. Одним из соединений-лидеров стала молекула SNIPER(ER)-19 (**39**) (**Рис. 14**), где в качестве лиганда для связывания с белками IAP выступало соединение MV1. При этом снижение уровня ER- $\alpha$  наблюдалось уже при 30 nM [115]. Дальнейшая оптимизация линкера, а также использование в качестве лиганда для связывания с IAP антагониста LCL161 вместо MV1 позволили получить SNIPER(ER)-87 (**40**) (**Рис. 14**),

обладающий улучшенной способностью расщеплять белок-мишень ER- $\alpha$  (значения  $DC_{50}$  и  $D_{max}^{10}$  составили 3 и 110 nM соответственно) [115].



**Рисунок 14.** Примеры деградеров к белку ER- $\alpha$ .

К настоящему моменту созданы молекулы SNIPER, действующие на широкий спектр мишеней. К ним относятся белки, действие которых ассоциируется с развитием онкологических заболеваний: AR [110], BCL-X<sub>L</sub> [65,116], BCR-ABL [109], BTK [117], BRD4 [118], CDK [119], CRABPII [1], EGFR [120], HDACs [121], PDE4 [115,122], TACC3 [123], JAK [124,125]; и нейродегенеративных процессов: mHtt [126], NOTCH1 [127], P97 [128], [63]. Несмотря на большое число известных молекул SNIPER и потенциал данной технологии, ещё ни один препарат данного класса не вышел на стадию клинических испытаний.

### 2.1.2. Выбор линкера

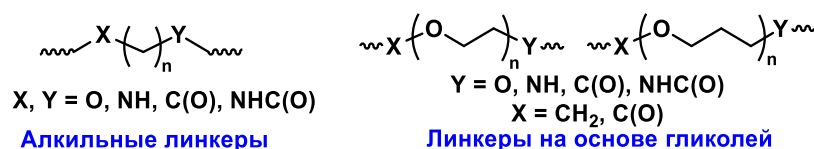
Линкер, соединяющий две активные части молекулы, играет важную роль при дизайне молекул PROTAC. Выбор типа линкера и сайтов его конъюгации с активными фрагментами, напрямую влияют на свойства и биоактивность PROTAC. Рациональный дизайн линкеров требует понимания их структурных типов и учета таких факторов, как длина, гибкость и

<sup>10</sup>  $DC_{50}$  и  $D_{max}$  - концентрации, при которых достигается максимальное и полумаксимальное расщепление белка-мишени.

наличие различных функциональных групп. Большую часть спейсеров, которые используются в синтезе PROTACs, можно разделить на группы гибких и относительно жестких фрагментов.

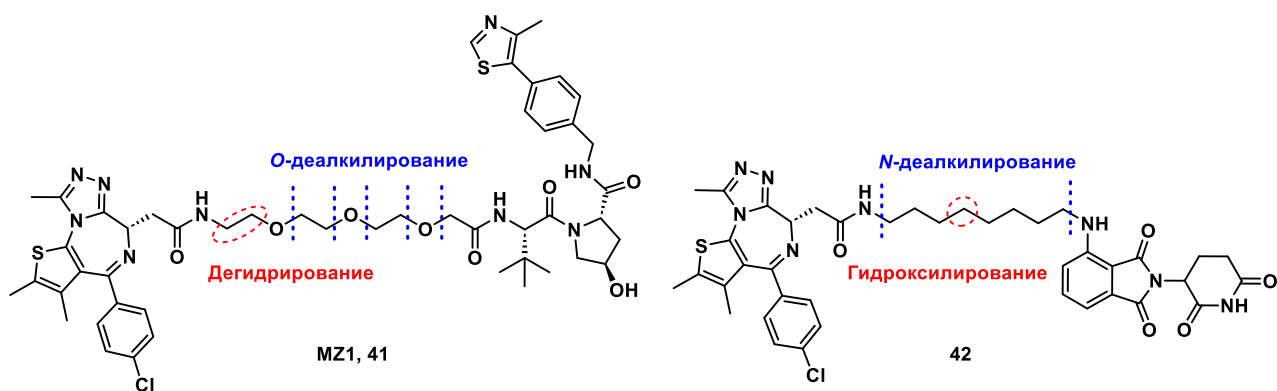
### 2.1.2.2. Гибкие линкеры

К группе гибких линкеров (**Рис. 15**) относятся линкеры на основе алкильных фрагментов и гликолей, при этом данные фрагменты могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными [31,129–132]. В составе гибких линкеров зачастую встречаются амидные, карбонильные фрагменты, сложноэфирные группы, а также атомы азота в составе вторичных аминов [27,133–136]. Сами по себе алифатические линкеры зачастую являются гидрофобными, что снижает растворимость конъюгатов и отрицательно сказывается на их свойствах в физиологических средах. Введение гетероатомов и полярных групп может решить данные проблемы [129,137].



**Рисунок 15.** Основные типы гибких линкеров в дизайне PROTAC-молекул

Одним из главных преимуществ гибких линкеров является простота структуры, и, как следствие, относительная легкость синтеза, возможность легко варьировать их длину, а также гидрофильность и липофильность. Недостатком данных линкеров является склонность к расщеплению под действием ферментов, например, сложноэфирные или амидные линкеры гидролизуются под действием эстераз или амидаз. В случае гибких линкеров в общем виде имеют место реакции N- и O-деалкилирования, дегидрирования, алифатического гидроксирования [138]. На примере молекул, нацеленных на деградацию BRD4 (**Рис. 16**) отображены основные точки расщепления линкеров, согласно обнаруженным авторами [138] метаболитам.



**Рисунок 16.** Точки расщепления алифатических линкеров в физиологических условиях на примере деградеров белка BRD4

Включение ПЭГ-фрагментов позволяет повысить растворимость итоговых конъюгатов в воде, что положительно сказывается на их биодоступности [27]. Тем не менее, по сравнению с линкерами на основе алкилов, линкеры на основе ПЭГ могут иметь пониженную стабильность в физиологических условиях.

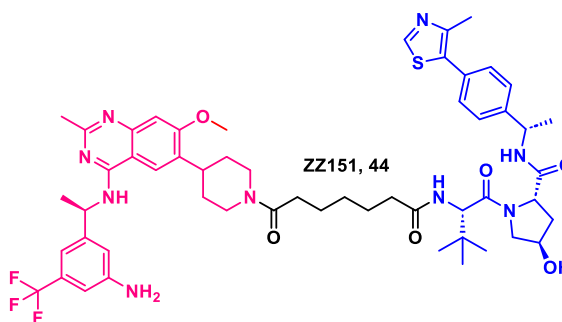
Свободное вращение вокруг одинарных связей в гибких линкерах дает возможность формировать различные низкоэнергетические конформации молекул PROTAC в растворе. При увеличении числа доступных конформаций увеличиваются и шансы образования тройного комплекса «белок-мишень-PROTAC-E3-лигаза». Поэтому, при дизайне активных PROTAC на начальных этапах используются, как правило, гибкие линкеры [139].

Конформационная гибкость, обеспечиваемая этими линкерами, позволяет молекулам PROTAC уменьшать эффективную полярную площадь поверхность путем образования внутримолекулярных водородных связей. Подобное «хамелеонство», или способность молекулы принимать определенные конформации в зависимости от среды, предположительно повышает способность молекул проникать через гидрофобные мембраны [140]. Тем не менее, среди молекул TPD, проходящих в настоящее время клинические испытания, известны лишь единичные примеры конъюгатов с гибкими линкерами без жестких фрагментов. В качестве примера можно привести соединение DT2216 (**43**) [141]. Использование гибкого алифатического линкера оптимальной длины позволило достичь более эффективного формирования тройного комплекса «BCL-XL-DT2216-VHL», и как следствие, лучшего

расщепления белка BCL-XL в сравнении с соединениями-предшественниками ( $DC_{50} = 17.4$  нМ в клетках MOLT-4)<sup>11</sup>.

На примере ряда деградеров белка SOS1 (Son of sevenless homolog 1), авторами [142] было продемонстрировано, что изменение длины линкера всего на одну метиленовую группу резко влияет на активность финальных PROTAC. Аналогичный эффект наблюдается и при введении атомов кислорода вместо одной из  $CH_2$ -групп.

Наиболее активным среди полученных конъюгатов оказался ZZ151 (**44**) (Рис. 17), отличающийся существенной способностью расщеплять целевой белок на KRAS-мутантных опухолевых клетках CAL-62 и NCI-H460<sup>12</sup> (значения  $DC_{50}$  составили 15,0 и 81,7 нМ соответственно).



**Рисунок 17.** Структура деградера ZZ151, воздействующего на белок белка SOS1

В качестве линкеров могут также использоваться аминокислоты и пептидные последовательности. Чаще всего используют аминоксановую кислоту, глицин, серин и линкер GSGS [143,144] - синтетический пептид, имеющий в составе 20 аминокислотных остатков [145].

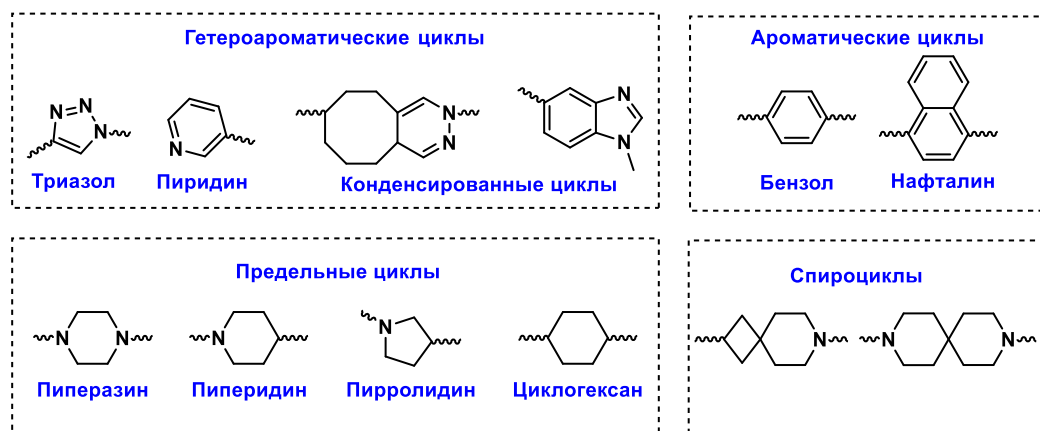
### 2.1.2.3. Жесткие линкеры

Относительно жесткие линкеры содержат циклические структуры [146–148], в качестве которых могут выступать гетеро- и карбоароматические фрагменты (триазолы [149], пиридины, конденсированные гетероциклы [150], производные бензола и нафталина [151]) предельные карбо- и гетероциклы (пиперазины [146], пиперидины [152], пирролидины [153],

<sup>11</sup> MOLT-4 – Т-лимфобластная клеточная линия (лимфобластный лейкоз).

<sup>12</sup> CAL-62 – Линия клеток анапластической карциномы щитовидной железы; NCI-H460 – немелкоклеточный рак легкого.

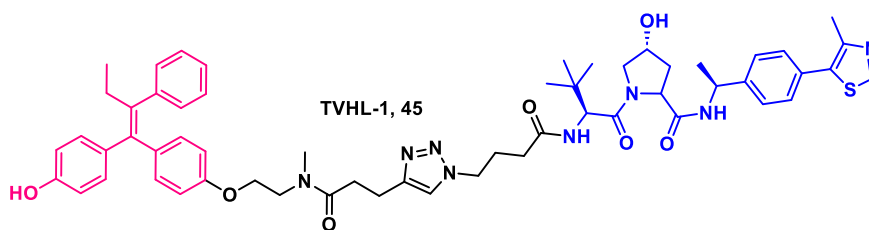
циклогексаны [154]) а также фрагменты, содержащие спироциклические [155] и макроциклические [156] структуры (**Рис. 18**).



**Рисунок 18.** Основные жесткие фрагменты в составе линкеров

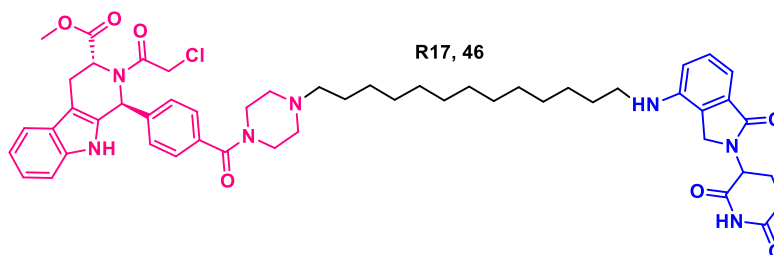
Одними из наиболее распространенных жестких линкеров являются триазол-содержащие фрагменты. Сборка триазольных циклов легко осуществляется посредством реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого медью (CuAAC). Как было отмечено ранее, проведение подобной реакции возможно внутри живых клеток, а также легко позволяет синтезировать ряд конъюгатов PROTAC с различной длиной линкера [157,158]. Преимуществом использования триазолов является их большая стабильность *in vivo* относительно гибких линкеров, и, как следствие, повышенная метаболическая стабильность конъюгата [159]. При этом введение триазола в среднюю часть спейсера значительно снижает его гибкость, стабилизируя его оптимальную конформацию. В то время как триазольный цикл ближе к концам линкера может не только увеличить жесткость, но и влиять на взаимодействие между лигандом и целевым белком.

Чаще всего триазол используется в сочетании с гибкими ПЭГ- и алкильными цепями. Примером служит деградер рецепторов эстрогена  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) на основе 4-гидрокситамоксифена [160]. Оптимизация длины и сайта связывания алкильного триазол-содержащего линкера позволила получить соединение TVHL-1 (**45**) (**Рис. 19**), наиболее активного в расщеплении ER $\alpha$  среди полученных авторами соединений со значением DC<sub>50</sub>, равным 4.5 нМ на клеточной линии рака груди MCF-7.



**Рисунок 19.** Структура соединения TVHL-1 (45) – деградера белков ER $\alpha$

Авторы [161] изучали влияние различных линкеров на активность PROTAC, воздействующих на мишень GPX4 (глутатионпероксидазу)<sup>13</sup>. В исследовании были использованы комбинированные линкеры, включающие в качестве жесткого фрагмента пиперазин либо триазол, а также гибкие полиэтиленгликолевые либо алифатические цепочки. При этом наибольшую активность в расщеплении GPX4 проявило соединение R17 (46) (Рис. 20), где линкер содержит пиперазин и алифатический фрагмент. При концентрации R17, равной 10 нМ, наблюдалась деградация более 50% белка GPX4 в клетках фибросаркомы (HT1080) [161].



**Рисунок 20.** Структура соединения R17 (46) – деградера белка GPX4

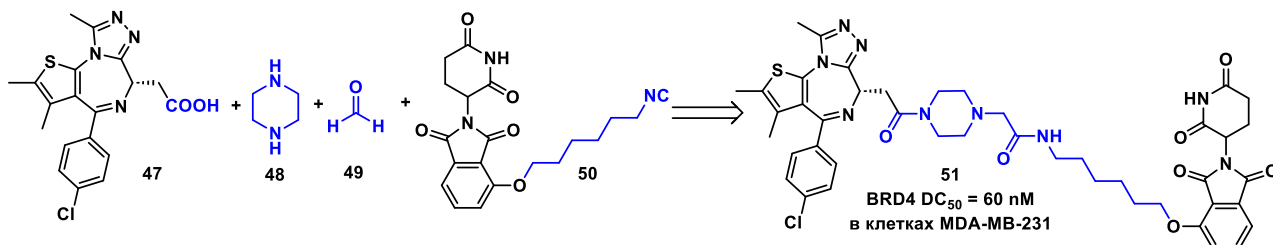
Далее описаны различные синтетические подходы к введению жестких фрагментов в состав линкера.

### ***Введение жестких фрагментов в состав линкеров***

Сборка молекул PROTAC посредством клик-реакций является одним из удобных подходов к их синтезу, в том числе с возможностью получения терапевтических агентов *in vivo*. Одним из примеров служит использование многокомпонентной реакции Уги (Схема 4)

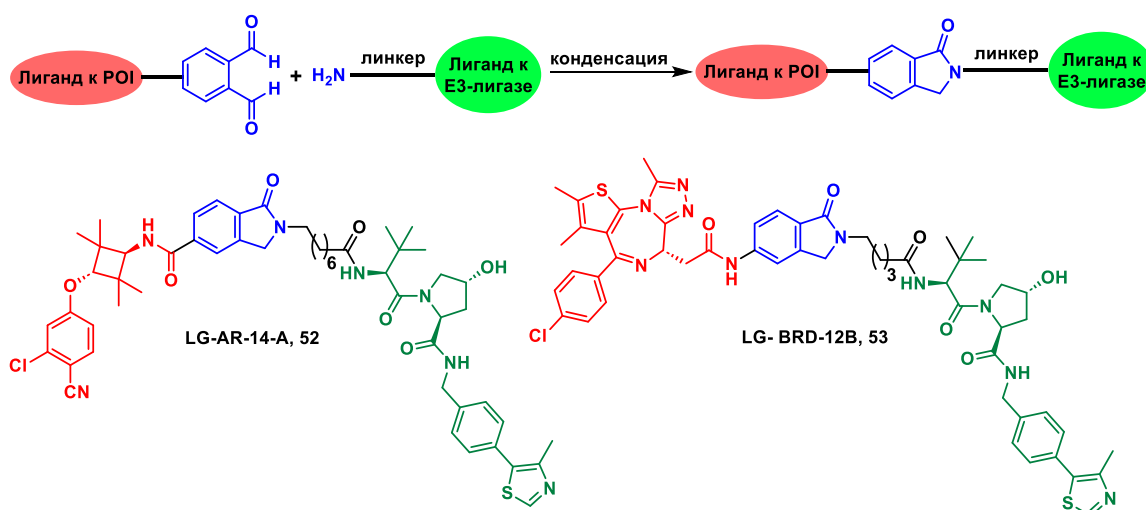
<sup>13</sup> Глутатионпероксидаза 4 (GPX4) представляет собой окислительно-восстановительный фермент, защищающий клетки от ферроптоза. Ферроптоз это железозависимая неапоптотическая форма гибели клеток. Индукция ферроптоза в настоящее время рассматривается как возможный подход в противоопухолевой терапии [399].

для получения деградеров белка BRD4. За исключением карбоновой кислоты на основе (+)-JQ1 (**47**), все остальные субстраты, необходимые для получения линкеров и конечных деградеров, являются блоками с доступным синтезом. *One-pot* сборка спейсера позволяет сократить число стадий синтеза и увеличить выход целевого конъюгата [162].



**Схема 4.** Получение деградера белка BRD4 (**82**) при помощи реакции Уги [162]

Распространение также получили подходы, основанные на реакциях конденсации, например, метод Rapid-TAC, основанный на реакции между *орто*-фталевым альдегидом в составе лиганда для POI и концевой аминогруппой, входящей в коммерчески доступные блоки PROTACs для связывания с E3-лигазами (**Схема 5**). В ходе конденсации побочным продуктом является только вода, что позволяет использовать получаемые конъюгаты без дополнительной очистки. Данный подход позволил синтезировать библиотеки деградеров белков AR (LG-AR-14-A, **52**) и BRD4 (LG-BRD-12B, **53**) (**Схема 5**) с величинами DC<sub>50</sub>, равными 41.9 нМ и 8.9 нМ соответственно [163].



**Схема 5.** Сборка целевых деградеров методом Rapid-TAC

Введение пиперазина и пиперидина в состав линкера способно повысить метаболическую стабильность PROTAC [146], увеличить его растворимость в водных средах и биодоступность, в том числе пероральную [156].

В настоящее время значительная доля PROTAC, которые находятся на стадии клинических исследований, характеризуются наличием жестких фрагментов в структуре линкера. Ярким примером служит препарат ARV-110 (**54**) (**Рис. 7**, стр. 24) [164], который избирательно связывается с андрогеновым рецептором (AR), вызывая его расщепление. В процессе оптимизации структуры гибкий линкер исходной молекулы был заменён на более жёсткую структуру с пиперидиновыми и пиперазиновыми фрагментами, что существенно повысило метаболическую стабильность и эффективность соединения. Аналогичная конструкция линкера была применена при создании другого PROTAC — ARV-417 (**55**) (**Рис. 7**, стр. 24) [165], который сейчас находится на III фазе клинических испытаний.

### 2.1.3. Выбор лиганда для целевого белка-мишени

Важным аспектом в дизайне химерных молекул является подбор лиганда ( $L_p$ ) для взаимодействия с целевым белком (POI). Большинство разрабатываемых в последние годы соединений базируется на малых молекулах. При выборе  $L_p$  исходя из ингибиторов для белка-мишени, могут быть использованы соединения как с нековалентным [5,6,166,167], так и с ковалентным [168,169], зачастую необратимым, типом связывания. Ковалентные ингибиторы, как правило, задействуются в случае белков-мишеней, для которых отсутствуют нековалентные лиганды. Высокое сродство или ковалентное связывание между белком-мишенью и  $L_p$  может затруднить высвобождение PROTAC после образования тройного комплекса, что важно для обеспечения каталитического механизма действия [170,171].

При этом используемое в качестве лиганда  $L_p$  соединение не обязательно должно взаимодействовать именно с активным центром белка – главным является наличие аффинность к белку-мишени. Это делает возможным создание PROTAC на основе аллостерических ингибиторов [172], [173].

Важно соблюдать баланс аффинности используемых лигандов к белку мишени – слишком сильное связывание с белком осложняет высвобождение PROTAC из тройного комплекса и его переход к следующей мишени, в то время как слишком слабое взаимодействие не позволит тройному комплексу просуществовать время, достаточное для полиубиквитинирования целевого белка. Интересный подход к решению данной проблемы был представлен авторами [174]. Для расщепления белка BRD4 были созданы «двойные»

PROTAC, в структуре которых присутствуют сразу две копии лигандов как к целевому белку, так и к E3-лигазе. По утверждению авторов, высокая способность «двухлигандных» PROTAC к расщеплению целевого белка, вероятно, обусловлена образованием более устойчивого тройного комплекса.

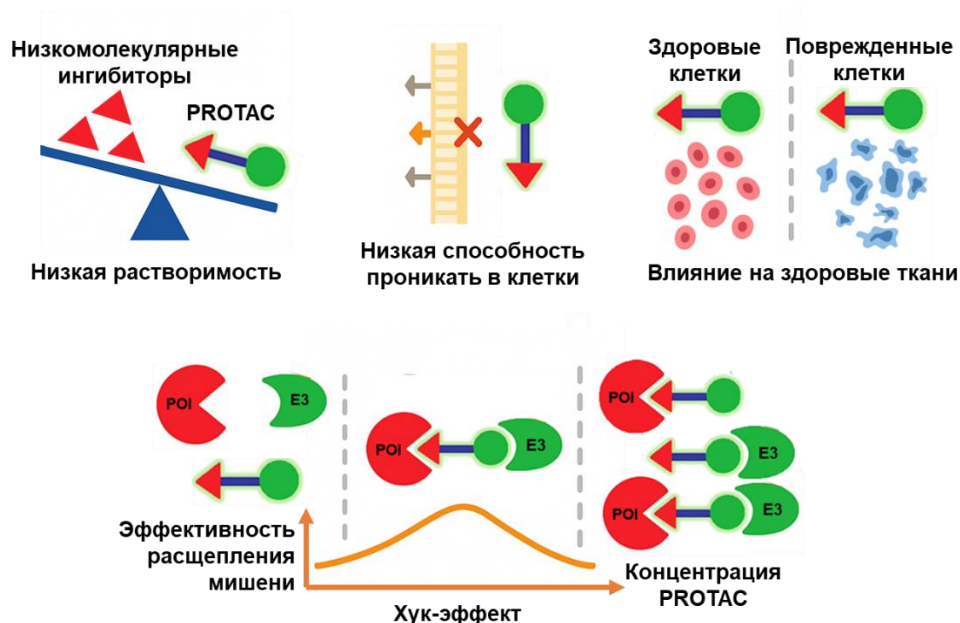
Стоит отдельно отметить, что при дизайне *Lp* важен выбор сайта конъюгирования активного фрагмента с остальной частью молекулы. Как место крепления линкера стараются задействовать структурные элементы, модификация которых не оказывает существенного влияния на способность *Lp* взаимодействовать с белком-мишенью. Важен и выбор конкретного ингибитора, что было продемонстрировано на примере деградаторов белка BCR-ABL [175].

В настоящее время технологии TPD охватывают большой спектр белковых мишеней. Сюда относятся не только тяжело таргетируемые мишени противоопухолевой терапии KRAS16 [176] и MYC17 [177], но и такие белки-мишени без явных активных центров, такие, как белок Тау, накопление агрегатов которого в нейронах ведет к прогрессированию ряда нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера и различных таупатий [178].

## **2.2. Недостатки терапевтических агентов PROTAC**

Несмотря на преимущества молекул PROTAC, имеется ряд проблем, ограничивающий их применение в клинической практике. Молекулы PROTAC первого поколения содержали пептидные фрагменты, и наличие пептидных связей делало их гидролитически нестабильными, а высокая полярность и низкая мембранотропность ограничивала биодоступность подобных терапевтических агентов. На смену пептидным конъюгатам пришли PROTAC на основе малых молекул, обладающие лучшей способностью проникать в клетки. При этом, их более обширное распределение в тканях также вызывает ряд проблем, так как E3-лигазы экспрессированы неселективно в нормальных и опухолевых клетках. Так, в случае доклинических исследований препарата ARV-771 на мышах [179] излишнее расщепление BET белков под действием PROTAC привело к развитию ряда побочных эффектов, включая кожные заболевания и анорексию [36,179]. Часто PROTACs имеют высокую молекулярную массу (> 800 Да), что снижает их растворимость и биодоступность [180]. Высокая полярная поверхность PROTACs осложняет переход через клеточные мембраны и гематоэнцефалический барьер [181,182]. Кроме того, имеет место Хук-эффект (Hook effect), когда при повышении внутриклеточных концентраций PROTAC вместо тройных комплексов образуются бинарные,

формирование которых не ведет к расщеплению мишеней и осложняет расчет дозировок *in vivo* (Рис. 21) [183].



**Рисунок 21.** Недостатки молекул PROTAC [36]

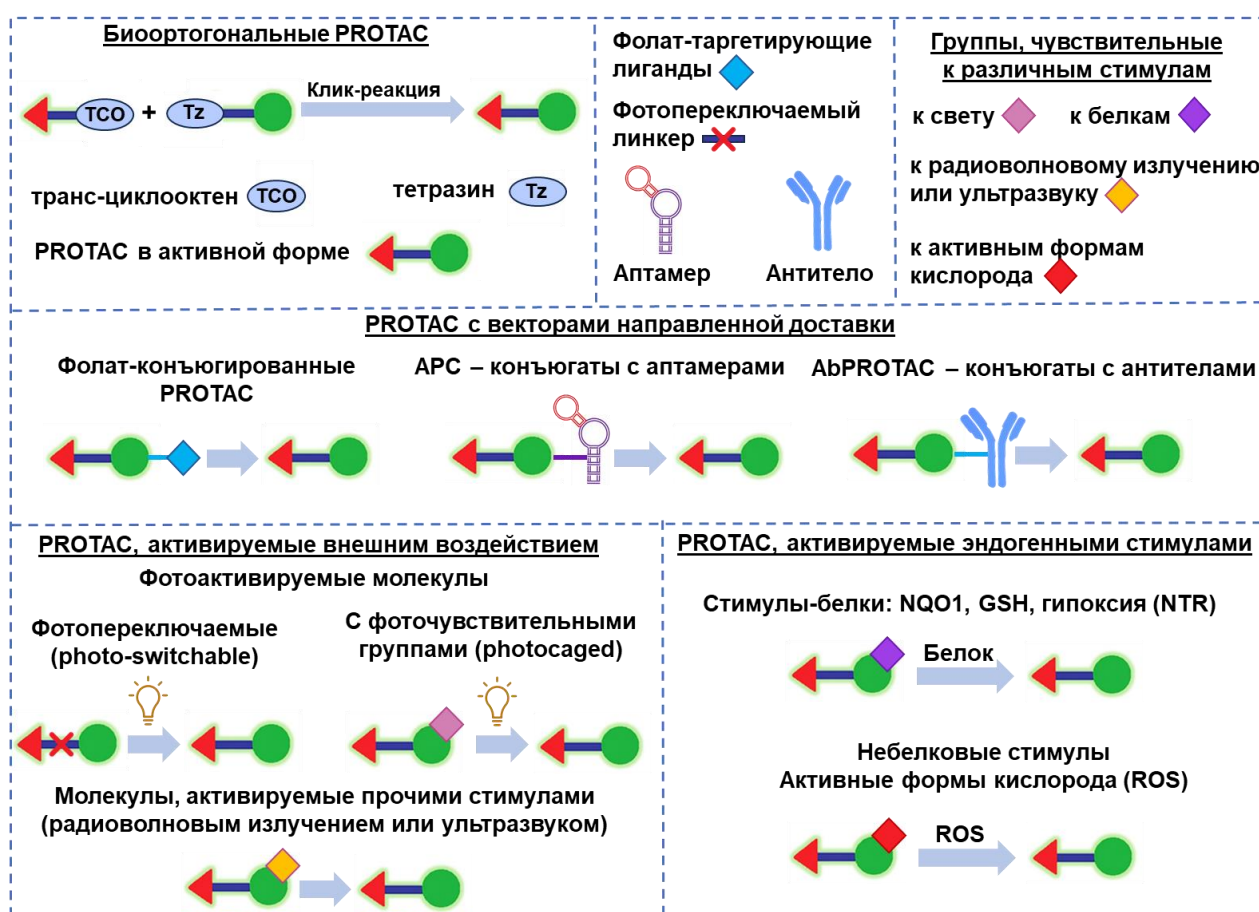
В совокупности неспецифическое биораспределение, неоптимальная растворимость, низкая биодоступность, ограниченная проницаемость и непредсказуемый Хук-эффект создают значительные проблемы для клинического применения PROTAC. Молекулы PROTAC должны быть достаточно малы и липофильны, чтобы проникать через клеточные мембраны. Их полярность и конформационная динамика также влияют на биораспределение и взаимодействие с клеточными мишенями. Оптимизация физико-химических свойств имеет решающее значение для улучшения доставки PROTAC в целевые ткани и повышения их терапевтического потенциала.

### 2.3. Новые типы PROTAC

Есть два основных направления развития протеасомальных деградеров с целью преодоления существующих недостатков. Первый подход основан на структурных модификациях, направленных на улучшение физико-химических свойств деградеров, и, как следствие, их большей эффективности *in vivo* [184,185]. Сюда можно отнести оптимизацию структуры линкеров и активных фрагментов, а также выбор лигандов для E3-лигаз с учетом их

субстратной специфичности и уровня экспрессии в опухолевых и нормальных тканях [186,187].

Вторым способом избежать недостатков существующих агентов служит разработка PROTAC новых классов. Создание PROTAC нового поколения направлено на избирательную активацию терапевтических агентов непосредственно в очаге патологии. Такой подход обеспечивает расщепление белков-мишеней в пораженных тканях, минимизируя воздействие на здоровые клетки. Возможны два варианта реализации такого подхода: сборка PROTAC внутри клеток из неактивных компонентов или их активация под действием внешних или внутренних стимулов. Новые классы PROTAC схематично представлены на **рисунке 22**.



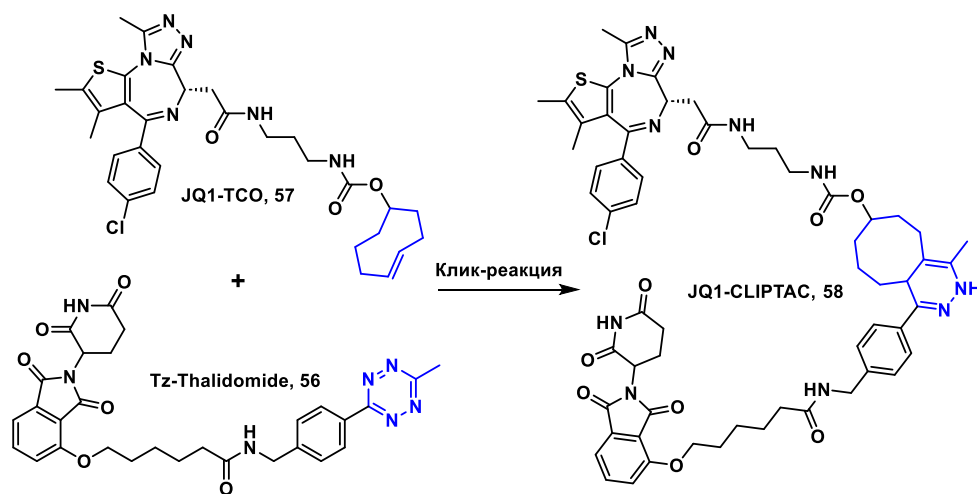
**Рисунок 22.** Новые типы молекул PROTAC. NQO1 - НАД(Ф)Н-хинондегидрогеназа 1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1), GSH - глутатион (glutathione), NTR - нитроредуктаза (nitroreductase), повышенный уровень NTR – один из маркеров гипоксии.

Группа биоортогональных молекул подразумевает возможность сборки PROTAC внутри живых клеток. Отдельный класс представляют собой соединения, содержащие векторы для таргетной доставки, в качестве которых могут выступать фолат-таргетирующие лиганды,

аптамеры или антитела. Группа молекул, активируемых внешними стимулами, включает соединения, активация которых может проходить под действием света, ультразвука или радиоволнового излучения. Возможными эндогенными стимулами для активации PROTAC могут быть белки либо другие факторы небелковой природы, к примеру, повышенный уровень активных форм кислорода в опухолевых клетках.

### 2.3.1 Биоортогональная сборка PROTACs

Как было отмечено выше, одной из проблем использования PROTAC является их высокая молекулярная масса и, как следствие, сниженная способность проникать через клеточные мембраны. Для решения данной проблемы, Х. Лебро (H. Lebraud) была реализована идея сборки деградеров из блоков с меньшими молекулярными массами внутри клеток путем быстрой биоортогональной реакции – IEDDA (электронно-обращенной реакции Дильса-Альдера) [147,157]. В качестве исходных соединений были использованы производное талидомида - лиганд для CRBN, конъюгированный с *тетразином* (Tz-thalidomide, **56**), а также лиганд для BRD4 – производное JQ1, содержащее *транс-циклооктеновый фрагмент* (JQ1-TCO, **57**, **Схема 6**). Эксперимент проводился при фиксированной концентрации JQ1-TCO (10 мМ) и различных концентрациях тетразинового компонента Tz-thalidomide. При высоких концентрациях Tz-thalidomide (3 и 10 мМ) наблюдалась полная, а при более низких (0,3 и 1 мМ) – частичная деградация BRD4. Данная работа стала отправной точкой в развитии биоортогональных подходов к синтезу PROTAC, которые получили широкое развитие [188–190]. При этом была показана возможность самосборки PROTAC не только *in vitro*, но и *in vivo* [191].



**Схема 6.** Клик-реакция между JQ1-TCO (**57**) и Tz-thalidomide (**56**) с образованием JQ1-CLIPTAC (**58**), направленного на расщепление BRD4 в клетках HeLa.

### 2.3.2. Использование векторов направленной доставки в составе PROTAC

Зачастую на поверхности опухолевых клеток наблюдается гиперэкспрессия определенных типов рецепторов. На этом основано применение различных векторов для селективной доставки терапевтических агентов, и молекулы PROTAC не являются исключением. Повышенная экспрессия фолатных рецепторов 1 (FOLR1) в злокачественных опухолях относительно нормальных тканей делает возможным использование фолатов в качестве векторов для направленной доставки препаратов [192]. *Фолат-конъюгированные PROTACs* связываются с FOLR1 на поверхности клеток, затем происходит их транспорт посредством эндоцитоза. Внутри клетки линкер, соединяющий фолат и активную часть молекулы, разрушается под действием гидролаз, что приводит к высвобождению PROTAC и последующему расщеплению белка-мишени (Схема 7). Существуют примеры фолат-конъюгированных PROTACs, действующих на следующие белки: BRD, MEK (восходящие MAPK-киназы), ALK (киназы анапластической лимфомы) [193,194].

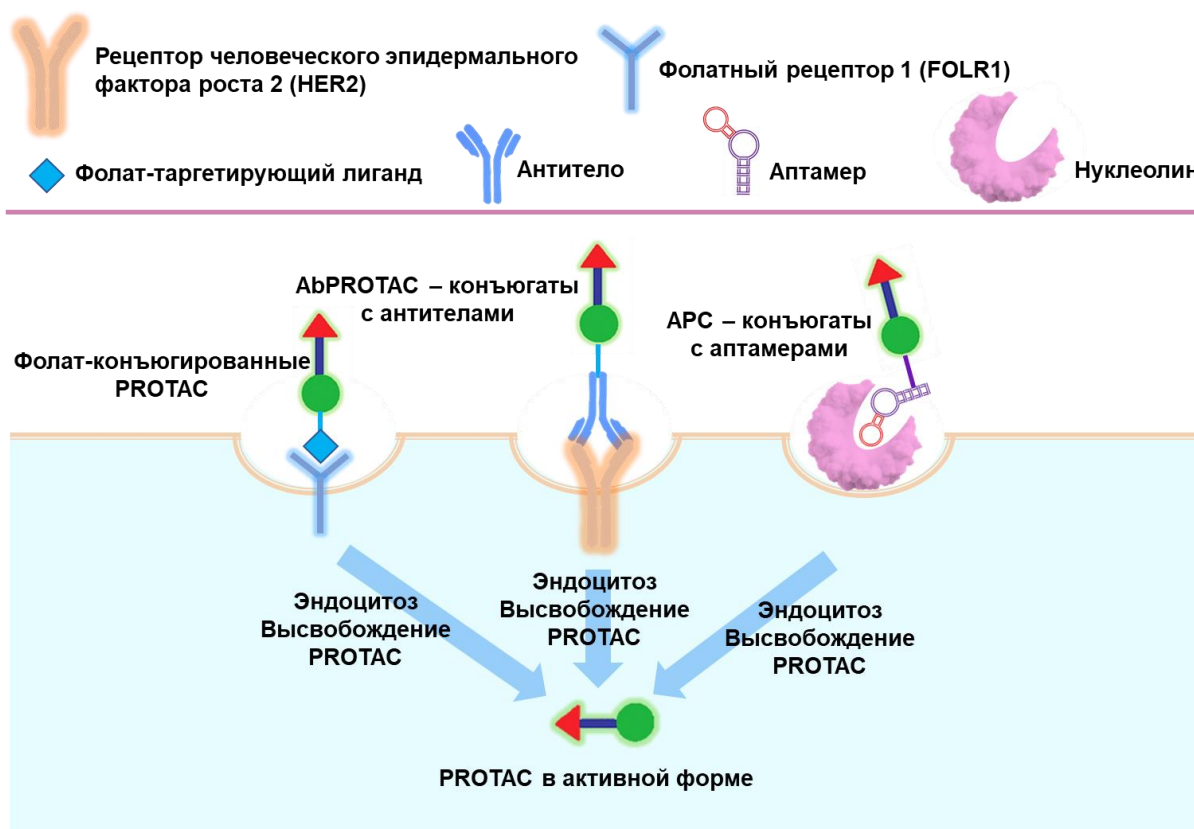


Схема 7. Механизм действия PROTAC с векторами направленной доставки [195]

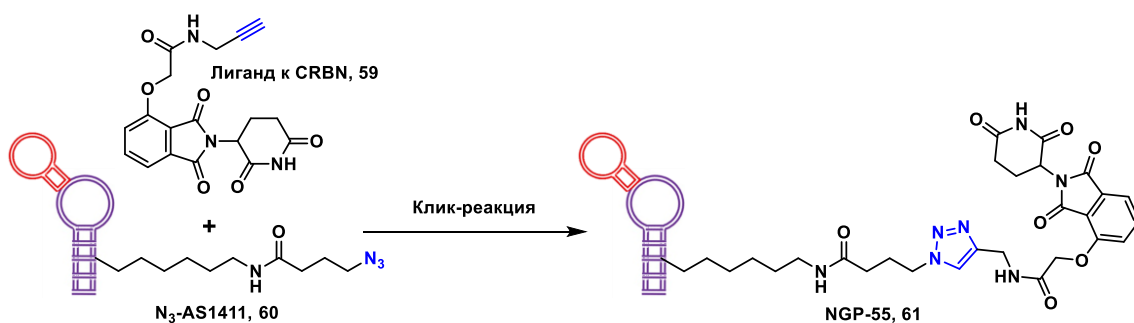
В качестве векторов для доставки PROTAC также используются *антитела* (Ab-PROTACs) и *аптамеры*<sup>14</sup> (APCs). Механизм действия подобных агентов аналогичен фолат-конъюгированным PROTACs. В случае Ab-PROTACs для создания конъюгатов используются опухоль-специфические антитела, к примеру, связывающиеся с HER2 (рецепторами человеческого эпидермального фактора роста 2), гиперэкспрессированными на поверхности некоторых типов клеток опухолей, в основном эпителиального происхождения [196]. Ab-PROTACs применялись для следующих мишеней противоопухолевой терапии: BRD4 [197,198]; EGFR [199]; ER $\alpha$  [200]; RIPK2 - рецептор-взаимодействующая протеинкиназа 2 [201], перспективная мишень в терапии рака груди, колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы и др. [202]. Ab-PROTAC это новый подход к повышению тканевой и клеточной селективности PROTAC, сочетающий в себе специфичность антител и действие PROTAC.

По сравнению с традиционными антителами, аптамеры обладают рядом преимуществ, среди которых низкая вероятность возникновения негативных реакций со стороны иммунной системы, а также высокая способность проникать в ткани [203]. В составе протеасомальных деградеров на основе аптамеров, обозначаемых как APC, используется олигонуклеотид AS1411, обеспечивающий связывание с нуклеолином (NCL) на поверхности опухолевых клеток [204]. Нуклеолин является белком, сверхэкспрессируемым на клеточной мембране во многих опухолях, и служит связывающим белком для нескольких лигандов, вовлеченных в ангиогенез и онкогенез. Нуклеолин присутствует в цитоплазме, нуклеоплазме и ядрышке и используется wybranymi патогенами для проникновения в клетку.

Первым примером APC служит NGP-53 (61), где AS1411 связан через эфирный дисульфидный мостик с деградером MZ1, действующим на BRD4. Была показана селективная доставка конъюгата NGP-53 к опухолевым, а не к нормальным клеткам [205]. Также известны APCs, расщепляющие непосредственно сам нуклеолин [206]. В таком случае AS141 служит не только вектором, но и лигандом для связывания с белком-мишенью. Примечательна возможность сборки таких конъюгатов внутри живых клеток по реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого эндогенной медью (Схема 8).

---

<sup>14</sup> Аптамеры – короткие РНК или одноцепочечные ДНК, состоящие из 20–80 нуклеотидов [400].



**Схема 8.** Сборка агента NGP-55 путем клик-реакции, катализируемой эндогенной медью внутри живых клеток [206]

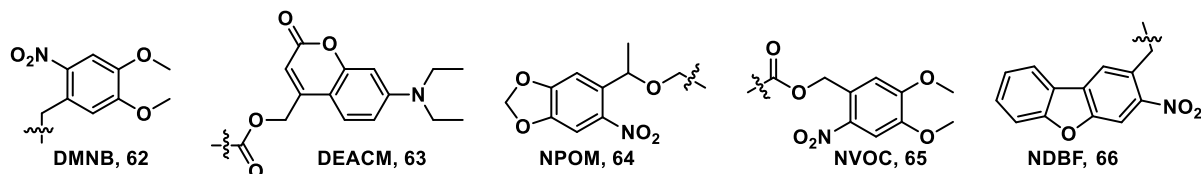
### 2.3.3. PROTAC, активируемые внешним воздействием

Активацию PROTAC непосредственно в очаге поражения можно достичь, используя неактивные предшественники, активирующиеся внутри клеток под воздействием специфических стимулов.

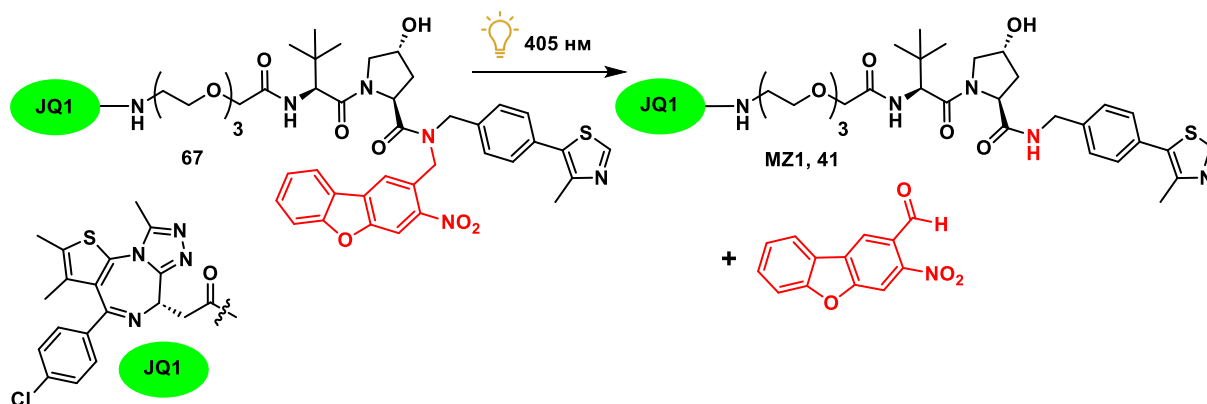
Наиболее распространены *фотоактивируемые агенты*: молекулы с фоточувствительными защитными группами (*photocaged PROTACs*) [207–212]; фотоперключаемые агенты (*photo-switchable PROTACs*) [213–216].

Использование фоточувствительных групп направлено на дезактивацию фрагментов, связывающихся с E3-лигазами либо с белком-мишенью при отсутствии света. Также существуют примеры включения фотозащитных групп в состав линкера [217]. Воздействие излучения определенной длины волны, чаще всего 365 нм, приводит к высвобождению PROTAC в активной форме. Среди используемых фотозащитных фрагментов выделяют 4,5-диметокси-2-нитробензильную группу (DMNB, **62**) [209,210], 7-(диэтиламино)-4-(гидроксиметил)-кумарин (DEACM, **63**), нитропиперонилоксиметильный заместитель (NPOM, **64**) [212], нитровератрилоксикарбонильную группу (NVOC, **65**) [211], нитродибензофуран (NDBF, **66**) [36,207].

#### Основные типы фотозащитных групп в дизайне белковых деградеров



#### Высвобождение активной формы соединения

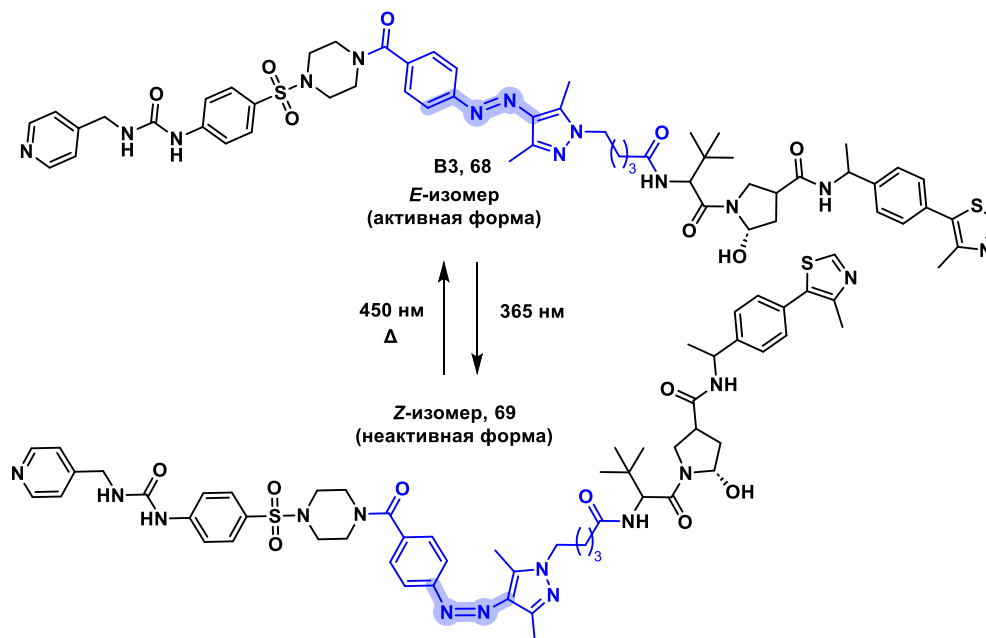


**Схема 9.** Примеры фотозащитных групп, используемые в синтезе фотоактивируемых PROTAC. Активация под действием света на примере соединения **49** [36,207]

Примечательной является работа группы под руководством Пана (Pan) по созданию фоточувствительных деградеров белка BRD4 [207]. В качестве фоточувствительной группы использовались 2-нитродибензо[b,d]фуран и *N,N*-диметил-8-нитродибензо[b,d]фуран-3-амин, присоединенные по разным положениям как со стороны лиганда для BRD4 – производного JQ1, так и фрагментов для связывания с E3-лигазой. Были продемонстрированы существенные отличия в способности целевых конъюгатов расщеплять белок BRD4 при воздействии видимого света и в темноте (**Схема 9**). Соединение **67**, где защитная группа вводилась в структуру лиганда для E3-лигаз, было неспособно вызывать деградацию BRD4 даже при высоких концентрациях (до 10 000 нМ) в темноте. Однако, при воздействии света с  $\lambda=405$  нм наблюдалось полное расщепление BRD4 при концентрации соединения **67**, равной 30 нМ. Эти результаты продемонстрировали, что видимый свет может эффективно регулировать способность рс-PROTAC вызывать деградацию целевого белка. Таким образом, авторам удалось эффективно контролировать активность PROTAC в опухолевых клетках воздействием света определенной длины волны.

Принцип действия фотопереключаемых PROTAC основан на использовании азо-содержащих линкеров с возможностью управляемой *E/Z* изомеризации. Различные изомеры

отличаются пространственной ориентацией активных фрагментов и расстоянием между ними, что является критическим в случае PROTAC. Наибольшее распространение получили азобензол и его производные, к примеру, метокси- [213], либо фтор- [215] замещенные фрагменты. Примером служат соединения с арилазопиразолом в составе линкера [218]. Так, в группе проф. Шэна (Sheng) [218] были получены деградеры фермента NAMPT (никотинамидфосфорибозилтрансферазы), регулирующего уровень кофермента NAD<sup>+</sup> (никотинамидадениндинуклеотида).



**Схема 10.** Образование активного изомера В3 (**68**) под действием света

Серия экспериментов на клеточной линии рака яичников A2780 подтвердила возможность регулировать расщепление белка-мишени NAMPT облучением светом с  $\lambda = 450$  и  $\lambda = 365$  нм (**Схема 10**) при переходе от активного E-изомера (**68**) к неактивной Z-форме (**69**) соответственно. Более того, было показано действие деградера В3 (**68**), обладающего благоприятными фармакокинетическими профилями, на моделях мышей. Это служит первым примером контроля действия PROTAC при помощи света *in vivo*.

Помимо света, в качестве внешних стимулов, регулирующих активность деградеров, могут быть использованы радиоволновое излучение [219,220] и ультразвук [221].

#### 2.3.4. PROTAC, активируемые эндогенными стимулами

Метаболизм опухолевых клеток, как и их микроокружение, имеет существенные отличия от таковых для нормальных клеток [222,223]. Повышенный уровень различных

ферментов в опухолевых клетках [224] открывает новые опции для таргетной терапии, в частности при дизайне PROTAC-конъюгатов. Как и в случае фотоактивируемых PROTAC, в структуру конъюгатов вводятся дезактивирующие защитные фрагменты, которые удаляются при действии ферментов, избыток которых наблюдается в опухолевых тканях. Данный подход направлен на избирательную деградацию белков именно внутри опухолевых, а не нормальных клеток, что призвано снизить побочные эффекты и системную токсичность. К настоящему времени в качестве эндогенных стимулов для активации PROTAC могут быть задействованы белки НАД(Ф)Н-хинондегидрогеназа 1 (NQO1) [225], а также глутатион (GSH) [226]. Однако, большая часть фермент-чувствительных PROTAC активируется нитроредуктазой (NTR), уровень которой высок в солидных опухолях в условиях гипоксии [227–230]. Одним из небелковых эндогенных стимулов служит повышенный уровень активных форм кислорода (ROS) [231,232].

Несмотря на то, что представленные в этом разделе молекулы PROTAC «нового поколения» создавались в рамках «модных» тенденций органической и медицинской химии, большинство из представленных подходов имеют свои ограничения для клинического применения. Так, в случае фоточувствительных молекул их область действия ограничивается глубиной проникновения в ткани света используемой длины волны. Например, при активации конъюгата **67** (Схема 9, стр. 48) излучением 405 нм [207], свет проникает в ткани не более, чем на 2 мм [233,234]. Применение лучевой активации радиочувствительных PROTAC может приводить к повреждению ДНК в нормальных тканях [235]. В случае фолат-конъюгированных PROTAC могут возникать проблемы с высвобождением фолат-содержащих конъюгатов из эндосом [236], что осложняет транспорт подобных агентов в клетки. Подходы биоортогональной химии часто требуют тонкой настройки кинетических параметров и тщательного подбора биосовместимых компонентов, не вызывающих нежелательных иммуногенных реакций [237,238]. Ключевой проблемой АФК-чувствительных терапевтических агентов является точность порога чувствительности молекул к уровням АФК для их активации только в опухолевых тканях без повреждения здоровых клеток [239]. Производство агентов на основе антител и аптамеров сложнее реализовать, чем получение активных веществ на основе малых молекул. Аптамеры часто имеют невысокую метаболическую стабильность ввиду чувствительности к действию нуклеаз.

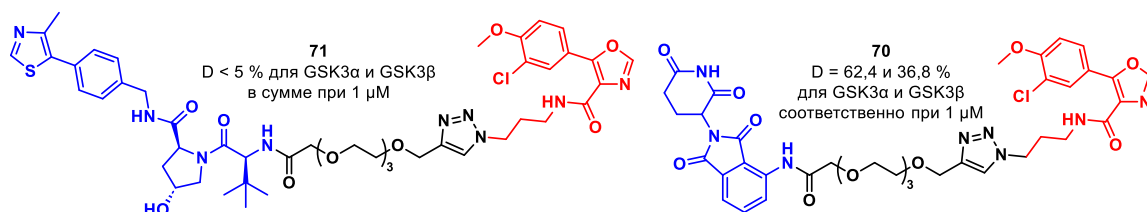
## 2.4. Сравнение различных классов протеасомальных деградеров

В таблице 1 представлено сравнение технологии SNIPER с другими типами молекул PROTACs и молекулярными клеями.

**Таблица 1.** Сравнение различных классов PROTAC с молекулами SNIPERs [63][240].

Класс молекул	Описание	Преимущества	Недостатки
<b>CRBN-PROTAC</b>	Задействуют CRBN в качестве E3-лигаз	Широкий спектр мишеней; простое строение лиганда для E3-лигазы повышает шанс перорального введения	Ограничения SAR для лиганда E3-лигазы; вопросы токсичности талидомида и его производных, используемых в качестве лигандов
<b>Молекулярные клеи</b>	Задействуют CRBN, реже – DCAF-15 в качестве E3-лигаз. Имеют отличное от PROTAC строение (моновалентные соединения, линкер отсутствует) и механизм действия (связываются с E3-лигазой либо белком-мишенью и индуцируют межбелковое взаимодействие)	Простота синтеза; отсутствие необходимости подбора линкера	Сложно предсказать возможные мишени действия,
<b>VHL-PROTAC</b>	Задействуют VHL в качестве E3-лигаз	Хорошо исследованный тип соединений; широкий спектр белков-мишеней	Сложная структура лигандов; ограниченная способность соединений проходить через гематоэнцефалический барьер и снижение доступности орального способа введения.
<b>SNIPER</b>	Задействуют cIAP1, cIAP2, XIAP в качестве E3-лигаз	Позволяет достичь одновременно деградации целевого белка и гибели опухолевых тканей посредством апоптоза	Не до конца изучен спектр возможных мишеней; строение лигандов для IAP ограничивает фармакологические свойства препарата
<b>Прочие PROTAC</b>	Задействуют другие E3-лигазы (MDM2, RNF114, DCAF15,16)	Новые возможности для таргетирования более широкого спектра мишеней; разнообразие химических структур активных фрагментов молекул	Сложность в подборе субстратов для специфических E3-лигаз

Примером сравнения деградеров, использующих различные типы E3-лигаз, служит работа [241] по созданию конъюгатов для расщепления киназы 3 гликогенсинтазы (GSK-3)<sup>15</sup> на основе ингибитора PF-367. PROTAC на основе помалидомида, рекрутирующий CRBN (**70**), оказался более активным в сравнении с VHL-связывающим аналогом (**71**) (**Рис. 23**) [186,241].



**Рисунок 23.** Молекулы PROTAC, воздействующие на киназу GSK-3 [241].

Важным фактором также является уровень экспрессии лигаз, варьирующийся в зависимости от типа клеток, как было отмечено в начале текущего раздела. Это можно рассматривать как преимущество IAP-рекрутирующих конъюгатов, т.к. уровень данных белков часто повышен в опухолевых тканях относительно нормальных [242].

Использование лигандов к белкам IAP в составе деградеров зачастую позволяет задействовать в качестве E3-лигазы не один белок, как в случае лигандов к CRBN, MDM2 или VHL, а целый класс белков. С одной стороны, это позволяет повысить шанс на образование тройного комплекса с последующим расщеплением мишени. С другой стороны, применение SNIPER в клетках со слишком высоким уровнем IAP-белков может привести к стерическим затруднениям при формировании тройного комплекса и снизить эффективность деградеров.

Способность индуцировать апоптоз рассматривается как основное преимущество использования в опухолевых клетках агентов SNIPER по сравнению с классическими PROTAC-деградерами [243]. Это подчеркивается в работах по дизайну деградеров, нацеленных на гистондеацетилазы 1-3 (HDAC1-3) [244], α-эстрогеновые рецепторы [245].

Несмотря на вышеуказанные достоинства, использование SNIPER не всегда является лучшим решением. При нейродегенеративных заболеваниях сопутствующий применению агентов SNIPER апоптоз является нежелательным явлением, т.к. существует необходимость утилизировать патогенные белковые агрегаты, избегая гибели самих нейронов [246]. SNIPER

<sup>15</sup> Данный белок в организме представлен двумя изоформами (GSK3α и GSK3β), обе из которых запускают гиперфосфорилирование тау-белка, что далее приводит к формированию его нейротоксичных агрегатов [401].

- более новый подход по сравнению с классическими PROTAC, однако, для них характерны те же проблемы с оптимизацией структуры, физико-химических свойств и повышением селективности для минимизации побочных эффектов [247]. Продолжение исследований призвано расширить применение SNIPERs для лечения других заболеваний, помимо рака [63,247].

### 3. Расщепление белков с участием лизосом

Убиквитин-протеасомальная деградация белков не является единственно возможным механизмом. Существует целый ряд возможных способов расщепления белков, которые различаются по механизму, задействованных в процессе клеточных структурах, и возможных мишеням. Основные подходы представлены в таблице 2 [167].

Как видно из таблицы, наряду с протеасомальной деградацией белков, широко распространены методы, основанные на расщеплении белковых мишеней в лизосомах. Сюда относятся агенты с эндосомно-лизосомным либо аутофаголизосомным механизмом действия.

**Таблица 2.** Классификация технологий TPD в соответствии с механизмом действия

<b>Механизм расщепления белка</b>	<b>Технология</b>	<b>Возможные мишени</b>
Убиквитин-протеасомальный	PROTAC	Внутриклеточные белки
	Молекулярный клей	Внутриклеточные белки
	Trim-Away	Эндогенные белки
	AbTAC	Мембранные белки
	PROTAB	Трансмембранные белки
Эндосомно-лизосомный	LYTAC	Внеклеточные и мембранные белки
	GlueTAC	Мембранные белки
Аутофаголизосомный	AUTAC	Внутриклеточные белки, поврежденные органеллы
	ATTEC	Внутриклеточные белки, небелковые клеточные компоненты
	AUTOTAC	Внутриклеточные белки
	CMA-degrader	Цитоплазматические белки

При эндосомно-лизосомном механизме белки-мишени (преимущественно мембранные и внеклеточные) попадают в лизосомы посредством эндоцитоза. Белки интернализируются в ранние эндосомы, которые созревают в поздние эндосомы и, наконец, сливаются с лизосомами. В лизосомах белки расщепляются кислыми гидролазами (Схема 11). Помимо белков, в лизосомах можно расщеплять углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты и даже целые органеллы или патогены, попавшие внутрь клетки. К терапевтическим агентам, использующим данный механизм относят конъюгаты LYTAC (LYsosome-TARgeting Chimera), GlueTAC (covalent nanobody-based PROTAC strategy), GELYTAC (Genetically Encoded LYTAC).

В основе аутофаголизосомного механизма лежит процесс аутофагии, при котором целевые субстраты (в основном внутриклеточные белки, агрегаты, органеллы) захватываются двухмембранной структурой (фагофор), которая замыкается в аутофагосому. Аутофагосома сливается с лизосомой, образуя аутофаголизосому, где происходит расщепление содержимого. Помимо белков, посредством аутофагии могут утилизированы органеллы (митофагия предполагает деградацию митохондрий, липофагия - липидных капель), агрегаты (агрефагия), патогены (ксенофагия) и другие технологии на основе аутофаголизосомного механизма: AUTAC (AUtophagy-TARgeting Chimera), ATTEC (AuTophagy-TEthering Compound), AUTOTAC (AUToPhagy-TARgeting Chimera).

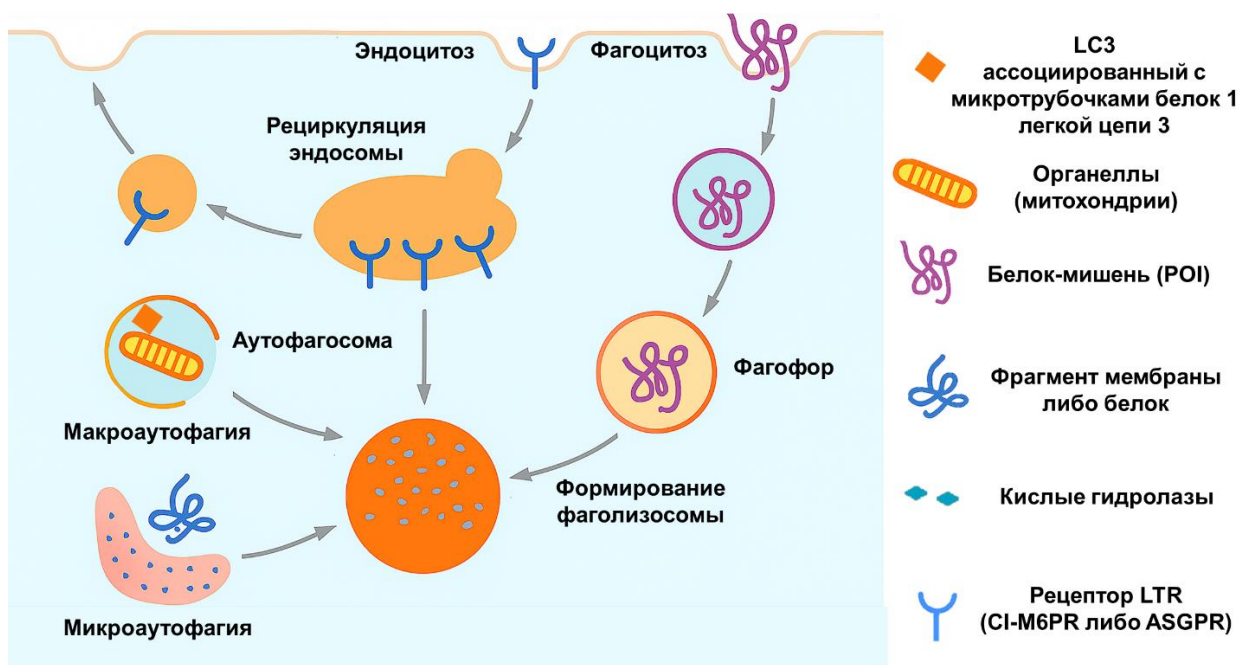


Схема 11. Возможные пути расщепления белков и органелл в лизосомах [167]

Оба механизма приводят к полному разрушению мишени в лизосомальных образованиях (лизосомах или аутофаголизосомах) и способны приводить к расщеплению не только белков, но и других клеточных структур (Схема 11). Эндосомно-лизосомный механизм применим в основном для утилизации внеклеточных и мембранных белков, а при реализации аутофаголизосомного механизма расщепляются преимущественно внутриклеточные белки, агрегаты и органеллы.

### 3.1. Эндосомно-лизосомный механизм

Одними из первых типов лизосомальных деградеров стали LYTAC (LYsosome-Targeting Chimeras), представляющие собой бифункциональные молекулы, в составе которых один из фрагментов, как правило, антитело либо лиганд, связывается с белком-мишенью (Схема 12).

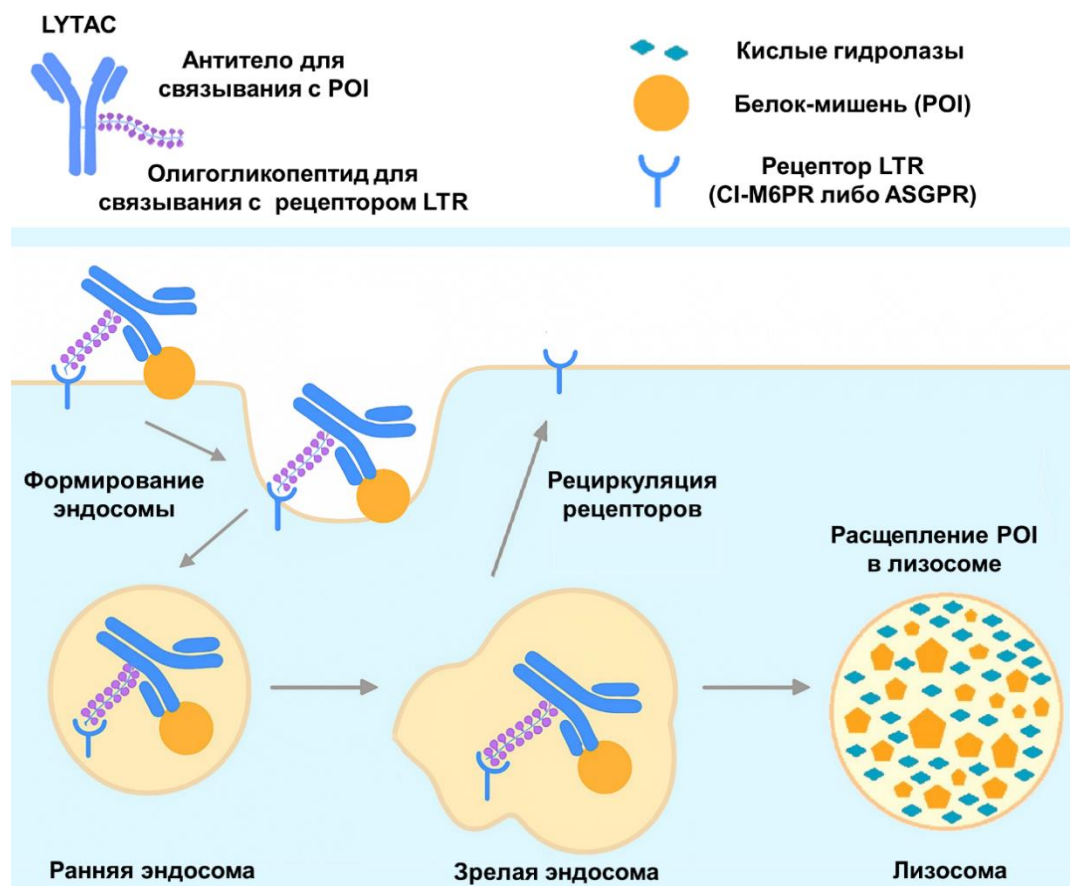
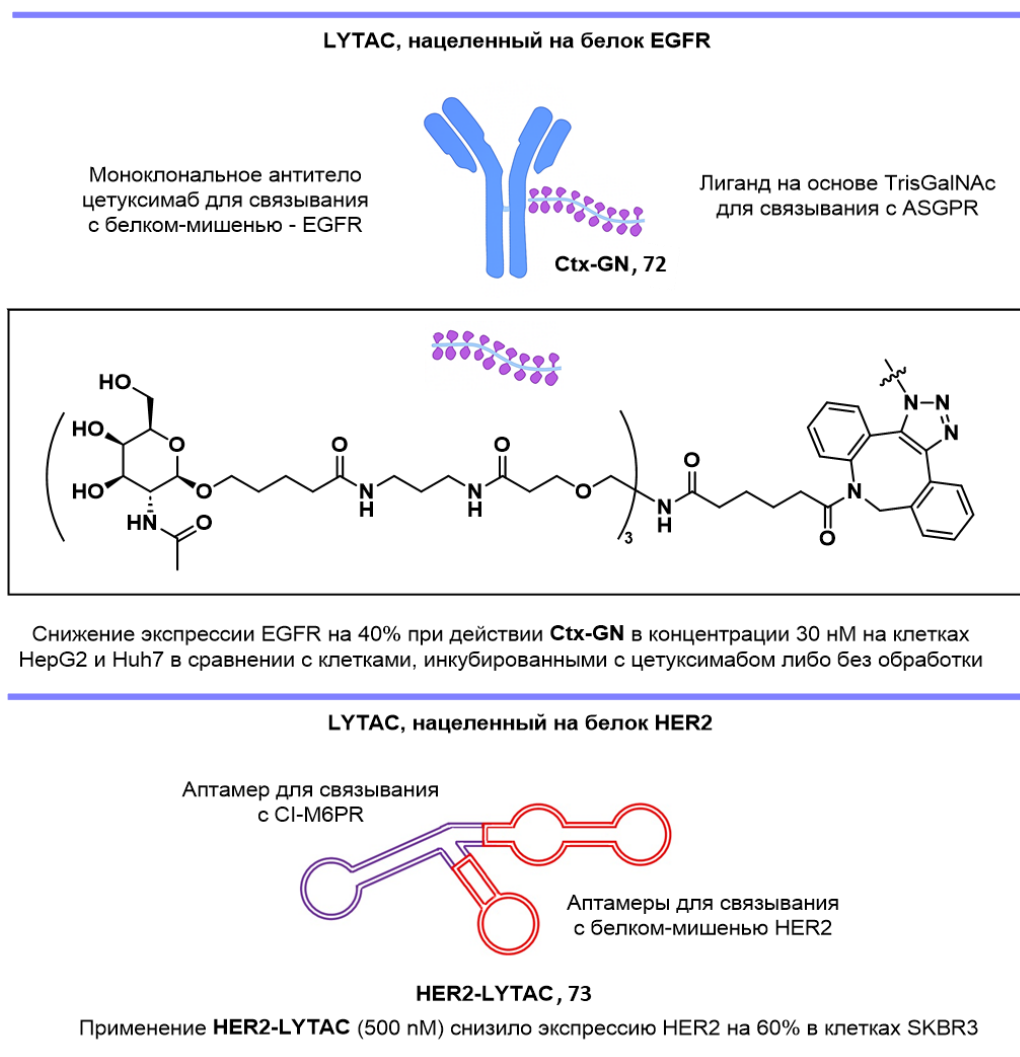


Схема 12. Механизм действия LYTAC [167,248]

Другой фрагмент представляет собой олигогликопептид для взаимодействия с лизосом-таргетирующими рецепторами (LTR) на поверхности клетки. В качестве LTR выступают катион-независимый маннозо-6-фосфатный рецептор (CI-M6PR) и асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR) [249], лигандами для которых служат олигомеры манноза-6-фосфата (M6Pn) [250] или производные *N*-ацетилгалактозамина (GalNAc) [251] соответственно. Связывание мишени с рецептором запускает интернализацию белкового комплекса через клатрин-зависимый эндоцитоз. Образовавшаяся эндосома созревает и сливается с лизосомой, где в дальнейшем расщепляется белок-мишень.

К настоящему времени известны конъюгаты LYTACs, нацеленные на расщепление мембранных белков, таких как EGFR [251,252], CD71, лиганды программируемой клеточной гибели (PD-L1) и аполипопротеин E4 [248,253], Met, PTK-7 [254] и HER2 [252,255]. Структуры некоторых деградеров в общем виде представлены на **рисунке 24**.



**Рисунок 24.** Примеры агентов LYTAC [251,255]

Появление LYTAC позволило выйти технологии TPD за пределы внутриклеточных мишеней. Однако, у технологии есть свои недостатки. Размер молекул ограничивает их способность проникать в ткани, в частности, преодолевать гематоэнцефалический барьер; эффективность метода зависит от экспрессии и доступности специфических лизосом-таргетирующих рецепторов (LTR); применение LYTAC иногда вызывает нежелательные иммунные ответы [3,248,256].

Сравнительно новым классом агентов LYTAC являются конъюгаты GlueTAC [257], объединяющие в себе сразу несколько технологий. Обычные антитела в составе GlueTAC заменяются нанотелами<sup>16</sup>, что облегчает их попадание в клетку (**Рис. 25**). Данное свойство усиливается введением клеточно-проникающих пептидов (CPP). Механизм действия GlueTAC близок к молекулярным клеям, однако, требует дальнейшего изучения. Под действием GlueTAC, нацеленного на PD-L1, в концентрации 100 нМ удалось достигнуть расщепления >70% целевого белка в клетках HCC827 и PD-L1-EGFP/MDA.



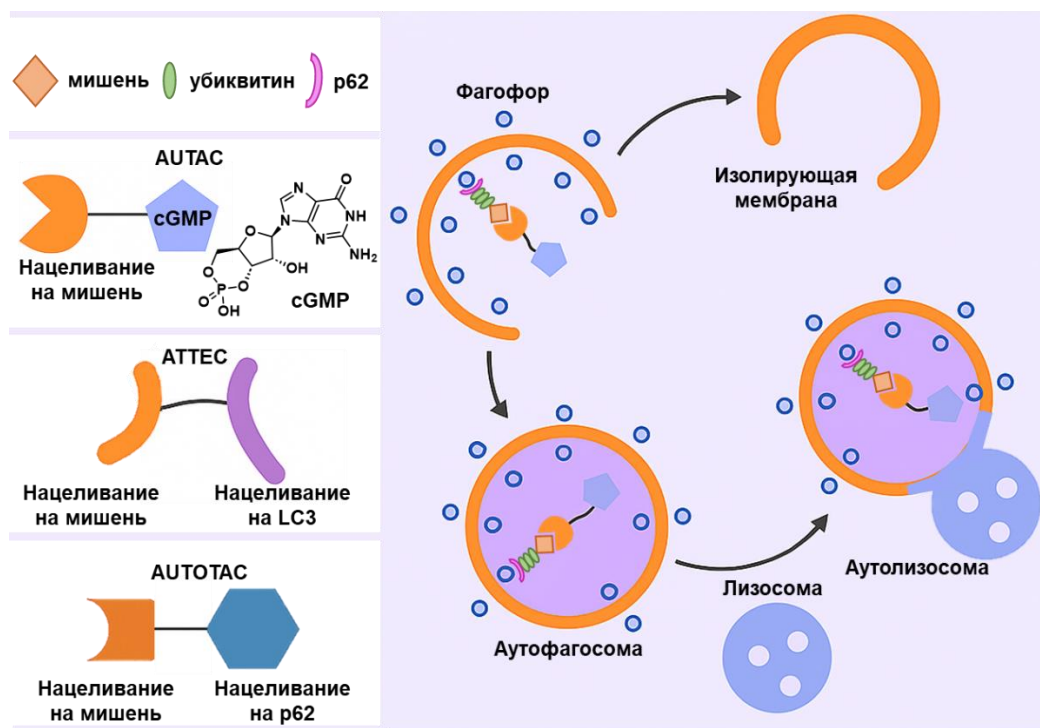
**Рисунок 25.** Строение GlueTAC

Одной из проблем молекул LYTAC первого поколения является то, что они расщепляются вместе с целевым белком-мишенью в лизосоме. В работе 2025 года [258] описывается создание cataLYTAC, способных к высвобождению и переходу к следующей мишени ввиду устойчивости к действию кислых гидролаз. Еще одной интересной концепцией является технология GELYTAC (Genetically Encoded LYTAC) [256], позволяющая получать генетически кодируемые деградеры, которые могут быть выработаны самой клеткой.

<sup>16</sup> Нанотела представляют собой однодоменные антитела, которые в сравнении с обычными антителами обладают меньшим размером, более высокой растворимостью и лучшей аффинностью и селективностью по отношению к активным центрам ферментов и рецепторов [402].

### 3.2. Аутофаголизосомный механизм

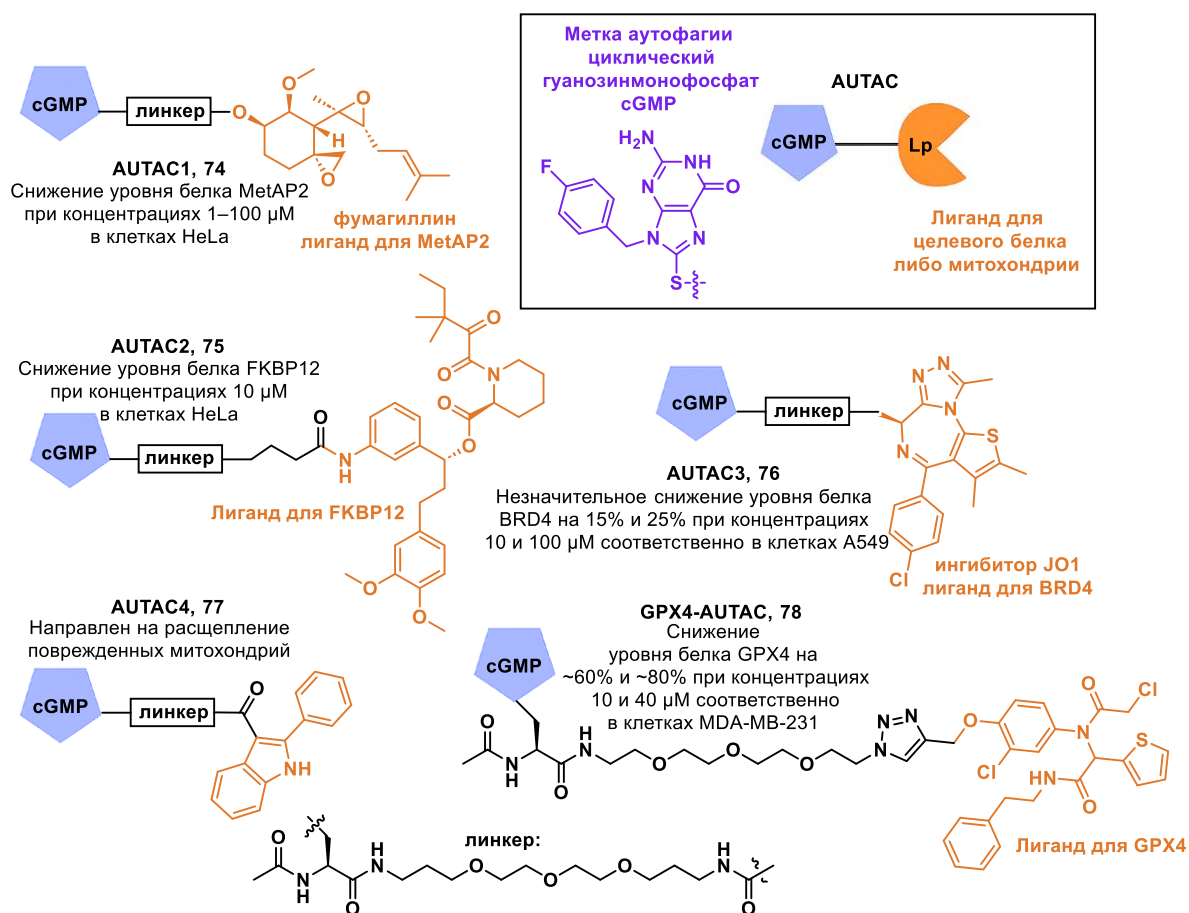
Молекулы AUTAC, ATTES, AUTOTAC имеют в структуре два фрагмента. В качестве фрагментов для связывания с целевым белком чаще используются низкомолекулярные ингибиторы, реже – пептидные последовательности. Несмотря на общий принцип действия, включающий последовательное формирование фагофора, аутофагосомы, и в конечном итоге лизосомы, в состав этих молекул входят различные «вспомогательные» фрагменты. Общий механизм действия и строение аутофаголизосомных агентов представлен ниже (Схема 13).



**Схема 13.** Строение деградеров, расщепляющих мишени по аутофаголизосомному механизму. Общий принцип действия представлен на примере AUTAC. **сGMP** - циклический гуанозинмонофосфат; **LC3** - ассоциированный с микротрубочками белок 1 легкой цепи 3; **мишень** – белок, белковый агрегат или органелла; **p62** - селективный белок-рецептор аутофагии.

В структуре молекул AUTAC присутствуют производные циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). Связывание с мишенью приводит к ее S-гуанилированию. Эта метка имитирует эндогенные сигналы (например, на поврежденных митохондриях происходит S-гуанилирование белков наружной мембраны), которые распознаются системой аутофагии,

что приводит к упаковке мишени в аутофагосомы с последующей деградацией в аутофаголизосомах [35]. Класс молекул AUTAC был разработан научной группе Аримото (Arimoto) [259–261]. AUTAC способны воздействовать на митохондрии (AUTAC4, 77), цитозольные белки: MetAP2 (AUTAC1, 74), FKBP12 (FK506-связывающий белок, AUTAC2, 75), локализованный в ядре BRD4 (AUTAC3, 76) [261], а также на расположенный в различных частях клетки белок GPX4 (GPX4-AUTAC, 78) [262]. Примеры представлены на **рисунке 26** [263].



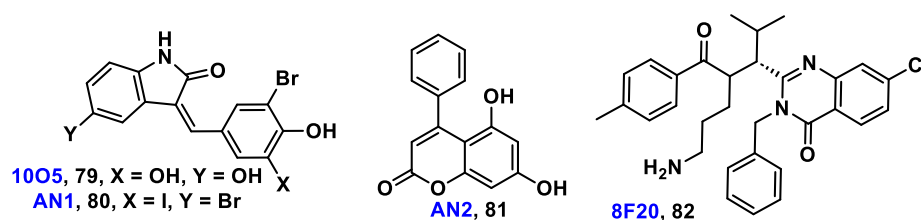
**Рисунок 26.** Примеры молекул AUTAC

Благодаря низкой молекулярной массе, молекулы AUTAC обладают высокой биодоступностью, в том числе, могут использоваться при пероральном введении. К еще одному достоинству следует отнести способность AUTAC расщеплять клеточные органеллы.

Одним из этапов развития подхода AUTAC стало появление терапевтических агентов ATTEC (AUTophagosome TEthering Compound). Молекулы ATTEC представляют собой низкомолекулярные соединения, действующие как "молекулярный клей", при этом, в их

структуре не обязательно находится линкер. Молекулы АТТЕС содержат лиганды для LC3<sup>17</sup>, маркерного белка на поверхности фагосомы, связывание с которым запускает фагоцитоз белка-мишени [264].

В научной группе Лу (Lu) были разработаны первые молекулы АТТЕС, мишенью которой стал мутантный белок Хантингтона (mНТТ), играющей ключевую роль в развитии болезни Хантингтона и ряда других нейродегенеративных заболеваний [265,266]. При этом удалось получить агенты, воздействующие только на мутантную форму белка и не затрагивающие НТТ дикого типа. Представленные на **рисунке 27** соединения (10O5 (**79**), AN1 (**80**), AN2 (**81**), 8F20 (**82**)) не имеют в своём составе линкеров, и действуют подобно молекулярным клеям, объединяя в тройной комплекс mНТТ и LC3.



**Рисунок 27.** Примеры молекул АТТЕС

На основе упомянутых соединений, имеющих сродство к LC3, разработаны АТТЕС, содержащие линкер и второй активный фрагмент для связывания с целевым белком. Данные молекулы воздействуют на белки BRD4 [267]; и никотинамид фосфорибозилтрансферазу (NAMPT) – фермент, являющийся одним из регуляторов энергетического метаболизма, часто гиперэкспрессированный в опухолевых клетках [268,269]. Примечательно, что технология АТТЕС применима для расщепления небелковых биомолекул, например, липидов. Так, проф. Лу (Lu) был разработан класс молекул LD-АТТЕС (Lipid Droplets·AuTophagy TEthering Compound) направленных на расщепление как липидов, так и липидных капель<sup>18</sup>. Расщепление накопленных в клетках жиров открывает новые возможности в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, жирового гепатоза и ожирения [270].

<sup>17</sup> LC3 - ассоциированный с микротрубочками белок 1 легкой цепи 3

<sup>18</sup> Липидные капли – богатые липидами органеллы, участвующие в различных клеточных процессах, включая метаболизм липидов и клеточную сигнализацию. Они состоят из нейтрального липидного ядра, окруженного монослоем фосфолипидов [403].

Технология АТТЕС имеет определенные достоинства. Терапевтические агенты являются низкомолекулярными соединениями, для которых характерна возможность расщепления не только белковых мишеней. Однако, разработка эффективных "клеев" сложна. Требуется высокое сродство одновременно и к мишени, и к LC3. Спектр возможных белковых мишеней ограничен, при этом отсутствует универсальная стратегия для дизайна АТТЕС [264].

Еще одним инструментом TPD, задействующим процесс аутофагии, являются AUTOTAC (AUTOpagy-TArgeting Chimera), действие которых заключается в образовании комплекса между мишенью и белком p62, инициирующим перенос убиквитинированных субстратов в аутофагосомы [271]. Терапевтические молекулы данного класса позволяют расщеплять не только отдельные белки и белковые агрегаты [271,272], но и патогенные бактерии [273]. Предполагается, что в отличие от PROTAC, в случае AUTOTAC длина линкера имеет меньшее влияние на активность конъюгатов, что облегчает разработку AUTOTAC [274].

Стоит отметить, что для молекул AUTAC, АТТЕС, как и для родственных им AUTOTAC, существует риск чрезмерной активации клеточной аутофагии и избыточного расщепления мишеней. Механизм действия AUTAC не до конца изучен, в частности, не ясно, какими именно клеточными структурами распознается образуемая под действием AUTAC аутофагическая метка.

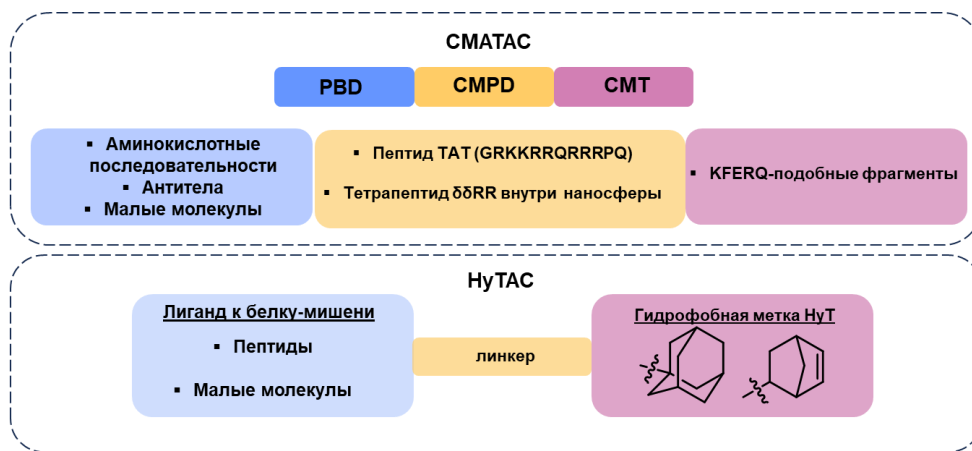
### 3.3. Шаперон-опосредованная аутофагия

В последние годы получила развитие шаперон-опосредованная аутофагия, или СМА (Chaperone-Mediated Autophagy), как один из подходов к утилизации условно-патогенных белков [275,276]. К терапевтическим агентам с подобным механизмом действия относятся СМАТАС (СМА-TArgeting Chimeras) [277,278], Ab-CMAs (СМА-химеры в сочетании с антителами) [279], SM-CMADs (split-and-mix CMA-based degraders) [280]. Рассмотрим принципиальные особенности строения и механизма действия молекул данного типа на примере СМАТАС (**рисунок 28**). В состав данных соединений входят три основных фрагмента. Первый фрагмент — это аминокислотная последовательность KFERQ, которая распознается белками-шаперонами (HSP70) как сигнал о необходимости утилизировать мишень посредством аутофагии, часто обозначается как СТМ<sup>19</sup>. Второй фрагмент необходим

---

<sup>19</sup> СМа-Targeting motif – СМА-нацеленная последовательность.

для связывания с белком-мишенью PBD<sup>20</sup>. Наличие третьего домена, CMPD<sup>21</sup>, облегчает прохождение соединения через мембраны клеток. Основное отличие структуры Ab-CMA в том, что для связывания с белком-мишенью в их состав входят антитела [279]. Конструкция SM-CMAD, помимо наличия последовательности KFERQ, предполагает вставки низкомолекулярных лигандов и фенилглицина [280].



**Рисунок 28.** Примеры деградеров, использующих CMA-опосредованный механизм при расщеплении мишеней [275]

К мишеням SMATAC относятся такие белки, как mHTT [281], структурный белок PSD-95,  $\alpha$ -синуклеин [277], ER $\alpha$  [278]. Известны примеры Ab-CMA, нацеленные на мембранные белки EGFR, HER2, PD-L1 (лиганд программируемой клеточной смерти 1) [279]. Агенты SM-CMAD способны воздействовать на белки ER $\alpha$ , AR, MEK1/2, и BCR-ABL [280].

Существуют соединения, действующие шапероны при помощи гидрофобных фрагментов (HyT – Hydrophobic Tag). Прикрепление HyT к белку-мишени приводит к тому, что он распознается шаперонами как «частично развернутый», что приводит к его CMA-опосредованному расщеплению [282]. Несомненным преимуществом соединений такого типа является возможность использовать низкомолекулярные структуры на основе адамантана вместо пептида KFERQ. Соединения HyTAC применяют для расщепления белков, связанных с возникновением нейродегенеративных (Tau [283], TDP-43 [284], mHtt [285]), а также

<sup>20</sup> Protein-Binding Domain – Белок-связывающий домен.

<sup>21</sup> Cell membrane-penetrating domain – Домен, улучшающий способность соединения преодолевать клеточные мембраны.

онкологических заболеваний (Her3 [286], EZH2 [287,288], ALK [287]). Развитие данного подхода значимо именно для терапии нейродегенеративных заболеваний, так как замена классических лигандов для E3-лигаз на НуТ ведет к сокращению числа акцепторов и доноров водородных связей, что положительно сказывается на способности молекул проникать через гематоэнцефалический барьер [289].

#### 4. Таргетное расщепление белков в контексте существующих терапевтических подходов

В зависимости от выбранного механизма действия и строения, каждый из подходов TPD имеет определенные достоинства и недостатки.

Молекулы *PROTAC* достаточно универсальны в плане разработки: они позволяют использовать типовые конструкции, чтобы обеспечить взаимодействие одной E3-лигазы со многими мишенями. Также использование *PROTAC* позволяет бороться с лекарственной устойчивостью, в том числе за счет возможности расщепления целевых белков при таргетировании их аллостерических сайтов. Но наряду с преимуществами, они обладают рядом недостатков: большой молярной массой, зачастую высокой гидрофобностью, потенциальной токсичностью, связанной с off-target эффектами [36].

Использование метода *Trim-Away* (раздел 2, стр. 22) позволяет быстро достичь расщепления целевого белка, но действие таких агентов требует использования антител. Одним из недостатков является зависимость эффективности расщепления мишени от уровня белка TRIM21 – требуется его избыток относительно мишени [290].

*PROTAB* обладают хорошей биодоступностью, как и способностью проникать в клетки, но при этом спектр возможных мишеней ограничен белками в мембране, либо на поверхности клетки [47]. За счет меньшего размера *молекулярных клеев* по сравнению с классическими *PROTAC*-конъюгатами, [291], они, предположительно, должны облегчать захват препарата клетками [292]. Однако, в настоящее время отсутствует системный подход к дизайну молекулярных клеев.

Использование *LYTAC* позволяет воздействовать как на внеклеточные, так и на мембранные белки с высокой селективностью, но такие агенты характеризуются плохой способностью проникать в ткани и низкой тканевой специфичностью, высокой скоростью выведения *in vivo* [3,248,256].

Среди преимуществ *AbTAC* - низкий иммунный ответ организма на вводимый препарат, однако механизм их действия еще не до конца исследован [293].

Агенты *GlueTAC* обладают высоким сродством к мишеням, что значительно снижает нецелевые взаимодействия с другими белками, но при этом профиль безопасности подобного рода препаратов неудовлетворителен.

Технология *AUTAC* имеет хорошие перспективы, так как позволяет утилизировать не только внутриклеточные белки, но поврежденные органеллы, однако, механизм действия *AUTAC* достаточно сложен и требуется изучить его более полно [167,293], в частности на моделях *in vivo* [294].

Преимущества соединений *ATTEC* заключается в широком спектре потенциальных мишеней, куда попадают не только белки, но и различные клеточные компоненты, однако отсутствуют достоверные методы скрининга [167,266].

Для большинства агентов TPD, огромное влияние на эффективность к разложению белка-мишени оказывает выбор линкера, соединяющего активные части молекулы. Для соединений *AUTOTACs* наименее критична длина линкера, что является существенным преимуществом [167], однако для *AUTOTACs* не до конца изучены побочные эффекты и тканевая селективность. В случае агентов *CMA* требуется больше исследований, чтобы полностью охарактеризовать механизм их действия [167].

Подобное разнообразие уже существующих подходов в TPD и постоянное появления новых свидетельствует об актуальности данного направления. Каждый из методов имеет свои плюсы и минусы, а также определенные возможности и ограничения, что стоит принимать во внимание при выборе подхода к расщеплению выбранной белковой мишени.

В **таблице 3** приводится сравнение PROTACs не только с ингибиторами на основе малых молекул, но и с другими терапевтическими подходами [295,296].

**Таблица 3.** Основные подходы к подавлению активности патогенных белков

Параметр	Ингибиторы на основе малых молекул	Моноклональные антитела	siRNA	CRISPR	PROTAC
Проникновение в ткани	Хорошее	Плохое	Плохое	Плохое	Умеренно е
Воздействие на структурные белки	Нет	Да	Да	Да	Да
Деструкция белков	Нет	Нет	Да	Да	Да
Способ введения	В/В, П/К, П/О	В/В, П/К	В/В, П/К	В/В	В/В, П/К, П/О
Воздействие на внутриклеточные белки	Да	Нет	Да	Да	Да
Возможность масштабного производства	Да	Да	Да	Нет	Да
Метаболическая стабильность	++	-/+	-/+	-/+	++
Возможность системной доставки	Да	Да	Да	Нет	Да
Каталитический характер действия	Нет	Нет	Да	Да	Да

В/В – внутривенный, П/К – подкожный, П/О – пероральный способ введения препарата.

Моноклональные антитела имеют высокую специфичность действия и, как следствие, меньшее число побочных реакций, однако, они имеют высокую стоимость производства, их большой размер затрудняет проникновение в ткани, а основными мишенями действия являются мембранные белки.

Низкомолекулярные ингибиторы имеют лучшие фармакокинетические профили по сравнению с антителами, а также для них доступен пероральный способ введения. Но существенным ограничением применения ингибиторов на основе малых молекул является то, что примерно 70–80% белков в организме человека не имеют энзиматических свойств и(или) обладают функциями, не зависящими от наличия каталитического сайта [297]. К примеру, это

могут быть факторы транскрипции или каркасные белки [298]. Есть и случаи, когда структура каталитического сайта белка-мишени неизвестна.

Геномные технологии, включая использование малых интерферирующих РНК (siRNA) [299] и метод редактирования генома CRISPR/Cas9 [300] также используются в качестве терапевтических подходов. Реализация CRISPR/Cas9 - длительный процесс, требующий трудоемкой подготовки и дорогостоящего оборудования, а само по себе редактирование генома необратимо и может привести к отложенным побочным эффектам [301,302]. Среди недостатков использования siRNA выделяют сложность доставки в клетки [303], что обусловлено неспособностью siRNA самостоятельно проникать через клеточные мембраны и их нестабильность к действию экзонуклеаз, также имеет место возникновение иммунного ответа по отношению к чужеродной (экзогенной) РНК [297,304,305]. В сравнении с CRISPR, PROTAC имеют возможность перорального введения и системной доставки, более доступные методы получения, большую метаболическую стабильность - как и в сравнении с моноклональными антителами и siRNA.

## 5. Агенты таргетного расщепления белков в клинических испытаниях

В 2019 году начались клинические испытания PROTAC-молекул, разработанных компанией Arvinas. Первыми исследуемыми препаратами стали ARV-471 (55) [165] и ARV-110 (54) [164] (рисунок 29). Мишенями ARV-110 (20) являются рецепторы андрогена (AR), гиперэкспрессия которых наблюдается при раке простаты [306,307]. Однако, ARV-110 не вышел за пределы II фазы клинических испытаний.

Большой успех имеет разработка препарата вепдегестрант (ARV-471) (рисунок 29) компанией Arvinas совместно с Pfizer. Он способен избирательно расщеплять рецепторы эстрогена  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Эти белки участвуют в онкогенных процессах при различных типах рака груди [308,309]. В мае 2024 года вепдегестрант получил статус «*fast track*» от FDA для исследования эффективности лечения пациентов с прогрессирующим метастатическим раком молочной железы (NCT05654623). Fast Track это статус, присваиваемый с целью ускорить разработку лекарств для лечения социально-значимых заболеваний, особенно тех, для которых характерны тяжелое течение и высокая смертность. Несмотря на неоднозначные промежуточные результаты III фазы испытаний, Arvinas и Pfizer сообщили о своих планах подать заявку на регистрацию препарата в качестве монотерапии второй линии<sup>22</sup>.

В настоящее время на различных стадиях клинических испытаний находятся около 30 соединений PROTAC [310]. Краткая информация об избранных молекулах PROTAC на различных стадиях испытаний представлена ниже в таблице 4. Структуры обсуждаемых в текущем разделе молекул отображены на рисунке 29.

---

<sup>22</sup> Вторая линия терапии подразумевает применение препарата после того, как первая линия терапии оказалась недостаточно эффективной или появились признаки прогрессирования заболевания

**Таблица 4.** Примеры PROTACs, находящихся на клинических испытаниях

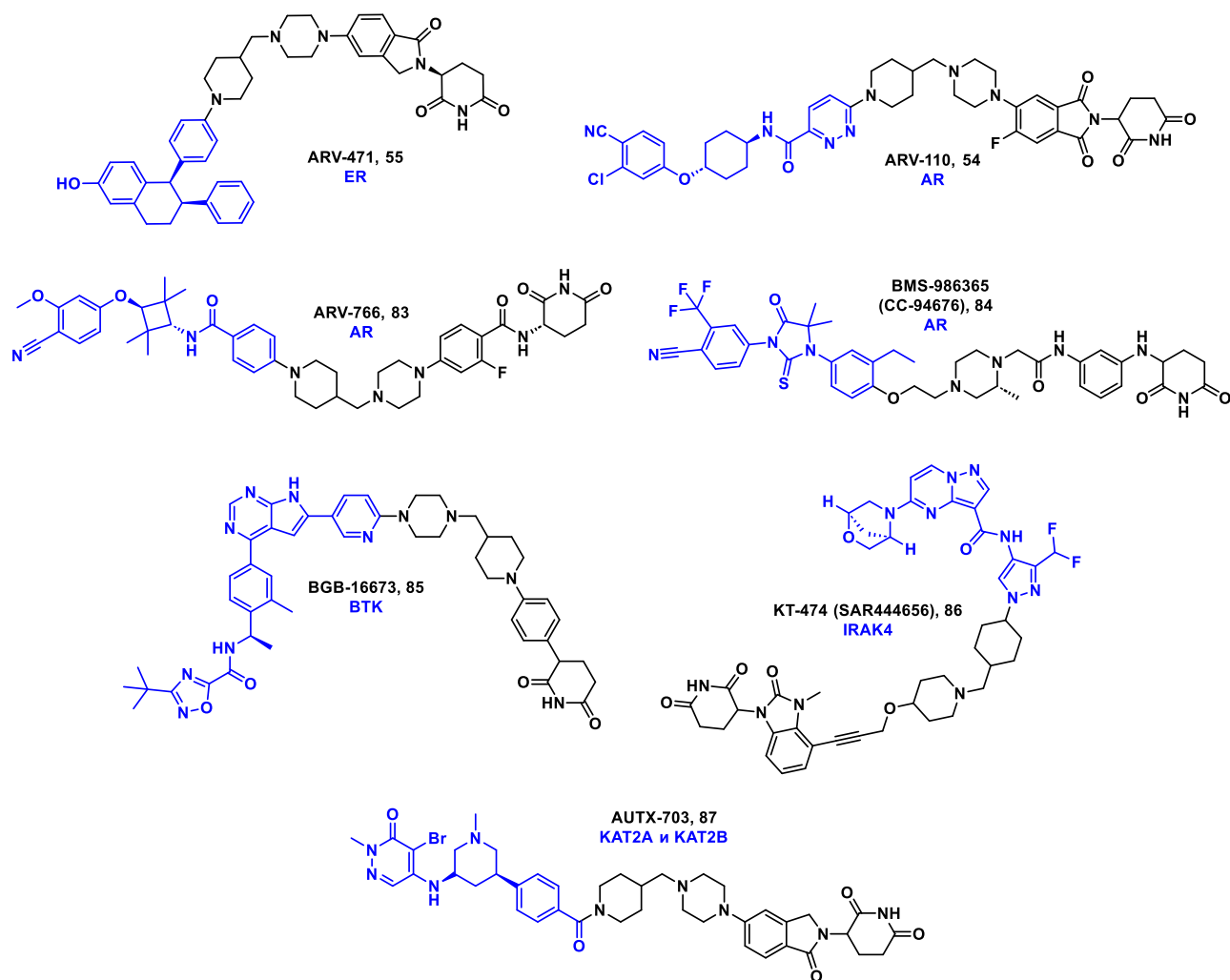
Белок-мишень	Препарат	Заболевание	Фаза клинических испытаний	Фарм-компания	N испытания
ER	ARV-471	Рак груди	III	Arvinas и Pfizer	NCT05654623
AR	ARV-110	Рак простаты	I	Arvinas	NCT05177042
	ARV-766		I/II	Arvinas	NCT05067140
	BMS-986365 (CC-94676)		III	Celgene	NCT06764485
BTK	BGB-16673	P/P хронический лимфолейкоз	III	BeiGene	NCT06970743
IRAK4	KT-474 (SAR444656)	Атопический дерматит	II	Sanofi и Kymera Therapeutics	NCT06058156
		Гнойный гидраденит	II	Sanofi и Kymera Therapeutics	NCT06028230
KAT2A и KAT2B	AUTX-703	P/P острый миелоидный лейкоз и миелодиспластический синдром	I	Auron Therapeutics	NCT06846606

\*ER – эстрогеновый рецептор; AR – андрогеновый рецептор; BTK – Тирозинкиназа Брутона; P/P – Рецидивирующий/рефрактерный; IRAK4 – интерлейкин-1 рецептор-ассоциированная киназа 4; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3; KAT2A и KAT2B – К-ацетилтрансферазы А и В. Взято из [34] и с сайта [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Вторым препаратом PROTAC в мире, который вошел на III фазу клинических испытаний, стал BMS-986365 (84), разрабатываемый компанией Celgene. Препарат BMS-986365 направлен на деградацию андрогеновых рецепторов (AR). Его разработка направлена на преодоление устойчивости опухолей к существующим методам лечения, в том числе к использованию ингибиторов сигнальных путей андрогеновых рецепторов (ARPI) вне зависимости от типа мутации AR [166].

Еще одним препаратом, который находится на III фазе, стал деградер BGB-16673 (**85**) от компании BeiGene. По результатам I фазы, у 78% пациентов с хроническим лимфолейкозом наблюдалась положительная динамика. Препарат BGB-16673 — это первый деградер тирозинкиназы Брутона (ВТК), дошедший до III стадии клинических испытаний.

Аналогично препарату вепдегестрант, в 2025 году деградер AUTX-703 (**87**) получил статус *fast track* от FDA как препарат для терапии рецидивирующего/рефрактерного острого миелоидного лейкоза. Мишенями AUTX-703 являются К-ацетилтрансферазы (КАТ2А, КАТ2В). [311]. На данный момент препарат находится на I стадии клинических испытаний.



**Рисунок 29.** Структуры PROTAC, находящихся на стадии клинических испытаний

В настоящее время ни один из представленных PROTAC-конъюгатов ещё не одобрен для клинического применения. Однако, некоторые кандидаты демонстрируют обнадеживающие результаты в клинических испытаниях, открывая новые возможности для терапии ряда заболеваний.

## Заключение

Область технологий направленной деградации белка демонстрирует значительный прогресс. На сегодняшний день разработаны стратегии, основанные как на протеасомальной, так и лизосомальной системах деградации, позволяющие эффективно таргетировать патогенные белки и даже целые органеллы. Исследуются более двадцати различных платформ для направленной деградации белков, ассоциированных с нейродегенеративными и онкологическими заболеваниями, а также воспалительными и аутоиммунными процессами. Основными преимуществами таргетного расщепления белков являются: уникальный механизм действия, дающий возможность полностью ликвидировать патогенный белок, тем самым устраняя все его функции, а не просто блокировать один активный центр; действие близко к каталитическому, что обуславливает потребность в меньших дозах деградера, и, как следствие, снижается вероятность возникновения побочных эффектов и развития устойчивости опухолей к терапии. Дополнительным плюсом является возможность использования лигандов для связывания с аллостерическими сайтами белка-мишени.

В настоящее время около тридцати соединений класса PROTAC находятся на клинических испытаниях, причем три из них достигли III фазы. Однако, несмотря на активные исследования, на данный момент ни одна молекула-деградер не зарегистрирована для терапевтического применения.

Несмотря на очевидные преимущества протеасомальных деградеров, включая способность воздействовать на тяжело таргетируемые мишени, рациональный дизайн PROTAC представляет собой нетривиальную задачу. Сложность заключается в правильном сочетании двух активных фрагментов молекулы и подборе соединяющего их линкера, что важно при формировании тройного комплекса "деградер – белок-мишень – E3-лигаза", необходимого для последующего убиквитинилирования и протеасомальной деградации целевого белка. Преодоление ограничений существующих платформ требует дальнейшего развития новых и усовершенствования имеющихся подходов к направленной деградации белков.

## Обсуждение результатов

### 1. Молекулы PROTAC на основе кабозантиниба, направленные на расщепление c-Met

Первая часть работы посвящена созданию конъюгатов PROTAC на основе кабозантиниба, направленных на расщепление белка c-Met.

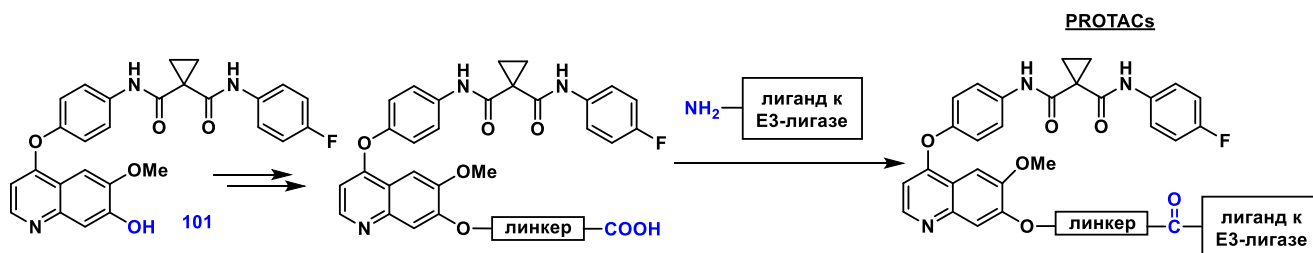
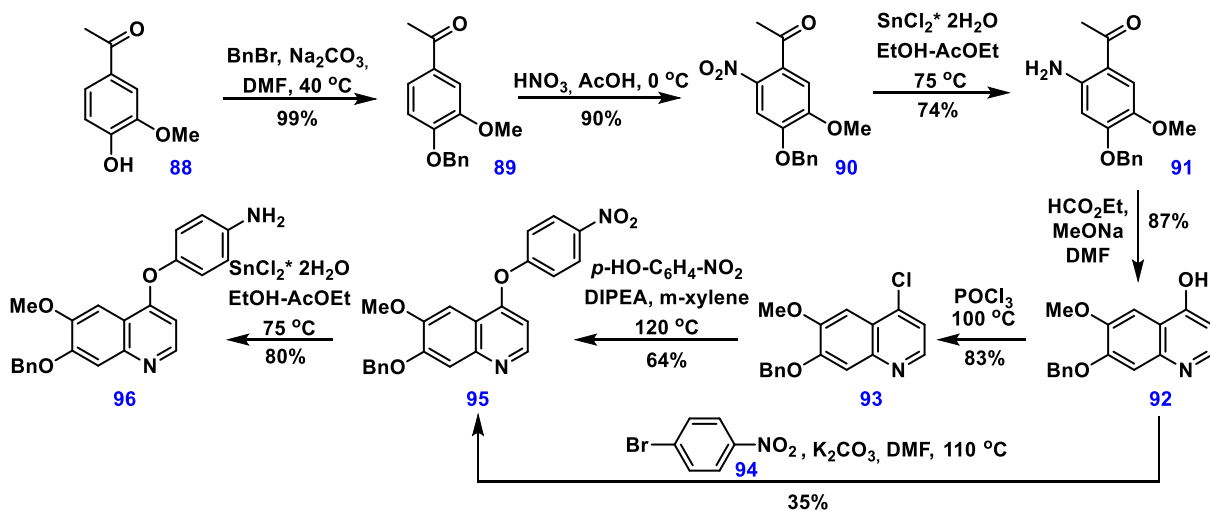


Схема 14. Упрощенная схема получения конъюгатов PROTAC на основе кабозантиниба

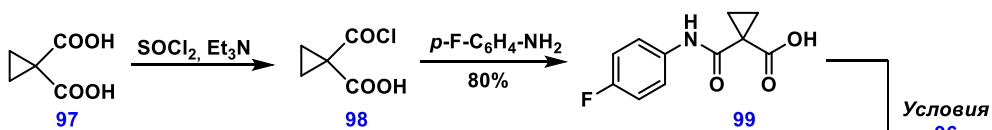
#### 1.1. Получение карбоксилатных производных кабозантиниба 104a-b, 106a-b, 112a-d

В качестве активного фрагмента, связывающегося с целевым белком c-Met, был использован деметилированный аналог кабозантиниба **101**, полученный по оптимизированной литературной методике [312] (Схема 15). Исходными соединениями служат коммерчески доступные 4-гидрокси-3-метоксиацетофенон **88** и 1,1-циклопропандикарбоновая кислота **97**. Основными промежуточными соединениями в синтезе являются производное хинолина **96**, содержащее фениламиноновый заместитель, а также производное пропандиовой кислоты **99**.

#### Синтез хинолинового фрагмента



#### Синтез фрагмента с циклопропановым кольцом



#### Синтез деметилированного производного 101

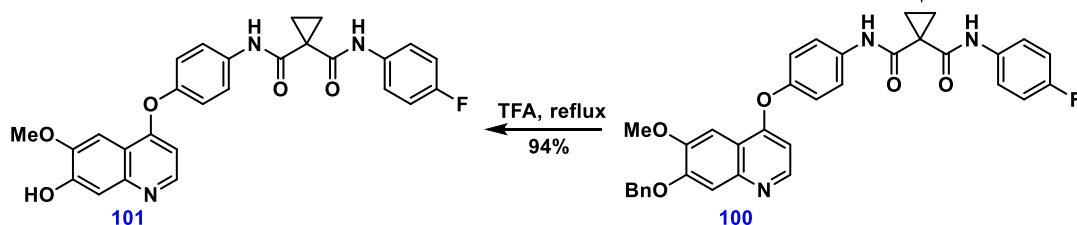


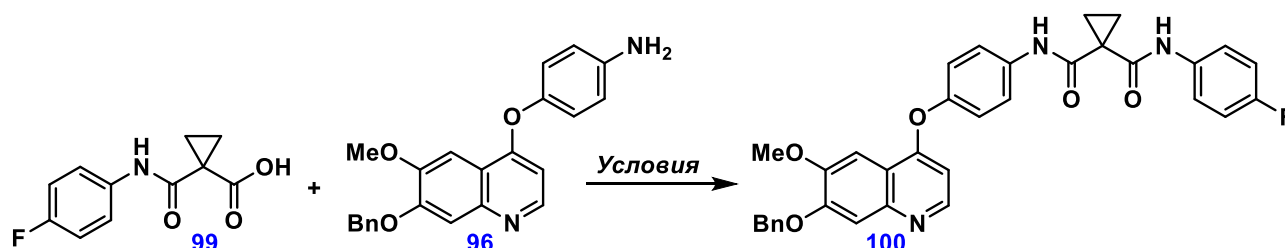
Схема 14. Синтез деметилированного аналога кабозантиниба 14

Была показана возможность сокращения синтетической схемы на одну стадию при проведении нуклеофильного замещения непосредственно между гидроксихинолином **92** и *p*-бромнитрофенолом (**94**), выход соединения **95** при этом составил 35%, что ниже суммарного выхода двухстадийного синтеза **95** (53%), включающего получение хлорхинолина **93** и его дальнейшую реакцию с *p*-нитрофенолом.

Для реакции амидирования между производным пропандиовой кислоты **99** и амином **96** были оптимизированы условия синтеза (Табл. 5). Методика проведения данной стадии, описанная в патенте, подразумевает получение промежуточного хлорангидрида исходя из кислоты **99** под действием тионилхлорида. Выход целевого продукта **100** при воспроизведении данных условий составил 36%, однако, его удалось повысить при использовании EDC·HCl в

качестве агента, активирующего исходную кислоту (44 %). Применение HATU позволяет увеличить выход целевого соединения **100** до 69%.

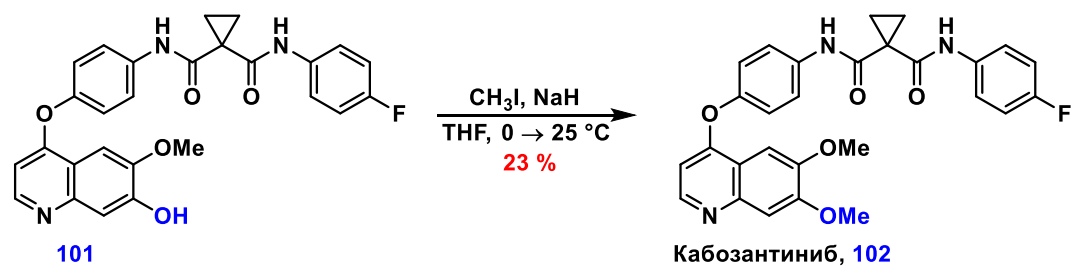
**Таблица 5.** Оптимизация получения производного **100** по реакции амидирования, исходя из кислоты **99** и амина **96**



№	Реагенты	Растворитель	T, °C	Выход 13, %
1	SOCl <sub>2</sub> , TEA	THF	0 → 25	36
2	EDC·HCl, DMAP, TEA,	DCM	0 → 25	44
3	HATU, DIPEA	DMF	25	69

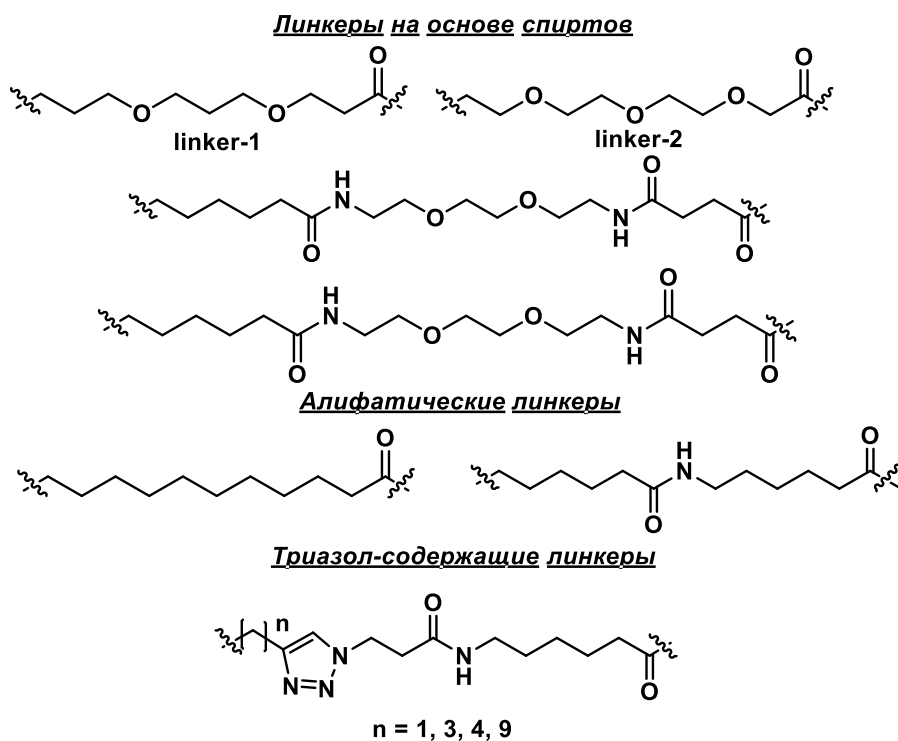
Последним этапом является удаление защитной бензильной группы в присутствии трифторуксусной кислоты с получением деметилированного производного кабозантиниба **101**. Суммарный выход целевого соединения **101**, полученного в 9 стадий, составил 16%. Деметилированное производное **101** содержит гидроксильную группу в положении «7» хинолинового ядра, и данный фрагмент был использован в качестве сайта для конъюгирования с линкером. На примере описанных ранее в литературе производных кабозантиниба [313] было показано, что его модификация в данном положении не оказывает существенного влияния на способность взаимодействовать с целевым белком. Также имеются литературные данные о создании PROTAC на основе структурного аналога кабозантиниба – форетиниба, где для сшивки с линкером также задействуется данная гидроксильная группа [314].

Кабозантиниб (**102**), используемый в качестве вещества сравнения при дальнейшем изучении биологической активности, был получен алкилированием деметилированного производного **101** MeI в присутствии NaN (Схема 16).



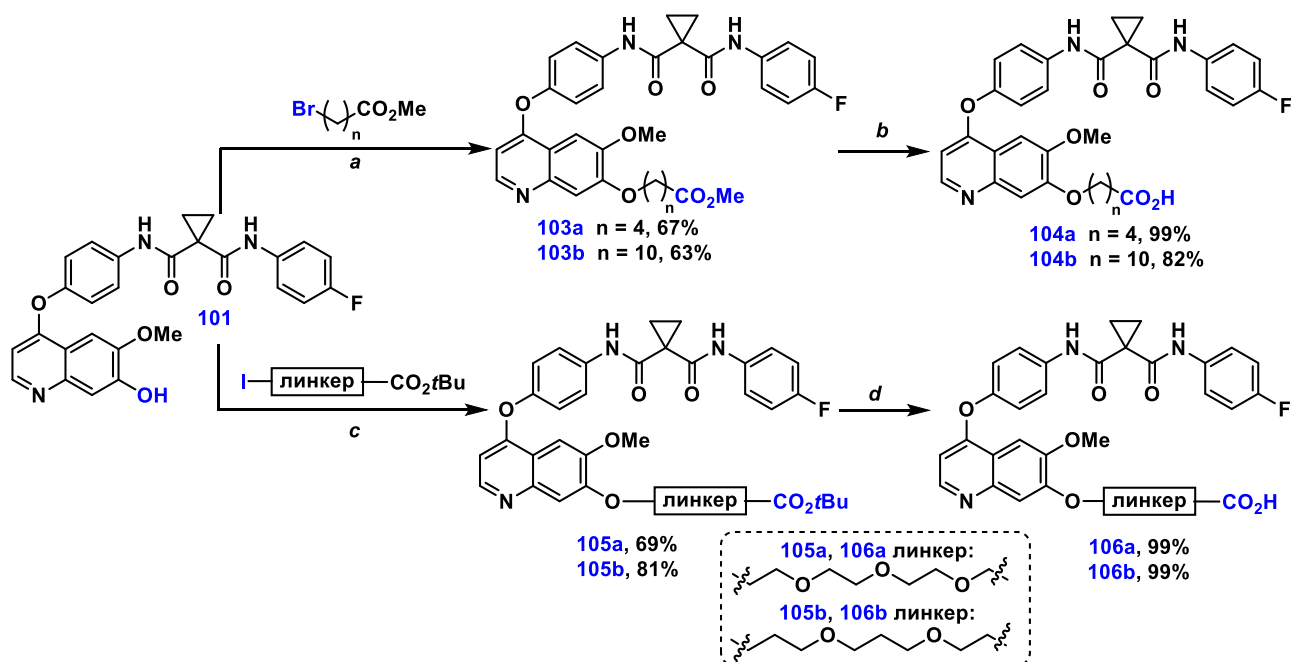
**Схема 16.** Получение кабозантиниба (**102**)

Структура и длина линкера оказывают важное влияние как на эффективность и селективность действия молекул PROTACs, так и на их фармакокинетические свойства. Поэтому нами было решено синтезировать конъюгаты с линкерами различной длины и структуры (**Рис. 30**). Так, были использованы не только линейные алифатические и полярные полиэтиленгликолевые линкеры, но и спейсеры, имеющие в своем составе триазольные циклы. Линкеры на основе 1,3-пропандиола и полиэтиленгликоля длиной в 11 атомов (**linker-1, 2, Рис. 30**) были выбраны, исходя из строения известных конъюгатов PROTAC, воздействующих на белок c-Met [314,315].



**Рисунок 30.** Линкерные фрагменты для создания PROTAC, нацеленных на белок c-Met

При получении карбоксилатных производных кабозантиниба были использованы два подхода. Первый из них предполагал алкилирование сложными эфирами галогензамещенных карбоновых кислот с последующим гидролизом сложноэфирной группы. Необходимые эфиры при этом были получены по литературным методикам из карбоновых кислот. Для синтеза производных **105a** и **105b** с линкерами на основе этиленгликоля и пропандиола-1,3 соответственно, были использованы *трет*-бутиловые эфиры  $\omega$ -йодзамещенных карбоновых кислот. Реакция алкилирования указанными эфирами соединения **101** по фенольному гидроксилу проходила в мягких условиях в присутствии  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  в качестве основания при комнатной температуре, с образованием целевых продуктов **105a** и **105b** с хорошими выходами (69-81%).



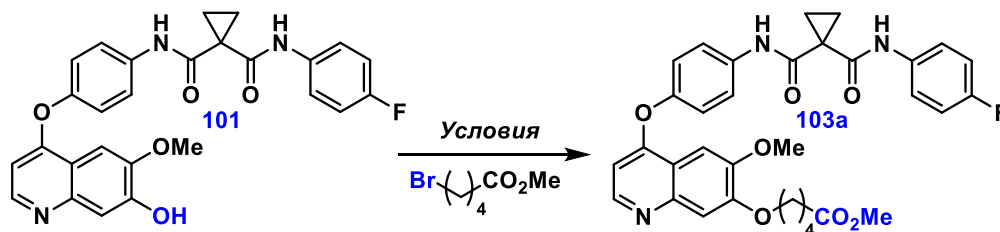
**Схема 17.** Синтез карбоксилатных производных кабозантиниба. Реагенты и условия:

a)  $\text{NaNH}$ , DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 65\text{ }^\circ\text{C}$ ; b)  $\text{NaOH}$ ,  $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$  (2:1),  $60\text{ }^\circ\text{C}$ ; c)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $65\text{ }^\circ\text{C}$ ; d) TFA, rt; e)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , DMF, rt; f) TBTA,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , AscNa,  $\text{DMF}-\text{H}_2\text{O}$  (1:1),  $55\text{ }^\circ\text{C}$ .

Алкилирование производного кабозантиниба **101** сложными эфирами  $\omega$ -бромзамещенных алифатических кислот, по описанным выше методикам не приводило к получению целевых продуктов и требовало оптимизации. Оптимизация условий синтеза производных **103a** и **103b** проводилась на примере алкилирования соединения **101** метиловым

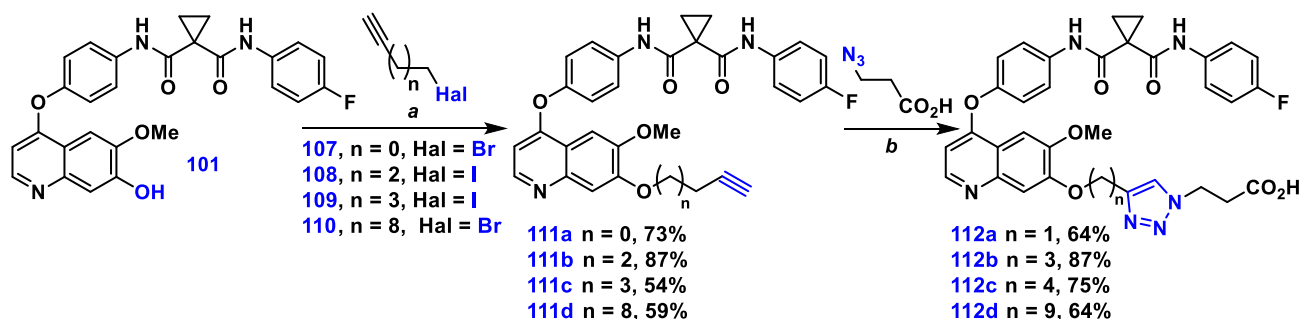
эфиром 5-бромвалериановой кислоты (**Табл. 6**). Установлено, что применение NaH в качестве основания в DMF при 65<sup>0</sup>C приводит к целевому продукту с **15a** с выходом 67% (**Табл. 6**, опыт 6).

**Таблица 6.** Подбор условий реакции производного кабозантиниба **101** с метиловым эфиром 5-бромвалериановой кислоты



№	Основание	Растворитель	T, °C	Выход 103a, %
1	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	25	18
2	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	80	20
3	NaH	THF	0 → 25	-
4		THF	0 → 65	-
5		Толуол	0 → 65	-
6		DMF	0 → 65	67

Для полученных соединений **103a-b**, **105a-b** проводили гидролиз сложноэфирных групп в щелочной (соединения **103a-b**) или в кислой среде (соединения **105a-b**) в случае метиловых и трет-бутиловых эфиров соответственно с получением карбоксилатных производных **104a-b**, **106a-b**. Второй синтетический подход включает алкилирование производного кабозантиниба **101** алкинилгалогенидами с терминальной тройной связью и последующую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) с 3-азидопропионовой кислотой с получением карбоксилатных производных **112a-d** (Схема 18).

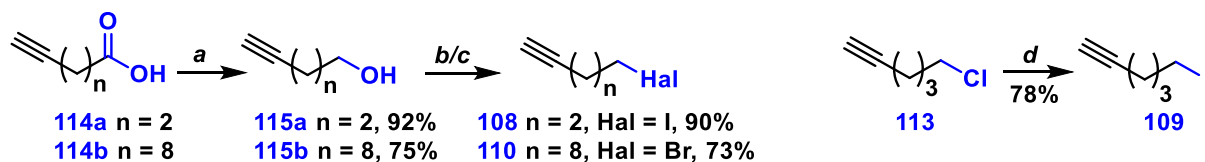


**Схема 18.** Синтез карбоксилатных производных кабозантиниба. Реагенты и условия:

*a)*  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , DMF, rt; *b)* TBTA,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , AscNa, DMF- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), 55 °C.

Модельной системой для подбора условий алкилирования послужила реакция пропаргилбромидом с соединением **101**, в качестве оснований были протестированы карбонаты щелочных металлов ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) в DMF или диоксане при различных температурах (25-65 °C). Установлено, что применение  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  в DMF при комнатной температуре, позволило синтезировать продукты **111a-d** с выходами 54-87 %.

Среди алкилирующих агентов были использованы коммерческий пропаргилбромид (**108**), 6-йодогексин-1 (**109**), который был получен из соответствующего хлорпроизводного (**113**), а также 5-йодопентин-1 (**108**) и 11-йодоундецин-1 (**110**), которые были синтезированы исходя из соответствующих алкиновых кислот в два этапа, включая восстановление кислот до спиртов с их последующим галогенированием (Схема 19).



**Схема 19.** Получение терминальных алкинилгалогенидов **108-110**. Реагенты и условия:

*a)*  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 0  $\rightarrow$  25 °C; *b)*  $\text{PPh}_3$ , имидазол,  $\text{I}_2$ , DCM, 0  $\rightarrow$  25 °C (для **108**); *c)*  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{PPh}_3$ , DCM, 25 °C (для **110**); *d)* NaI, ацетон, 50 °C.

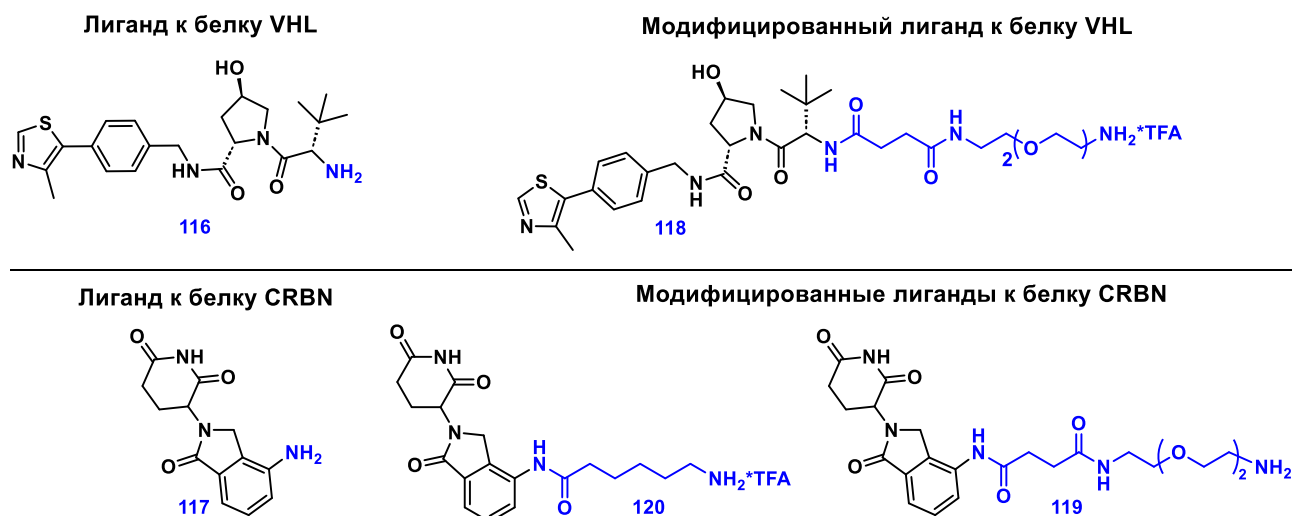
Таким образом, первые два типа соединений имеют в своем составе линейные фрагменты: алифатические линкеры (соединения **104a**, **104b**), либо линкеры на основе этиленгликоля и пропандиола-1,3 (соединения **106a**, **106b**). В соединениях третьего типа в состав линкера входит триазольный цикл (соединения **112a-d**). При этом, для установления влияния триазольного фрагмента на биологическую активность финальных конъюгатов, в

полученных соединениях триазол находится на различном расстоянии от активного фрагмента – кабозантиниба (Схема 18). В общей сложности было получено 8 производных кабозантиниба, содержащих карбоксильную группу, которые далее были использованы для конъюгирования со структурными блоками, содержащими лиганды для E3-лигаз.

## 1.2. Синтез молекул PROTACs 121a-d, 122a-b, 123a-d на основе кабозантиниба

При разработке противоопухолевых PROTAC-конъюгатов важно задействовать разные E3-убиквитинлигазы. Это обусловлено их вариабельной экспрессией в разных типах рака, различиями в субклеточном распределении и необходимостью обходить потенциальную резистентность, возникающую при таргетинге только одной лигазной системы [316].

В данной работе в качестве лигандов для E3-лигаз были использованы производные леналидомида (**117**) - соединения **119**, **120**, взаимодействующие с белком cereblon (CRBN), а также пептидомиметик **116** и его производное **118**, связывающиеся с белком фон Гиппеля-Линдау (VHL). При этом были использованы как сами лиганды **116** и **117**, так и их модифицированные производные (**118-120**), содержащие линкерные фрагменты. Данные соединения были получены на базе ФГБНУ "Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" (Рисунок 31).



**Рисунок 31.** Лиганды для E3-лигаз, использованные при сборке PROTACs.

Соединения **116**, **118-120**, содержащие аминогруппу, вводили в реакцию с карбоксилированными производными кабозантиниба **104a-b**, **106a-b**, **112a-d** в присутствии классических агентов пептидного синтеза, что привело к получению 10 целевых молекул PROTAC (Схема 20).

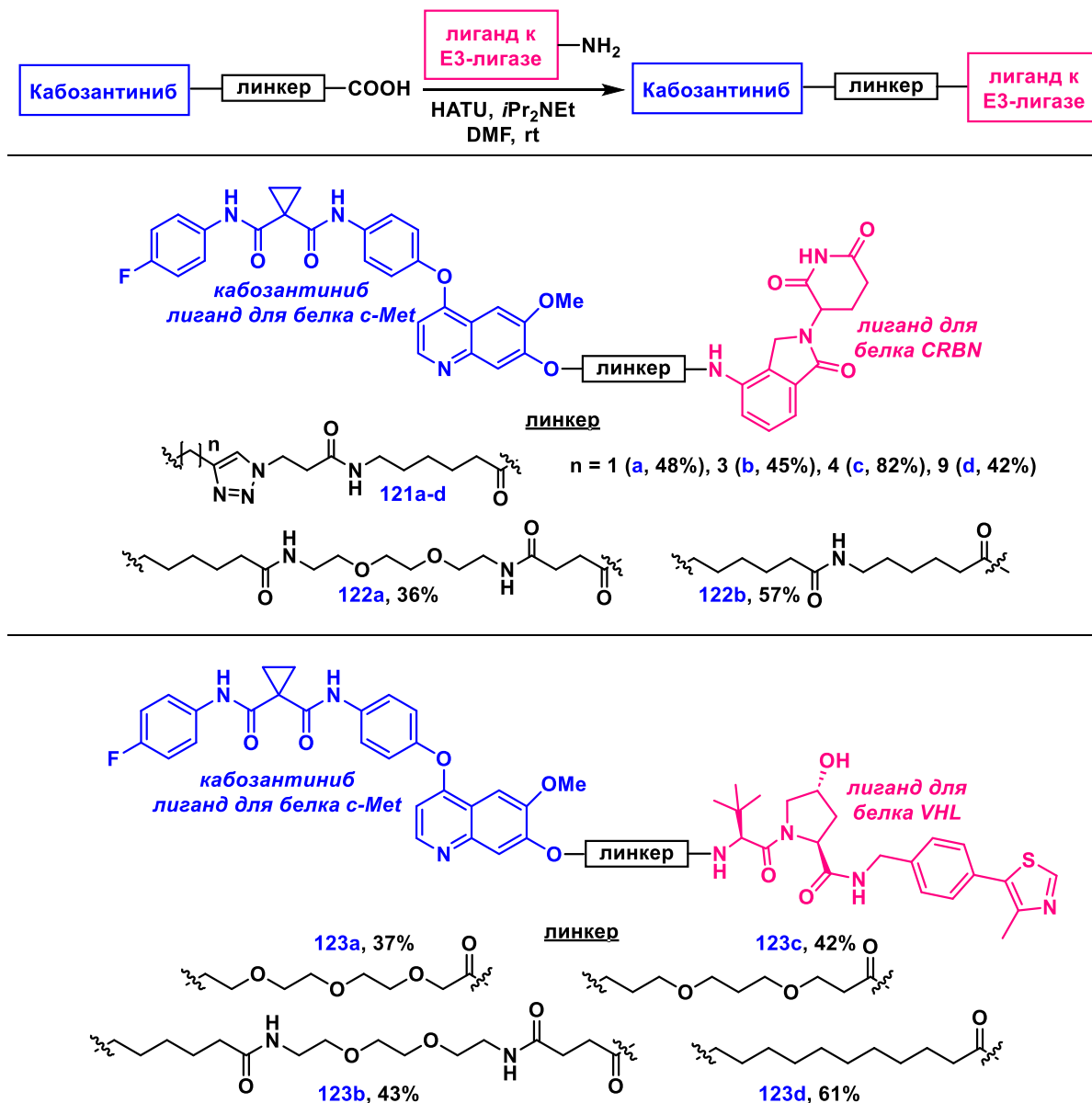


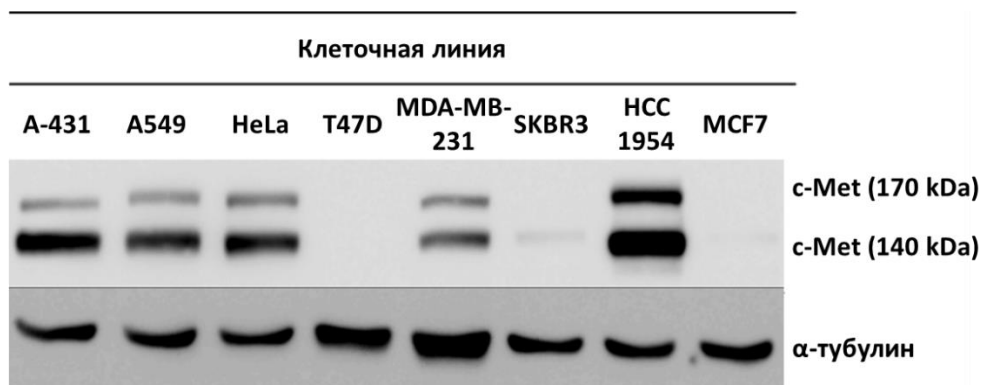
Схема 20. Синтез целевых молекул PROTAC, нацеленных на киназу c-Met.

Выходы целевых соединений составили 36 - 82%.

### 1.3. Изучение биологической активности молекул PROTAC 121a-d, 122a-b, 123a-d

Для изучения биологической активности PROTAC-конъюгатов, нацеленных на с-Met, было проведено два типа экспериментов. В начале было изучено влияние целевых соединений на рост клеток (антипролиферативная активность соединений). Затем, для оценки способности полученных конъюгатов к ингибированию и расщепления целевого белка отслеживали изменение уровня с-Met и его фосфорилированной формы методом вестерн блоттинга.

Таким образом, первым этапом биологических исследований стал подбор оптимальной клеточной модели для тестирования синтезированных конъюгатов. Анализ литературных данных выявил существенные расхождения в оценках уровня экспрессии с-Met в различных опухолевых клетках [317–322]. Был проведен систематический скрининг ряда опухолевых клеточных линий для достоверной оценки уровня экспрессии с-Met (**Рис. 32**).



**Рисунок 32.** Уровень экспрессии белка с-Met в разных клеточных линиях

Анализ проводили при помощи вестерн-блоттинга на линиях рака молочной железы (T47D, MDA-MB-231, SKBR3, HCC1954, MCF7), рака кожи (A-431), рака легких (A549) и рака шейки матки (HeLa). Наибольшая экспрессия с-Met была обнаружена в клетках HCC1954; для клеток MDA-MB-231, A-431, A549 и HeLa уровень экспрессии с-Met оказался ниже, однако в указанных клетках с-Met также хорошо визуализируется. В клеточных линиях MCF7, SKBR3 T47D были обнаружены лишь следовые количества целевой киназы.

В дальнейшем уровень экспрессии с-Met в конкретной клеточной линии учитывался при оценке антипролиферативной активности синтезированных конъюгатов (**121a-d, 122a-b,**

**123a-d**), кабозантиниба **102** и его деметилированного производного **101** с помощью МТТ-теста. Результаты представлены в **таблице 7**.

**Таблица 7.** Антипролиферативная активность целевых молекул PROTAC (значения IC<sub>50</sub> указаны в µМ)

	Клеточная линия (экспрессия c-Met)				
Соединение (тип линкера)	A-431 ++	T47D -	MCF7 -	HCC1954 +++	SKBR3 +/-
	PROTAC с лигандом для CRBN				
<b>121a</b> (триазольный)	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
<b>121b</b> (триазольный)	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
<b>121c</b> (триазольный)	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
<b>121d</b> (триазольный)	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
<b>122a</b> (ПЭГ и амидные группы)	12.3	8.2	19.4	> 25	> 25
<b>122b</b> (алифатический с амидными группами)	> 25	3.8	> 25	> 25	> 25
	PROTAC с лигандом для VHL				
<b>123a</b> (ПЭГ-линкер)	> 25	6.1	28.1	5.7	>25
<b>123b</b> (ПЭГ и амидные группы)	> 25	14.2	> 25	9.1	> 25
<b>123c</b> (1,3-пропандиол)	> 25	> 25	>50	6.7	10.8
<b>123d</b> (алифатический)	> 25	> 25	>50	20.3	>25
	Референсные соединения				
<b>101</b> (CabOH)	20.6	7.2	14.8	9.8	22.6
<b>Кабозантиниб (102, CabOMe)</b>	11.2	4.4	9.0	8.7	18.1

Все соединения серии **121** с триазольным фрагментом в составе линкера не проявили активности по отношению к выбранным клеточным линиям вне зависимости от расположения триазольного фрагмента. Конъюгаты **123b** и **122a**, имеющие спейсеры с гликольным фрагментом, как и соединение **123d**, имеющее неполярный алифатический линкер, проявили несколько большую активность в сравнении с триазол-содержащей серией. Наибольшую антипролиферативную активность продемонстрировали соединения **123a** и **123c**, содержащие

линкеры на основе этиленгликоля и 1,3-пропандиола соответственно. Для связывания с ЕЗ-лигазой в их структуре присутствует лиганд к белку фон Гиппеля-Линдау. Соединения **123a** и **123c** продемонстрировали избирательное антипролиферативное действие – они значительно подавляли рост с-Met-позитивных клеток HCC1954, в то время как их влияние на с-Met-негативные клетки MCF7 было существенно слабее. Таким образом, соединения **123a** и **123c** оказались лидерами и были выбраны для дальнейшего исследования биологической активности.

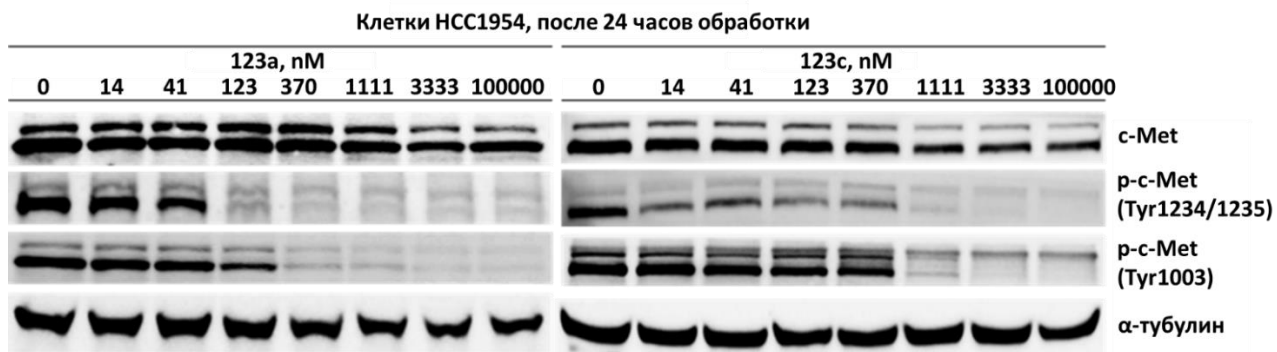
Стоит отдельно отметить активность кабозантиниба в клетках T47D, не экспрессирующих с-Met. При этом, определенная в данной работе активность кабозантиниба совпадает с описанной в литературе [322]. Аналогичным образом, деметилованный аналог кабозантиниба **101** и конъюгаты **122a-b** и **123a-b** также были активны в отношении с-Met-отрицательных клеток рака молочной железы T47D. Это делает поиск новых мишеней для кабозантиниба в с-Met/VEGFRs/KIT-отрицательных клетках перспективной задачей.

Далее исследовали взаимодействие выбранных соединений с белком с-Met и его фосфорилированной формой. Для этого клетки HCC1954 обрабатывали соединениями **123a** и **123c** в диапазоне концентраций 14-10000 нМ. Воздействие на экспрессию и активацию с-Met оценивали с помощью вестерн-блоттинга, определяя общий уровень белка и уровень его фосфорилирования по остаткам Tyr1003 и Tyr1234/1235 (**Рис. 33**).

Рецептор с-Met состоит из нескольких частей: участка, прилегающего к клеточной мембране киназного домена и С-концевого сайта связывания [323,324]. В участке у мембраны аминокислота Tyr1003 взаимодействует с белком с-Cbl, что приводит к разрушению с-Met [325,326]. Это важный механизм контроля активности рецептора.

Авторами [325] установлено, что при замене Tyr1003, например, на фенилаланин, с-Met становится способен вызывать раковое перерождение клеток. Важны и два других остатка тирозина в киназном домене - Tyr1234 и Tyr1235. Когда они подвергаются фосфорилированию, структура с-Met меняется, и его киназная активность резко возрастает. Именно поэтому эти два тирозина также были выбраны для дальнейшего изучения.

Нами показано, что соединения **123a** и **123c** ингибируют фосфорилирование аминокислоты Tyr1003 в с-Met при концентрациях 0,1–0,3 мкМ (**Рис. 33**). В присутствии соединения **123c** уже при концентрациях 10–20 нМ наблюдалось ингибирование фосфорилирования Tyr1234/1235, а случае **123a** такого же эффекта удастся добиться при концентрациях ~100 нМ.



**Рисунок 33.** Изменение уровня фосфорилирования белка c-Met и его общей экспрессии под действием соединений **123a** и **123c**

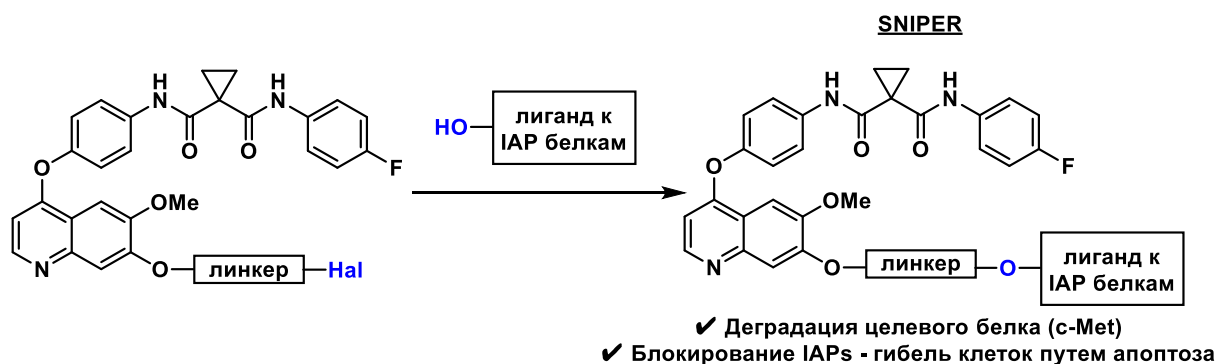
Проведенные исследования показали, что конъюгаты **123a** и **123c**, являясь эффективными ингибиторами фосфорилирования белка c-Met в наномолярных концентрациях, не вызывают его расщепления, т.е. не выполняют функции PROTAC-деградеров.

Существует несколько возможных причин, из-за которых расщепления белка не происходит. Одна из них – нарушение формирования тройного комплекса «c-Met-PROTAC-Е3-лигаза», несмотря на связывание PROTAC с белковой мишенью. Для проверки данной гипотезы требуется провести дополнительные тесты, выявляющие способность лигаз взаимодействовать с целевыми соединениями. Кроме того, причина отсутствия деградации белка может заключаться в особенностях убиквитинирования самого c-Met [327–329]. Как было отмечено ранее (раздел 1, стр. 17), формирование полиубиквитиновой цепи — не единственный возможный вариант убиквитинирования белка. В частности, можно предположить моноубиквитинирование c-Met, не приводящее к его расщеплению, либо его иные убиквитиновые модификации.

Структуры полученных молекул могут быть в дальнейшем оптимизированы для получения PROTAC-конъюгатов с большей активностью относительно c-Met. Одними из возможных модификаций могут быть дальнейший подбор линкера и изменение лиганда для Е3-лигазы.

## 2. Молекулы SNIPERs на основе кабозантиниба

Наряду с классическими молекулами PROTAC, в данной работе были получены соединения нового поколения, которые в качестве E3-лигаз задействуют белки-ингибиторы апоптоза (IAP) (**Рис. 34**). Такие конъюгаты носят название SNIPER (Specific and Non-genetic IAP-dependent Protein ERaser) и позволяют не только расщеплять патогенные белки, но и вызывать гибель опухолевых клеток, запуская апоптоз [243], что дополнительно повышает эффективность терапии.



**Рисунок 34.** Общая схема синтеза конъюгатов SNIPER

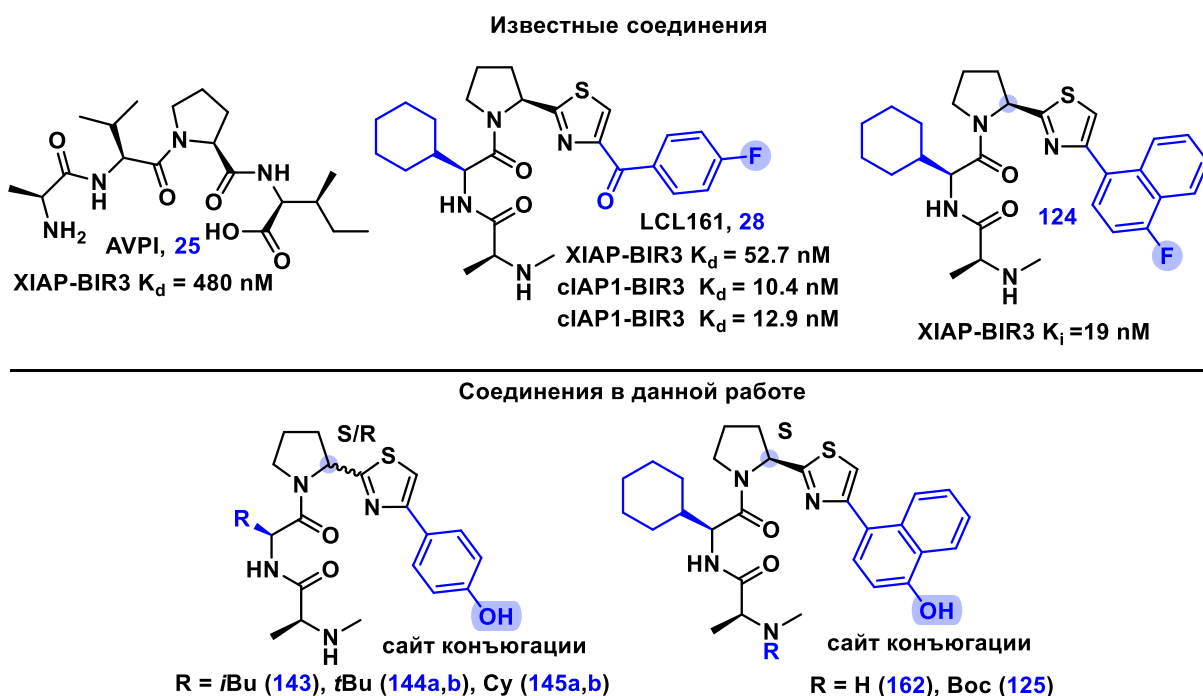
При выборе лигандов для связывания с белками-ингибиторами апоптоза, были проанализированы структуры уже существующих молекул SNIPERs и ингибиторов IAP. Как было показано ранее, SMAC-пептидомиметики — это один из основных классов антагонистов IAP [68,82] (раздел 2.1.1.1, стр. 27). Прототипом для SMAC-миметиков стал тетрапептид AVPI (**25**, **Рис. 10**, стр. 28) [77,330]. Также мы обратили внимание на соединение LCL161, полученное при оптимизации AVPI, и его производные.

Было выявлено несколько ключевых особенностей строения таких соединений [77]:

(а) Наличие неполярного гидрофобного заместителя необходимо для совмещения с гидрофобным участком в IAP. Такими фрагментами могут быть изопропил (*i*Pr), изобутильная (*i*Bu), *трет*-бутильная (*t*Bu), или циклогексильная группа (Cy) [77];

(б) В лигандах LCL161 и **124** присутствие тиазольного фрагмента обуславливает взаимодействие с остатком глицина (Gly312) в составе пептидомиметика BIR-домена [331];

(в) Пролиновый фрагмент обеспечивает лиганду не только достаточную конформационную жесткость, но и формирует ван-дер-ваальсовы взаимодействия с аминокислотными остатками Trp323-Tyr324 [77].



**Рисунок 35.** Лиганды для белков IAP, использованные в текущей работе

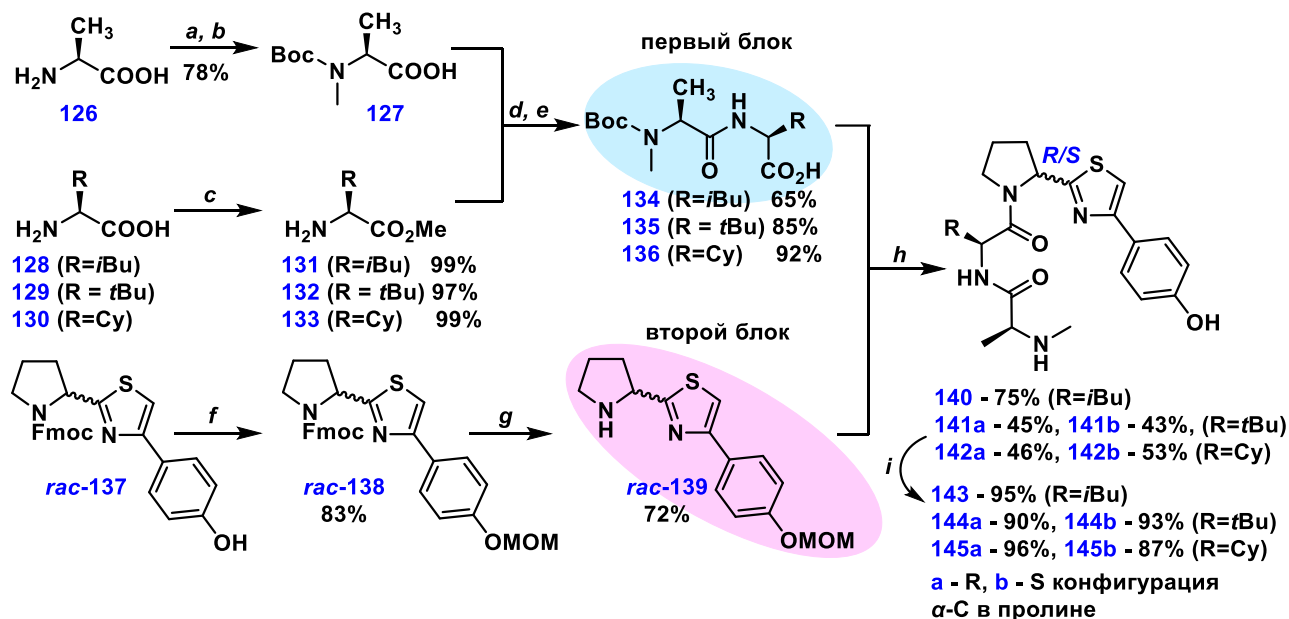
Соединения LCL161 и **124** нашли применение в дизайне конъюгатов SNIPER. При этом их конъюгацию с остальной частью молекулы деградера осуществляют через функциональные группы в ароматических фрагментах (например, через гидроксильные группы, которые вводят вместо атомов фтора) [332–334].

Учитывая описанные выше закономерности «структура – активность», характерные для лигандов к белкам IAP, за основу были выбраны соединения LCL161 [335] и его аналог **124**, не содержащий карбонильной группы [336]. При этом наряду с циклогексилом (соединения **145a, b**), выступающим в качестве неполярного гидрофобного заместителя, были использованы также *трет*-бутильный (**144a, b**) и изобутильный (**143**) фрагменты. Также был получен лиганд **162**, представляющий аналог известного соединения **125** [332,333]. Во всех случаях вместо фтора в ароматическом кольце вводили гидроксильные группы, чтобы использовать их как сайты конъюгирования с линкером.

## 2.2. Синтез лигандов для белков ингибиторов апоптоза (IAP) **125**, **143**, **144a-b**, **145a-b**, **162**

Получение лигандов проводилось исходя из двух синтетических блоков (Схема 21). В качестве первого блока использовались дипептиды **134–136**, содержащие остаток *N*-Me-L-аланина и другой аминокислоты с объемным алифатическим заместителем. Исходными соединениями послужили  $\alpha$ -аминокислоты L-ряда (L-изолейцин (**128**), L-*трет*-лейцин (**129**) и

L-циклогексилглицин (**130**)). Их метиловые эфиры, полученные по литературным методикам из соответствующих кислот [337], вступали в реакцию пептидного синтеза с Вос-*N*-Метил-L-аланином **127** [338]. Последующий гидролиз в щелочной среде позволил получить дипептиды **134-136**, содержащие свободную карбоксильную группу, с выходами 65-92%.



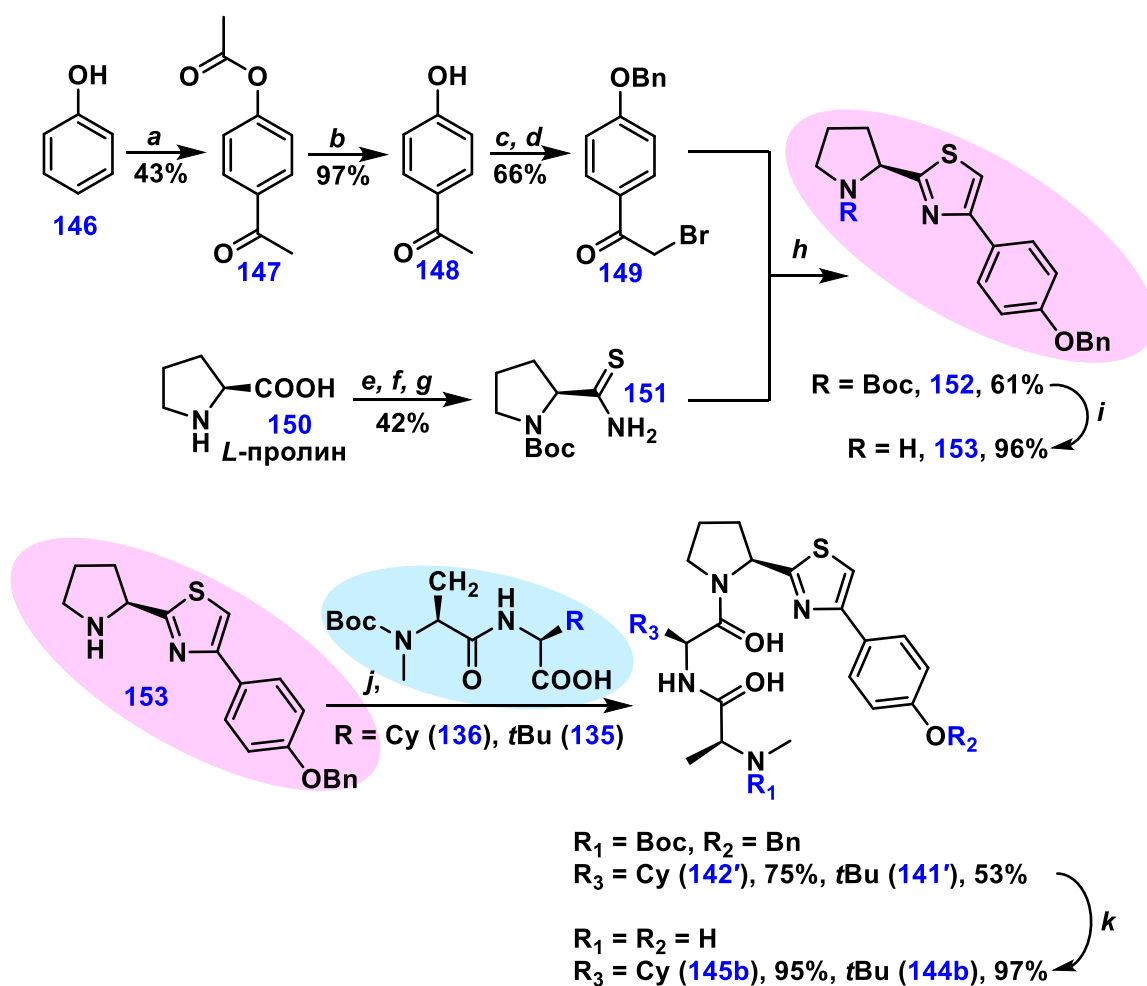
**Схема 21.** Синтез IAP-лигандов. Реагенты и условия: a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , NaOH, THF- $\text{H}_2\text{O}$ , rt; b)  $\text{CH}_3\text{I}$ , NaH, THF, 0 °C; c)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH, 60 °C, d) HATU, DIPEA, DMF, rt; e) NaOH, MeOH -  $\text{H}_2\text{O}$ ; f) MOMCl, DIPEA, DCM, 0→rt; g) Пирролидин, 10% in DMF, rt; h) HATU, DIPEA, DMF; i) TFA, DCM, rt.

В качестве второго блока были использованы производные пролина с арилзамещенным тиазолом, которые могут быть получены двумя способами. Первый подход описан на **схеме 21**. В качестве стартового соединения использовался коммерчески доступный рацемический арилтиазол **rac-137**. На первом этапе в соединение **rac-137** была введена защитная MOM-группа, являющаяся ортогональной для уже имеющегося в соединении *Fmoc*-фрагмента. Удаление *Fmoc*-защитной группы позволило синтезировать строительный блок **rac-139** с выходом 72%. Его конъюгирование с полученными ранее дипептидами **134-136** в присутствии HATU приводило к трипептидам **140-142** с выходами 43-75%. На последнем этапе было проведено удаление защитных MOM и *Boc*-групп действием трифторуксусной кислоты в DCM, что позволило получить целевые лиганды **143-145** с высокими выходами. При этом лиганды с *трет*-бутильным (**144a**, **144b**) и циклогексильным (**145a**, **145b**) заместителями удалось

получить в виде индивидуальных диастереомеров. Лиганд **143**, содержащий изобутильный заместитель, был получен в виде диастереомерной смеси с соотношением 1:1.

К сожалению, реакция амидирования между производным пролина **rac-139** и дипептидами **134-136** не обладает хорошей воспроизводимостью (**Схема 21**, этап h). Выходы целевых продуктов (каждого диастереомера в отдельности) при этом могут варьироваться от 15 до 53 %. Причины в сложности разделения образующихся стереоизомеров, отличающихся конфигурацией асимметрического атома углерода в пролиновом фрагменте. В ряде случаев наблюдалась эпимеризация с образованием продуктов преимущественно с S-конфигурацией указанного атома. В частности, наблюдалось изменение соотношения стереоизомеров от 1:1 до 1:3 для производных с циклогексильным заместителем, что возможно, связано с увеличением времени реакции и зависит от скорости смешивания реагентов. Подробно механизм не был исследован. Как отмечается в литературе, эпимеризация характерна для пролиновых производных [339], что может осложнять проведение пептидного синтеза [340]. Было решено исследовать альтернативные методы получения пролин-содержащего блока, исключающие необходимость дальнейшего разделения стереоизомеров.

Второй подход к синтезу структурного блока на основе пролина (соединение **153**) был основан на литературных методиках [341] и представлен на **схеме 22**.



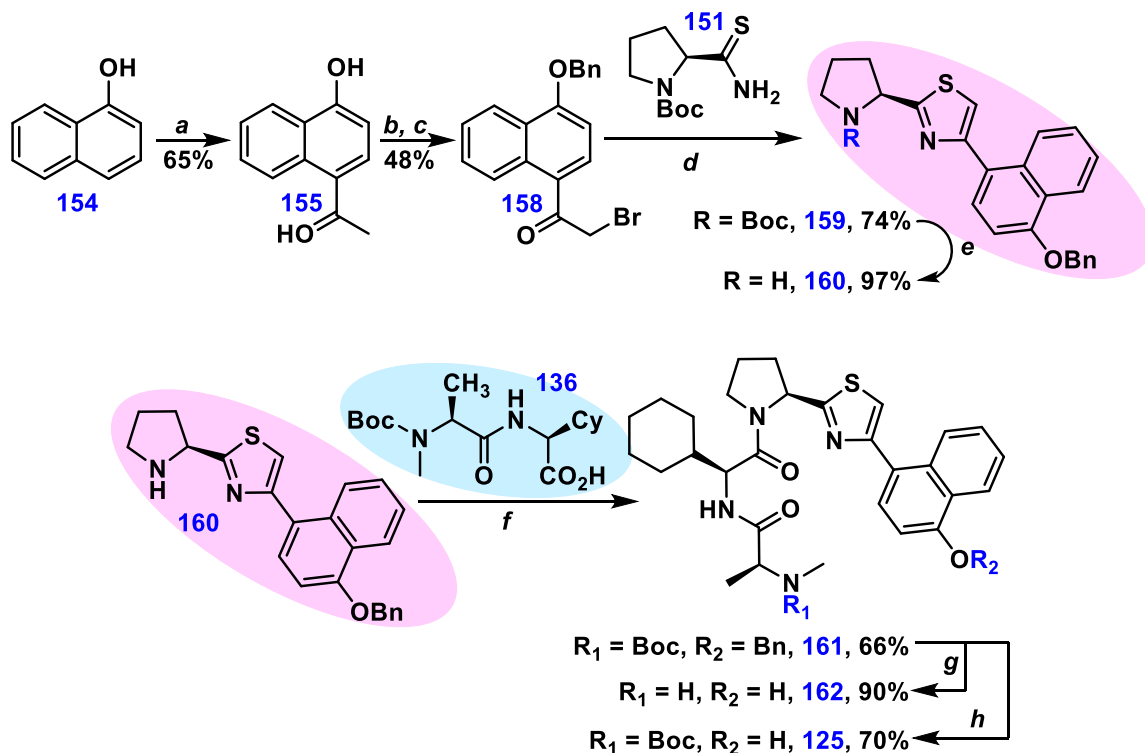
**Схема 22.** Синтез IAP-лигандов **144b**, **145b** в виде чистых стереоизомеров. Реагенты и условия: а)  $\text{AcCl}$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{DCM}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ ; б)  $\text{AcONa}$ ,  $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ ,  $100\text{ }^\circ\text{C}$ ; в)  $\text{BnBr}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{rt}$ ; г)  $\text{NBS}$ ,  $p\text{TSA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeCN}$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ; е)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{THF}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ ; ж) этилхлорформиат,  $\text{TEA}$ ,  $\text{THF}$ ,  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $-10\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ ; з)  $\text{THF}$ ,  $\text{Ar}$ ,  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , реагент Лавессона (2,4-Бис-(4-метоксифенил)-1,3,2,4-дитиадифосфетан-2,4-дисульфид); и)  $\text{Py}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ; л)  $\text{TFA}$ ,  $\text{DCM}$ ,  $\text{reflux}$ ; м)  $\text{HATU}$ ,  $\text{DIPEA}$ ,  $\text{DMF}$ ; н)  $\text{TFA}$ ,  $\text{reflux}$ .

Для синтеза пролин-содержащего интермедиата **153**, фенол **146** в две стадии был превращен в 4-гидроксиацетофенон **147**. В дальнейшем, введение бензильной защитной группы и реакция бромирования позволили получить  $\alpha$ -бромкетон **149** с выходом 66%. Конденсация бром-производного **149** с тиамидом *N*-Вос-замещенного пролина **151**, полученного из *L*-пролина в три стадии [342–344], приводит к тиазолу **152** с выходом 61%.

После удаления Вос-защитной группы, тиазол-замещенный пролин **153** вступал в реакцию амидирования с дипептидами **135**, **136**, что приводило к получению двух трипептидов

**141b** и **142b** с выходами 53 и 75% соответственно. И, наконец, удаление бензильной и Boc защитных групп при кипячении в трифторуксусной кислоте позволило получить целевые лиганды **144b-145b** в виде индивидуальных стереоизомеров с выходами, близкими к количественным.

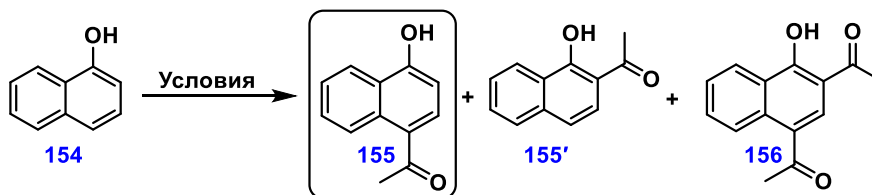
Аналогичным образом были получены лиганды **125** и **162** с нафталиновым фрагментом (Схема 23).



**Схема 23.** Синтез IAP-лигандов **125**, **161**, **162**. Реагенты и условия: *a*) AcCl, AlCl<sub>3</sub>, MeNO<sub>2</sub>, rt; *b*) BnBr, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, rt; *c*) NBS, MeCN, pTSA, reflux; *d*) Py, EtOH, 80 °C; *e*) TFA, DCM, rt; *f*) HATU, DIPEA, DMF; *g*) TFA, DCM, reflux; *h*) Pd/C 10%, H<sub>2</sub>.

Некоторые стадии **схемы 23** требовали оптимизации. В начале проводился подбор условий для ацилирования  $\alpha$ -нафтола в *para*-положение при помощи ацетилхлорида (**Табл. 8**). Попытки провести реакцию в системе ZnCl<sub>2</sub> (1,05 эквив.) / AcCl (1,1 эквив.) в нитрометане (MeNO<sub>2</sub>) по литературной методике [39] оказались неудачными, так как образования целевого продукта **155** не наблюдалось (**Табл. 8**, опыт 1). При этом увеличение количества эквивалентов как хлорида цинка, так и ацетилхлорида, не повлияло на результат реакции (**Табл. 8**, опыты 2-3).

**Таблица 8.** Оптимизация синтеза 4-ацето-1-гидроксинафталина (**155**) из альфа-нафтола (**154**)



№	Кислота Льюиса, эквив.	AcCl, эквив.	Растворитель	Результат
1	ZnCl <sub>2</sub> , 1,05	1,1	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	Реакция не идет**
2	ZnCl <sub>2</sub> , 1,05	3	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	Реакция не идет**
3	ZnCl <sub>2</sub> , 2	3	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	Реакция не идет**
4	AlCl <sub>3</sub> , 2	1,1	DCM	Реакция не идет**
5	AlCl <sub>3</sub> , 1.5-2	1,1	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	Смесь <b>154</b> , <b>155</b> и <b>155'</b> *
6	AlCl <sub>3</sub> , 2	2-3	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	Смесь <b>155</b> и <b>155'</b> *
7	AlCl <sub>3</sub> , 3	6	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	<b>155</b> (15%) и <b>156</b> (40%)
8	AlCl <sub>3</sub> , 3	2	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	<b>155</b> (65%)

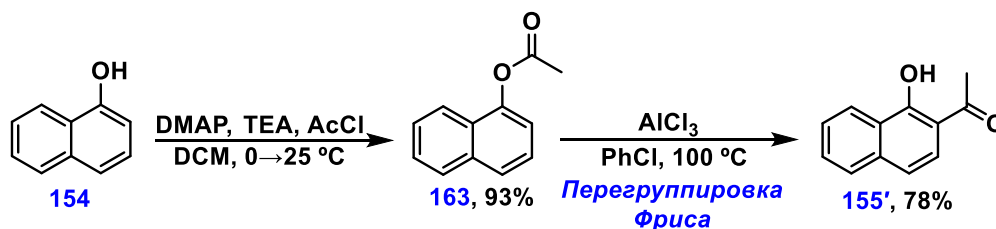
Все указанные реакции проводились при температуре 0→25 °С в инертной атмосфере.

\*Образование продуктов фиксировали по ТСХ без последующего выделения.

\*\*По ТСХ было зафиксировано только исходное соединение **154**.

Наряду с хлоридом цинка (ZnCl<sub>2</sub>), в качестве кислоты Льюиса был использован хлорид алюминия (AlCl<sub>3</sub>) (табл. 1., опыты 4-8). При недостатке AcCl (1,1 эквив.) (Табл. 8, опыт 5) исходный нафтол **154** не реагирует полностью, однако, слишком большой избыток AcCl (6 эквив.) приводит к образованию преимущественно диацелированного производного **156** (Табл. 8, опыт 7). Наибольший выход целевого продукта **155** (65%) был достигнут при использовании 2 эквивалентов AcCl в присутствии 3 эквивалентов AlCl<sub>3</sub> в CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (Табл. 8, опыт 8).

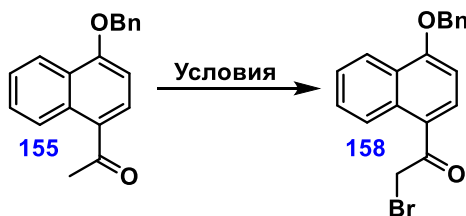
В качестве альтернативного подхода к синтезу пара-ацелированного производного был опробован метод, включающий перегруппировку Фриса. Однако, нагревание *O*-ацетил-нафтола (**163**) в присутствии хлорида алюминия приводит не к целевому *para*-изомеру (**155**), а к образованию *орто*-продукта (**155'**).



**Схема 24.** Проведение перегруппировки Фриса с *O*-ацетилнафтолом **163**

Для стадии получения бром-производного **158** из ацетилированного производного **155** также проводили скрининг условий. В начале реакцию проводили в соответствии с приведенной в литературе методикой при использовании 1.2 эквивалентов брома в дихлорметане (Табл. 9, опыт 1) [345]. Однако, в данном случае образования целевого продукта **158** зафиксировано не было. Увеличение количества брома до 3 эквивалентов не дало желаемого результата (Табл. 9, опыт 2), как и использование системы Br<sub>2</sub> (1,2 экв) / AcOH (Табл. 9, опыт 3). Во всех случаях по ТСХ фиксировали смесь продуктов, что может быть связано как с протеканием реакции по ароматическому кольцу, так и со склонностью производных нафталина к окислению.

**Таблица 9.** Оптимизация синтеза 1-бензилокси-4-бромацетонафталина (**158**) из 4-ацето-1-бензилоксинафталина (**155**)



№	T, °C	Реагенты (эквив.)		Растворитель	Выход целевого продукта <b>158</b> , %
1	0→25	Br <sub>2</sub> (от 1,2 до 3)		DCM	—*
2	0→25	Br <sub>2</sub> (1,2)		AcOH	—*
3	80	NBS (1,1)	AIBN (0,2)	CCl <sub>4</sub>	—*
4	25	NBS (1,2)	pTSA·H <sub>2</sub> O (1)	CH <sub>3</sub> CN	—*
5	50	NBS (1,2)	pTSA·H <sub>2</sub> O (1)	CH <sub>3</sub> CN	25
6	80	NBS (1,2)	pTSA·H <sub>2</sub> O (1)	CH <sub>3</sub> CN	60

\*По ТСХ не было зафиксировано образования продукта **158**.

Для получения бромпроизводного **158** также использовали *N*-бромсукцинимид (NBS) (Табл. 9, опыты 3-6). В условиях радикального бромирования в присутствии инициатора 2,2-азобисизобутиронитрила (AIBN) (Табл. 9, опыт 3) не наблюдалось образования целевого продукта **158**.

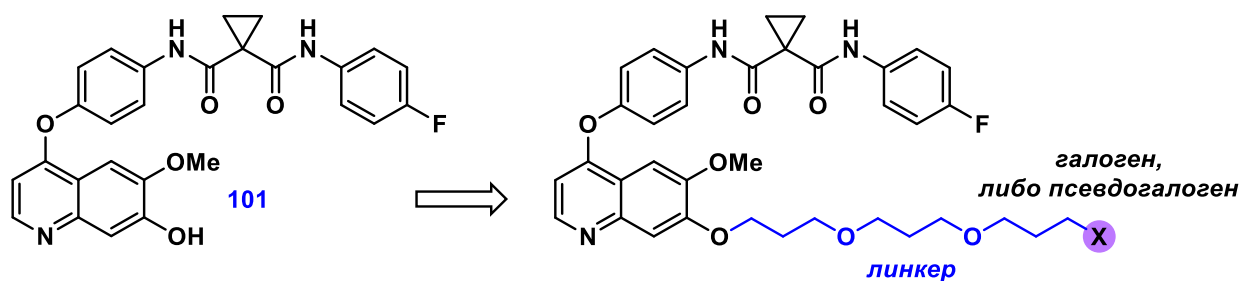
Использование в качестве добавки пара-толуолсульфокислоты (pTSA) в ацетонитриле при комнатной температуре также оказалось безуспешно. Было установлено, что температура реакции является критическим параметром: её повышение до 50 °C позволило получить продукт **158** с выходом 25% (Табл. 9, опыт 5). При дальнейшем повышении температуры до 80 °C и медленном добавлении NBS в ацетонитриле удалось увеличить выход целевого продукта до 60% (Табл. 9, опыт 6). Оптимальным по результатам скрининга стало использование системы NBS (1.2 эквив.) / pTSA·H<sub>2</sub>O (1 эквив.) в CH<sub>3</sub>CN при 80 °C (Табл. 9, опыт 6).

Таким образом, для использования в качестве лигандов белков-ингибиторов апоптоза, были синтезированы пептидомиметики – структурные аналоги описанного в литературе соединения LCL161 (**28**, Рис. 35, стр. 85), содержащие различные гидрофобные заместители. Были получены новые соединения, имеющие в своем составе как фенильный (**143**, **144a-b**, **145a-b**, Схема 22, стр. 88), так и нафталиновый (**162**, Схема 23, стр. 89) фрагменты. Гидроксильная группа при этом выступает центром конъюгирования с галогенсодержащими производными кабозантиниба.

## 2.1. Синтез алкилированных производных кабозантиниба 169-172

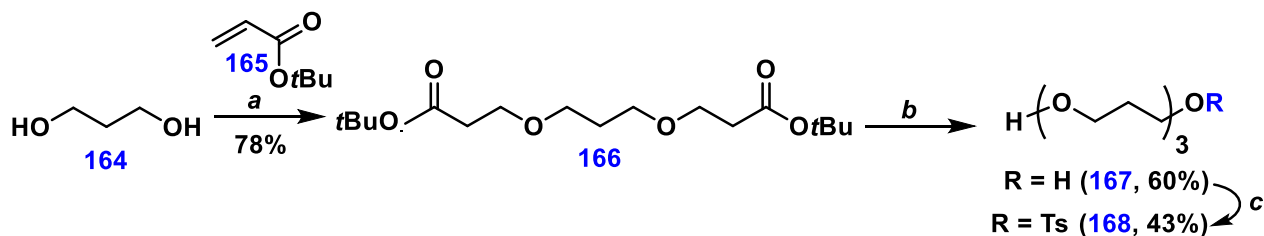
Для синтеза кабозантиниб-содержащего блока было использовано полученное ранее деметилированное производное кабозантиниба **101**. Наличие свободной гидроксильной группы в структуре лигандов к IAP-белкам (**143-145**, **162**) определило стратегию синтеза кабозантиниб-содержащих блоков в виде производных с уходящими группами (галогены или псевдогалогены), для последующего алкилирования указанных лигандов (Схема 25).

С учетом результатов, полученных на предыдущем этапе работы [346], а также литературных данных, в качестве линкера был использован фрагмент на основе 1,3-пропандиола длиной 11 атомов ввиду оптимального баланса гибкости и полярности. В литературе описано использование данного линкера в составе молекул, успешно расщепляющих белок c-Met [314,315].



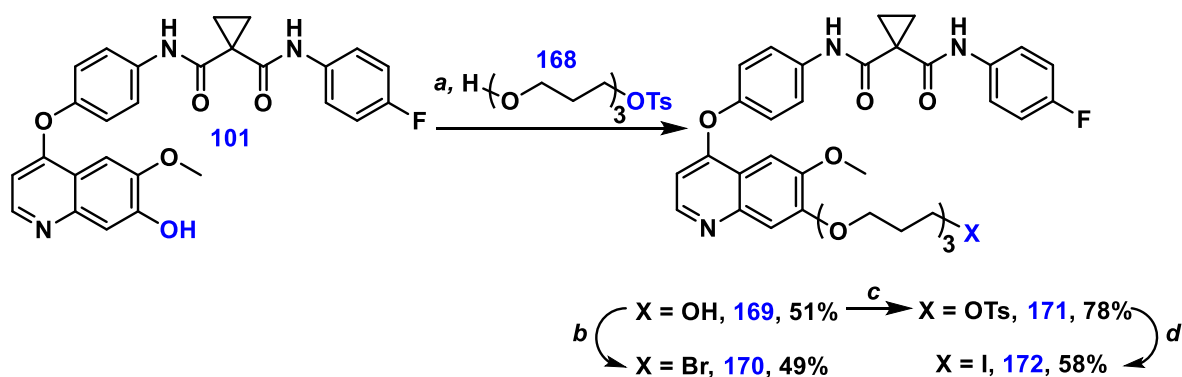
**Схема 25.** Общая схема получения галогенсодержащих производных кабозантиниба для дальнейшей конъюгации с IAP-лигандами в виде спиртов.

Соединение **168**, использованное для алкилирования деметилированного аналога кабозантиниба **101**, было получено исходя из 1,3-пропандиола и *трет*-бутилакрилата (Схема 26). Продуктом реакции Михаэля между указанными субстратами в присутствии гидроксида бензилтриметиламмония (triton-B) в качестве основания стал сложный эфир **166**, который далее подвергли восстановлению при помощи  $\text{LiAlH}_4$  до диола **167**. Монотозилирование диола **167** привело к желаемому продукту **168**.



**Схема 26.** Получение линкера **168** на основе пропандиола-1,3. Реагенты и условия: *a*) triton-B, MeCN, 25°C *b*)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 0 → 25 °C *c*) TsCl,  $\text{Ag}_2\text{O}$ , KI, DCM

Алкилирование деметилированного аналога кабозантиниба **101** при помощи линкера **168** позволило получить промежуточное производное **169** (выход 51%). Данное соединение было использовано в качестве субстрата в реакциях Аппеля или нуклеофильного замещения для синтеза конечных продуктов – бромида **170**, йодида **172** и тозилата **171** (Схема 27).

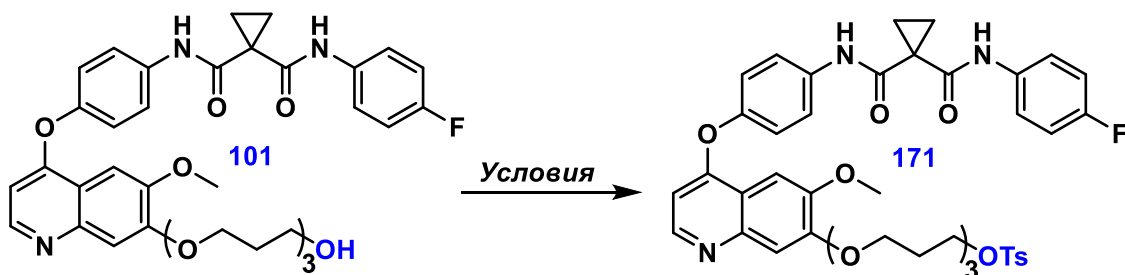


**Схема 27.** Получение алкилированных производных кабозантина.

Реагенты и условия: *a)* Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 25 °C *b)* CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, DCM, 0 → 25 °C *c)* TsCl, TEA, DMAP, DCM, reflux *d)* NaI, DMF, 90 °C.

Нами была проведена оптимизация условий получения тозилатного производного **171** (Табл. 10). Наибольший выход продукта (78%) был достигнут при кипячении с использованием смеси оснований (TEA, DMAP), при этом по ТСХ не наблюдалось исходного соединения.

**Таблица 10.** Подбор условий реакции получения производного **171**.



№	Основание, эквив.	T, °C	TsCl, эквив.	Выход 171, %
1	TEA, 3	0 → 25	1.2	20
2	TEA, 3	0 → 25	3	23
3	TEA, 3	40	3	45
5	DMAP (0.5)	40	3	47
6	TEA (3), DMAP (0.5)	40	3	78

В качестве растворителя во всех указанных реакциях был использован дихлорметан.

При получении йодпроизводного **172** реакция нуклеофильного замещения между **171** и йодидом натрия изначально проводилась в более мягких условиях - в ацетоне при нагревании

до 56 °С. Однако, в таком случае наблюдалась неполная конверсия исходного тозилата даже при увеличении числа эквивалентов NaI от 10 до 20 и проведении реакции в течение двух суток. Было решено изменить условия: в качестве растворителя был использован DMF, что позволило увеличить температуру до 90 °С и достичь удовлетворительного выхода целевого йодида **172** (58%).

### 2.3. Получение финальных молекул SNIPERs **173a-b**, **174a-b**, **175**, **177**

Для получения целевых молекул SNIPER было проведено алкилирование производными кабозантиниба (**170-172**) IAP-лигандов (**143-145**) по фенольному фрагменту (Схема 28). В результате было получено четыре диастереомерно чистых конъюгата SNIPER (**173a**, **173b**, **174a**, **174b**) и один конъюгат в виде смеси диастереомеров (**175**). Аналогичный подход был использован при получении нафталин-содержащего конъюгата **177** (Схема 28), синтез которого более подробно описан ниже.

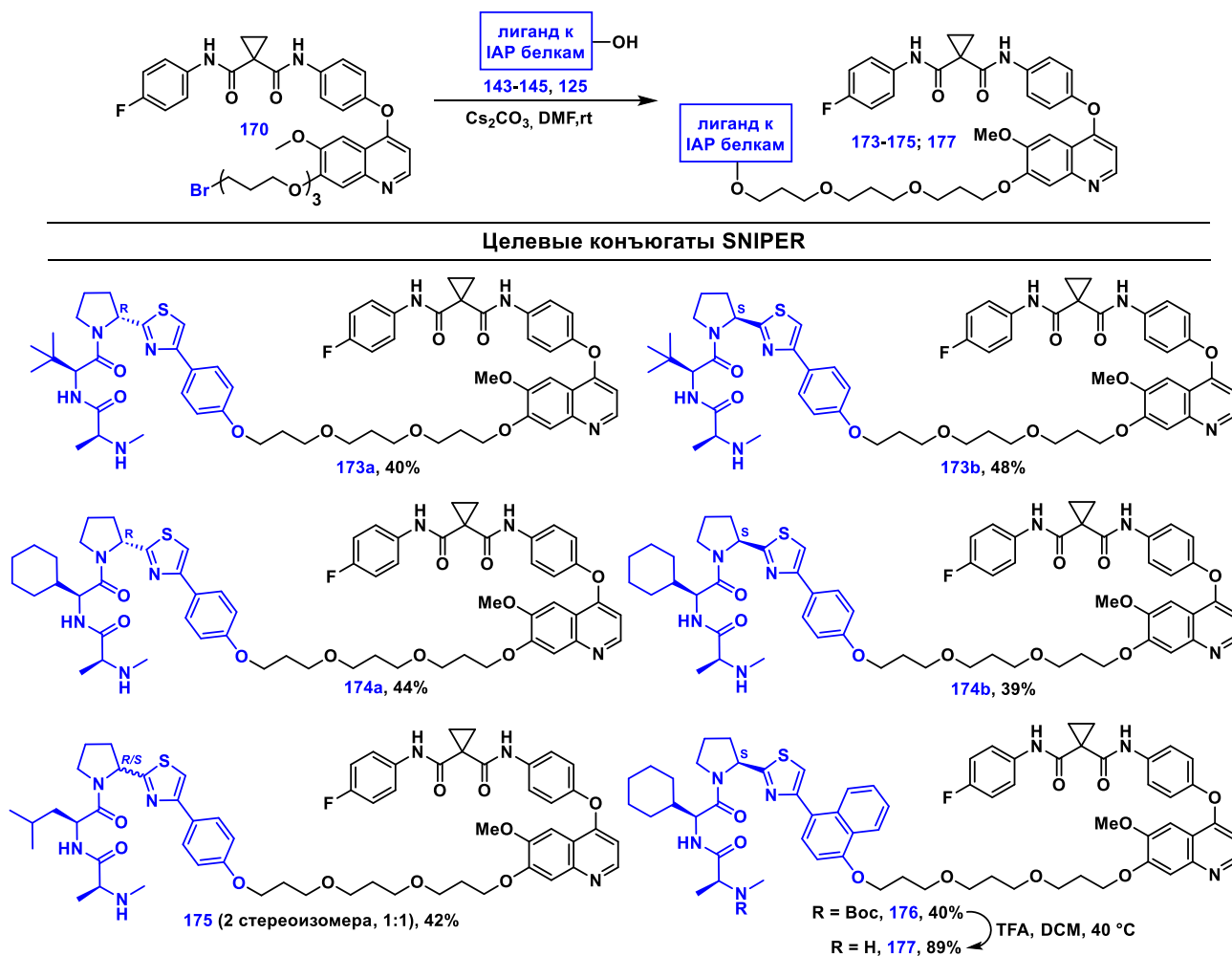
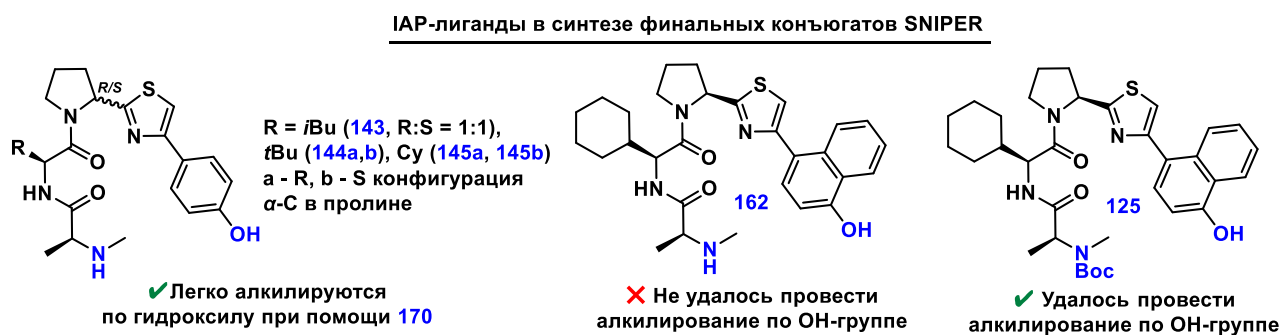


Схема 28. Получение целевых молекул SNIPERs

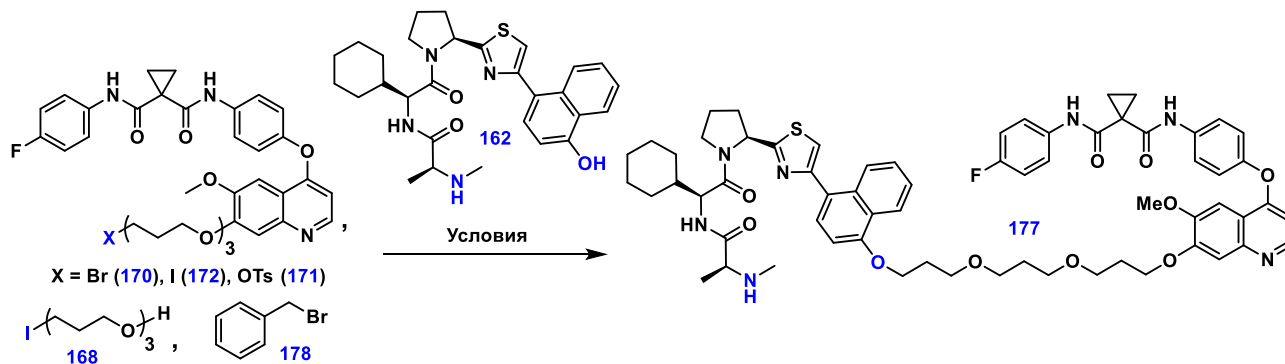
Для получения конъюгатов **173-175** с фенольными фрагментами использованы IAP-лиганды, не содержащие защитных групп в фрагменте *N*-метилаланина, при этом реакция алкилирования по спиртовой группе проходит в достаточно мягких условиях с применением  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  в качестве основания в DMF при комнатной температуре. Такой подход упрощает синтез самих лигандов – на последнем этапе (Схема 22, стр. 88) в кислотной среде в одну стадию удаляются защитные группы *Boc* и *Bn* с терминальных amino- и спиртового фрагментов соответственно. Существенным плюсом использования таких лигандов является возможность получать целевые конъюгаты SNIPER в одну стадию без необходимости удаления *Boc*-защитной группы. Однако, для полученного нами лиганда **162** на основе нафтола провести подобную реакцию не удалось (Рис. 36).



**Рисунок 36.** Реакционная способность IAP-лигандов

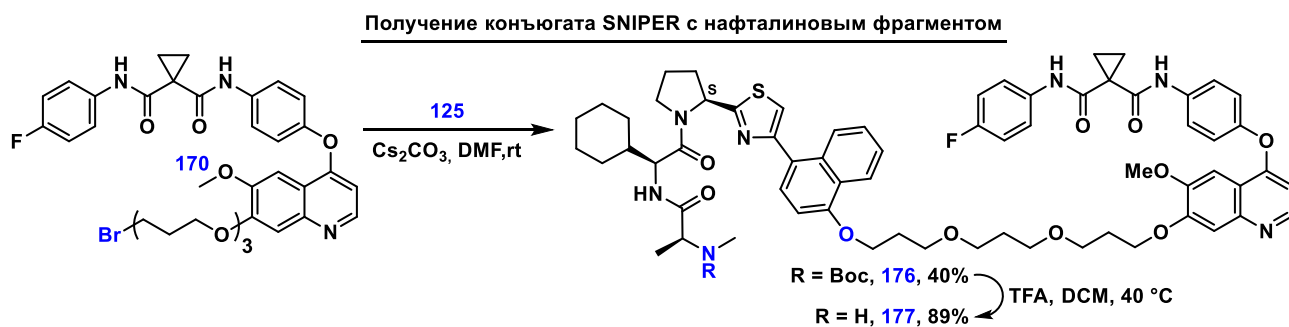
Для алкилирования IAP-лиганда **162** был проведен скрининг условий реакции. В качестве алкилирующего агента, или кабозантиниб-содержащего блока, при этом был использован не только бромид **170**, но и йодид **172**, а также тозилат **171**. В качестве оснований были использованы карбонаты щелочных металлов ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) а также гидрид натрия (NaH) (Табл. 11). Температура и растворитель также варьировались. При нагревании в ряде случаев субстраты **170-172** распадались до исходного спирта **169**. Попытки использовать бензилбромид **178**, либо линкер **168** в качестве алкилирующих агентов, также оказались неудачными.

Таблица 11. Подбор условий реакции алкилирования IAP-лиганда **162**



№	Субстрат, эквив.	Основание, эквив.	Растворитель	T, °C	Продукт O-алкилирования
1	<b>170</b> (X = Br), 1.2	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 4	DMF	25 → 80	-
2	<b>171</b> (X = OTs), 1.2	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 3	DMF	25	-
3	<b>171</b> (X = OTs), 1.2	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 4	DMF	80	-
5	<b>172</b> (X = I), 1.2	$\text{K}_2\text{CO}_3$ , 3	DMF	25 → 80	-
6	<b>172</b> (X = I), 1.2	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 3	DMF	25 → 80	-
7	<b>168</b> , 1.5	NaN, 3	THF	0 → 25	-
8	BnBr ( <b>178</b> ), 1.5	$\text{K}_2\text{CO}_3$ , 3	DMF	25	-

Падение реакционной способности нафтол-содержащего субстрата **162** в реакции *O*-алкилирования, в отличие от его фенольных аналогов (**143-145**), а также последующее её восстановление при защите *N*-концевой аминогруппы, позволяют предположить, что ключевую роль играет образование внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода аминогруппы и карбонильным кислородом пептидной цепи. Эта связь, по-видимому, стабилизирует конформацию, в которой объемный нафталиновый фрагмент экранирует гидроксильную группу, создавая непреодолимые стерические препятствия для атаки электрофила. Введение защитной *N*-Вос-группы (IAP-лиганд **125**) устраняет вышеупомянутые взаимодействия, делая нафтоловый кислород вновь доступным для алкилирования.



**Схема 29.** Получение конъюгата SNIPER **177** на основе нафталинового IAP-лиганда **125**.

В связи с этим, синтез финального конъюгата **177** был проведён в две стадии, включающие алкилирование литературного IAP-лиганда **125** при помощи производного кабозантиниба **170** и дальнейшее удаление *Boc*-защитной группы (Схема 29).

#### 2.4. Исследование биологической активности IAP-лигандов **143**, **144a-b**, **145a-b** и молекул SNIPER **173a-b**, **174a-b**, **175**, **177**

Для синтезированных IAP-лигандов **143-145** и молекул SNIPER **173-175**, **177** была определена антипролиферативная активность, изучено их влияние на клеточный цикл, в том числе способность увеличивать долю апоптотических клеток, а также были исследованы взаимодействия конъюгатов с целевым белком c-Met и его фосфорилированной формой методом вестерн блотт. В качестве соединений сравнения были использованы кабозантиниб (**102**) и его деметилированное производное **101**.

На первом этапе для полученных IAP-лигандов **143-145**, конъюгатов SNIPER **173-175**, а также для кабозантиниба (**102**) и его деметилированного производного **101** была определена антипролиферативная активность по отношению к нескольким клеточными линиям, включая линии рака молочной железы (SkBr-3), Т-клеточного лейкоза (Jurkat), хронического миелолейкоза (K562), глиобластомы (A172) и эндотелиальные клетки EA.hy926 (Таблица 12).

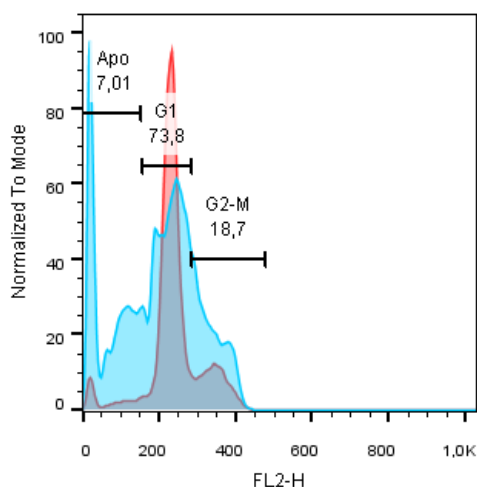
**Таблица 12.** Антипролиферативная активность IAP-лигандов **143-145**,  
и конъюгатов SNIPER **173-175**, IC<sub>50</sub>, μM

Клеточная линия	EA.hy926	Jurkat	K562	A172	SkBr-3
<b>143</b>	-*	25	25	13	64
<b>144a</b>	-*	25	25	50	50
<b>144b</b>	-*	25	100	200	100
<b>145a</b>	-*	25	25	13	50
<b>145b</b>	-*	13	13	3	5
<b>101</b>	12	-*	-*	24	50
<b>175</b>	3	-*	-*	3	3
<b>173a</b>	12	-*	-*	12	1
<b>173b</b>	3	-*	-*	2	1
<b>174a</b>	6	-*	-*	6	6
<b>174b</b>	3	-*	-*	3	1
<b>Кабозантиниб</b>	25	-*	-*	25	25

\*- не определяли

Антипролиферативная активность всех исследуемых соединений находится в микромолярном диапазоне концентраций, однако токсичность IAP-лигандов **143-145** примерно на 1.5-2 порядка ниже аналогичной величины для соответствующих конъюгатов SNIPER **173-175**. Кабозантиниб и его деметилированное производное **101** при этом имеют на 1 порядок меньшую токсичность относительно большинства молекул SNIPER. Не было обнаружено зависимости между активностью конъюгата и конфигурацией стереоцентра в IAP-лиганде. При этом антипролиферативная активность конъюгатов SNIPER в большей степени определяется наличием кабозантиниба, в то время как присутствие IAP-лиганда играет вспомогательную роль.

Было протестировано влияние самого активного из IAP-лигандов – соединения **145b** на клеточный цикл на клетках HaCaT (**Рис. 37**).



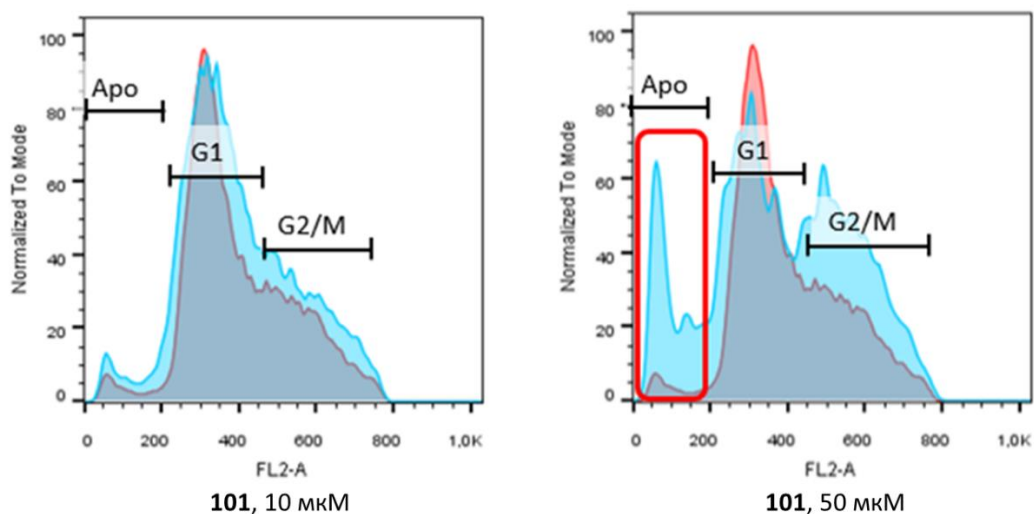
	Апоптоз	G1	G2/M
Контроль	7	74	19
145b	37	43	19

**Рисунок 37.** Влияние IAP-лиганда **145b** на клеточный цикл. Красный цвет -контрольные клетки HaCaT, синий - клетки HaCaT, инкубированные с 25 мкМ соединения **145b**.

Показано, что инкубирование пептидомиметика **145b** в концентрации 25 мкМ с клетками HaCaT<sup>23</sup> приводит к увеличению популяции апоптотических клеток (37%) по сравнению с контрольным образцом (7%). Это происходит главным образом за счет снижения доли клеток в фазе G1, в то время как количество клеток на стадии G2/M остается прежним.

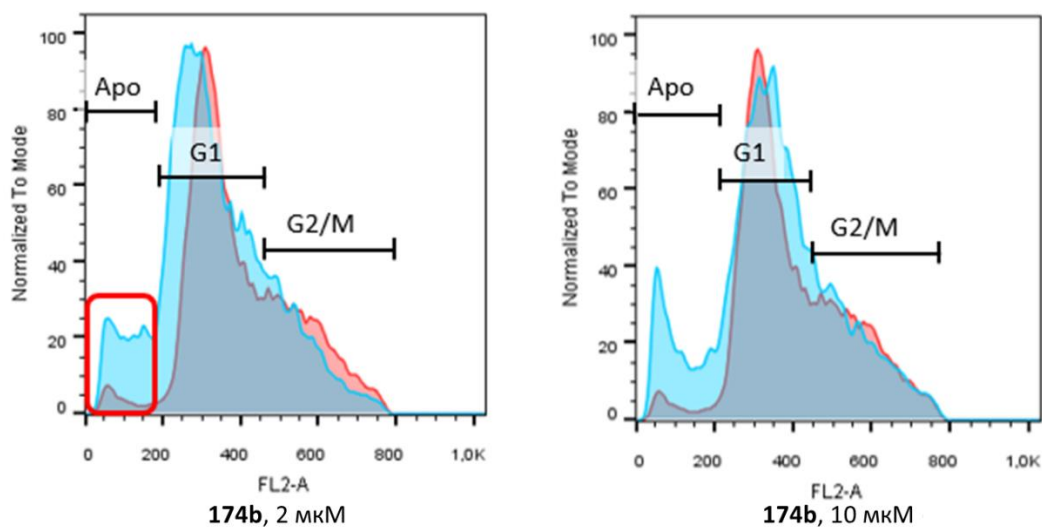
Деметилированное производное кабозантиниба **101** (**Рис. 38**) при концентрации 50 мкМ индуцирует апоптоз в HaCaT клетках, при этом происходит накопление клеток в G2/M, что приводит к остановке их деления. Подобный эффект характерен для ингибиторов тирозинкиназ, в частности для самого кабозантиниба [347] и близкого к нему по структуре и свойствам форетиниба [348]. Более низкие концентрации терапевтического агента не оказывают влияние на клеточный цикл.

<sup>23</sup> Клетки HaCaT (Human immortalized keratinocytes) представляют собой нераковые immortalized (или получившие способность к бесконечному делению) кератиноциты человека.



**Рисунок 38.** Влияние соединения **101** на клеточный цикл. Красный цвет – контрольные клетки HaCaT, голубой – клетки HaCaT, инкубированные 10 и 50 мкМ **101**

При изучении клеточного цикла на клетках HaCaT в присутствии молекулы SNIPER **70a**, уже при концентрации 2 мкМ наблюдалось увеличение доли апоптотических клеток.

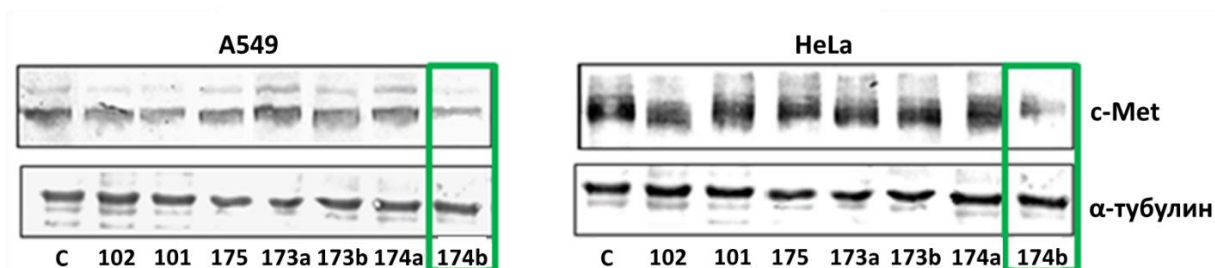


**Рисунок 39.** Влияние соединения **174b** на клеточный цикл. Красный цвет – контрольные клетки HaCaT, голубой – клетки HaCaT, инкубированные 2 и 10 мкМ **174b**

Принимая во внимание, что индивидуальное деметилированное производное кабозантиниба **101** вызывает увеличение доли апоптотических клеток при более высоких концентрациях (50 мкМ), в случае конъюгата SNIPER подобный эффект достигается при более

низких концентрациях (2 мкМ) за счет наличия IAP-лиганда в его составе и блокирования действия белков-ингибиторов апоптоза (IAP).

Способность конъюгатов **173-175** расщеплять белок с-Met тестировали с применением метода вестерн-блот на клетках A549 и HeLa (**Рис. 40.**). Установлено, что конъюгат **174b** расщепляет с-Met в концентрации 1 мМ. К сожалению, остальные протестированные молекулы (**173-175**) не индуцируют расщепление белка при концентрации в 1 мМ [349].



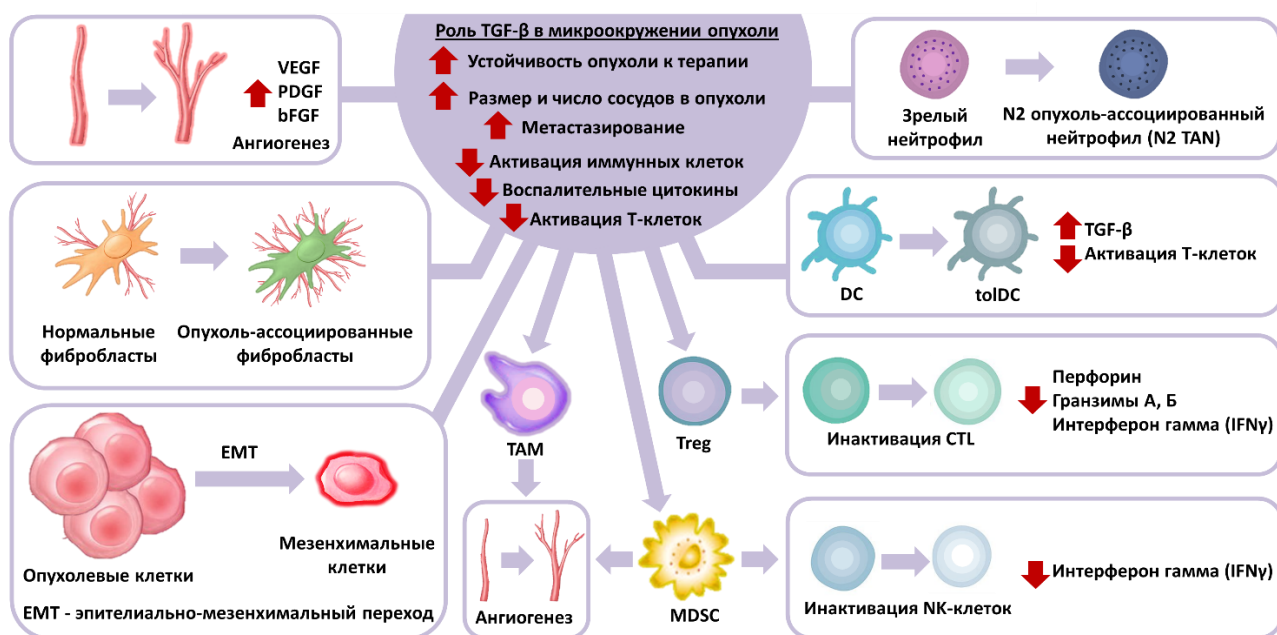
**Рисунок 40.** Влияние полученных молекул SNIPER **173-175** на целевой белок с-Met в клетках A549 и HeLa. **C** – контроль, **102** – кабозантиниб, **101** – деметилированное производное кабозантиниба.

В дальнейшем для соединения-лидера **174b** планируется провести серию экспериментов: с использованием различных клеточных линий; в присутствии ингибитора протеасом с целью подтвердить протеасомальный механизм деградации с-Met; при различных концентрациях активного соединения **174b**.

### 3. Потенциальные ингибиторы белка ALK5

#### 3.1. Выбор структуры потенциальных ингибиторов

Трансформирующий ростовой фактор  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) является новой мишенью противоопухолевой терапии. Белок TGF- $\beta$  имеет двойственную роль в онкогенезе - на ранних стадиях он является опухолевым супрессором, а на поздних активно участвует в развитии раковых клеток (**Схема 30**). Сигнальный путь TGF- $\beta$  тесно переплетается с процессами роста, ангиогенеза и метастазирования опухолей. Гиперэкспрессия TGF- $\beta$  может приводить к деактивации иммунных клеток, в частности Т-лимфоцитов, что помогает раковым клеткам избегать иммунного ответа со стороны организма человека.



**Схема 30.** Онкогенное влияние киназы TGF- $\beta$  при воздействии на различные сигнальные пути в микроокружении опухоли. Treg – регуляторные Т-лимфоциты; NK-клетки – естественные киллеры; TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги; VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; bFGF – базовый фактор роста фибробластов; MDSC – миелоидные супрессорные клетки; CTL – цитотоксические Т-лимфоциты; DC – дендритные клетки; tolDC – толерогенные дендритные клетки.

Одним из подходов к блокировке онкогенных функций TGF- $\beta$  служит использование ингибиторов соответствующих рецепторов TGF- $\beta$ R<sup>24</sup>. В качестве второй онкогенной мишени в рамках данной работы был выбран белок ALK5 (активин-подобная рецепторная киназа 5), являющийся одной из изоформ TGF- $\beta$ R.

На основании существующих типов ингибиторов [350][351], были определены структурные особенности, ключевые для связывания с белком-мишенью ALK5 (**Рис. 41**). Взаимодействие с фрагментом гистидина (His283) в домене ALK5 осуществляется через присутствующий в структуре ингибитора конденсированный гетероцикл (Het), ответственный за возникновение водородных связей с активным сайтом белка. Связывание с остатком аспаргиновой кислоты (Asp351) обеспечивает ароматический фрагмент с полярным заместителем. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с остатками валина (Val219), аланина

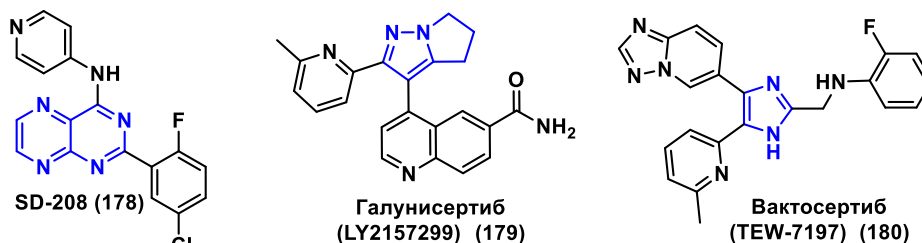
<sup>24</sup> TGF- $\beta$ R – рецептор трансформирующего ростового фактора  $\beta$

(Ala230), лейцина (Leu260, Leu340), серина (Ser287) достигаются за счет наличия объемного гибкого заместителя (R).

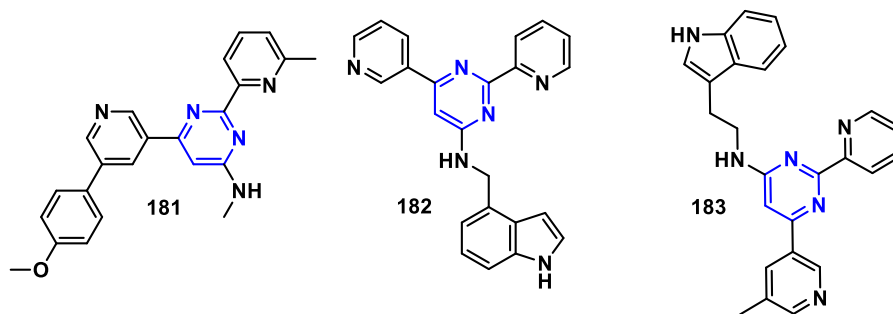
В структуре ингибиторов ALK5 в качестве центрального ядра часто фигурирует гетероцикл с двумя гетероатомами в 1,3-положениях (Het'), способный взаимодействовать с остатком лизина (Lys232) [352]. К таким гетероциклическим структурам относят пиримидины, однако, существует сравнительно небольшое число ингибиторов ALK5 на их основе [353].

В качестве потенциальных ингибиторов данного белка нами было предложено использовать аминопиримидины, активность которых относительно ALK5 еще не была исследована. При этом, их структура учитывает основные фрагменты, необходимые для связывания с доменом целевого белка, а аминогруппа, в свою очередь, выступает как сайт конъюгирования с остальной частью молекулы SNIPER.

#### Ингибиторы ALK5 на клинических испытаниях



#### Известные ингибиторы ALK5 на основе пиримидинов



#### Потенциальные ингибиторы ALK5 в данной работе

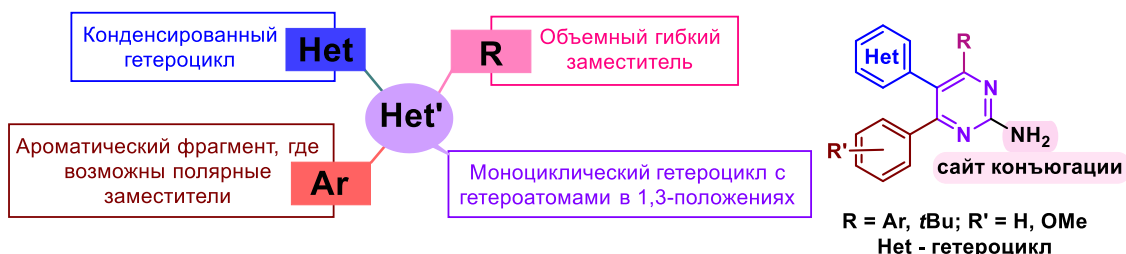


Рисунок 41. Дизайн потенциальных ингибиторов белка ALK5.

### 3.2. Подход к синтезу целевых соединений по реакции гетеро-Дильса-Альдера

Первоначально было предложено синтезировать целевые аминопиримидины по реакции гетеро-Дильса-Альдера с последующим окислением промежуточных дигидропиримидинов. Нами было выдвинуто предположение, что дигидропиримидиновый скелет можно создать с применением трехкомпонентных реакций с участием дизамещенных алкинов, альдегидов, не содержащих  $\alpha$ -атомов водорода, а также гуанидина (Схема 31). Исходные алкины планировалось получить по реакции кросс-сочетания Соногаширы.

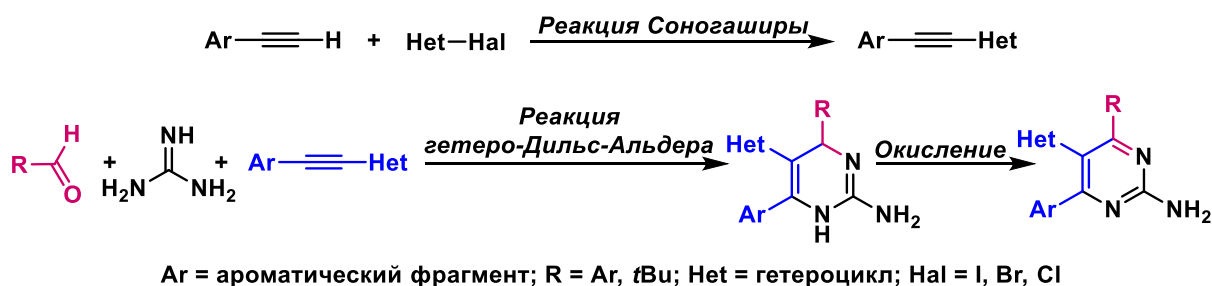


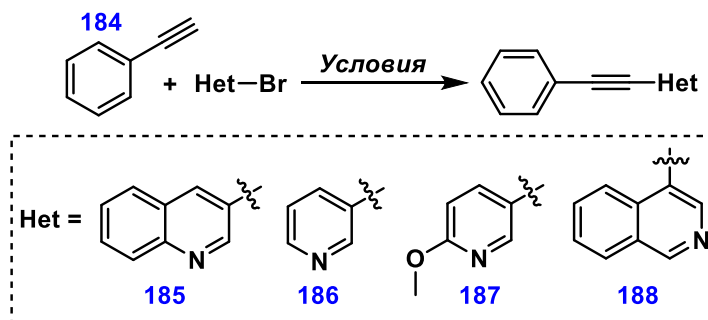
Схема 31. Подход к синтезу потенциальных ингибиторов ALK5.

#### 3.2.1. Получение дизамещенных алкинов

На первом этапе по реакции кросс-сочетания Соногаширы был получен ряд дизамещенных ацетиленов, содержащих ароматический фрагмент и различные гетероциклы, в том числе конденсированные (Табл. 13). Большая часть данных субстратов является описанными ранее в литературе соединениями.

Нами была проведена оптимизация условий получения дизамещенных алкинов в присутствии палладиевых катализаторов, таких, как PdCl<sub>2</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>. Более высоких выходов целевых соединений удалось достичь при использовании дихлорида палладия PdCl<sub>2</sub> (Табл. 13).

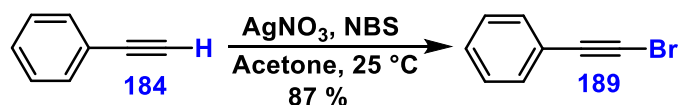
**Таблица 13.** Условия реакции Соногаширы для получения дизамещенных ацетиленов.



№	PPh <sub>3</sub> , ЭКВИВ.	PdCl <sub>2</sub> , ЭКВИВ.	Основание, ЭКВИВ.	CuI, ЭКВИВ.	178, ЭКВИВ.	Het-Br, ЭКВ	Продукт, ВЫХОД
1	0.15	PdCl <sub>2</sub> , 0.05	TEA, 3	0.1	1.2	1	<b>185</b> , 93 %
2	0.06	PdCl <sub>2</sub> , 0.02	TEA, 6	-	1	1	<b>186</b> , 52 %
3	0.06	PdCl <sub>2</sub> , 0.02	TEA, 6	-	1	5	<b>187</b> , 43 %
4	0.06	PdCl <sub>2</sub> , 0.015	TEA, 3	0.05	1.2	1	<b>188</b> , 91 %

Все указанные реакции проводили в ацетонитриле при 80 °С.

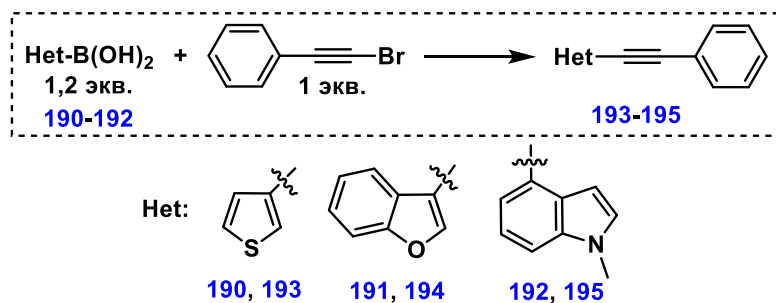
Часть субстратов была получена с применением кросс-сочетания Сузуки-Мияуры, исходя из бромэтинилбензола **189**, синтезированного по реакции бромирования фенилацетилена **184** с выходом 87% (Схема 32).



**Схема 32.** Получение бромэтинилбензола (**189**) бромированием фенилацетилена (**184**) [354]

Для синтеза интернальных алкинов **193-195** проводили поиск оптимальных условий каталитического кросс-сочетания реакции Сузуки-Мияуры гетероарилбороновых кислот **190-192** с бром-содержащим ацетиленом **189** (Табл. 14), что позволило получить целевые продукты с выходами 43, 10 и 20% соответственно.

**Таблица 14.** Подбор условий получения интернальных ацетиленов по реакции кросс-сочетания Сузуки.



Продукт	Катализатор, эквив.	Основание, 3 эквив.	Растворитель	T, °C	Выход, %
<b>193</b>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.03	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dioxane-H <sub>2</sub> O (9 : 1)	90	43
	Pd(dppf)Cl <sub>2</sub> , 0.05	KOAc	DMF- H <sub>2</sub> O (9 : 1)	110	35
<b>194</b>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.03	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dioxane-H <sub>2</sub> O (9 : 1)	90	-
	Pd(dppf)Cl <sub>2</sub> , 0.05	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dioxane-H <sub>2</sub> O (9 : 1)	90	10
			DMF- H <sub>2</sub> O (9 : 1)	110	-
			THF-H <sub>2</sub> O (9 : 1)	70	7
			MeCN - H <sub>2</sub> O (9 : 1)	80	-
<b>195</b>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.03	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dioxane-H <sub>2</sub> O (9 : 1)	90	-
	Pd(dppf)Cl <sub>2</sub> , 0.03	KOAc	Dioxane-H <sub>2</sub> O (9 : 1)	90	20

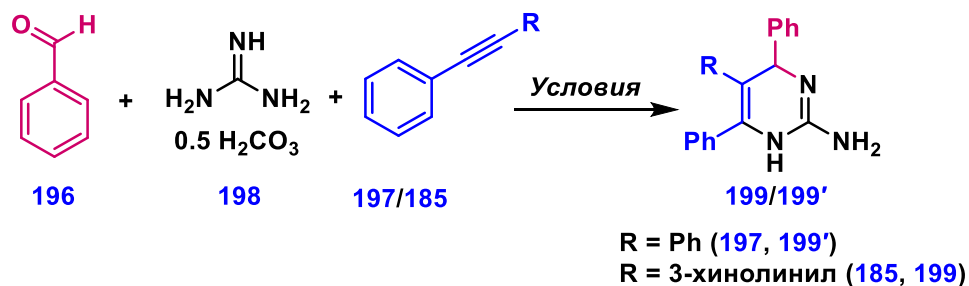
Таким образом, было синтезировано 7 дизамещенных алкинов с использованием двух различных стратегий в зависимости от типа субстрата. В случае гетероарилбороновых кислот применяли реакцию Сузуки, а для галогензамещенных гетероциклов — кросс-сочетание Соногаширы.

### 3.2.2. Реакция гетеро-Дильса-Альдера с дизамещенными алкинами

Полученные дизамещенные ацетилены вводили в трехкомпонентную реакцию гетеро-Дильса-Альдера [355]. Модельная система для подбора условий включала бензальдегид (**196**), дизамещенный алкин (дифенилацетилен **197** или 3-(фенилэтинил)хинолин **185**) и гуанидин (**198**). Для активации субстратов были использованы кислоты Льюиса (Ti(OiPr)<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, ZrCl<sub>4</sub>), кислоты Брэнстеда (*p*TSA, AcOH, TFA), неорганические и органические основания (NaOH, NaNH, DBU, DMAP) и соли переходных металлов (Ni(dppf)Cl<sub>2</sub>, CuI, La(OAc)<sub>3</sub>) (**Таблица 15**). Проведенный скрининг условий не выявил реагентов или катализаторов, позволяющих получить продукт **199**. Далее была исследована возможность проведения синтеза в два этапа,

включая образование промежуточного енимина, исходя из альдегида и гуанидина, с последующей реакцией полученного енимина с алкином в различных условиях (*m*-ксилол, 130 °C; ZnCl<sub>2</sub>, THF, 65 °C). К сожалению, образования целевого продукта **199**, как и его аналога **199'** также не наблюдалось.

**Таблица 15.** Подбор условий реакции гетеро-Дильса-Альдера



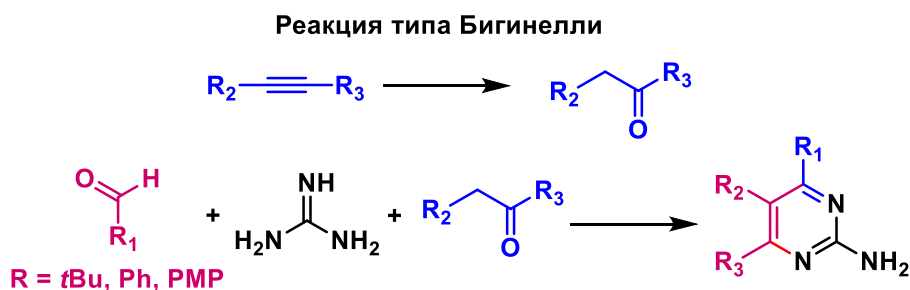
№	Алкин	Добавка, эквив.	T, °C	Растворитель
1	185	Ti(OiPr) <sub>4</sub> , 2	65	THF
2	185	ZnCl <sub>2</sub> , 2	65	THF
3	185	ZrCl <sub>4</sub> , 2	65	THF
4	185	CuCl, 0.2	100	Толуол
5	185	p-TSA·H <sub>2</sub> O, 0.2	100	Толуол
6	185	AcOH : TFA = 1 : 3	72	MeCN
7	197	DMAP : DBU = 1 : 1 (1.5)	120	DMF
8	197	La(OAc) <sub>3</sub> ·1.5 H <sub>2</sub> O (0.5)	70	MeCN/AcOH/THF
9	197	CuI, 0.5	70	MeCN/AcOH/TFA
10	197	Ni(dppf)Cl <sub>2</sub> , 0.5	70	MeCN/AcOH/TFA
11	197	NaOH, 2	120	-
12	197	NaH, 3	70	THF

Ни в одном из экспериментов образования целевого продукта **199** не было зафиксировано по ТСХ.

По нашему предположению, данные результаты могут объясняться большей стабильностью дизамещенных алкинов по сравнению с терминальными. В литературе описаны единичные примеры использования интернальных алкинов в подобных трансформациях, в то время как терминальные алкины являются классическим субстратами для таких реакций [356] [357] [358].

### 3.3. Подход к синтезу целевых соединений на основе реакции Бигинелли

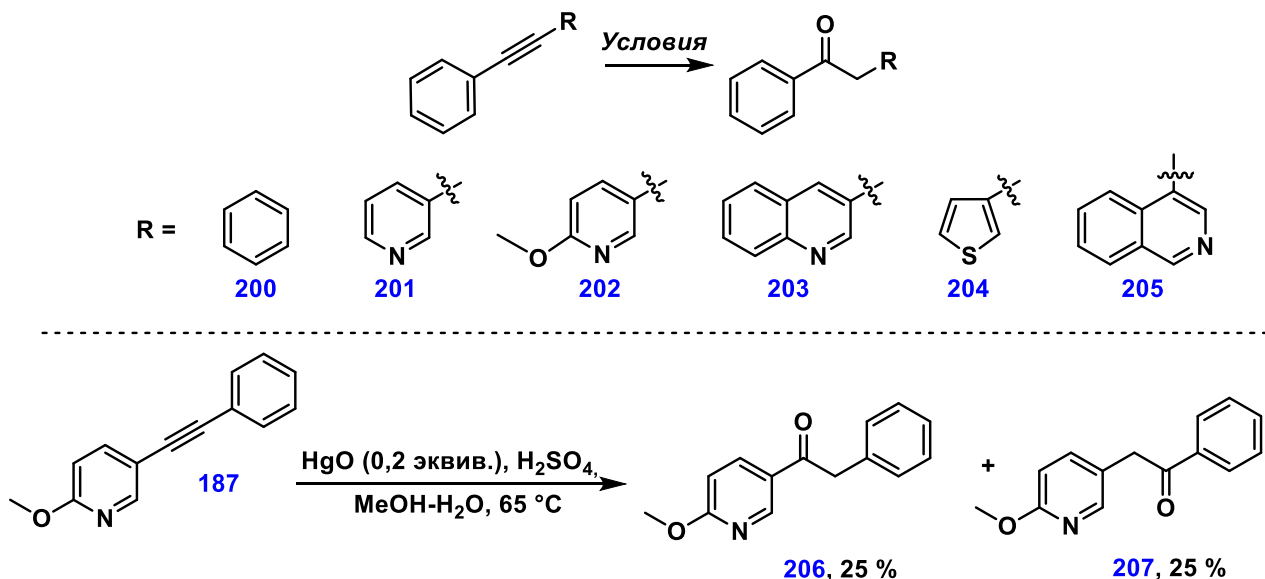
Следующий подход, который был использован для получения пиримидинов как потенциальных ингибиторов ALK5, основывался на реакции Бигинелли. Это трехкомпонентная конденсация проходит, как правило, с участием различных карбонильных соединений, альдегидов, мочевины или её аналогов [359]. Среди преимуществ данного подхода — возможность использовать полученные на предыдущем этапе интернальные алкины для синтеза кетонов, необходимых для проведения реакции конденсации (Схема 33).



**Схема 33.** Второй подход к синтезу целевых соединений

Стоит отметить, что при получении кетонов из алкинов по реакции Кучерова в присутствии солей ртути (II) для большинства субстратов наблюдалось формирование продуктов, где карбонильная группа расположена ближе к ароматическому, а не гетероароматическому фрагменту. В случае субстрата с метоксипиридиновым заместителем, наблюдалось образование двух продуктов в соотношении 1:1. Получение кетонов и условия отражены ниже в **таблице 16**.

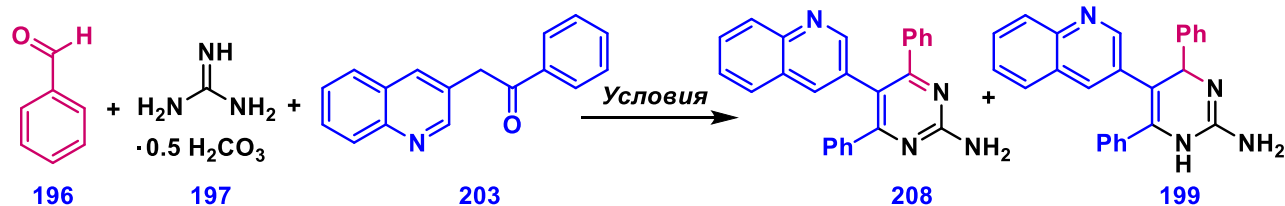
Таблица 16. Получение кетонов – субстратов для реакции Бигинелли



№	Продукт	Условия	Выход, %
1	200	4 % PtO <sub>2</sub> , pTSA·H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> O EtOH, 90 °C, 12 h	68
2	202, 203		-
3	202, 203	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, Toluene, 80 °C	-
4	200	20 % HgO, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, MeOH, 70 °C	71
5	201		49
6	202		49
7	203		42
8	204		9
9	204		70

На следующем этапе проводили трехкомпонентную конденсацию для синтеза целевых пиримидинов. В качестве модельной системы для оптимизации условий реакции были использованы бензальдегид **196**, карбонат гуанидина **198** и хиолин-содержащий кетон **203**.

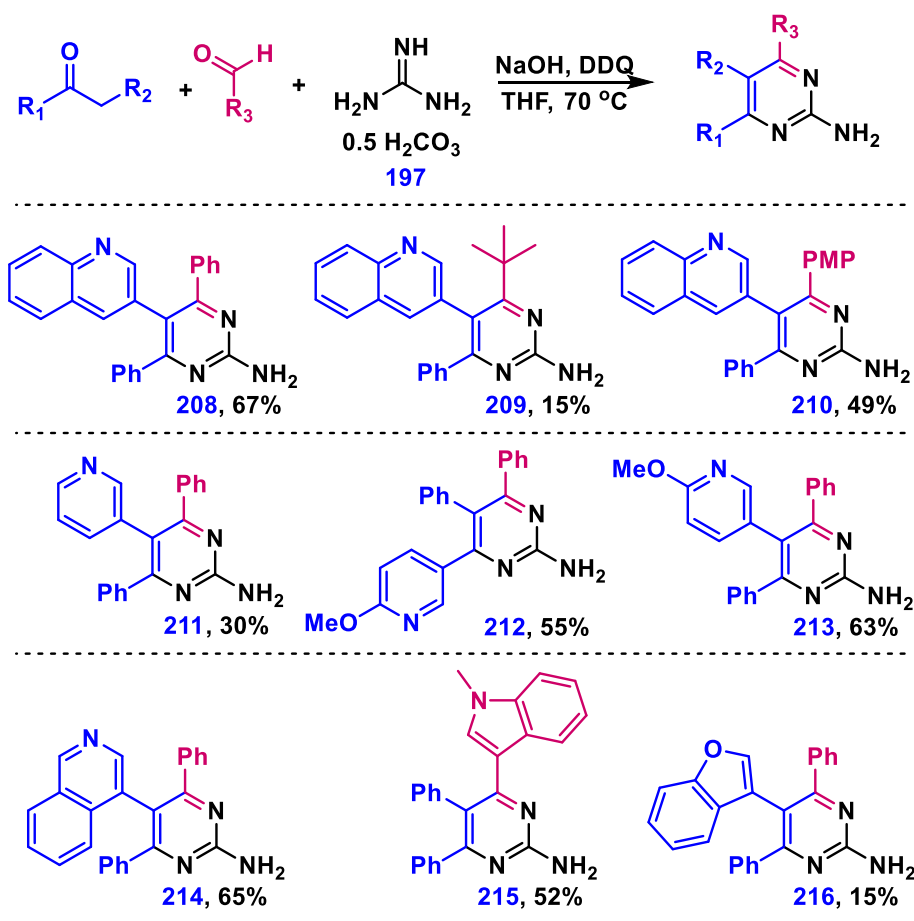
Таблица 17. Оптимизация условий реакции Бигинелли



№	Добавка	Растворитель	T, °C	Выход 208, %	Выход 199, %
1	Ti(OiPr) <sub>4</sub>	THF	70	13	-
2	p-TSA	EtOH	90	-	-
3	p-TSA	MeCN	70	-	-
4	AcOH/TFA	MeCN	70	-	-
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	EtOH	90	21	3
6	NaH	THF	70	9	15
7	NaOH	THF	70	37	2
8	NaOH, DDQ	THF	70	67	-

Нами показано, что использование кислот Бренстеда не привело к желаемому результату (Табл. 17, опыты 2-4). В то же время, в присутствии оснований (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, NaH) наблюдалось образование смеси продуктов – пиримидина **208** и дигидропиримидина **199**. С целью увеличить выход соединения **208**, в реакционную смесь вводили окислитель - 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (DDQ). Это позволило полностью перевести образующийся дигидропиримидин **199** в целевой пиримидин **208** с увеличением выхода последнего от 37% до 67%.

Применение данного подхода позволило получить 9 различных 4,5,6-тризамещенных 2-аминопиридинов **208-216** (Схема 34) с выходами от 15 до 67%.



**Схема 34.** Синтез 4,5,6-тризамещенных 2-аминопиридинов по модифицированной реакции типа Бигинелли

Следует отметить, что предложенная нами методика имеет определенные ограничения. Алифатические альдегиды в данной реакции оказались менее реакционноспособными по сравнению с ароматическими аналогами. В частности, продукт синтеза на основе пивалевого альдегида (соединение **209**) был получен с низким выходом (15%). Это, по-видимому, обусловлено низкой стабильностью промежуточного имина вследствие отсутствия сопряжения, стабилизирующего аналогичные интермедиаты в случае ароматических альдегидов. Кроме того, применение сильного окислителя DDQ на заключительной стадии синтеза ограничивает применимость подхода к субстратам, содержащим легко окисляемые функциональные группы.

Для расширения ряда применимых субстратов исходная методика была усовершенствована. Было решено на начальном этапе синтеза проводить сборку пиримидинового фрагмента без необходимости в дальнейшем использовать окислитель (Схема 35). На первой стадии синтезировали дизамененный 2-аминопиримидин (**219**) исходя

из ацетофенона (**218**). Полученный аминопиримидин **108** бромировали по C–H связи в положении «4» пиримидинового цикла с использованием *N*-бромсукцинимид, при этом не наблюдалось галогенирования в ароматических фрагментах (фенильном и *p*-метоксифенильном). Производное **220** было использовано в реакции палладий-катализируемого кросс-сочетания Сузуки, что позволило вводить в структуру финальных молекул различные гетероароматические заместители (Схема 35).

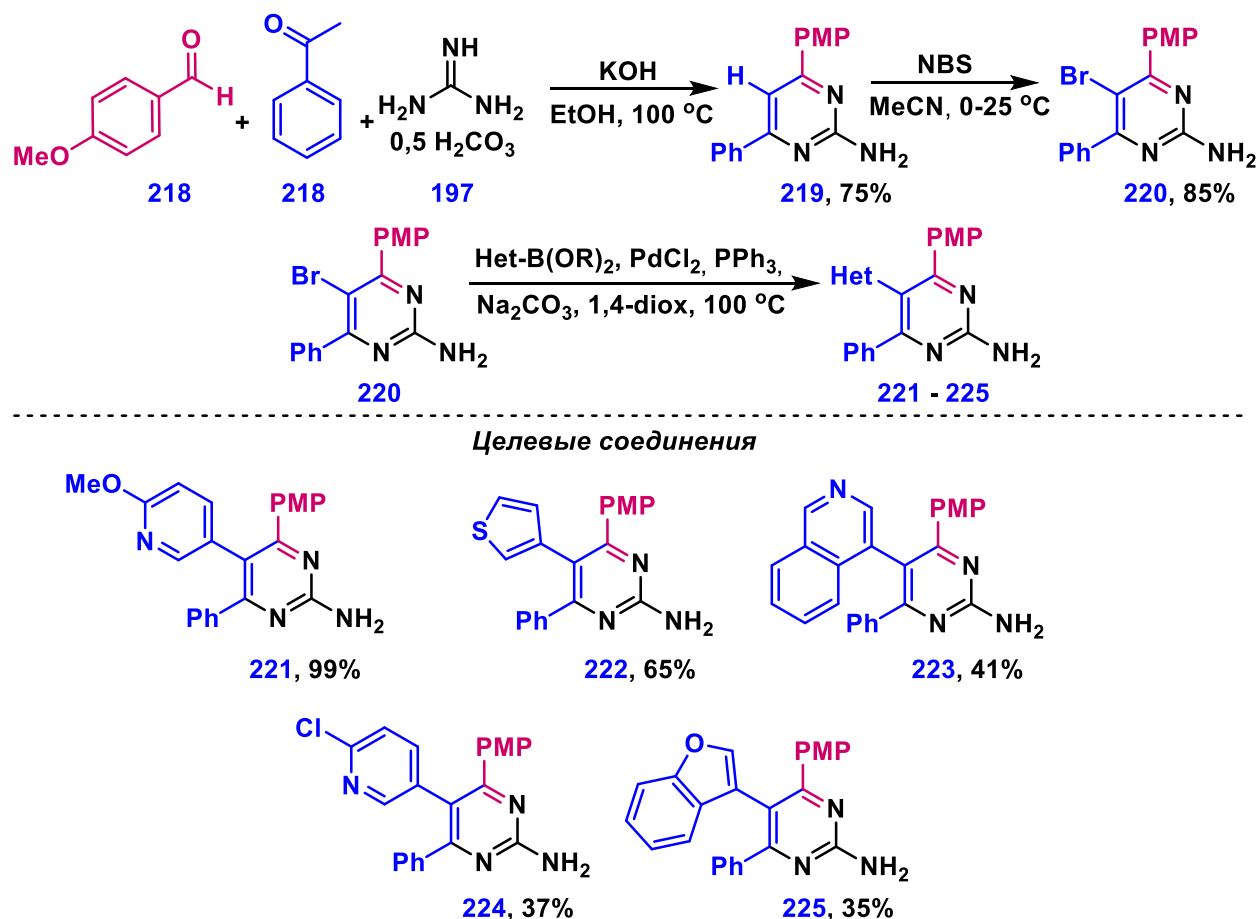


Схема 35. Получение пиримидинов **221-225** по реакции кросс-сочетания Сузуки

Предложенная методика позволила синтезировать 5 новых замещенных пиримидинов с выходами 35% - 99%. По сравнению с ранее описанным методом (Схема 34), данный подход позволяет вводить в структуру целевых соединений фрагменты, чувствительные к действию окислителей (например, тиофеновый и бензофурановый).

Для установления влияния свободной аминогруппы на антипролиферативную активность соединений *in vitro*, были получены *N*-ацилированное (**226**) и *N*-алкилированное (**227**) производные соединения **221** (Схема 36).

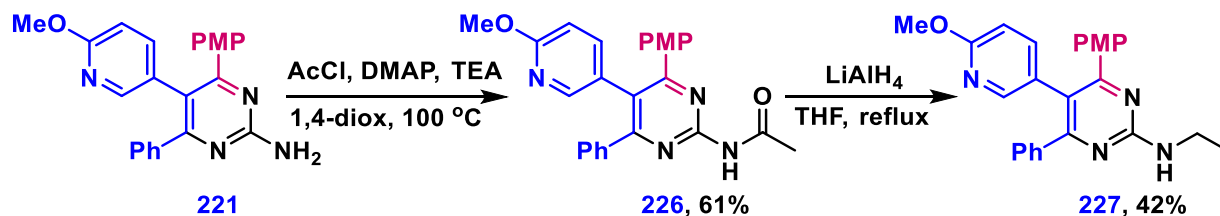


Схема 36. Синтез *N*-производных пириимидина **221** [346]

Реакция ацилирования соединения **221** по аминогруппе протекает в достаточно жёстких условиях – при 100 °С в диоксане с использованием смеси оснований – DMAP/TEA.

Невысокая реакционная способность аминогруппы в соединениях данного типа может быть следствием сопряжения неподеленной пары электронов азота аминогруппы с электронодефицитным пириимидиновым кольцом.

Кроме пириимидинов **208-216**, **221-227** нами были также синтезированы родственные соединения **229** и **230**, где в качестве аналога гуанидина был использован 2-аминобензимидазол (**228**). Это позволило получить производные с изохинолиновым (**229**) и метоксипиридиновыми заместителями (**230**) с выходами 34 и 36% соответственно (Схема 37).

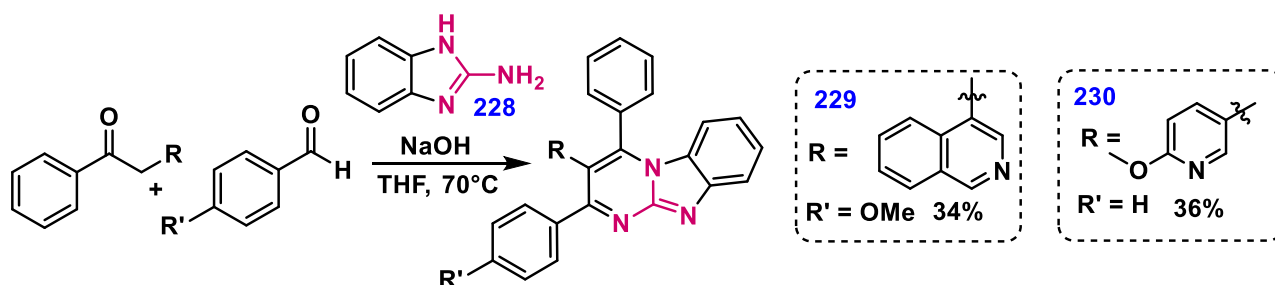


Схема 37. Синтез молекул с использованием 2-аминобензимидазола (**228**)

Соединения **229** и **230** имеют тип центрального ядра, отличный от пириимидина, и на данный момент сложно сказать, как это отражается на их биологической активности. Планируется расширить субстратный ряд и провести исследование антипролиферативной активности подобных имидазопириимидиновых молекул.

### 3.4. Исследование антипролиферативной активности полученных пириимидинов

Для синтезированных соединений была исследована антипролиферативная активность *in vitro* с применением стандартного метода МТТ на клетках аденокарциномы поджелудочной железы человека (Colo357), карциномы легких человека (A549), хронической миелоидная

лейкемии человека (K562), раке молочной железы (MCF7), а также лимфомы мышей (EL-4). Среди неопухолевых клеточных линий были использованы макрофаги (RAW264.7) и фибробласты (L929) (Табл. 18).

Антипролиферативная активность всех исследуемых соединений находится в диапазоне 6-200  $\mu\text{M}$ , при этом содержащие *n*-метоксифенильный заместитель соединения **210**, **221-227** проявили чуть большую активность. Введение в структуру объемного *трет*-бутильного заместителя вместо ароматического (соединения **208** и **209**) не оказало существенного влияния на активность *in vitro*. Для подтверждения этой тенденции, однако, необходимо исследовать биологическую активность большего числа производных с неароматическими заместителями.

**Таблица 18.** Антипролиферативная активность целевых соединений **208-216**, **221-227**,  $\text{IC}_{50}^*$  ( $\mu\text{M}$ )

Соединение	A549	K562	EL-4	Colo357	MCF7	L929	RAW264.7
<b>208</b>	-**	-	40	40	200	-	-
<b>209</b>	200	40	40	40	200	40	40
<b>210</b>	12	12	25	25	-	-	-
<b>211</b>	-	-	200	40	200	-	-
<b>212</b>	-	-	40	40	40	-	-
<b>213</b>	40	40	40	30	40	35	40
<b>214</b>	120	40	40	10	200	40	125
<b>215</b>	40	40	8	8	40	200	200
<b>216</b>	-	-	8	40	40	-	-
<b>221</b>	12	12	25	100	-	-	-
<b>222</b>	25	12	25	100	-	-	-
<b>223</b>	6	6	6	25	-	-	-
<b>224</b>	25	25	25	50	-	-	-
<b>225</b>	25	6	25	50	-	-	-
<b>226</b>	12	6	25	50	-	-	-
<b>227</b>	25	6	12	200	-	-	-

\* Представленные величины являются средними значениями 3 экспериментов. Стандартные отклонения не превышают 10% и не отображены для удобства восприятия.

\*\* Не было определено

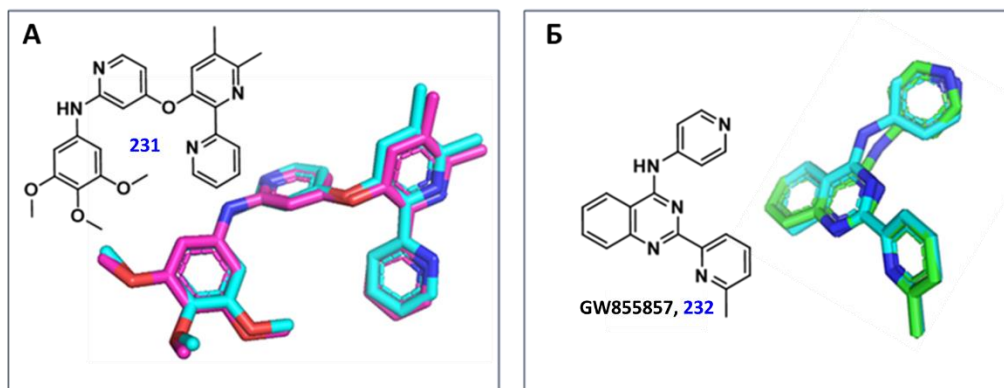
При исследовании антипролиферативной активности производных с функционализированной аминогруппой (**226**, **227**) были получены значения  $\text{IC}_{50}$ , сопоставимые с аналогичными для исходного соединения **221** со свободной аминогруппой. Это может быть аргументом о возможности использовать аминогруппу в качестве сайта конъюгации при дальнейшей разработке терапевтических конъюгатов PROTACs.

### 3.5. Проведение докинг-исследований

Наряду с изучением антипролиферативной активности, параллельно проводились докинг-исследования с целью выявить потенциально наиболее активные по отношению к белку ALK5 соединения как среди уже полученных молекул, так и среди соединений, которые можно синтезировать при помощи разработанных нами подходов.

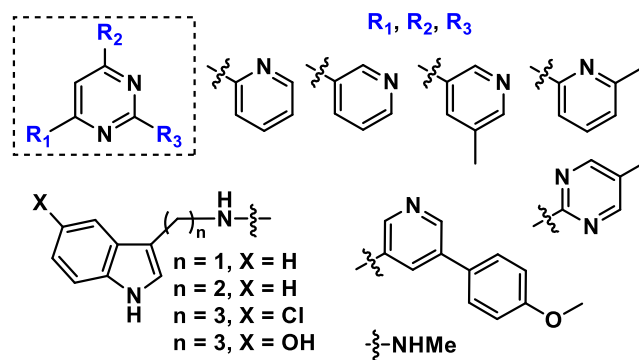
Для докинга была использована структура белка ALK5 из Protein Data Bank (PDB ID: 2WOT [360]). В качестве лигандов были использованы как уже известные ингибиторы ALK5 [353], так и библиотека наших молекул. Непосредственно для проведения докинга задействовали программы AutoDock Tools и Vina.

Для валидации выбранного протокола был проведен редокинг, или повторная стыковка известного лиганда - 4-((5,6-диметил-2-(2-пиридил)-3-пиридил)окси)-N-(3,4,5-триметоксифенил)пиридин-2-амин **231**. Значение RMSD, или среднего квадратичного отклонения, составило 0.215 Å, что меньше 2 Å и свидетельствует о хорошей воспроизводимости положения лиганда в белковом кармане при расчете по сравнению с данными PCA. При проведении кросс-докинга между белком (PDB ID: 2WOT [360]) и лигандом **GW855857 (232)** с хиназолиновым ядром из другой кристаллической структуры (PDB ID: 3HMM [361]) аналогичное значение составило 0.371 Å (рисунок 13). При этом значения энергий связывания были менее -10 ккал/моль.



**Рисунок 42.** Наложение конформаций лигандов, полученных в ходе докинг-исследований (расчетные структуры выделены голубым цветом; синий – цвет атомов азота, красный – кислорода) и положений лигандов по данным PCA, для соединения **231** (рис. 42 а, положение **231** по данным PCA отмечено розовым цветом) и соединения **GW855857** (рис. XX, б, положение лиганда по данным PCA отмечено зеленым цветом).

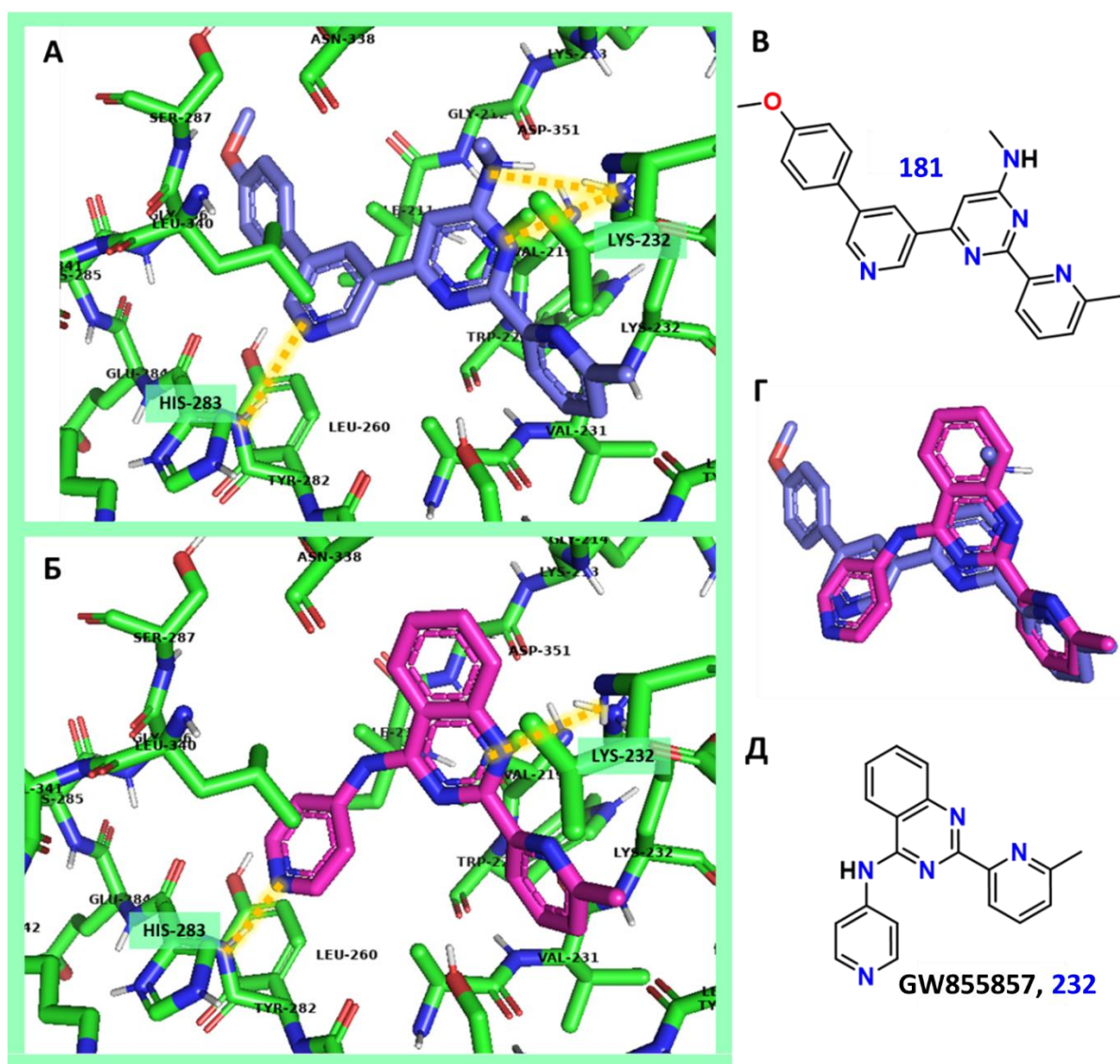
В своей работе мы начали докинг с известных тризамещенных пиримидинов, описанных в литературе [353] [WO2008006583A1] (**Схема 38**), аффинность которых к ALK5 была доказана экспериментально (значения  $IC_{50}$ , отражающие активность по отношению к ALK5, находятся в диапазоне от 10 до 910 нМ), чтобы далее сопоставить полученные величины энергий связывания с соответствующими значениями для соединений нашей библиотеки. При этом, для всех пиримидиновых лигандов, известных в литературе, у полученных в ходе докинга конформаций, совпадало положение пиримидинового ядра внутри кармана связывания с белком.



**Схема 38.** Структуры литературных ингибиторов ALK5 с пиримидиновым ядром в общем виде

В литературе к настоящему времени отсутствуют кристаллические структуры белка ALK5 с ингибиторами с пиримидиновым ядром. Однако, в одной из работ [362] говорится о возможности пиримидина GSK-J4 связываться с TGF $\beta$ R (белок ALK5 – изоформа TGF $\beta$ R). Проведенные авторами [362] докинг-исследования демонстрируют возможное связывание ингибитора GSK-J4 (**233**), где расположение пиримидинового ядра в кармане белка аналогично хиназолиновому ядру. Наложение структуры хиназолина GW855857, извлеченного из кристаллической структуры его комплекса с белком (PDB ID: 3HMM), и рассчитанной нами в ходе докинга конформации пиримидина **231** также демонстрирует, что пиримидиновые ингибиторы ALK5 имеют сходный с хиназолиновыми тип связывания и аналогичную ориентацию азот-содержащего ядра (**Рис. 43**).

Взаимодействия с остатком лизина (LYS-232) в структуре белка ALK5, как правило, характерны для центрального гетероциклического ядра соответствующих ингибиторов [352]. По результатам проведенного нами докинга, взаимодействие с LYS-232 в случае описанных в литературе ингибиторов ALK5 (на примере соединения **181**), осуществляется за счет атомов азота в составе центрального пиримидинового ядра. Для молекулы **GW855857**, аналогичные контакты формируются при участии хиназолинового ядра. Также в обоих случаях взаимодействие с остатком гистидина (HIS-283) возможно при участии гетероциклического заместителя (пиридина). Это согласуется с нашими предположениями о ключевых взаимодействиях потенциальных ингибиторов белка ALK5 с его активным сайтом, что более подробно описано в разделе 3.1 (стр. 103).

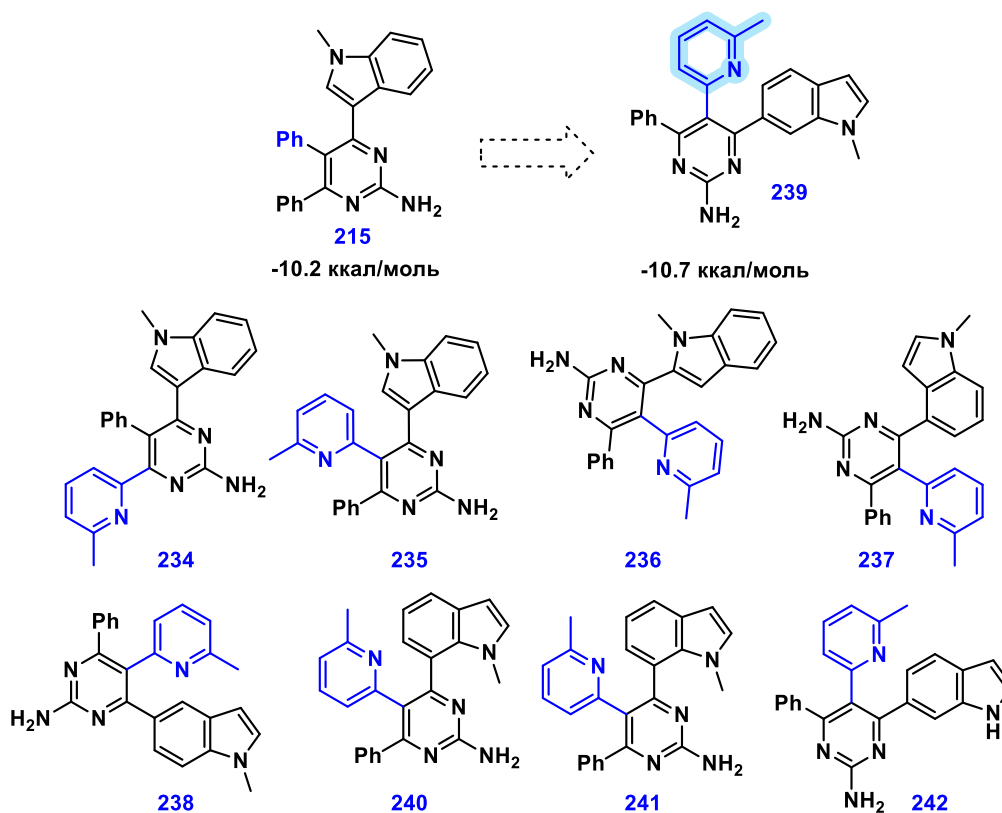


**Рисунок 43.** Положение лигандов **GW855857** и **181** в структуре белка ALK5 (2WOT) (рис. А и Б соответственно); наложение структур лигандов **GW855857** (голубой цвет) и **181** (розовый цвет) (Г); химические структуры молекул **GW855857** и **181** (В, Д). Атомы N отмечены синим цветом, О - красным

В результате проведения молекулярного докинга для ряда известных пиримидиновых ингибиторов ALK5 было установлено, что расчетная энергия связывания для наиболее активного соединения **181** ( $IC_{50} = 10$  нМ) составила -10.4 ккал/моль. Анализ выявил отсутствие строгой корреляции между экспериментальной ингибиторной активностью лигандов и расчетными значениями энергии связывания, которые для всей серии соединений находились в диапазоне (-10.10) – (-10.70) ккал/моль. Полученный диапазон энергий связывания был принят в качестве референсного для последующей оценки сродства к АТФ-связывающему

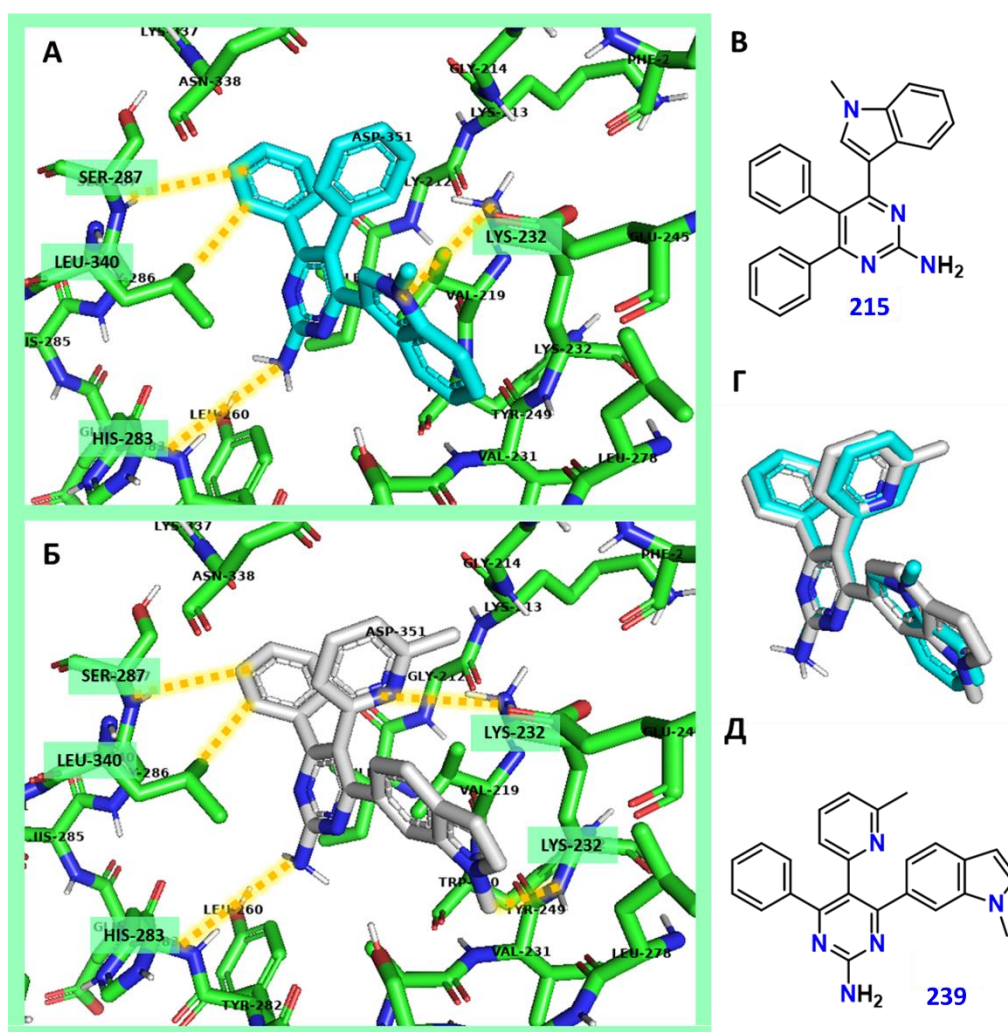
домену ALK5 новых соединений, представленных в данной работе. К ним относятся как ранее полученные нами субстраты, так и модельные соединения, дизайн которых базировался на синтетических возможностях разработанного метода с учётом ключевых структурных особенностей известных ингибиторов ALK5.

Далее был проведен докинг для полученных нами соединений **208-216**, **221-225**, **226-227**. Результаты представлены в таблице 15. Наименьшее значение энергии связывания, равное -10.2 ккал/моль, было получено для соединения **215**, имеющего в своей структуре один индольный заместитель и два фенильных. Это значение близко к аналогичной величине для литературных ингибиторов, что может быть свидетельством о потенциальной активности соединения **215** относительно белка ALK5. Было решено заменить один из фенилов на 3-метилпиридиновый фрагмент и провести докинг для подобных структур, т.к. метилпиридин является одним из наиболее часто встречающихся фрагментов в структуре ингибиторов ALK5 и его введение может повысить активность потенциальных ингибиторов (**Схема 39**).



**Схема 39.** Модельные соединения для проведения докинга

Среди исследуемых структур, полученные значения энергии связывания являются близкими для соединений **215** и **239**. Данные, полученными для других исследуемых соединений, представлены в приложении (Табл. 19, стр. 121). На примере данных молекул отмечены ключевые взаимодействия с сайтом белка (Рис. 44). Необходимо отметить, что докинг полученных нами пиримидинов показал иное расположение пиримидинового ядра, не совпадающее с ориентацией центрального ядра **GW855857** и литературных пиримидинов, в частности, соединения **181** (рис. 43). Это может быть связано с присутствием свободной аминогруппы и наличием в скелете большего числа заместителей.



**Рисунок 44.** Положение соединений **215** и **239** в активном сайте белка ALK5 (2WOT) (рис. А и Б соответственно); наложение структур **215** (голубой цвет) и **239** (серый цвет) (Г); химические структуры молекул **215** и **239** (В, Д). Атомы N отмечены синим цветом, О - красным.

Взаимодействия с гидрофобной областью домена ALK5 (LEU-240, SER-287) осуществляются за счет фенилов, контакт с фрагментом гистидина (HIS-283) – за счет аминогруппы. Возможно, более низкие расчетные значения энергии связывания для **239** (-10.7 ккал/моль) по сравнению с данными для **215** (-10.2 ккал/моль), обусловлены тем, что в случае **239** с фрагментом лизина (LYS-232) способны взаимодействовать сразу два гетероцикла – индол и пиридин. Планируется в дальнейшем провести синтез соединения **239**, чтобы изучить его взаимодействие с целевым белком и проверить влияние метилпиридинового фрагмента на активность ингибитора.

## Экспериментальная часть

*Спектры ЯМР*  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  были получены с использованием спектрометра Agilent DDR2 400 с рабочей частотой 400 и 101 МГц при 25°C. Химические сдвиги в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах приведены в шкале  $\delta$  (м.д.) относительно остаточного пика дейтерированного растворителя. Химические сдвиги в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах приведены в шкале  $\delta$  (м.д.) относительно дейтерированного растворителя в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги в  $^{19}\text{F}$  ЯМР спектрах приведены в шкале  $\delta$  (м.д.) относительно внутреннего стандарта.

*Спектры MALDI* были зарегистрированы на Bruker Microflex LT. Для регистрации масс-спектров высокого разрешения был использован прибор Bruker maXis Q-TOF (Bruker Daltonik) с источником ионизации электрораспылением (ESI).

*ВЭЖХ анализ* осуществлялся на хроматографе Shimadzu Class-VP V6.12SP1, А:  $\text{H}_2\text{O}$ ; В: MeCN. Чистота всех финальных соединений была более 95%. *Элементный анализ* проводили с использованием аппарата Elementar (Vario Micro Cube).

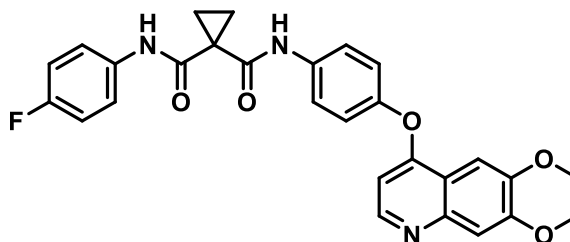
При проведении *колоночной хроматографии* был использован Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh). При проведении тонкослойной хроматографии применяли пластины Merck TLC Silica gel 60 с флуоресцентным индикатором (F254).

*Коммерчески доступные реагенты* («Sigma Aldrich», «РусХим», «ABCR», «Acros», «Alfa Aesar», и др.) использовали без предварительной очистки. Растворители очищали по стандартным методикам. Используемый петролейный эфир соответствует фракции 40–70°C.

Следующие соединения были получены по описанным в литературе методикам: лиганд к белку VHL **116** [363] и его производное **118** [364], леналидомид **117** и его производное с линкером на основе капроновой кислоты **120** [365], деметилированный аналог кабозантиниба **101** [366], метиловые эфиры аминокислот *L*-ряда **131–133** [337], Вос-*N*-Метил-*L*-аланин **127** [338], тиаомид *N*-Вос-замещенного пролина **151** [342–344], 1-(4-гидроксифенил)этанон-1 **148** [367], 1-(4-(бензилокси)фенил)-2-бромэтанон-1 **149** [368,369].

## Получение кабозантиниба и его производных

### Синтез кабозантиниба **102**

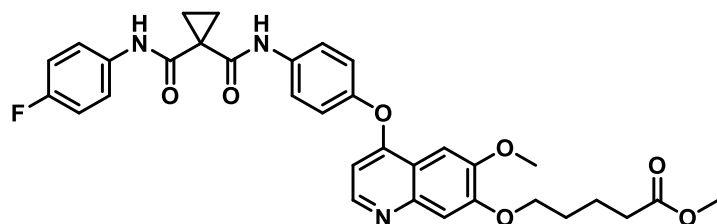


К раствору 60 мг деметилированного производного кабозантиниба **101** (0.12 ммоль, 1.00 эквив.) в ТГФ прибавили 10 мг 60% суспензии NaH в минеральном масле (0.24 ммоль, 2.00 эквив.) при 0 °С в инертной атмосфере. Спустя 30 минут к реакционной смеси добавили 9 мкл MeI (0.15 ммоль, 1.20 эквив.) и оставили перемешиваться при комнатной температуре в течение 12 часов. По окончании реакции (контроль по ТСХ) растворитель был удален при пониженном давлении. Далее к твердому остатку прибавили 30 мл H<sub>2</sub>O и провели экстракцию ЭА (3x15 мл). Органический слой осушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали смесь ЭА - MeOH (1:0→ 9:1). Выделено 14 мг (23%) продукта **102** в виде бежевого порошка. <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C ЯМР спектры соединения **102** соответствуют литературным данным [370].

### Общая методика получения производных кабозантиниба, содержащих алифатические линкеры со сложноэфирными группами **103a,b**

К раствору производного кабозантиниба **101** (1.00 эквив.) в ТГФ (3 мл) в инертной атмосфере по каплям добавляли суспензию NaH (3.00 эквив.) в ТГФ (3 мл). После перемешивания при 0 °С в течение 30 минут, к реакционной смеси по каплям добавляли раствор соответствующего галогенированного сложного эфира кислоты (2.00 эквив.) в ТГФ (2 мл). Полученный раствор перемешивали при 65°C в течение 2 часов. По окончании реакции, растворитель был удален при пониженном давлении. К твердому остатку прилили 30 мл H<sub>2</sub>O и провели экстракцию ЭА (3x15 мл). Органический слой осушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем растворитель был удален при пониженном давлении. Продукты были выделены при помощи колоночной хроматографии.

**Метил 5-((4-(4-(1-((4-фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)-фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)пентаноат 103a**



Элюент: ЭА-МеОН (1:0 → 9:1). Бледно-желтый порошок, выход 67%.

$T_{пл} = 110 - 111\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$^1\text{H ЯМР}$  (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.18$  (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.46 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.76 (д,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.67-7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 8.9$  Гц, 2H), 7.19-7.12 (м, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 4.15 (т,  $J = 6.1$  Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 3.60 (с, 3H), 2.43 (т,  $J = 7.3$  Гц, 2H), 1.89 – 1.79 (м, 2H), 1.79 – 1.68 (м, 2H), 1.48 (с, 4H).

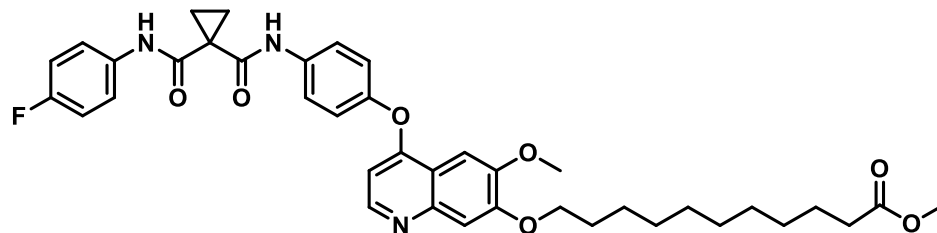
$^{13}\text{C ЯМР}$  (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 173.27$ , 168.16, 168.11, 158.27 (д,  $J = 240.1$  Гц), 159.92, 151.81, 149.50, 149.41, 148.77, 146.44, 136.37, 135.16 (д,  $J = 2.6$  Гц), 122.41 (д,  $J = 7.9$  Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.13 (2C), 115.07, 115.01 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.53, 103.00, 99.14, 67.90, 55.72, 51.22, 32.90, 31.53, 27.84, 21.24, 15.40 (2C).

$^{19}\text{F ЯМР}$  (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-118.98) - (-119.10)$  (м).

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_7$  рассчитано: С, 65.88; Н, 5.36; найдено: С, 65.95; Н, 5.30.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_7$  рассчитано: 602.24; найдено: 602.00.

**Метил 11-((4-(4-(1-((4-фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)-фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)ундеканоат 103b**



Элюент: ЭА-МеОН (1:0 → 9:1). Бледно-желтый порошок, выход 63%.

$T_{пл} = 120 - 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$^1\text{H ЯМР}$  (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.17$  (с, 1H), 10.04 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.75 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.66-7.59 (м, 2H), 7.49 (с, 1H), 7.36 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.18 – 7.11 (м,

2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 4.13 (т,  $J = 6.5$  Гц, 2H), 3.92 (с, 3H), 3.57 (с, 3H), 2.28 (т,  $J = 7.4$  Гц, 2H), 1.84 – 1.75 (м, 2H), 1.55 – 1.40 (м, 8H), 1.40-1.20 (м, 10H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 173.46, 168.26, 168.21, 159.99, 158.35$  (д,  $J = 240.1$  Гц), 151.97, 149.58, 149.50, 148.83, 146.47, 136.39, 135.17 (д,  $J = 2.7$  Гц), 122.51 (д,  $J = 7.7$  Гц, 2C), 122.26 (2C), 121.20 (2C), 115.20, 115.09 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.48, 103.05, 99.18, 68.34, 55.78, 51.22, 33.33, 31.57, 28.96, 28.86, 28.76, 28.69, 28.50 (2C), 25.58, 24.48, 15.48 (2C).

$^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-118.93) - (-119.05)$  (м).

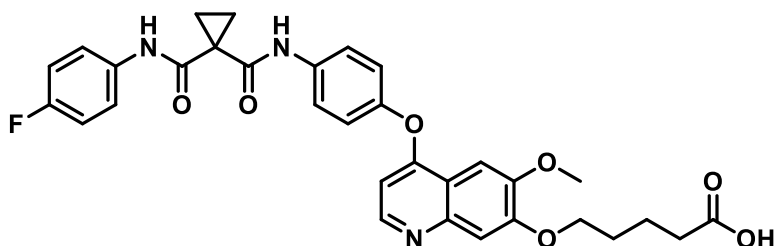
Элементный анализ: для  $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{FN}_3\text{O}_7$  рассчитано: С, 68.30; Н, 6.47; найдено: С, 68.41; Н, 6.40.

Масс-спектр (MALDI-TOF):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{FN}_3\text{O}_7$  рассчитано: 686.3; найдено: 686.5.

### Общая методика получения производных кабозантиниба 104a,b, содержащих карбоксильные группы

Раствор соответствующего сложного эфира **103a,b** (1.00 эквив.) и NaOH (6.00 эквив.) в смеси растворителей MeOH :  $\text{H}_2\text{O} = 2 : 1$  (10 мл) перемешивали при 60 °С в течение 12 часов. Реакционную смесь сконцентрировали при пониженном давлении, pH водной фазы довели до 5, прибавляя по каплям 10% водный раствор HCl. Провели экстракцию ЭА (3×10 мл). Органическую фазу осушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Последующее фильтрование и удаление растворителя при пониженном давлении позволило выделить соответствующие продукты.

### 5-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)пентановая кислота 104a



Бежевый порошок, выход 99%.

$T_{\text{пл}} = 133 - 134$  °С.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.18$  (с, 1H), 10.06 (с, 1H), 8.46 (д,  $J = 5.2$  Гц, C5-H, 1H), 7.76 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.68-7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.39 (с, 1H), 7.25 – 7.20 (м, 2H), 7.19 – 7.11 (м, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 4.15 (т,  $J = 6.3$  Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 2.33 (т,  $J = 7.4$  Гц, 2H), 1.88 – 1.79 (м, 2H), 1.76 – 1.66 (м, 2H), 1.46 (с, 4H).

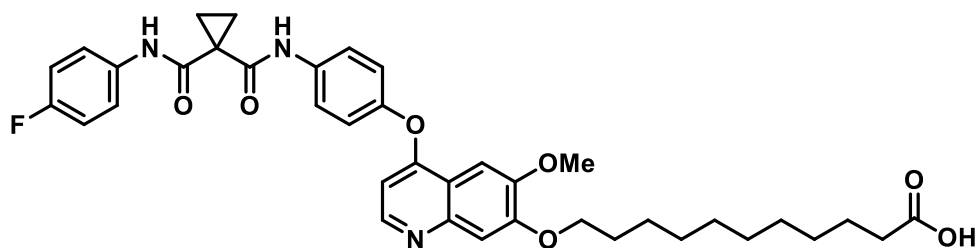
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 174.42, 168.17, 168.13, 159.93, 158.28 (д, J = 240.1 Гц), 151.85, 149.52, 149.43, 148.77, 146.45, 136.37, 135.17 (д, J = 2.6 Гц), 122.42 (д, J = 7.9 Гц, 2С), 122.18 (2С), 121.15 (2С), 115.08, 115.02 (д, J = 22.2 Гц, 2С), 108.52, 103.01, 99.15, 67.99, 55.73, 33.31, 31.54, 27.96, 21.29, 15.42 (2С).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ -118.96 – -119.15 (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: С, 65.41; Н, 5.15; найдено: С, 65.49; Н, 5.20.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: 588.21; найдено: 588.77.

**11-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)ундекановая кислота 104b**



Белое твердое вещество, выход 82%.

T<sub>пл</sub> = 140 – 141 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 11.96 (с, 1H), 10.17 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.76 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.67–7.60 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.22 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.17–7.12 (м, 2H), 6.42 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.13 (т, J = 6.5 Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 2.18 (т, J = 7.4 Гц, 2H), 1.85–1.73 (м, 2H), 1.53–1.20 (м, 18H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 174.49, 168.14, 168.10, 159.91, 158.25 (д, J = 240.0 Гц), 151.90, 149.49, 149.43, 148.75, 146.44, 136.36, 135.16 (д, J = 2.6 Гц), 122.40 (д, J = 7.8 Гц, 2С), 122.15 (2С), 121.13 (2С), 115.02 (д, J = 22.1 Гц, 2С), 115.01, 108.45, 102.97, 99.11, 68.27, 55.71, 33.66, 31.54, 28.94, 28.85, 28.72, 28.55 (2С), 28.46, 25.54, 24.49, 15.38 (2С).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ -118.99 – -119.11 (м).

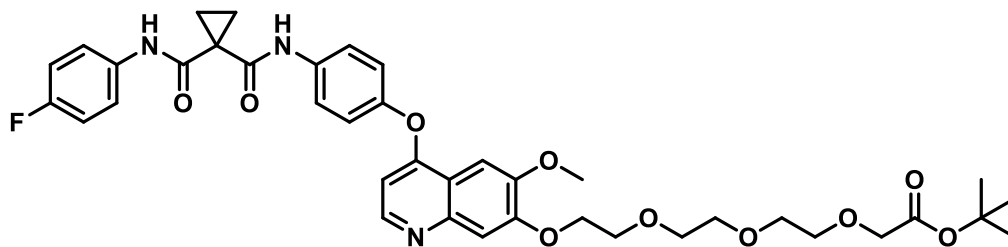
**Элементный анализ:** для C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: С, 67.94; Н, 6.30; найдено: С, 67.88; Н, 6.25.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: 672.3; найдено: 672.3.

## Общая методика синтеза производных кабозантиниба с линкерами на основе полиэтиленгликоля и 1,3-пропандиола 105a,b

К раствору деметилированного производного кабозантиниба **101** (1.00 эквив.) и Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.00 эквив.) в DMF (2 мл) добавили *трет*-бутиловый эфир соответствующей йодированной кислоты (2.00 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Реакционная смесь перемешивалась при 60 °С в течение 1 часа. Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукты были выделены при помощи колоночной хроматографии.

**Трет-бутил** **2-(2-(2-(2-((4-(4-(1-((4-фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)этокси)этокси)этокси)ацетат 105a**



Элюент: CHCl<sub>3</sub> – MeOH (29:1 → 19:1), бледно-желтое твердое вещество, выход 69 %.

T<sub>пл</sub> = 134 – 135 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.59 (с, 1H), 9.09 (с, 1H), 8.44 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.61 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.51 (с, 1H), 7.50–7.44 (м, 2H), 7.36 (с, 1H), 7.14 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.06–6.97 (м, 2H), 6.42 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 4.30 (т, J = 4.8 Гц, 2H), 4.02–3.94 (м, 7H), 3.78–3.72 (м, 2H), 3.72–3.65 (м, 6H), 1.75–1.60 (м, 4H), 1.45 (с, 9H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.81, 169.49, 169.05, 160.70, 159.81 (д, J = 244.5 Гц), 152.21, 150.98, 149.84, 148.86, 146.83, 134.99, 133.33 (д, J = 3.3 Гц), 122.90 (д, J = 8.1 Гц, 2C), 122.59 (2C), 121.72 (2C), 116.26, 115.82 (д, J = 22.5 Гц, 2C), 108.82, 103.46, 99.72, 81.71, 70.99, 70.82, 70.73, 70.71, 69.37, 69.12, 68.30, 56.18, 29.30, 28.21 (3C), 17.68 (2C).

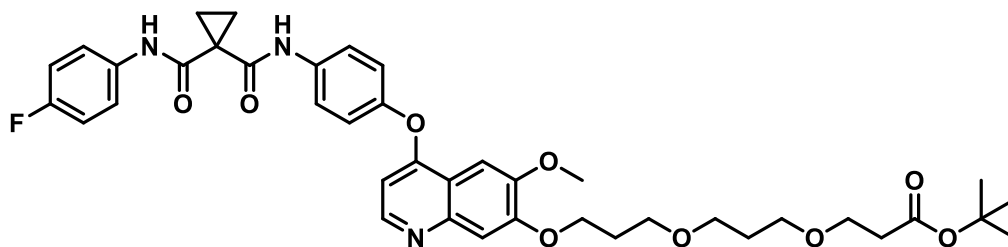
**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = (-121.01) – (-121.13) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub> рассчитано: С, 63.84; Н, 6.04; найдено: С, 63.94; Н, 5.98.

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub> рассчитано: 734.3083; найдено: 734.2926.

**Трет-бутил**

**3-(3-(3-((4-(4-(1-((4-фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)пропокси)пропокси)пропаноат**  
**105b**



Элюент:  $\text{CHCl}_3$  –  $\text{MeOH}$  (29:1  $\rightarrow$  19:1), белое твердое вещество, выход 81%.

$T_{\text{пл}} = 132 - 133\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.70$  (с, 1H), 9.22 (с, 1H), 8.44 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.61 (д,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.51 (с, 1H), 7.46 (дд,  $J = 8.9, 4.8$  Гц, 2H), 7.38 (с, 1H), 7.14 (д,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.01 (т,  $J = 8.6$  Гц, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 4.25 (т,  $J = 6.3$  Гц, 2H), 4.00 (с, 3H), 3.66–3.56 (м, 4H), 3.53–3.44 (м, 4H), 2.44 (т,  $J = 6.5$  Гц, 2H), 2.22–2.12 (м, 2H), 1.85–1.77 (м, 2H), 1.73–1.61 (м, 4H), 1.42 (с, 9H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.15, 169.63, 169.12, 160.71, 159.78$  (д,  $J = 244.5$  Гц), 152.40, 150.99, 149.89, 148.76, 146.90, 134.99, 133.35 (д,  $J = 3.2$  Гц), 122.93 (д,  $J = 8.1$  Гц, 2C), 122.61 (2C), 121.67 (2C), 116.04, 115.77 (д,  $J = 22.6$  Гц, 2C), 108.65, 103.37, 99.62, 80.58, 77.16, 68.00, 67.97, 67.37, 66.54, 66.14, 56.22, 30.07, 29.38, 29.23, 28.18 (3C), 17.70 (2C).

$^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = (-122.00) - (-121.12)$  (м).

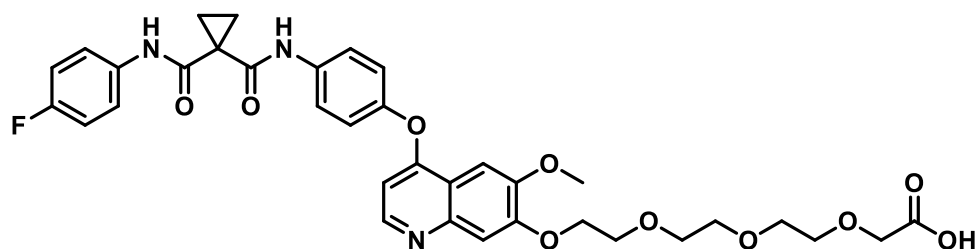
Элементный анализ: для  $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{FN}_3\text{O}_9$  рассчитано: С, 65.65; Н, 6.34; найдено: С: С, 65.60; Н, 6.29

HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{FN}_3\text{O}_9$  рассчитано: 732.3291; найдено: 732.3413.

**Общая методика получения карбоксилированных производных кабозантиниба с линкерами на основе полиэтиленгликоля и 1,3-пропандиола 106a, 106b**

Растворы *трет*-бутиловых эфиров **105a,b** (1.00 эквив.) в TFA (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Растворитель и побочные продукты гидролиза *трет*-бутиловых эфиров были удалены при пониженном давлении, что позволило выделить целевые кислоты с количественным выходом.

**2-(2-(2-(2-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)- фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)этоксид)этоксид)этоксид)уксусная кислота 106a**



**T<sub>пл</sub>** = 139 – 140 °C.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): 10.34 (с, 1H), 10.04 (с, 1H), 8.81 (д, J = 6.6 Гц, 1H), 7.86 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.74 (с, 1H), 7.69–7.60 (м, 3H), 7.38 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.19–7.11 (м, 2H), 6.82 (д, J = 6.6 Гц, 1H), 4.38–4.34 (м, 2H), 4.04 (с, 3H), 4.01 (с, 2H), 3.92–3.87 (м, 2H), 3.67–3.61 (м, 2H), 3.60–3.53 (м, 6H), 1.50 (с, 4H).

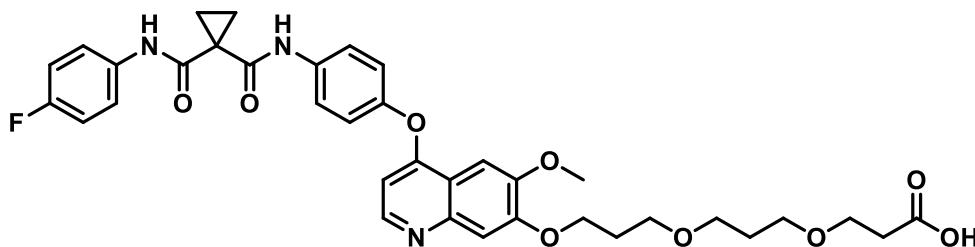
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 171.66, 168.28, 168.22, 158.73, 158.33 (д, J = 240.2 Гц), 155.24, 151.10, 147.92, 143.36, 137.80, 137.28, 135.20 (д, J = 3.1 Гц), 122.47 (д, J = 8.1 Гц, 2C), 122.25 (2C), 121.42 (2C), 115.34, 115.07 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 103.24, 100.85, 100.40, 70.06, 69.86, 69.77 (2C), 68.98, 68.41, 67.58, 56.44, 31.73, 15.44 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ (-121.06) – (-121.17) (m).

**Элементный анализ:** для C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub> рассчитано: С, 62.03; Н, 5.35; найдено: С, 62.10; Н, 5.27.

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub> рассчитано: 678.2457; найдено: 678.2530.

**3-(3-(3-(3-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)пропокси)пропокси) пропановая кислота 106b**



**T<sub>пл</sub>** = 137 – 138 °C.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.34 (с, 1H), 10.04 (с, 1H), 8.82 (д, J = 6.6 Гц, 1H), 7.87 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.73 (с, 1H), 7.68–7.61 (м, 3H), 7.37 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.15 (т, J = 8.8 Гц, 2H), 6.43

(д,  $J = 6.6$  Гц, 1H), 4.28 (т,  $J = 5.9$  Гц, 2H), 4.04 (с, 3H), 3.61–3.48 (м, 4H), 3.47–3.36 (м, 4H), 2.39 (т,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 2.14–2.05 (м, 2H), 1.77–1.66 (м, 2H), 1.40 (с, 4H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 172.69, 168.31, 168.25, 158.79, 158.35$  (д,  $J = 240.1$  Гц), 155.40, 151.21, 147.90, 143.18, 137.86, 137.14, 135.22 (д,  $J = 3.0$  Гц), 122.48 (д,  $J = 8.2$  Гц, 2C), 122.28 (2C), 121.43 (2C), 115.30, 115.08 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 103.19, 100.48, 100.39, 67.13 (2C), 66.63, 66.34, 65.93, 56.51, 34.75, 31.73, 29.52, 28.63, 15.46 (2C).

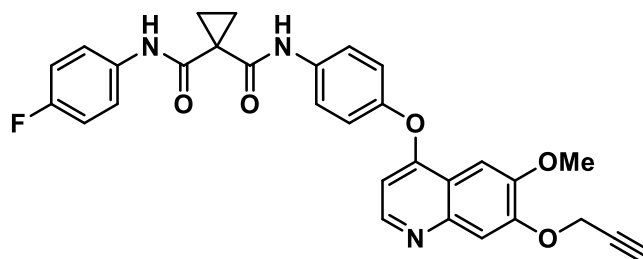
$^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-121.07) - (-121.19)$  (м).

Элементный анализ: для  $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{FN}_3\text{O}_9$  рассчитано: С, 63.99; Н, 5.67; найдено: С, 64.07; Н, 5.62.

### Общая методика получения алкинильных производных кабозантиниба 111a-d

Раствор деметилированного производного кабозантиниба **101** (1.00 эквив.) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3.00 эквив.) в DMF (10 мл) перемешивали в инертной атмосфере при комнатной температуре в течение 15 минут, после чего добавили соответствующий галогеналкин (2.00 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще 12 часов. Растворитель был удален при пониженном давлении. Целевые продукты были выделены при помощи колоночной хроматографии.

### *N*-(4-Фторфенил)-*N*-((4-((6-метокси-7-(проп-2-ин-1-илокси)хинолин-4-ил)окси)-фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид **111a**



Элюент: ПЭ - ЭА (1:1  $\rightarrow$  0:1). Бледно-жёлтое твердое вещество, выход 73%.

$T_{\text{пл}} = 110 - 111$  °C.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.18$  (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.48 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.76 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.53 (с, 1H), 7.50 (с, 1H), 7.25–7.20 (м, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.01 (д,  $J = 2.3$  Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 3.65 (т,  $J = 2.3$  Гц, 1H), 1.48 (с, 4H).

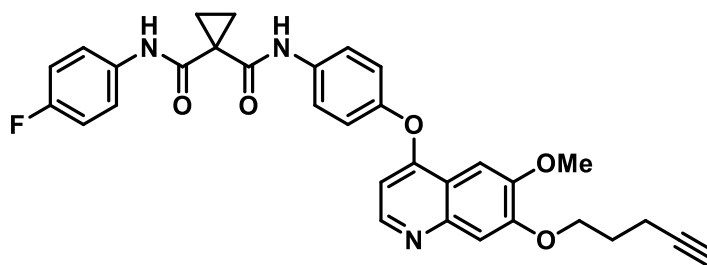
$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 168.14, 168.11, 159.98, 158.26$  (д,  $J = 240.1$  Гц), 150.16, 149.45, 149.31, 148.97, 146.01, 136.41, 135.16 (д,  $J = 2.6$  Гц), 122.41 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2C), 122.17 (2C), 121.15 (2C), 115.59, 115.01 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 109.62, 103.26, 99.40, 78.86, 78.68, 56.06, 55.76, 31.55, 15.39 (2C).

<sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ -118.99-119.13 (m).

Элементный анализ: для C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> рассчитано: С, 68.56; Н, 4.60; найдено: С, 68.51; Н, 4.67.

Масс-спектр (MALDI-TOF): m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> рассчитано: 526.18; найдено: 526.19.

*N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((6-метокси-7-(пент-4-ин-1-илокси)хинолин-4-ил)окси)-фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 111b



Элюент: ПЭ - ЭА (1:1 → 0:1). Бледно-желтое твердое вещество, выход 87%.

Тпл = 113 – 114 °С.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.18 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.47 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.77 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.52 (с, 1H), 7.40 (с, 1H), 7.26–7.20 (м, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.44 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.22 (т, J = 6.2 Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 2.85 (т, J = 2.6 Гц, 1H), 2.42–2.36 (м, 2H), 2.04–1.96 (м, 2H), 1.48 (с, 4H).

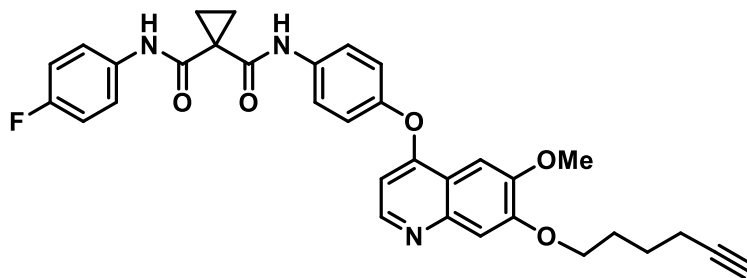
<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 168.14, 168.10, 160.11, 158.26 (д, J = 240.2 Гц), 151.79, 149.44, 149.43, 148.64, 146.06, 136.42, 135.16 (д, J = 2.6 Гц), 122.40 (д, J = 7.8 Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.14 (2C), 115.17, 115.01 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.30, 103.06, 99.28, 83.55, 71.76, 66.77, 55.77, 31.54, 27.53, 15.39, 14.54 (2C).

<sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.99) – (-119.09) (m).

Элементный анализ: для C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> рассчитано: С, 69.43; Н, 5.10; найдено: С, С, 69.51; Н, 5.00.

Масс-спектр (MALDI-TOF): m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> рассчитано: 554.2; найдено: 554.0.

***N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((7-(гекс-5-ин-1-илокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)-фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 111c**



Элюент: ЭА - MeOH (1:0 → 5:1). Белое твердое вещество, выход 54%.

$T_{пл} = 117 - 118\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.18$  (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.76 (д,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.68–7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.39 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 8.2$  Гц, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 4.17 (т,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 2.81–2.78 (м, 1H), 2.42–2.36 (м, 2H), 2.04–1.96 (м, 2H), 1.71–1.58 (м, 2H), 1.48 (с, 4H).

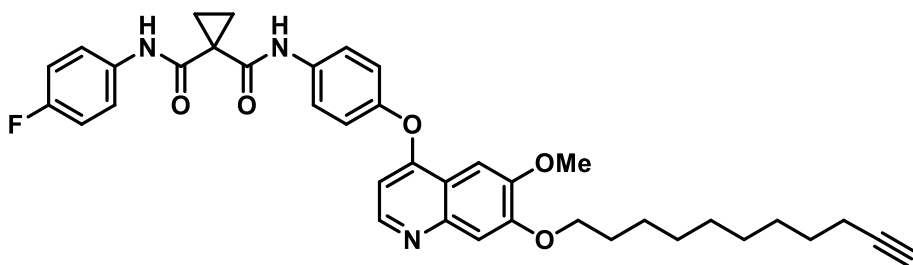
$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 168.16$ , 168.11, 159.92, 158.27 (д,  $J = 240.1$  Гц), 151.82, 149.51, 149.41, 148.77, 146.44, 136.37, 135.16 (д,  $J = 2.6$  Гц), 122.41 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2C), 122.17 (2C), 121.13 (2C), 115.08, 115.01 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.53, 103.00, 99.14, 84.34, 71.41, 67.77, 55.73, 31.52, 27.62, 24.70, 17.46, 15.41 (2 C).

$^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-118.81) - (-118.99)$  (м).

Элементный анализ: для  $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_5$  рассчитано: C, 69.83; H, 5.33; найдено: C, 69.95; H, 5.21.

Масс-спектр (MALDI-TOF):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_5$  рассчитано: 568.2; найдено: 568.0.

***N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((6-метокси-7-(ундек-10-ин-1-илокси)хинолин-4-ил)-окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 111d**



Элюент: ЭА - MeOH (1:1 → 9:1). Маслянистое желтоватое вещество, выход 59%.

$T_{пл} = 120 - 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.18 (с, 1H), 10.06 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.76 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.67–7.62 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.22 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.18–7.12 (м, 2H), 6.42 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.13 (т, J = 6.5 Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 2.72 (т, J = 2.6 Гц, 1H), 2.18–2.10 (м, 2H), 1.85–1.76 (м, 2H), 1.51–1.25 (м, 16H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 168.16, 168.11, 159.92, 158.27 (д, J = 240.1 Гц), 151.90, 149.51, 149.43, 148.73, 146.44, 136.36, 135.16 (д, J = 2.6 Гц), 122.40 (д, J = 7.9 Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.12(2C), 115.03, 115.00 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.44, 102.97, 99.12, 84.54, 71.77, 68.27, 55.70, 31.51, 28.89, 28.71, 28.46, 28.43, 28.11, 27.96, 25.53, 17.66, 15.42 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.98) – (-119.10) (м).

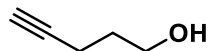
**Элементный анализ:** для C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> рассчитано: C, 71.57; H, 6.32; найдено: C, 71.50; H, 6.39.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> рассчитано: 638.30; найдено: 638.59.

#### Общая методика получения спиртов **115a**, **115b** с терминальной тройной связью

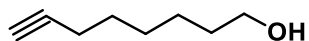
К раствору соответствующей кислоты (**111a**, **111b**, 1.00 эквив.) в THF (20 мл) по каплям прибавили 2.3 М раствор LiAlH<sub>4</sub> в ТГФ (3.00 эквив.) при 0 °С в инертной атмосфере. Реакционную смесь оставили нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 часов. Далее THF был удален при пониженном давлении, к реакционной смеси прилили H<sub>2</sub>O (5 мл) и по каплям 10%-ный водный раствор HCl до значения pH = 5 (определено при помощи индикаторной бумаги). Провели экстракцию Et<sub>2</sub>O (4 x 25 мл). Органическую фазу осушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Последующее фильтрование и удаление растворителя при пониженном давлении позволило выделить соответствующие продукты.

#### Пентин-4-ол-1 (**115a**)



Прозрачное масло, выход 92%. <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C ЯМР спектры соединения **115a** соответствуют литературным данным [371].

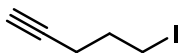
#### Октин-7-ол-1 (**115b**)



Прозрачное масло, выход 75%. <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C ЯМР спектры соединения **115b** соответствуют литературным данным [372].

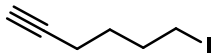
## Получение галогенпроизводных 108-110 с терминальной тройной связью

### 5-Йодопентин-1 (108)



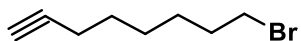
Соединение **108** было получено по методике, описанной в литературе [373], в виде коричневого масла с выходом 90%.  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединения **108** соответствуют литературным данным [374].

### 6-Йодгексин-1 (109)



К раствору 200 мг 6-хлоргексин-1-а **113** (1.72 ммоль, 1.00 эквив.) в ацетоне (10 мл) добавили 837 мг NaI (8.58 ммоль, 5.00 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Затем реакционную смесь перемешивали при 50 °С в течение 12 часов. По завершению реакции растворитель был удален при пониженном давлении. К полученному твердому остатку прилили ЭА (30 мл) и  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (15 мл), провели экстракцию ЭА (3 x 30 мл). Органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали смесь DCM. Выделено 278 мг 7(8%) продукта **109** в виде желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединения **108** соответствуют литературным данным [375].

### 8-Бромоктин-1 (110)

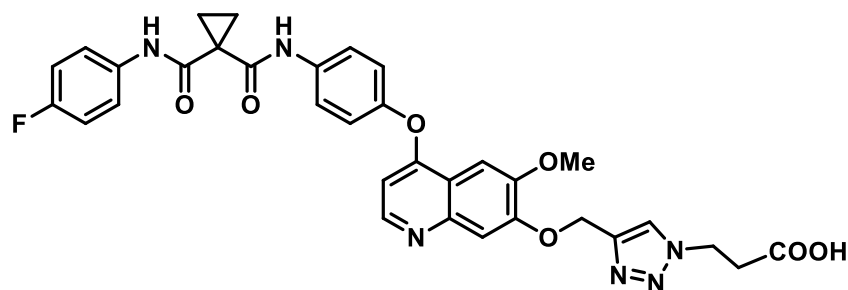


Смесь 1849 мг  $\text{CBr}_4$  (5.52 ммоль, 1.20 эквив.), 3652 мг  $\text{Ph}_3\text{P}$  (13.80 ммоль, 3.00 эквив.) в DCM (30 мл) в инертной атмосфере при комнатной температуре перемешивали в течение 15 минут до появления коричневой окраски раствора. Далее к указанной смеси прилили раствор 581 мг спирта **115b** (4.60 ммоль, 1.00 эквив.) в DCM (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов при комнатной температуре. После этого добавили 20 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и провели экстракцию DCM (4 x 40 мл). Органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали DCM. Выделено 635 мг (73%) продукта **110** в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединения **110** соответствуют литературным данным [376].

## Общая методика получения карбоксилированных производных кабозантиниба с триазол-содержащими линкерами **112a-d**

К раствору соответствующего производного кабозантиниба, содержащего линкер с терминальной тройной связью **111a-d** (1.00 эквив.) и 2-азидоуксусной кислоты (1.00 эквив.) в DMF (3 мл) добавили смесь  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.20 эквив.), ТВТА (0.40 эквив.), AscNa (0.20 эквив.) и  $\text{H}_2\text{O}$  (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при 55 °С в течение 1 часа, после чего растворитель был удален при пониженном давлении. Продукты выделяли с помощью колоночной хроматографии,

### **3-(4-(((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)-фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропановая кислота **112a****



Элюент: ЭА - MeOH (9:1 → 7:3). Бледно-желтое твердое вещество, выход 64%.

$T_{\text{пл}}$  = 115 – 116 °С.

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 10.25 (с, 1H), 10.13 (с, 1H), 8.45 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 8.28 (с, 1H), 7.77 (д,  $J$  = 9.0 Гц, 2H), 7.68–7.62 (м, 2H), 7.51 (с, 1H), 7.22 (д,  $J$  = 9.0 Гц, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.43 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 5.29 (с, 2H), 4.56 (т,  $J$  = 6.8 Гц, 2H), 3.90 (с, 3H), 3.65 (т,  $J$  = 2.3 Гц, 2H), 2.76 (т,  $J$  = 6.7 Гц, 2H), 1.48 (с, 4H).

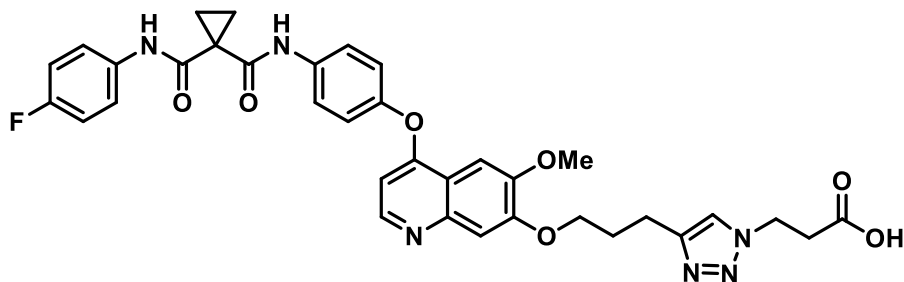
**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 172.48, 168.18 (д,  $J$  = 2.9 Гц, 2C), 168.19, 168.16), 159.95, 158.25 (д,  $J$  = 240.2 Гц), 151.23, 149.46, 149.32, 148.85, 146.29, 141.79, 136.42, 135.20 (д,  $J$  = 2.6 Гц), 125.11, 122.39 (д,  $J$  = 7.9 Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.15 (2C), 115.31, 115.00 (д,  $J$  = 22.2 Гц, 2C), 109.10, 103.11, 99.22, 61.68, 55.64, 46.31, 35.64, 31.62, 15.36 (2C).

**$^{19}\text{F}$  ЯМР** (376 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = (-119.02) – (-119.13) (м).

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{FN}_6\text{O}_7$  рассчитано: С, 61.87; Н, 4.56; найдено: С, 62.98; Н, 4.5.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{FN}_6\text{O}_7$  рассчитано: 641.22; найдено: 641.90.

**3-(4-(3-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)-фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)пропил)-1Н-1,2,3-триазол-1-ил)пропановая кислота 112b**



Элюент: ЭА - MeOH (1:0 → 5:1). Бледно-желтое твердое вещество, выход 87%.

$T_{пл} = 120 - 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.22$  (с, 1H), 10.11 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.90 (с, 1H), 7.76 (д,  $J = 8.9$  Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.18–7.12 (м, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 4.46 (т,  $J = 6.9$  Гц, 2H), 4.20 (т,  $J = 6.3$  Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 2.81 (т,  $J = 7.5$  Гц, 2H), 2.63 (т,  $J = 7.0$  Гц, 2H), 2.18–2.08 (дд,  $J = 14.0, 6.5$  Гц, 2H), 1.47 (с, 4H).

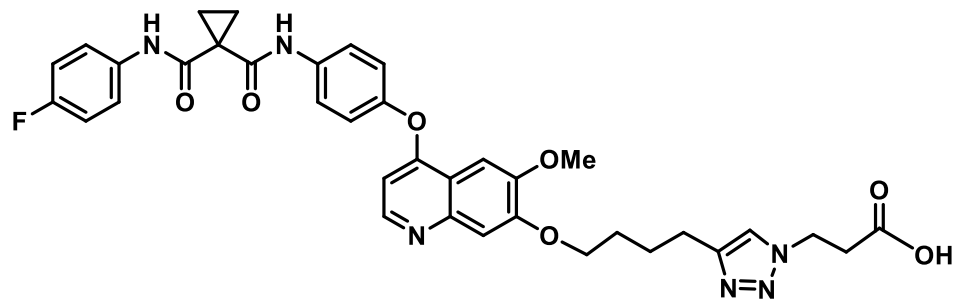
$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 172.47, 168.19, 168.17, 159.96, 158.28$  (д,  $J = 240.0$  Гц), 151.83, 149.51, 149.45, 148.80, 146.39, 145.84, 136.40, 135.20 (д,  $J = 2.6$  Гц), 128.75, 122.42 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2C), 122.19 (2C), 121.17 (2C), 115.12, 115.03 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.53, 103.03, 99.20, 67.61, 55.76, 46.53, 36.56, 31.61, 28.36, 21.71, 15.37 (2C).

$^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-119.00) - (-119.10)$  (м).

Элементный анализ: для  $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{FN}_6\text{O}_7$  рассчитано: C, 62.87; H, 4.97; найдено: C, 62.95; H, 4.85.

Масс-спектр (MALDI-TOF):  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{FN}_6\text{O}_7$  рассчитано: 669.2; найдено: 669.0.

**3-(4-(4-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)-фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)бутил)-1Н-1,2,3-триазол-1-ил)пропановая кислота 112c**



Элюент: ЭА - MeOH (1:0 → 7:3). Бледно-желтое твердое вещество, выход 75%.

$T_{пл} = 121 - 122\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.22 (с, 1H), 10.10 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.84 (с, 1H), 7.76 (д, J = 8.0 Гц, 2H), 7.67–7.62 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.24–7.21 (м, 2H), 7.17–7.12 (м, 2H), 6.42 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.47 (т, J = 6.9 Гц, 2H), 4.16 (т, J = 6.1 Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 2.76–2.67 (м, 4H), 1.90–1.74 (м, 4H), 1.48 (с, 4H).

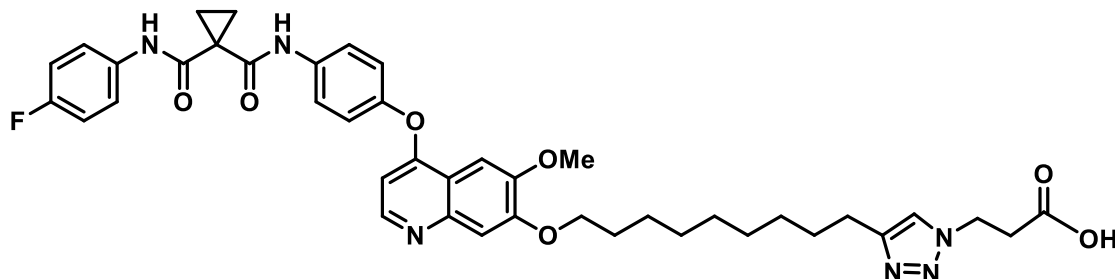
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 172.40, 168.16, 168.12, 159.93, 158.25 (д, J = 240.1 Гц), 151.86, 149.48, 149.41, 148.74, 146.41, 146.39, 136.39, 135.19 (д, J = 2.6 Гц), 122.39 (д, J = 7.9 Гц, 2C), 122.15 (2C), 121.95, 121.14 (2C), 115.04, 115.00 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.45, 102.98, 99.12, 68.04, 55.71, 45.90, 35.52, 31.59, 28.02, 25.59, 24.68, 15.35 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ -119.01 – -119.12 (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: С, 63.34; Н, 5.17; найдено: С, 63.30; Н, 5.23.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: 683.3; найдено: 683.0.

**3-(4-(9-((4-(4-(1-((4-Фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)-фенокси)-6-метоксхинолин-7-ил)окси)нонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропановая кислота 112d**



Элюент: ЭА - MeOH (1:1 → 5:1). Бледно-желтое твердое вещество, выход 64%.

T<sub>пл</sub> = 123 – 124 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.24 (с, 1H), 10.12 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.80–7.75 (м, 3H), 7.68–7.62 (м, 2H), 7.49 (с, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.21 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.41 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.43 (т, J = 7.0 Гц, 2H), 4.13 (т, J = 6.4 Гц, 2H), 3.92 (с, 3H), 2.63–2.54 (м, 4H), 1.85–1.74 (м, 2H), 1.61–1.53 (м, 2H), 1.51–1.28 (м, 14H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): 172.42, 168.16, 168.11, 159.93, 158.25 (д, J = 240.1 Гц), 151.85, 149.48, 149.43, 148.72, 146.44, 146.40, 136.36, 135.15 (д, J = 2.6 Гц), 122.39 (д, J = 7.9 Гц, 2C), 122.15 (2C), 121.95, 121.12 (2C), 115.03, 115.01 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.43, 102.97, 99.12, 68.27, 55.70, 45.94, 35.52, 31.51, 28.89, 28.71, 28.46, 28.43, 28.11, 27.96, 26.00, 25.53, 15.42 (2C).

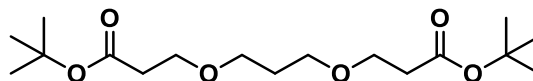
**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.98) – (-119.10) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>41</sub>H<sub>45</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>7</sub> рассчитано: С, 65.41; Н, 6.03; найдено: С, 65.50; Н, 5.90.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $C_{41}H_{45}FN_6O_7$  рассчитано: 753.34; найдено: 753.97.

### Синтез линкеров (соединения 166-168)

#### Синтез ди-трет-бутил-3,3'-(пропан-1,3-диилбис(окси))дипропионата 166



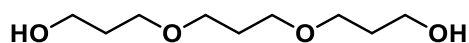
К раствору 3000 мкл (41.66 ммоль, 1.00 эквив) 1,3-пропандиола **164** в 50 мл ацетонитрила прилили 18280 мкл (124.98 ммоль, 3.00 эквив) бутилакрилата **165** и 3300 мкл 40%-ного раствора бензилтриметиламмония (triton-B) в воде (8.33 ммоль, 0.20 эквив). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, после чего растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был выделен при помощи колоночной хроматографии. Элюент: ПЭ – ЭА (1:0 → 10:1). Выделено 10770 мг (78%) продукта в виде прозрачной вязкой жидкости.

**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 3.62 (т,  $J$  = 6.5 Гц, 4H), 3.47 (т,  $J$  = 6.4 Гц, 4H), 2.44 (т,  $J$  = 6.5 Гц, 4H), 1.78 (дт,  $J$  = 12.7, 6.3 Гц, 2H), 1.43 (с, 18H).

**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 171.07 (2C), 80.53 (2C), 67.97 (2C), 66.56 (2C), 36.45 (2C), 30.01, 28.20 (6C).

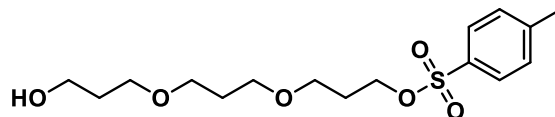
**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $C_{17}H_{32}O_6$   $[M]^+$   $m/z$  332.2; найдено 332.3; рассчитано для  $C_{17}H_{32}O_6$   $[M+Na]^+$   $m/z$  355.2; найдено 355.3.

#### Синтез 3,3'-(пропан-1,3-диилбис(окси))бис(пропан-1-ола) 167



К раствору 1300 мг эфира **166** (39.00 ммоль, 1.00 эквив.) в 50 мл ТГФ добавили 5200 мкл 2.3 М р-ра  $LiAlH_4$  в ТГФ (117.00 ммоль, 3.00 эквив.) при 0 °С в инертной атмосфере. Температуру реакционной смеси постепенно увеличили до 70 °С и перемешивали в течение 12 часов. После этого растворитель был удален при пониженном давлении, к твердому остатку прибавили 50 мл ЭА и 10 мл  $H_2O$ , при помощи 5% водного раствора  $HCl$  подкислили водный слой до  $pH = 5$ . Провели экстракцию ЭА (4 x 50 мл). Органический слой осушили над  $Na_2SO_4$ , затем растворитель был удален при пониженном давлении. Выделено 449 мг (60%) продукта в виде прозрачной вязкой жидкости.  $^1H$  ЯМР и  $^{13}C$  ЯМР спектры соединения **167** соответствуют литературным данным [377].

### Синтез 3-(3-(3-гидроксипропокси)пропокси)пропил 4-метилбензолсульфоната **168**

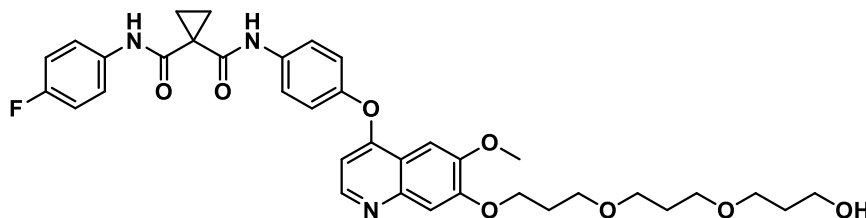


К раствору 1800 мг спирта **167** (9.00 ммоль, 1.00 эквив.) в 50 мл DCM добавили 3200 мг Ag<sub>2</sub>O (14.00 ммоль, 1.50 эквив.), 500 мг KI (4.00 ммоль, 0.40 эквив.) и 1900 мг TsCl (10.00 ммоль, 1.04 эквив.) при 0 °C в инертной атмосфере. Реакционную смесь оставили нагреваться до комнатной температуры, перемешивание велось в течение 12 часов, затем растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали смесь ПЭ - ЭА (1:1 → 0:1), затем ЭА - MeOH (9:1). Выделено 1340 мг (43%) продукта **168** в виде желтого масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.79–7.73 (м, 2H), 7.32 (д, J = 8.0 Гц, 2H), 3.75–3.70 (м, 2H), 3.57 (т, J = 5.8 Гц, 2H), 3.47–3.35 (м, 8H), 2.42 (с, 3H), 1.86 (п, J = 6.1 Гц, 2H), 1.83–1.76 (м, 2H), 1.76–1.69 (м, 2H).

### Синтез алкилированных производных кабозантиниба **169-172**

Синтез производного кабозантиниба, содержащего линкер с гидроксильной группой, N-(4-фторфенил)-N-(4-((7-(3-(3-(3-гидроксипропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксиамида **169**



К раствору 489 мг деметилированного производного кабозантиниба **101** (1.00 ммоль, 1.00 эквив.) в DMF (10 мл) добавили 978 мг Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.00 ммоль, 3.00 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавили 460 мг линкера **168** (1.30 ммоль, 1.30 эквив.) и оставили реакционную смесь перемешиваться в течение 12 часов. Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали систему ЭА - MeOH (1:0 → 10:1). Выделено 354 мг (51%) продукта **169** в виде густого светло-желтого масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.18 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.46 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 7.76 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.70–7.59 (м, 2H), 7.51 (с, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.23 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.19–7.11 (м,

2H), 6.43 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.36 (с, 1H), 4.20 (т, J = 6.3 Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 3.56 (т, J = 6.2 Гц, 2H), 3.49–3.35 (м, 8H), 2.04 (п, J = 6.3 Гц, 2H), 1.73 (п, J = 6.4 Гц, 2H), 1.60 (п, J = 6.4 Гц, 2H), 1.48 (с, 4H).

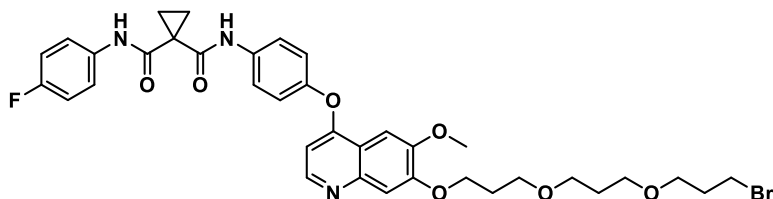
<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 168.14, 168.10, 159.98, 158.26 (д, J = 240.1 Гц, 1H), 151.85, 149.46, 149.43, 148.74, 146.31, 136.39, 135.16 (д, J = 2.5 Гц), 122.40 (д, J = 7.8, 2C), 122.16 (2C), 121.14 (2C), 115.12, 115.01 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.42, 103.02, 99.19, 67.18, 67.14, 67.01, 66.52, 65.43, 57.79, 55.74, 32.70, 31.55, 29.64, 28.90, 15.38 (2C).

<sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.99) – (-119.10) (м).

Элементный анализ: рассчитано для C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: C, 65.34; H, 6.09; найдено: C, 65.40; H, 6.15.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 662.3; найдено 662.2.

**Синтез производного кабозантиниба, содержащего линкер с бромом, N-(4-((7-(3-(3-(3-бромпропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-N-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксиамида 170**



Смесь 201 мг СВг<sub>4</sub> (0.600 ммоль, 1.20 эквив.), 397 мг Ph<sub>3</sub>P (1.50 моль, 3.00 эквив.) в DCM (7 мл) в инертной атмосфере при комнатной температуре перемешивали в течение 15 минут до появления коричневой окраски раствора. Далее к указанной смеси прилили раствор 334 мг спирта **169** (0.50 ммоль, 1.00 эквив.) в DCM (7 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов при комнатной температуре. После этого добавили 15 мл H<sub>2</sub>O и провели экстракцию DCM (4×20 мл). Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали ПЭ - ЭА (1:1 → 0:1), затем ЭА - MeOH (9:1). Выделено 177 мг (49%) продукта **169** в виде желтого масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.18 (с, 1H), 10.04 (с, 1H), 8.48 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 7.77 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.66–7.60 (м, 2H), 7.52 (с, 1H), 7.39 (с, 1H), 7.23 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.18–7.12 (м, 2H), 6.45 (д, J = 5.4 Гц, 1H), 4.21 (т, J = 6.3 Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 3.59–3.39 (м, 10H), 2.08–2.01 (м, 2H), 2.00–1.93 (м, 2H), 1.74 (п, J = 6.4 Гц, 2H), 1.48 (с, 4H).

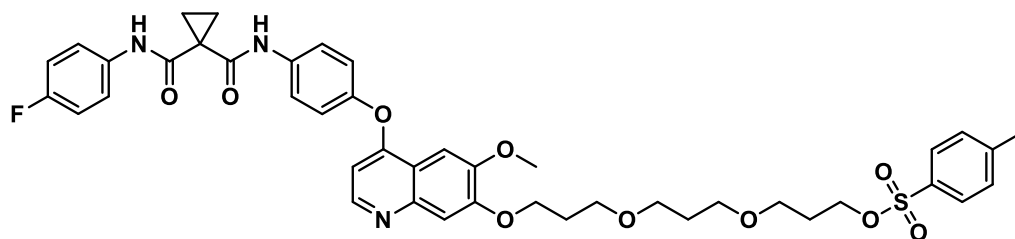
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 168.15, 168.11, 160.42, 158.26 (д, J = 240.1 Гц), 152.11, 149.55, 149.35, 148.36, 145.56, 136.49, 135.16 (д, J = 2.5 Гц), 122.41 (д, J = 7.8, 2C), 122.16 (2C), 121.15 (2C), 115.11, 115.02 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 107.87, 103.04, 99.28, 67.50, 67.06, 67.00, 66.50, 65.50, 55.80, 32.31, 31.74, 31.56, 29.53, 28.88, 15.39 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.98) – (-119.09) (м).

**Элементный анализ:** рассчитано для C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: С, 59.67; Н, 5.43; найдено: С, 59.60; Н, 5.35.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M-Br]<sup>+</sup> m/z 644.3; найдено 644.2; рассчитано для C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>BrFN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [2M-Br]<sup>+</sup> m/z 1369.6; найдено 1369.2 (<sup>81</sup>Br).

**Синтез тозилированного производного кабозантиниба, 3-(3-(3-((4-(4-(1-((4-фторфенил)карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-илокси)пропокси)пропокси)пропил 4-метилбензолсульфоната 171**



К смеси 75 мг спирта **169** (0.11 ммоль, 1.00 эквив.), 46 мкл (0.33 ммоль, 3.00 эквив.) ТЕА, и 7 мг (0.06 ммоль, 0.50 эквив.) DMAP в растворе DCM (5 мл) добавили 63 мг TsCl (0.33 ммоль, 3.00 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Затем реакционную смесь перемешивали при 40 °С в течение часа. По завершению реакции растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (1:1 → 0:1), затем ЭА - MeOH (10:1). Выделено 70 мг (78%) продукта **170** в виде белого порошка.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.18 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.46 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 7.79 – 7.73 (м, 4H), 7.68 – 7.60 (м, 2H), 7.51 (с, 1H), 7.46 (д, J = 8.0 Гц, 2H), 7.38 (с, 1H), 7.23 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.18 – 7.12 (м, 2H), 6.43 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 4.20 (т, J = 6.3 Гц, 2H), 4.02 (т, J = 6.2 Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 3.57 – 3.50 (м, 2H), 3.37 (т, J = 6.5 Гц, 2H), 3.28-3.23 (м, 4H), 2.40 (с, 3H), 2.07 – 1.99 (м, 2H), 1.75 (п, J = 6.1 Гц, 2H), 1.63 (п, J = 6.4 Гц, 2H), 1.47 (с, 4H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 168.15, 168.11, 159.73, 158.26 (д, J = 239.8 Гц), 151.83, 149.59, 149.28, 148.81, 146.75, 144.86, 136.58, 135.17 (д, J = 2.6 Гц), 132.32, 130.13 (2C), 127.56 (2C), 122.41 (д, J = 8.0 Гц, 2C), 122.17 (2C), 121.18 (2C), 115.11, 115.03 (д, J = 22.2 Гц, 2C),



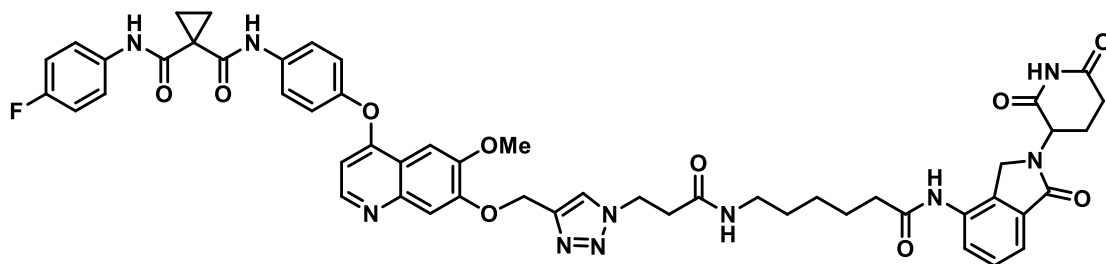
## Получение молекул PROTAC на основе кабозантиниба

### Общая методика получения PROTACs 121a-d, 122a, 122b, 123a-d

К раствору соответствующего лиганда к E3-лигазе (1.00 эквив.) в DMF (3 мл) в инертной атмосфере последовательно добавили карбоксилатные производные кабозантиниба **104a-b**, **106a-b**, **112a-d** (1.00 эквив.), DIPEA (2.50 эквив.) и HATU (1.20 эквив.).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1.5 часов с последующим удалением растворителя при пониженном давлении. Целевые продукты были выделены при помощи колоночной хроматографии.

*N*-(4-((7-((1-(3-((6-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)-амино)-6-оксогексил)амино)-3-оксопропил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)-6-метокси-хинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид **121a**



Элюент: ЭА - MeOH (9:1 → 7:3). Белый порошок, выход 48%.

**Тпл** = 173 – 174 °C.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 11.01 (с, 1H), 10.20 (с, 1H), 10.08 (с, 1H), 9.83 (с, 1H), 8.47 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 8.28 (с, 1H), 8.04–7.97 (м, 1H), 7.83–7.79 (м, 1H), 7.76 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 3H), 7.52–7.44 (м, 3H), 7.22 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.43 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 5.31 (с, 2H), 5.13 (дд, J = 13.3, 5.1 Гц, 1H), 4.59 (т, J = 6.7 Гц, 2H), 4.36 (квад., J = 17.5 Гц, 2H), 3.90 (с, 3H), 3.02 (дд, J = 12.7, 6.6 Гц, 2H), 2.96–2.85 (м, 1H), 2.72 (т, J = 6.8 Гц, 2H), 2.64–2.54 (м, 1H), 2.40–2.30 (м, 3H), 2.05–2.00 (м, 1H), 1.63–1.53 (м, 2H), 1.48 (с, 4H), 1.43–1.34 (м, 2H), 1.31–1.21 (м, 2H).

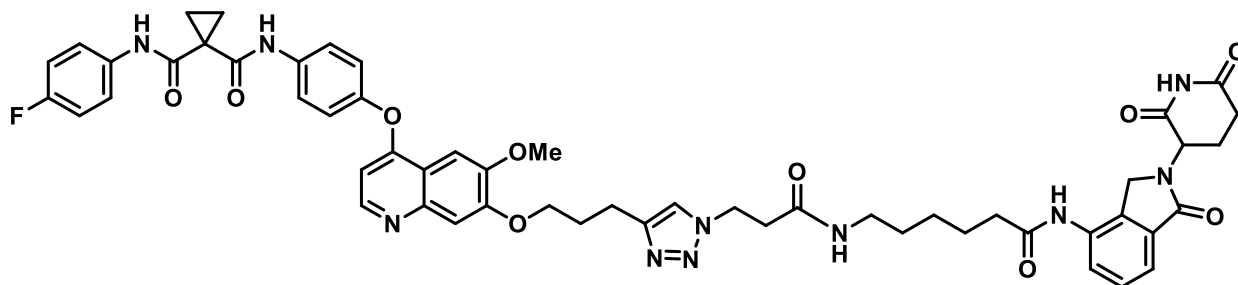
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.88, 171.35, 171.06, 168.72, 168.21, 168.16, 167.85, 159.96, 158.28 (д, J = 240.2 Гц), 151.20, 149.48, 149.34, 148.87, 146.28, 141.87, 136.41, 135.18 (д, J = 2.7 Гц), 133.82, 133.70, 132.65, 128.59, 125.29, 125.12, , 122.44 (д, J = 7.9 Гц, 2C), 122.20 (2C), 121.17 (2C), 118.95, 115.34, 115.03 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 109.13, 103.13, 99.26, 66.36, 55.68, 51.56, 46.56, 45.96, 38.43, 35.73, 35.48, 31.59, 31.22, 28.79, 26.04, 24.79, 22.62, 15.41 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = (-118.79) – (-118.91) (м).

**Элементный анализ:** для  $C_{52}H_{51}FN_{10}O_{10}$  рассчитано: С, 62.77; Н, 5.17; найдено: С, 62.84; Н, 5.10.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $C_{52}H_{51}FN_{10}O_{10}$  рассчитано: 995.3846; найдено: 995.3833.

*N*-(4-((7-(3-(1-(3-((6-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)-6-оксогексил)амино)-3-оксопропил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)пропокси)-6-метокси-хинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид **121b**



Элюент: ЭА - MeOH (9:1  $\rightarrow$  7:3). Белый порошок, выход 45%.

$T_{пл}$  = 175 – 176 °С.

**$^1H$  ЯМР** (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  11.02 (с, 1H), 10.20 (с, 1H), 10.07 (с, 1H), 9.81 (с, 1H), 8.45 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 7.97 (т,  $J$  = 6.6 Гц, 1H), 7.84–7.79 (м, 2H), 7.76 (д,  $J$  = 9.0 Гц, 2H), 7.67–7.62 (м, 2H), 7.52–7.47 (м, 3H), 7.37 (с, 1H), 7.24–7.20 (м, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.42 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 5.13 (дд,  $J$  = 13.3, 5.1 Гц, 1H), 4.51 (т,  $J$  = 6.9 Гц, 2H), 4.36 (квад.,  $J$  = 17.5 Гц, 2H), 4.19 (т,  $J$  = 6.3 Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 3.01 (дд,  $J$  = 12.6, 6.7 Гц, 2H), 2.96–2.85 (м, 1H), 2.82 (т,  $J$  = 7.5 Гц, 2H), 2.67 (т,  $J$  = 6.9 Гц, 2H), 2.64–2.56 (м, 1H), 2.38–2.30 (м, 3H), 2.18–2.09 (м, 2H), 2.05–2.00 (м, 1H), 1.62–1.52 (м, 2H), 1.48 (с, 4H), 1.37 (дт,  $J$  = 14.3, 7.1 Гц, 2H), 1.25 (дд,  $J$  = 15.1, 8.1 Гц, 2H).

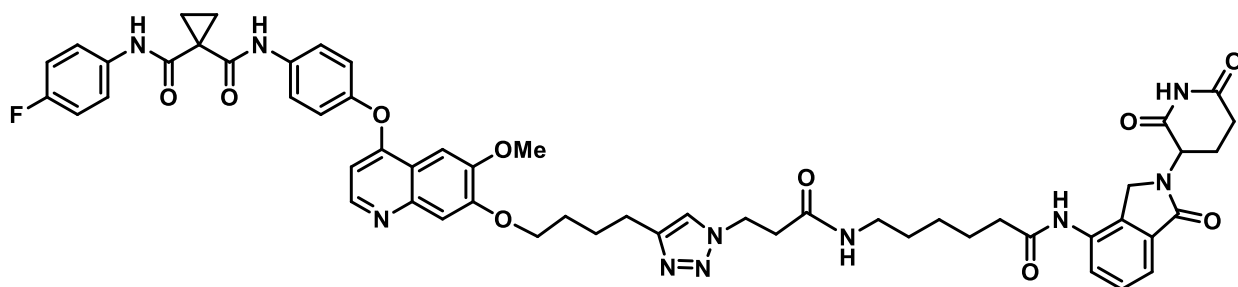
**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.84, 171.30, 171.05, 168.76, 168.17, 168.13, 167.82, 159.93, 158.26 (д,  $J$  = 240.2 Гц), 151.79, 149.48, 149.41, 148.79, 146.40, 145.87, 136.39, 135.17 (д,  $J$  = 2.5 Гц), 133.81, 133.68, 132.64, 128.56, 125.23, 122.40 (д,  $J$  = 7.8 Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.14 (2C), 118.92, 118.85, 115.10, 115.01 (д,  $J$  = 22.2 Гц, 2C), 108.55, 103.01, 99.19, 67.50, 55.74, 51.53, 46.52, 45.78, 38.38, 35.69, 31.57, 31.20, 28.81, 28.33, 25.99, 24.76, 22.62 (2C), 21.62, 15.39 (2C).

**$^{19}F$  ЯМР** (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  = (-119.00) – (-119.10) (м).

**Элементный анализ:** для  $C_{54}H_{55}FN_{10}O_{10}$  рассчитано: С, 63.40; Н, 5.42; найдено: С, 63.45; Н, 5.36.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $C_{54}H_{55}FN_{10}O_{10}$  рассчитано: 1023.4159; найдено: 1023.4166.

***N*-(4-((7-(4-(1-(3-((6-((2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)-6-оксогексил)амино)-3-оксопропил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)бутокс)-6-метоксифенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 121с**



Элюент: ЭА - MeOH (9:1 → 7:3). Бледно-желтое твердое вещество, выход 87%.

$T_{пл} = 179 - 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 11.02$  (с, 1H), 10.18 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 9.77 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.95 (т,  $J = 5.5$  Гц, 1H), 7.82–7.74 (м, 4H), 7.67–7.62 (м, 2H), 7.51–7.44 (м, 3H), 7.38 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.19–7.11 (м, 2H), 6.41 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.14 (дд,  $J = 13.4, 5.1$  Гц, 1H), 4.50 (т,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 4.36 (квад.,  $J = 17.5$  Гц, 2H), 4.16 (т,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 3.94 (с, 3H), 3.03 (дд,  $J = 12.7, 6.6$  Гц, 2H), 2.96–2.85 (м, 1H), 2.73–2.64 (м, 4H), 2.64–2.56 (м, 1H), 2.38–2.30 (м, 3H), 2.06–2.01 (м, 1H), 1.88–1.75 (м, 4H), 1.62–1.53 (м, 2H), 1.48 (с, 4H), 1.42–1.33 (м, 2H), 1.30–1.22 (м, 2H).

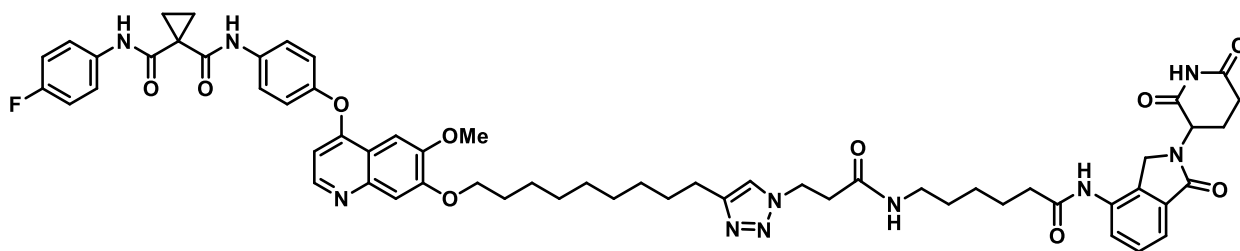
**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = 172.83, 171.26, 171.05, 168.77, 168.15, 168.10, 167.80, 159.92, 158.25$  (д,  $J = 240.1$  Гц), 151.85, 149.48, 149.39, 148.77, 146.42, 146.38, 136.37, 135.16 (д,  $J = 2.6$  Гц), 133.78, 133.67, 132.63, 128.56, 125.22, 122.40 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2C), 122.15 (2C), 122.00, 121.14 (2C), 118.93, 115.04, 115.01 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.47, 102.98, 99.12, 68.02, 55.71, 51.52, 46.48, 38.37, 35.70 (2C), 31.55, 31.20, 28.82, 27.97, 25.99, 25.60, 24.76, 24.63, 22.62 (2C), 15.38 (2C).

**$^{19}\text{F}$  ЯМР** (376 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta = (-119.00) - (-119.11)$  (м).

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{55}\text{H}_{57}\text{FN}_{10}\text{O}_{10}$  рассчитано: С, 63.70; Н, 5.54; найдено: С, 63.65; Н, 5.62.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{55}\text{H}_{57}\text{FN}_{10}\text{O}_{10}$  рассчитано: 1037.4316; найдено: 1037.4320.

***N*-(4-((7-((9-(1-(3-((6-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)-амино)-6-оксогексил)амино)-3-оксопропил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)нонил)окси)-6-метокси-хинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 121d**



Элюент: ЭА - MeOH (9:1 → 7:3). Бледно-желтый порошок, выход 42%.

$T_{пл} = 185 - 186\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.02$  (с, 1H), 10.20 (с, 1H), 10.08 (с, 1H), 9.83 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.97 (т,  $J = 6.5$  Гц, 1H), 7.82 (дд,  $J = 7.1, 1.8$  Гц, 1H), 7.76 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.70 (с, 1H), 7.67–7.62 (м, 2H), 7.51–7.46 (м, 3H), 7.37 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.18–7.12 (м, 2H), 6.41 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.14 (дд,  $J = 13.3, 5.1$  Гц, 1H), 4.49 (т,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 4.37 (квд.,  $J = 17.6$  Гц, 2H), 4.12 (т,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 3.92 (с, 3H), 3.02 (дд,  $J = 12.6, 6.7$  Гц, 2H), 2.96–2.85 (м, 1H), 2.68–2.61 (м, 3H), 2.59–2.54 (м, 2H), 2.38–2.31 (м, 3H), 2.05–1.99 (м, 1H), 1.83–1.77 (м, 2H), 1.62–1.53 (м, 4H), 1.50–1.24 (м, 18H).

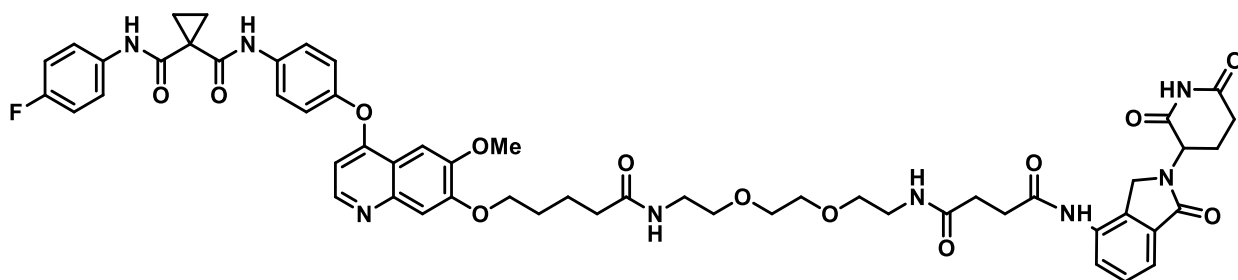
**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 172.84, 171.29, 171.04, 168.78, 168.18, 168.14, 167.82, 159.92, 158.25$  (д,  $J = 239.9$  Гц), 151.90, 149.48, 149.43, 148.75, 146.65, 146.45, 136.39, 135.18 (д,  $J = 2.4$  Гц), 133.83, 133.64, 132.64, 128.55, 125.19, 122.40 (д,  $J = 7.7$  Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.79, 121.13 (2C), 118.90, 115.02, 115.01 (д,  $J = 22.1$  Гц, 2C), 108.46, 102.98, 99.13, 68.27, 55.71, 51.53, 46.53, 45.68, 38.36, 35.69 (2C), 31.57, 31.20, 29.02, 28.94, 28.82, 28.76 (2C), 28.58, 28.46, 26.00, 24.97, 24.78, 22.63 (2C), 15.38 (2C).

**$^{19}\text{F}$  ЯМР** (376 МГц, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = (-119.02) - (-119.13)$  (м).

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{60}\text{H}_{67}\text{FN}_{10}\text{O}_{10}$  рассчитано: С, 65.09; Н, 6.10; найдено: С, 64.98; Н, 6.15.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{60}\text{H}_{67}\text{FN}_{10}\text{O}_{10}$  рассчитано: 1107.5098; найдено: 1107.5064.

***N*-(4-((7-((1-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)-1,4,15-триоксо-8,11-диокса-5,14-дiazанонадекан-19-ил)окси)-6-метоксифенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 122a**



Элюент: ЭА - MeOH (9:1 → 7:3). Белый порошок, выход 37%.

$T_{пл} = 190 - 191\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 11.02$  (с, 1H), 10.19 (с, 1H), 10.07 (с, 1H), 9.88 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.95 (т,  $J = 5.5$  Гц, 1H), 7.90 (т,  $J = 5.5$  Гц, 1H), 7.82 (дд,  $J = 6.8, 2.1$  Гц, 1H), 7.76 (д,  $J = 8.9$  Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.51–7.45 (м, 3H), 7.38 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.18–7.11 (м, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.14 (дд,  $J = 13.3, 5.1$  Гц, 1H), 4.35 (квад.,  $J = 17.6$  Гц, 2H), 4.14 (т,  $J = 6.3$  Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 3.51–3.47 (м, 4H), 3.44–3.37 (м, 4H), 3.20 (п,  $J = 5.7$  Гц, 4H), 2.97–2.86 (м, 1H), 2.66–2.55 (м, 3H), 2.43 (т,  $J = 7.1$  Гц, 2H), 2.38–2.24 (м, 1H), 2.18 (т,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 2.06–1.99 (м, 1H), 1.84–1.74 (м, 2H), 1.74–1.64 (м, 2H), 1.48 (с, 4H).

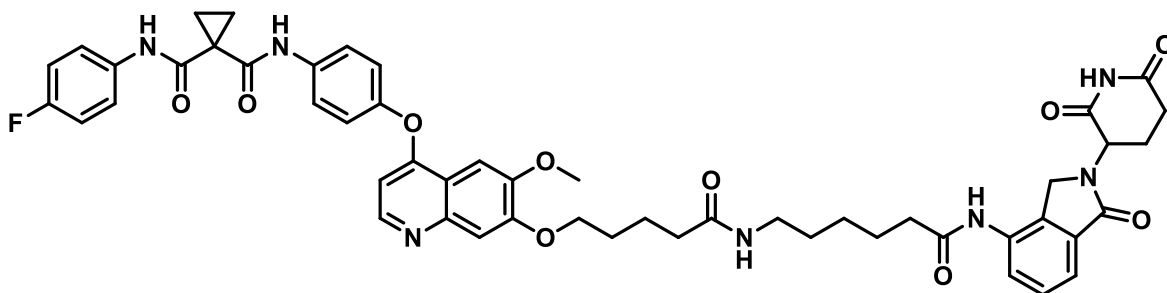
**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 172.83, 172.05, 171.26, 171.03, 170.68, 168.17, 168.12, 167.83, 159.92, 158.26$  (д,  $J = 240.1$  Гц), 151.85, 149.49, 149.40, 148.77, 146.43, 136.38, 135.17 (д,  $J = 2.6$  Гц), 133.82, 133.49, 132.62, 128.59, 124.97, 122.41 (д,  $J = 7.9$  Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.14 (2C), 118.84, 115.04, 115.01 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.47, 102.98, 99.13, 71.76, 69.51, 69.16, 69.11, 67.97, 55.72, 51.50, 46.43, 38.58, 38.47, 34.87, 31.57, 31.19, 30.69, 30.31, 27.99, 22.68, 21.97, 15.39 (2C).

**$^{19}\text{F}$  ЯМР** (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-119.00) - (-119.09)$  (м).

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{55}\text{H}_{59}\text{FN}_8\text{O}_{13}$  рассчитано: С, 62.37; Н, 5.62; найдено: С, 62.30; Н, 5.70.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{55}\text{H}_{59}\text{FN}_8\text{O}_{13}$  рассчитано: 1059.4258; найдено: 1059.4221.

***N*-(4-((7-((5-((6-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)-6-оксогексил)амино)-5-оксопентил)окси)-6-метоксифенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 122b**



Элюент: ЭА - МеОН (1:1 → 7:3). Бежевый порошок, Выход 57%.

**Тпл** = 183 – 184 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 11.01 (с, 1H), 10.18 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 9.78 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.84–7.79 (м, 2H), 7.76 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.51–7.46 (м, 3H), 7.37 (с, 1H), 7.22 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.18–7.12 (м, 2H), 6.42 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 5.13 (дд, J = 13.1, 5.0 Гц, 1H), 4.36 (квад., J = 17.4 Гц, 2H), 4.13 (т, J = 6.3 Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 3.05 (дд, J = 13.0, 6.8 Гц, 2H), 2.96–2.85 (м, 1H), 2.64–2.56 (м, 1H), 2.39–2.32 (м, 3H), 2.15 (т, J = 7.3 Гц, 2H), 2.06–1.99 (м, 1H), 1.83–1.74 (м, 2H), 1.69 (дд, J = 14.9, 7.5 Гц, 2H), 1.65–1.56 (м, 2H), 1.48 (с, 4H), 1.46–1.40 (м, 2H), 1.35–1.28 (м, 2H).

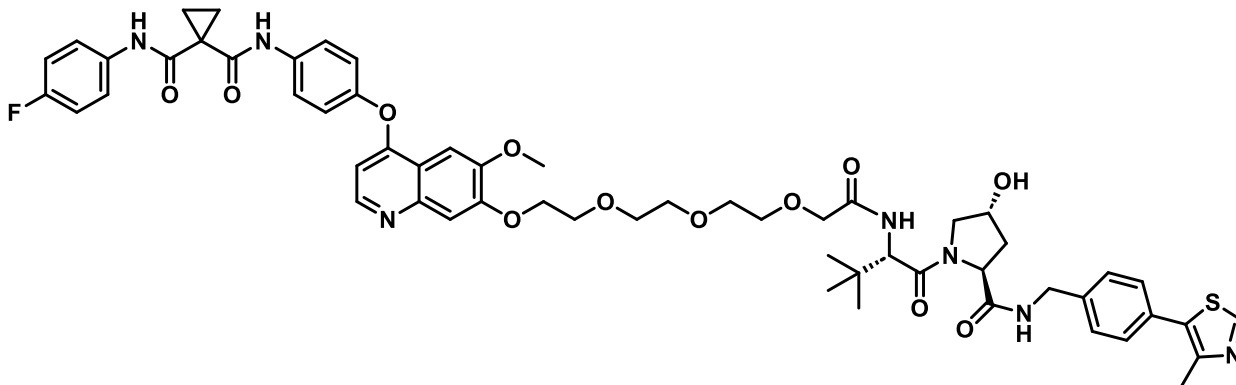
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.84, 171.70, 171.30, 171.05, 168.16, 168.12, 167.81, 159.93, 158.26 (д, J = 240.0 Гц), 151.84, 149.49, 149.40, 148.78, 146.43, 136.38, 135.17 (д, J = 2.7 Гц), 133.80, 133.67, 132.64, 128.58, 125.22, 122.41 (д, J = 7.7 Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.14 (2C), 118.93, 115.04, 115.01 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.48, 102.98, 99.14, 67.96, 55.72, 51.54, 46.50, 38.34, 35.74, 35.01, 31.56, 31.20, 29.01, 28.04, 26.12, 24.83, 22.02, 20.76, 15.39 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = (-119.01) – (-119.10) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>51</sub>H<sub>52</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub> рассчитано: С, 65.03; Н, 5.56; найдено: С, 65.13; Н, 5.43.

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>51</sub>H<sub>52</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub> рассчитано: 942.3832; найдено: 942.3470.

***N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((7-(((*S*)-13-((2*S*,4*R*)-4-гидрокси-2-((4-(4-метилтиазол-5-ил)бензил)карбамоил)пирролидин-1-карбонил)-14,14-диметил-11-оксо-3,6,9-триокса-12-азапентадецил)окси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 123а**



Элюент: CHCl<sub>3</sub> - MeOH (29:1 → 19:1). Бежевый порошок, выход 37%.

$T_{пл} = 191 - 192\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 9.62 (с, 1H), 9.11 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.36 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.98–7.92 (м, 1H), 7.60 (д,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.53–7.41 (м, 4H), 7.34–7.28 (м, 5H), 7.12 (д,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.06–6.96 (м, 2H), 6.40 (д,  $J = 5.3$  Гц, 1H), 4.76 (т,  $J = 7.8$  Гц, 1H), 4.57–4.45 (м, 3H), 4.43–4.22 (м, 3H), 4.06–3.87 (м, 8H), 3.79–3.53 (м, 9H), 2.47 (с, 3H), 2.43–2.37 (м, 1H), 2.16–2.08 (м, 1H), 1.73–1.59 (м, 4H), 0.96 (с, 9H).

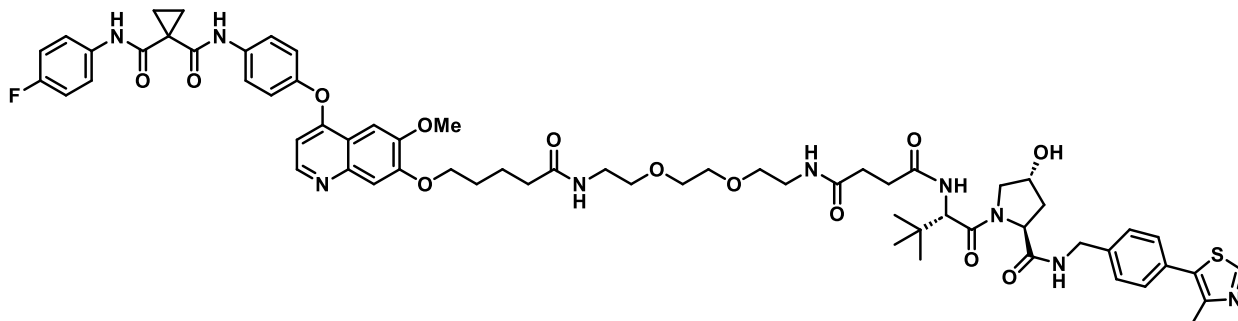
**<sup>13</sup>C ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171.42, 171.04, 170.36, 169.51, 169.10, 161.01, 159.79 (д,  $J = 244.7$  Гц), 152.47, 150.78, 150.44, 149.92, 148.44, 148.26, 146.28, 138.37, 135.14, 133.36 (д,  $J = 3.1$  Гц), 131.77, 130.82, 129.47 (2C), 128.13 (2C), 122.90 (д,  $J = 8.1$  Гц, 2C), 122.62 (2C), 121.69 (2C), 116.21, 115.80 (д,  $J = 22.6$  Гц, 2C), 108.27, 103.36, 99.67, 71.17, 70.79, 70.70, 70.48, 70.38, 70.19, 69.37, 68.39, 58.77, 57.05, 56.95, 56.16, 43.23, 36.60, 35.42, 29.33, 26.50 (3C), 17.67, 16.14 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = (-121.03) – (-121.16) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>57</sub>H<sub>64</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>12</sub>S рассчитано: С, 62.80; Н, 5.92; найдено: С, 62.92; Н, 6.03.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>57</sub>H<sub>64</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>12</sub>S рассчитано: 1090.4390; найдено: 1090.4264.

***N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((7-(((*S*)-3-((2*S*,4*R*)-4-гидрокси-2-((4-(4-метилтиазол-5-ил)бензил)карбамоил)пирролидин-1-карбонил)-2,2-диметил-5,8,19-триоксо-12,15-диокса-4,9,18-триазатрикозан-23-ил)окси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-циклопропан-1,1-дикарбоксамид 123b**



Элюент: ЭА - MeOH (9:1 → 1:1). Бледно-желтый порошок, выход 43%.

$T_{пл} = 183 - 184\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.17$  (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.98 (с, 1H), 8.55 (т,  $J = 6.1$  Гц, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 7.92–7.84 (м, 3H), 7.76 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.43–7.33 (м, 5H), 7.22 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.19–7.11 (м, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.11 (д,  $J = 3.3$  Гц, 1H), 4.51 (д,  $J = 9.4$  Гц, 1H), 4.46–4.38 (м, 2H), 4.36–4.31 (м, 1H), 4.22 (дд,  $J = 15.9, 5.5$  Гц, 1H), 4.14 (т,  $J = 6.3$  Гц, 2H), 3.93 (с, 3H), 3.69–3.59 (м, 2H), 3.53–3.46 (м, 4H), 3.44–3.35 (м, 4H), 3.25–3.14 (м, 4H), 2.48–2.45 (м, 2H), 2.44 (с, 3H), 2.40–2.25 (м, 2H), 2.18 (т,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 2.07–1.99 (м, 1H), 1.93–1.85 (м, 1H), 1.84–1.74 (м, 2H), 1.74–1.64 (м, 2H), 1.47 (с, 4H), 0.92 (с, 9H).

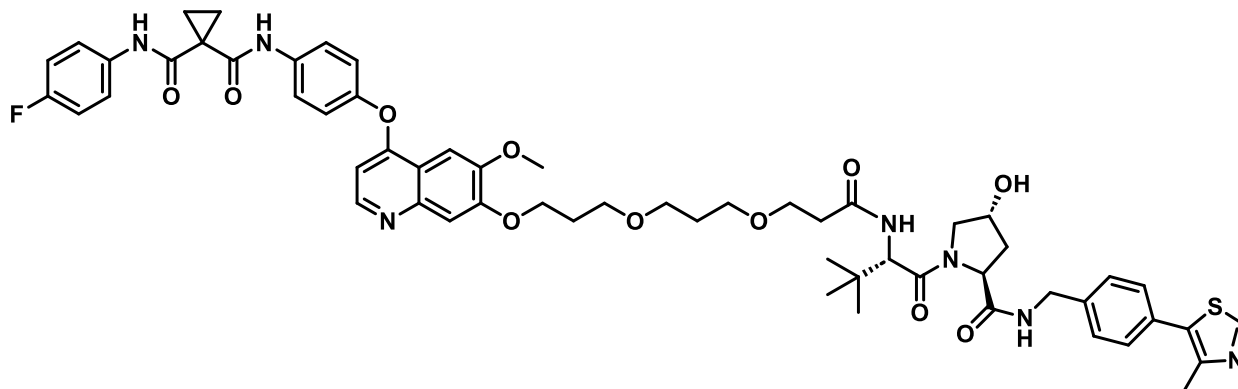
**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (100 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 172.04, 171.90, 171.47, 171.24, 169.55, 168.14, 168.10, 159.45, 158.26$  (д,  $J = 240.1$  Гц), 151.85, 151.41, 149.48, 149.40, 148.75, 147.70, 146.41, 139.48, 136.37, 135.16 (д,  $J = 2.6$  Гц), 131.14, 129.63 (2C), 128.62 (2C), 127.41, 122.40 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2C), 122.16 (2), 121.14 (2C), 115.04, 115.01 (д,  $J = 22.2$  Гц, 2C), 108.45, 102.98, 99.13, 69.51, 69.17, 69.10, 68.87, 67.97, 58.69, 56.40, 56.29, 55.71, 54.90, 41.65, 38.55, 38.47, 37.92, 35.31, 34.87, 31.54, 30.89, 30.52, 27.99, 26.33 (3C), 21.97, 15.93, 15.39 (2C).

**$^{19}\text{F}$  ЯМР** (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-118.99) - (-119.09)$  (м).

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{64}\text{H}_{76}\text{FN}_9\text{O}_{13}\text{S}$  рассчитано: С, 62.47; Н, 6.23; найдено: С, 62.40; Н, 6.13.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  для  $\text{C}_{64}\text{H}_{76}\text{FN}_9\text{O}_{13}\text{S}$  рассчитано: 1230.5340; найдено: 1230.5320.

***N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((7-(3-(3-(3-(((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-гидрокси-2-((4-(4-метилтиазол-5-ил)бензил)карбамоил)пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)амино)-3-оксопропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-циклопропан-1,1-дикарбоксамид 123с**



Элюент: CHCl<sub>3</sub> - MeOH (29:1 → 19:1). Бежевый порошок, выход 42%.

$T_{пл} = 187 - 188\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 9.62 (с, 1H), 9.13 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.42 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 7.64–7.54 (м, 3H), 7.52–7.44 (м, 3H), 7.41 (с, 1H), 7.35–7.27 (м, 4H), 7.18 (д,  $J$  = 8.2 Гц, 1H), 7.13 (д,  $J$  = 8.8 Гц, 2H), 7.02 (т,  $J$  = 8.6 Гц, 2H), 6.42 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 4.73 (т,  $J$  = 7.8 Гц, 1H), 4.55–4.42 (м, 3H), 4.34–4.21 (м, 3H), 4.08–4.02 (м, 1H), 3.99 (с, 3H), 3.64–3.44 (м, 9H), 2.50–2.36 (м, 6H), 2.19–2.05 (м, 3H), 1.88–1.79 (м, 2H), 1.72–1.62 (м, 4H), 0.92 (с, 9H).

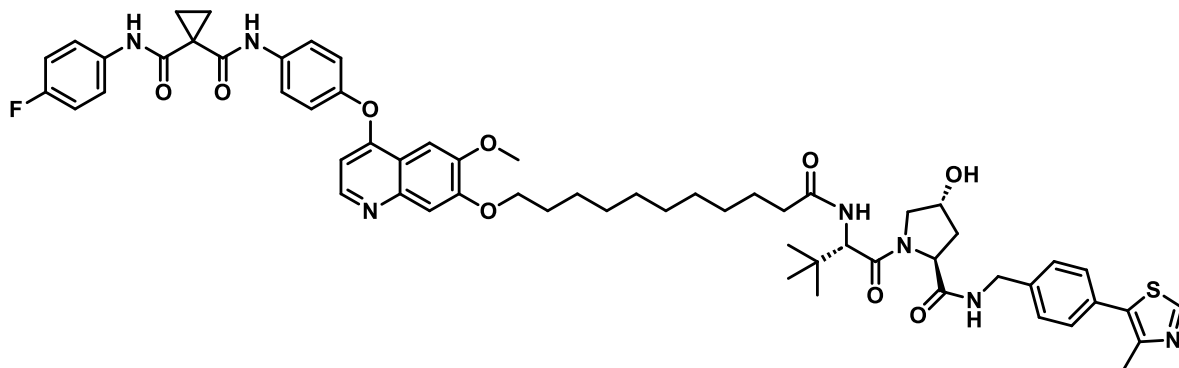
**<sup>13</sup>C ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 172.27, 171.82, 171.07, 169.47, 169.11, 160.83, 159.83 (д,  $J$  = 244.7 Гц), 152.51, 151.00, 150.42, 149.94, 148.66, 148.51, 146.73, 138.26, 135.03, 133.35 (д,  $J$  = 3.1 Гц), 131.74, 130.96, 129.57 (2C), 128.16 (2C), 122.90 (д,  $J$  = 8.1 Гц, 2C), 122.64 (2C), 121.66 (2C), 116.11, 115.83 (д,  $J$  = 22.5 Гц, 2C), 108.49, 103.50, 99.69, 70.11, 68.41, 67.67, 67.28, 66.77, 66.16, 58.57, 57.78, 56.71, 56.25, 43.29, 36.76, 36.17, 35.02, 29.81, 29.39, 29.31, 26.53 (3C), 17.70, 16.15 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = (-121.07) – (-121.18) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>58</sub>H<sub>66</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S рассчитано: С, 64.01; Н, 6.11; найдено: С, 64.10; Н, 6.21.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>58</sub>H<sub>66</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S рассчитано: 1088.4598; найдено: 1088.4491.

***N*-(4-Фторфенил)-*N*-(4-((7-((11-(((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-гидрокси-2-((4-(4-метилтиазол-5-ил)бензил)карбамоил)пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)амино)-11-оксундецил)окси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 123d**



Элюент: CHCl<sub>3</sub> - MeOH (29:1 → 19:1). Бледно-желтое твердое вещество, выход 61%.

**Тпл** = 176 – 177 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.66 (с, 1H), 9.20 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.24 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.61 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.51 (с, 1H), 7.46 (дд, J = 8.9, 4.8 Гц, 2H), 7.40 (т, J = 5.7 Гц, 1H), 7.37–7.28 (м, 5H), 7.13 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.01 (т, J = 8.7 Гц, 2H), 6.41 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 6.23 (д, J = 8.7 Гц, 1H), 4.69 (т, J = 7.8 Гц, 1H), 4.56–4.43 (м, 3H), 4.31 (дд, J = 15.0, 5.2 Гц, 1H), 4.14 (т, J = 6.7 Гц, 2H), 4.04–3.94 (м, 4H), 3.64–3.56 (м, 1H), 2.49 (с, 3H), 2.46–2.41 (м, 1H), 2.18–2.06 (м, 3H), 1.96–1.83 (м, 2H), 1.72–1.62 (м, 2H), 1.60–1.50 (м, 2H), 1.50–1.41 (м, 2H), 1.37–1.16 (м, 12H), 0.92 (с, 9H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.81, 171.91, 170.97, 169.50, 169.10, 160.73, 159.80 (д, J = 244.6 Гц), 152.49, 151.02, 150.46, 149.92, 148.72, 148.50, 146.89, 138.14, 134.97, 133.34 (д, J = 3.0 Гц), 131.69, 131.01, 129.59 (2C), 128.14 (2C), 122.91 (д, J = 8.1 Гц, 2C), 122.61 (2C), 121.68 (2C), 115.99, 115.81 (д, J = 22.5 Гц, 2C), 108.44, 103.36, 99.60, 70.04, 69.08, 58.74, 57.49, 56.79, 56.25, 43.31, 36.62, 36.13, 35.20, 29.47, 29.39, 29.36 (2C), 29.29, 29.24, 28.84, 26.52 (3C), 25.98, 25.70, 17.61, 16.14 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = (-121.05) – (-121.17) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>60</sub>H<sub>70</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S рассчитано: С, 66.46; Н, 6.51; найдено: С, 66.54; Н, 6.60.

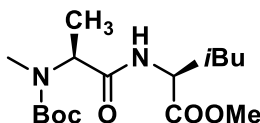
**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>60</sub>H<sub>70</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S рассчитано: 1084.5013; найдено: 1084.4855.

## Получение IAP-лигандов

### Общая методика синтеза дипептидов 134a, 135a, 136a

К раствору метилового эфира соответствующей аминокислоты **131-133** (1.00 эквив.) в DMF (3 мл) в инертной атмосфере последовательно добавили Вос-*N*-Метил-L-аланин **127** (1.00 эквив.), DIPEA (2.50 эквив.) и HATU (1.20 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов с последующим удалением растворителя при пониженном давлении. Целевые продукты были выделены при помощи колоночной хроматографии.

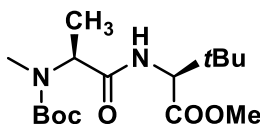
**Метилловый эфир (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино) пропанамидо)-4-метилпентановой кислоты 134a**



Элюент: ЭА – ПЭ (0:1 → 1:1). Бледно-желтое масло, выход 71%.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединения **134a** соответствуют литературным данным [378].

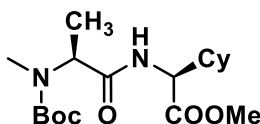
**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  353.4, найдено 353.2.

**Метилловый эфир (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)- пропанамидо)-3,3-диметилбутановой кислоты 135a**



Элюент: ЭА – ПЭ (0:1 → 1:1). Бледно-желтое масло, выход 88%.  $^1\text{H}$  ЯМР спектр соединения **135a** соответствует литературным данным [379].

**Метилловый эфир (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)- пропанамидо)-2-циклогексилуксусной кислоты 136a**



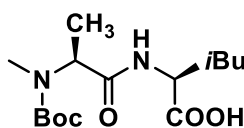
Элюент: ЭА – ПЭ (0:1 → 1:1). Бледно-желтое масло, выход 97%.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединения **136a** соответствуют литературным данным [379].

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  379.46, найдено 379.3.

### Общая методика синтеза кислот 134-136

Раствор соответствующего сложного эфира **134a**, **135a**, **136a** (1.00 эквив.) и NaOH (6.00 эквив.) в смеси растворителей MeOH:H<sub>2</sub>O = 2:1 (5 мл) перемешивали при 60 °С в течение 12 часов. Реакционную смесь сконцентрировали при пониженном давлении, pH водной фазы довели до 5, прибавляя по каплям 10% водный раствор HCl. Провели экстракцию ЭА (3×10 мл). Органическую фазу осушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Последующее фильтрование и удаление растворителя при пониженном давлении позволило выделить соответствующие продукты.

#### (S)-2-((S)-2-((Трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)пропанамидо)-4-метил-пентановая кислота **134**

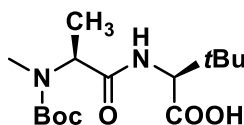


Твёрдая пена, выход 92%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 12.46 (с, 1H), 7.93 (с, 1H), 4.47 (д, J = 58.7 Гц, 1H), 4.28–4.14 (м, 1H), 2.74 (с, 3H), 1.68–1.59 (м, 1H), 1.59 – 1.53 (м, 1H), 1.51–1.45 (м, 1H), 1.37 (с, 9H), 1.23 (с, 3H), 0.91–0.86 (м, 3H), 0.83 (д, J = 6.3 Гц, 3H).

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 339.4, найдено 339.1.

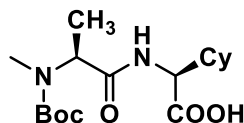
#### (S)-2-((S)-2-((Трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)пропанамидо)-3,3-диметил-бутановая кислота **135**



Твердая пена, выход 97%. <sup>1</sup>H ЯМР спектр соединения **135** соответствует литературным данным [379].

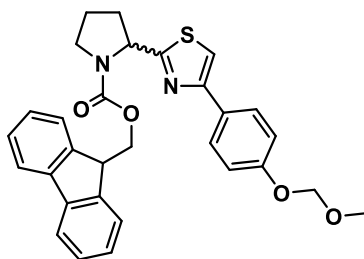
Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> m/z 339.4, найдено 339.2.

#### (S)-2-((S)-2-((Трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)пропанамидо)-2-цикло-гексил-уксусная кислота **136**



Твердая прозрачная пена, выход 95%.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры соединения **136** соответствуют литературным данным [379].

**Синтез** (9H-флуорен-9-ил)метил 2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-карбоксилата **rac-138**



К раствору 3000 мг производного пролина **rac-137** (6.10 ммоль, 1.00 эквив.) в DCM (80 мл) добавили 10600 мкл DIPEA (61.10 ммоль, 10.00 эквив.) и прилили по каплям 2400 мкл MOMCl (31.20 ммоль, 5.00 эквив.) при 0 °C в инертной атмосфере. Реакционную смесь оставили нагреваться до комнатной температуры, перемешивание шло в течение 12 часов. Затем растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (9:1 → 1:1). Выделено 2600 мг (83%) продукта **rac-138**.

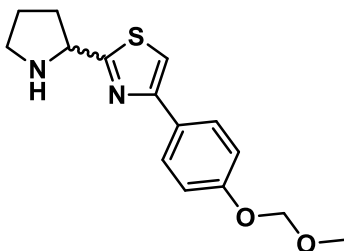
$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.00–7.61 (м, 5H), 7.49–7.24 (м, 8H), 5.36–5.10 (м, 3H), 4.46 – 4.05 (м, 3H), 3.63–3.52 (м, 1H), 3.49–3.37 (м, 4H), 2.43–2.28 (м, 1H), 2.19–2.06 (м, 1H), 2.02–1.86 (м, 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ , смесь 2 ротамеров):  $\delta$  174.18, 173.52, 156.62 (4C), 154.33, 154.23, 154.13, 153.96, 143.71 (2C), 143.43 (2C), 140.77, 140.59 (2C), 128.11 (2C), 127.67 (2C), 127.57 (2C), 127.47, 127.29 (4C), 127.15 (2C), 126.96, 126.85, 125.08, 124.91, 120.11 (2C), 120.02 (2C), 116.26 (4C), 112.08 (2C), 93.83 (2C), 66.95, 66.92, 59.14, 58.82, 55.62 (2C), 47.03, 46.70, 46.54, 46.45, 33.81, 32.51, 23.48, 22.43.

**Элементный анализ:** для  $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  рассчитано: C, 70.29; H, 5.51; найдено: C, 70.35; H, 5.45.

## Получение IAP-лигандов с фенольным фрагментом

### Синтез 4-(4-(метоксиметокси)фенил)-2-(пирролидин-2-ил)тиазола **rac-139**



К раствору 2600 мг производного **rac-138** (5.00 ммоль, 1.00 эквив.) в DCM (20 мл) прилили по каплям при перемешивании 4000 мкл пирролидина (50.00 ммоль, 10.00 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. По прошествию 12 часов, растворитель и избыток пирролидина были удалены при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ЭА - MeOH (1:0 → 7:3). Выделено 1275 мг (72%) продукта **rac-139** в виде маслянистого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.83 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.72 (с, 1H), 7.05 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 5.21 (с, 2H), 4.49 (дд, J = 8.2, 5.2 Гц, 1H), 3.39 (с, 3H), 3.02–2.85 (м, 2H), 2.26–2.13 (м, 1H), 1.95–1.79 (м, 1H), 1.76–1.66 (м, 2H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 179.94, 156.47, 154.27, 128.57, 127.15 (2C), 116.30 (2C), 112.03, 93.90, 58.98, 55.67, 46.49, 33.78, 25.49.

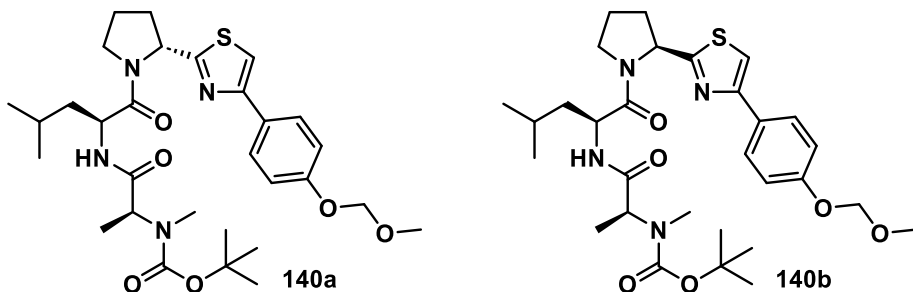
Элементный анализ: для C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S рассчитано: C, 62.04; H, 6.25; найдено: C, 62.10; H, 6.28.

Масс-спектр (MALDI-TOF): m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S рассчитано: 291.1; найдено: 291.1.

### Общая методика синтеза IAP-лигандов 140-142, содержащих защитные группы на атоме азота пролина (Boc) и атоме кислорода фенольного фрагмента (MOM)

К раствору амина **rac-139** (1.00 эквив.) в DMF (10 мл) последовательно добавили соответствующую кислоту **135-136** (1.00 эквив.), DIPEA (2.50 эквив.) и HATU (1.20 эквив.) в инертной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, затем растворитель был удален при пониженном давлении. Продукты были выделены с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (49:1 → 0:1).

**Вещество 140 (смесь диастереомеров 140a : 140b = 1 : 1):** трет-бутил ((*S*)-1-(((*S*)-1-((*R*)-2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)карбамат (140a), трет-бутил ((*S*)-1-(((*S*)-1-((*S*)-2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)карбамат (140b)



Белый порошок, суммарный выход двух диастереомеров - 75%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, смесь ротамеров 1:1): δ = 8.16–7.90 (м, 2H), 7.87–7.83 (м, 4H), 7.80 (с, 2H), 7.09–7.04 (м, 4H), 5.35 (дд, J = 7.9, 2.2 Гц, 1H), 5.30 (дд, J = 8.0, 1.6 Гц, 1H), 5.21 (с, 4H), 4.73–4.34 (м, 4H), 3.78–3.67 (м, 2H), 3.64–3.52 (м, 2H), 3.39 (с, 6H), 2.76 (с, 3H), 2.74 (с, 3H), 2.34–2.22 (м, 2H), 2.17–1.90 (м, 6H), 1.75–1.50 (м, 6H), 1.38 (с, 18H), 1.29–1.18 (м, 6H), 0.94–0.85 (м, 12H).

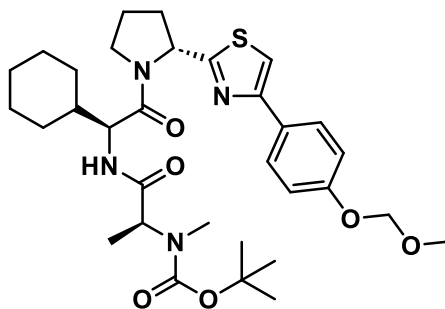
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, смесь ротамеров 1:1): δ = 173.02, 173.88, 172.88, 171.55, 171.15, 170.65, 156.70, 156.59, 156.54, 154.13, 153.59, 153.55, 128.12, 128.05, 127.34 (2C), 127.23 (2C), 116.25 (4C), 112.07, 112.03, 93.84 (2C), 78.80 (2C), 59.03 (2C), 58.48, 58.31, 55.63, 55.62, 48.79 (2C), 46.55, 46.45, 34.30 (2C), 31.73, 31.68, 30.31 (2C), 28.00 (6C), 24.13, 24.01, 23.65, 23.43, 23.19, 23.11, 21.49, 21.17, 14.08 (2C).

**Элементный анализ:** для C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: C, 61.20; H, 7.53; найдено: C, 61.29; H, 7.50.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** m/z [M+Na]<sup>+</sup> для C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: 611.3; найдено: 611.1.

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: 589.3054; найдено: 589.3048; [M+Na]<sup>+</sup> рассчитано: 611.2874; найдено: 611.2866; [M+K]<sup>+</sup> рассчитано: 627.2613; найдено: 627.2598.

**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-циклогексил-2-((R)-2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)-карбамат 142a**



Желтое масло, Выход 53%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 7.89-7.79 (м, C10-H, C9-H, 4H), 7.08-7.04 (м, 2H), 5.35 (дд, J = 7.9, 1.4 Гц, 1H), 5.22 (с, 2H), 4.61 – 4.29 (м, 2H), 3.97 – 3.75 (м, 1H), 3.69 – 3.48 (м, 1H), 3.39 (с, 3H), 2.75 (с, 3H), 2.30-2.20 (м, 1H), 2.17-2.09 (м, 1H), 2.04-1.94 (м, 2H), 1.86-1.54 (м, 6H), 1.45-1.31 (м, 10H), 1.29-1.09 (м, 7H).

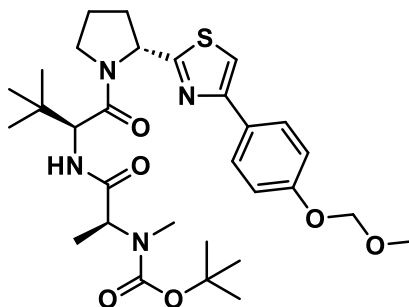
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 172.87, 170.20, 170.11 (2C), 156.54, 153.58, 128.12, 127.22 (2C), 116.24 (2C), 111.99, 93.83, 78.84, 58.22, 55.61, 54.62, 46.81, 33.87, 31.89, 29.11 (2C), 28.33, 28.00 (3C), 25.86, 25.51, 25.41 (2C), 23.49, 15.69.

**Элементный анализ:** для C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: C, 62.52; H, 7.54; найдено: C, 62.47; H, 7.60.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** m/z [M+Na]<sup>+</sup> для C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: 637.3; найдено: 637.1.

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: 615.3211; найдено: 615.3209; [M+Na]<sup>+</sup> для C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: 637.3030; найдено: 637.3025.

**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((R)-2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)-карбамат 141b**



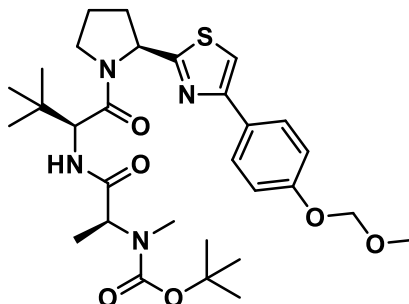
Белый порошок, выход 43%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 7.90–7.79 (м, 3H), 7.74–7.61 (м, 1H), 7.06 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 5.34 (дд, J = 7.8, 1.6 Гц, 1H), 5.22 (с, 2H), 4.79–4.44 (м, 2H), 3.97–3.82 (м, 1H), 3.77–3.65 (м, 1H), 3.39 (с, 3H), 2.80 (с, 3H), 2.35–2.01 (м, 4H), 1.42-1.22 (м, 12H), 0.96 (с, 9H).

**Элементный анализ:** для C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S рассчитано: C, 61.20; H, 7.53; найдено: C, 61.24; H, 7.59.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[M+Na]^+$  для  $C_{30}H_{44}N_4O_6S$  рассчитано: 611.3; найдено: 611.2.

**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)-карбамат 141b**



Белый порошок, выход 45%.

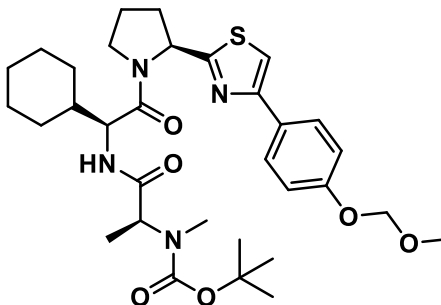
**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  7.86–7.81 (м, 3H), 7.64–7.24 (м, 1H), 7.10–7.04 (м, 2H), 5.36 (дд,  $J = 8.0, 3.1$  Гц, 1H), 5.22 (с, 2H), 4.65–4.53 (м, 2H), 3.87–3.70 (м, 2H), 3.39 (с, 3H), 2.76 (с, 3H), 2.34–2.13 (м, 2H), 2.05–1.99 (м, 2H), 1.39 (с, 9H), 1.35–1.29 (м, 3H), 0.96 (с, 9H).

**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  172.19, 170.39 (2C), 169.97, 156.59, 153.30, 128.02 (2C), 127.23, 116.25 (2C), 112.14, 93.82, 79.22, 63.48, 58.28, 56.34, 55.62, 47.87, 31.69, 30.16, 28.02 (3C), 26.26 (3C), 24.15, 18.60, 13.54.

**Элементный анализ:** для  $C_{30}H_{44}N_4O_6S$  рассчитано: C, 61.20; H, 7.53; найдено: C, 61.25; H, 7.60.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[M+Na]^+$  для  $C_{30}H_{44}N_4O_6S$  рассчитано: 611.3; найдено: 611.2.

**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-(метоксиметокси)фенил)-тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)карбамат 142b**



Желтое масло, выход 46%.

**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  7.86–7.75 (м, 4H), 7.06 (д,  $J = 8.9$  Гц, 2H), 5.36 (дд,  $J = 8.1, 2.7$  Гц, 1H), 5.22 (с, 2H), 4.61 – 4.39 (м, 2H), 3.69 – 3.44 (м, 2H), 3.39 (с, 3H), 2.78 (с, 3H), 2.30–2.19 (м, 1H), 2.17–2.07 (м, 1H), 2.05–1.96 (м, 2H), 1.78–1.56 (м, 6H), 1.43–1.31 (м, 10H), 1.29–1.01 (м, 7H).

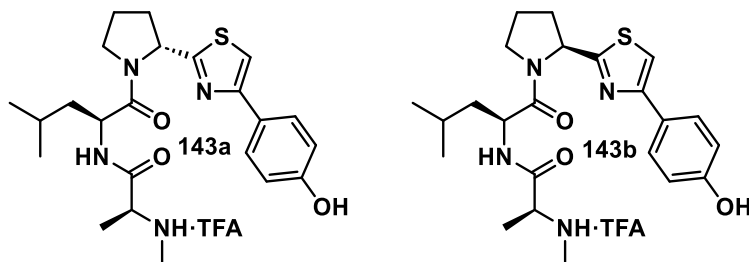
**Элементный анализ:** для  $C_{32}H_{46}N_4O_6S$  рассчитано: C, 62.52; H, 7.54; найдено: C, 62.55; H, 7.50.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[M+Na]^+$  для  $C_{32}H_{46}N_4O_6S$  рассчитано 637.3; найдено: 637.2.

#### Общая методика получения лигандов 143-145

Раствор соответствующего пролиганда **140**, **141a-b**, **142a-b** (1.00 эквив.) в смеси DCM (7 мл) и TFA (7 мл) перемешивали при 40°C в течение 4 часов. Далее добавили 30 мл толуола и удалили смесь растворителей при пониженном давлении. Твердый остаток растворили в 10 мл DCM и промыли  $H_2O$  (3 x 5). Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$ . Последующее фильтрование и удаление растворителя позволили выделить целевые продукты.

**Вещество 143** (смесь диастереомеров **143a** : **143b** = 1 : 1): (*S*)-*N*-((*S*)-1-((*R*)-2-(4-(4-гидроксифенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)-2-(метил-амино)пропанамид (в виде соли с TFA) **143a**, (*S*)-*N*-((*S*)-1-((*S*)-2-(4-(4-гидроксифенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)-2-(метил-амино)пропанамид (в виде соли с TFA) **143b**



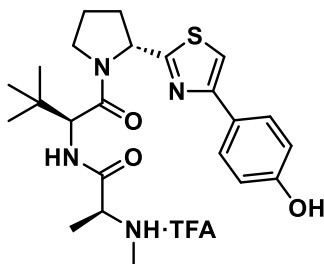
Белый порошок, суммарный выход двух диастереомеров 68%.

**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $DMCO-d_6$ , смесь ротамеров 1:1):  $\delta$  = 9.62 (с, 2H), 8.95–8.75 (м, 6H), 7.77–7.65 (м, 6H), 6.80 (д,  $J$  = 8.5 Гц, 4H); 5.35 (дд,  $J$  = 7.8, 2.5 Гц, 1H), 5.33–5.29 (м, 1H), 4.73 (дд,  $J$  = 14.4, 8.8 Гц, 1H), 4.64 (дд,  $J$  = 14.1, 7.5 Гц, 1H), 3.87–3.63 (м, 6H), 3.39 (с, 6H), 2.41–2.20 (м, 4H), 2.19–1.90 (м, 4H), 1.75 – 1.48 (м, 6H), 1.38–1.31 (м, 6H), 0.98–0.86 (м, 12H).

**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц,  $DMCO-d_6$ , смесь ротамеров 1:1):  $\delta$  172.31, 172.14, 170.49, 169.96, 168.58, 168.45, 158.50 (квад.,  $J$  = 33.7 Гц, 2C), 157.40, 157.38, 154.25, 154.10, 127.34 (4C), 125.52, 125.50, 116.05 (квад.,  $J$  = 289.5 Гц, 2C), 115.42 (4C), 110.75, 110.67, 59.21 (2C), 58.52, 58.39, 49.29, 48.88, 46.63, 46.52, 34.34 (2C), 31.71, 31.67, 30.70, 30.67, 24.25, 24.19, 23.64, 23.57, 23.13, 23.01, 21.42, 21.10, 15.79, 15.56.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $C_{23}H_{32}N_4O_3S$  рассчитано: 445.2; найдено: 445.3;  $m/z$   $[M+Na]^+$  для  $C_{25}H_{34}N_4O_3S$  рассчитано: 467.2; найдено: 467.3.

**(S)-N-((S)-1-((R)-2-(4-(4-Гидроксифенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)-2-(метиламино)пропанамид (в виде соли с TFA) 144a**



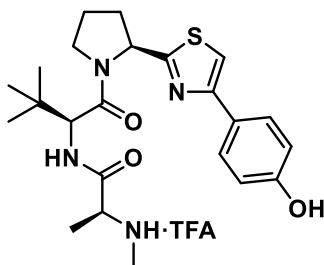
Белый порошок, выход 90%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 9.60 (с, 1H), 8.89–8.72 (м, 3H), 7.74–7.63 (м, 3H), 6.82–6.78 (м, 2H), 5.39–5.34 (м, 1H), 4.72–4.66 (м, 1H), 3.94–3.74 (м, 3H), 3.31 (с, 3H), 2.33–2.23 (м, 1H), 2.18–2.11 (м, 1H), 2.09–2.00 (м, 2H), 1.30 (д, J = 6.8 Гц, 3H), 0.99 (с, 9H).

**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  = 172.23, 172.03, 168.77, 158.16 (квад., J = 33.7 Гц), 157.35, 154.08, 127.34 (2С), 125.50, 115.95 (квад., J = 289.5 Гц), 115.41 (2С), 110.43, 58.18, 56.68, 55.99, 47.48, 34.48, 31.74, 30.79, 26.20 (3С), 23.57, 16.18.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $C_{23}H_{32}N_4O_3S$  рассчитано: 445.2268; найдено: 445.2255.

**(S)-N-((S)-1-((S)-2-(4-(4-Гидроксифенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)-2-(метиламино)пропанамид (в виде соли с TFA) 144b**



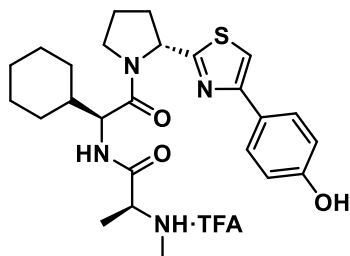
Белый порошок, выход 88%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 9.67 (с, 1H), 8.20–7.95 (м, 3H), 7.76–7.68 (м, 3H), 6.82–6.79 (м, 2H), 5.34 (дд, J = 7.8, 2.8 Гц, 1H), 4.60–4.53 (м, 1H), 3.94–3.68 (м, 3H), 3.16 (с, 3H), 2.35–2.28 (м, 1H), 2.27–2.23 (м, 1H), 2.07–1.96 (м, 2H), 1.18–1.12 (м, 3H), 0.98 (с, 9H).

**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  = 171.98, 169.97, 168.56, 158.15 (квад.,  $J$  = 33.7 Гц), 157.47, 153.99, 127.46 (2С), 125.61, 115.92 (квад.,  $J$  = 289.5 Гц), 115.66 (2С), 110.97, 58.78, 56.17, 55.95, 45.34, 34.88, 30.97, 30.91, 26.47 (3С), 23.31, 15.98.

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $C_{23}H_{32}N_4O_3S$  рассчитано: 445.2268; найдено: 445.2257.

**(S)-N-((S)-1-Циклогексил-2-((R)-2-(4-(4-гидроксифенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-2-(метиламино)пропанамид 145a**



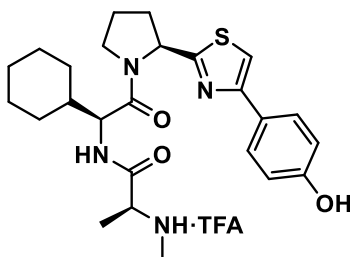
Белый порошок, выход 98%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 9.61 (с, 1H), 8.95–8.76 (м, 3H), 7.76–7.65 (м, 3H), 6.80 (д, *J* = 8.5 Гц, 2H), 5.35 (дд, *J* = 7.8, 1.5 Гц, 1H), 4.53–4.45 (м, 1H), 3.99–3.93 (м, 1H), 3.89–3.73 (м, 2H), 3.30 (с, 3H), 2.33–2.10 (м, 2H), 2.08–1.92 (м, 2H), 1.84–1.54 (м, 7H), 1.31 (д, *J* = 7.0 Гц, 3H), 1.21–1.10 (м, 8H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.29, 169.55, 168.61, 158.16 (квд., *J* = 33.7 Гц), 157.44, 154.22, 126.60 (2C), 125.53, 115.94 (квд., *J* = 289.5 Гц), 114.66 (2C), 109.85, 59.02, 57.58, 55.94, 47.17, 31.88, 30.57, 29.03 (2C), 26.77, 25.79, 25.44 (2C), 24.26, 15.40.

**HRMS (ESI):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S рассчитано: 471.2424; найдено: 471.2416.

**(S)-N-((S)-1-Циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-гидроксифенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-2-(метиламино)пропанамид 145b**



Белый порошок, выход 92%.

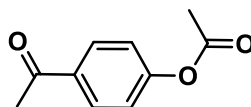
**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 9.59 (с, 1H), 8.90–8.64 (м, 3H), 7.75–7.70 (м, 3H), 6.80 (д, *J* = 8.7 Гц, 2H), 5.35 (дд, *J* = 8.0, 2.8 Гц, 1H), 4.49 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 3.91–3.73 (м, 3H), 3.29 (с, 3H), 2.40–2.32 (м, 1H), 2.29–2.17 (м, 1H), 2.17–2.10 (м, 1H), 2.06–1.99 (м, 1H), 1.82–1.58 (м, 6H), 1.40–1.27 (м, 4H), 1.24–1.11 (м, 4H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.03, 169.80, 168.68, 158.17 (квд., *J* = 33.7 Гц), 157.42, 154.05, 127.37 (2C), 125.50, 115.92 (квд., *J* = 289.5 Гц), 115.46 (2C), 110.78, 67.45, 58.37, 55.90, 47.22, 31.97, 30.81, 29.05 (2C), 25.73, 25.64, 25.48 (2C), 24.07, 15.77.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S рассчитано: 471.2; найдено: 471.1.

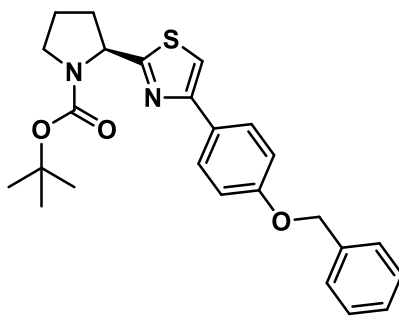
## Альтернативный подход к синтезу лигандов 144b, 145b

### Синтез 4-ацетилфенил ацетата (147)



К раствору 2000 мг фенола **146** (22.00 ммоль, 1.00 эквив.), 5800 мг хлорида алюминия (44.00 ммоль, 2.00 эквив.) в DCM (30 мл) по каплям добавили 3400 мкл хлорангидрида уксусной кислоты (48.00 ммоль, 2.20 эквив.) при 0 °С в инертной атмосфере. Реакционную смесь оставили нагреваться до комнатной температуры, перемешивание велось в течение 12 часов, затем растворитель и избыток ацетилхлорида были удалены при пониженном давлении. Далее к остатку прилили насыщенный водный раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 мл) и провели экстракцию DCM (4 x 30 мл). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, удалили DCM при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (9:1 → 8:2). Выделено 1117 мг (43%) продукта **146** в виде порошка бежевого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C ЯМР спектры соединения **146** соответствуют литературным данным [380].

### Трет-бутил (S)-2-(4-(4-(бензилокси)фенил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-карбоксилат **152**



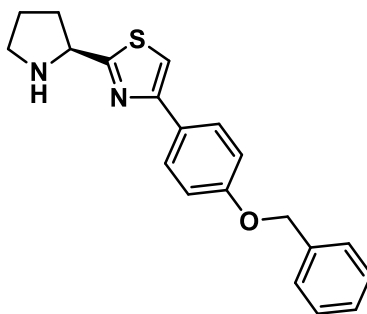
Методика получения соединения **152** аналогична подходу к синтезу соединения **159** (стр. 168). Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (8:2 → 1:1). Желтое маслянистое вещество, выход 61%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 7.88 – 7.77 (м, 3H), 7.49 – 7.45 (м, 2H), 7.42 – 7.37 (м, 2H), 7.36 – 7.30 (м, 1H), 7.09 – 7.04 (м, 2H), 5.15 – 5.06 (м, 3H), 3.54 – 3.39 (м, 2H), 2.40 – 2.23 (м, 1H), 2.12 – 2.03 (м, 1H), 1.95 – 1.85 (м, 2H), 1.45 – 1.20 (м, 9H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, смесь ротамеров): δ = 174.43, 174.37, 158.19 (2C), 157.24 (2C), 153.85 (2C), 137.00, 136.92, 128.46 (4C), 128.35 (2C), 127.88 (2C), 127.76 (2C), 127.65 (2C), 127.31 (2C), 127.20 (2C), 115.02 (2C), 114.91 (2C), 111.65, 111.55, 79.02 (2C), 69.27 (2C), 58.87, 58.69, 46.70, 46.41, 33.61, 32.56, 28.11 (3C), 27.88 (3C), 23.46, 22.83.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S [M]<sup>+</sup> m/z 436.2; найдено 436.2; рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z 459.2; найдено 459.2.

**(S)-4-(4-(Бензилокси)фенил)-2-(пирролидин-2-ил)тиазол 153**



Методика получения соединения **153** аналогична подходу к синтезу соединения **160** (стр. 169). Желтое масло, выход 97%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 7.84 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.71 (с, 1H), 7.49 – 7.44 (м, 2H), 7.43 – 7.37 (м, 2H), 7.36 – 7.30 (м, 1H), 7.05 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 5.14 (с, 2H), 4.48 (дд, J = 8.2, 5.1 Гц, 1H), 3.65 – 3.40 (м, 1H), 3.02 – 2.83 (м, 2H), 2.25 – 2.14 (м, 1H), 1.90 – 1.81 (м, 1H), 1.77 – 1.67 (м, 2H).

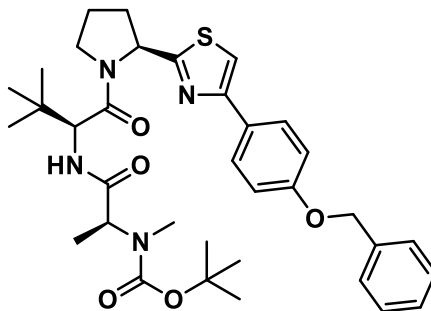
**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> m/z 337.1; найдено 337.1; рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z 359.1; найдено 359.2.

**Общая методика синтеза IAP-лигандов 141', 142', содержащих защитные группы на атоме азота пролина (Вос) и атоме кислорода фенольного фрагмента (Вп)**

К раствору амина **153** (1.00 эквив.) в DMF (5 мл) последовательно добавили соответствующую кислоту **135**, **136** (1.20 эквив.), DIPEA (2.50 эквив.) и NATU (1.20 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, после чего удалили растворитель был удален при пониженном давлении. Продукты были выделены с

помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (9:1 → 0:1).

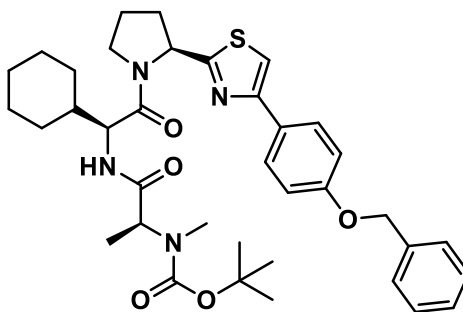
**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-(4-(4-(бензилокси)фенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-ил)-3,3-диметил-1-оксобутан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)-карбамат 141'**



**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 7.89 – 7.79 (м, 4H), 7.50 – 7.44 (м, *J* = 6.7 Гц, 2H), 7.44 – 7.31 (м, 3H), 7.07 (д, *J* = 8.9 Гц, 2H), 5.35 (дд, *J* = 7.9, 3.0 Гц, 1H), 5.14 (с, 2H), 4.66 – 4.52 (м, 2H), 3.88 – 3.68 (м, 2H), 2.76 (с, 3H), 2.33 – 2.09 (м, 2H), 2.08 – 1.95 (м, 2H), 1.39 (с, 9H), 1.23 (с, 3H), 0.96 (с, 9H).

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M]<sup>+</sup> *m/z* 634.3; найдено 634.3; рассчитано для C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 657.3; найдено 657.3; рассчитано для C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M+K]<sup>+</sup> *m/z* 673.3; найдено 673.3.

**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-2-((S)-2-(4-(4-(бензилокси)фенил)тиазол-2-ил)-пирролидин-1-ил)-1-циклогексил-2-оксоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)-карбамат 142'**



**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 7.86 – 7.81 (м, 3H), 7.80 (с, 1H), 7.49 – 7.44 (м, 2H), 7.43 – 7.37 (м, 2H), 7.36 – 7.31 (м, 1H), 7.10 – 7.02 (м, 2H), 5.35 (дд, *J* = 8.1, 2.6 Гц, 1H), 5.14 (м, 2H), 4.61 – 4.40 (м, 2H), 3.79 (т, *J* = 6.7 Гц, 2H), 2.76 (с, 3H), 2.31 – 2.17 (м, 1H), 2.16 – 2.05 (м, 1H), 2.05 – 1.96 (м, 2H), 1.76 – 1.52 (м, 6H), 1.38 (с, 9H), 1.29 – 0.98 (м, 8H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 172.52, 170.34 (2C), 162.43, 158.22, 153.60, 137.02, 128.49 (2C), 127.92 (2C), 127.81, 127.34 (2C), 127.24, 115.05 (2C), 111.78, 79.16, 69.33, 58.34, 54.77, 47.13, 38.31, 35.87, 31.96, 30.85, 30.14, 29.26, 28.07 (3C), 25.83, 25.68, 25.51 (2C), 24.02.

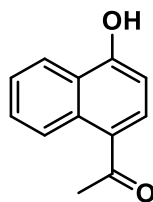
**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> m/z 661.3; найдено 661.4; рассчитано для C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z 683.3; найдено 683.4.

#### Общая методика получения лигандов **144b**, **145b**

Раствор соответствующего предлиганда **141'**, **142'** в TFA перемешивали при 72 °C в течение 2 часов. Далее растворитель был удален при пониженном давлении. Твердый остаток растворили в 10 мл ЭА и промыли H<sub>2</sub>O (3 x 5). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Последующее фильтрование и удаление растворителя позволило выделить целевые продукты. Выход составил 97 и 95 % для соединений **144b**, **145b** соответственно. <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C ЯМР спектры полученных продуктов соответствуют спектрам образцов, синтезированных по методике, описанной ранее на стр. 164.

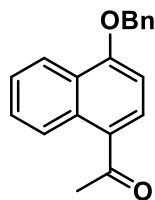
#### Получение IAP-лигандов с нафтольным фрагментом

##### Синтез 4-ацето-1-гидроксинафталина (**158**)



Раствор 3000 мг α-нафтола **154** (20.80 ммоль, 1.00 эквив.), 8300 мг хлорида алюминия (62.40 ммоль, 3.00 эквив.) в нитрометане (70 мл) перемешивали при 0 °C в инертной атмосфере в течение 5 минут, после чего по каплям добавили 2953 мкл хлорангидрида уксусной кислоты (41.60 ммоль, 2.00 эквив.). Реакционную смесь оставили нагреваться до комнатной температуры, перемешивание велось в течение 12 часов, затем растворитель и избыток ацетилхлорида были удалены при пониженном давлении. Далее к остатку прилили H<sub>2</sub>O (70 мл) и провели экстракцию ЭА (4 x 35 мл). Органический слой отделили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, удалили этилацетат при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (9:1). Выделено 2529 мг (65%) продукта **155** в виде порошка бежевого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР и <sup>13</sup>C ЯМР спектры соединения **155** соответствуют литературным данным [381].

### Синтез 4-ацето-1-бензилоксинафталина (157)



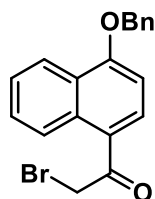
К раствору 3325 мг спирта **155** (17.90 ммоль, 1.00 эквив.) в DMF (40 мл) добавили 2839 мг карбоната натрия (27.00 ммоль, 1.50 эквив.) и 2530 мкл бензилбромида (21.20 ммоль, 1.10 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, после чего растворитель был удален при пониженном давлении. Затем к твердому остатку прибавили 50 мл H<sub>2</sub>O и провели экстракцию ЭА (3 x 50 мл). Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (8:2). Выделено 3950 мг продукта **157** (80%) в виде желтого порошка.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 8.89 (дт,  $J$  = 8.5, 1.0 Гц, 1H), 8.30 – 8.24 (м, 1H), 8.19 (д,  $J$  = 8.3 Гц, 1H), 7.62 (ддд,  $J$  = 8.6, 6.8, 1.5 Гц, 4H), 7.57 – 7.51 (м, 4H), 7.30 – 7.45 (м, 5H), 7.12 (д,  $J$  = 8.3 Гц, 1H), 5.39 (с, 2H), 2.64 (с, 3H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 200.21, 158.94, 136.52, 132.42, 131.72, 129.01, 128.75 (2C), 127.95, 127.61, 127.12 (2C), 126.61, 126.05, 124.73, 122.01, 106.95, 71.21, 29.53.

**Масс-спектр (MALDI-TOF)**: рассчитано для C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 277.1; найдено 277.1.

### Синтез 1-бензилокси-4-бромацетонафталина (158)



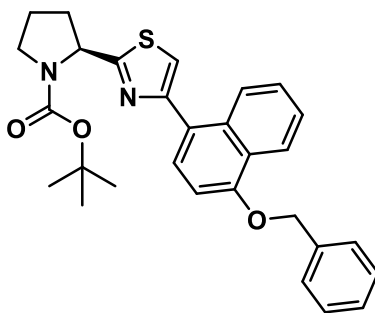
К раствору 600 мг 4-ацето-1-бензилоксинафталина **157** (2.40 ммоль, 1.00 эквив.) и 450 мг pTSA·H<sub>2</sub>O (2.40 ммоль, 1.00 эквив.) в ацетонитриле (10 мл) по каплям добавили раствор 504 мг *N*-бромсукцинимид (2.58 ммоль, 1.20 эквив.) в ацетонитриле (10 мл) при 80 °С в инертной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали еще 2 часа, после чего растворитель был удален при пониженном давлении. Далее к остатку добавили 30 мл H<sub>2</sub>O и провели экстракцию ЭА (4x15 мл). Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента

была использована смесь ПЭ - ЭА (8:2). Выделено 512 мг продукта **158** (60%) в виде желтого порошка.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.93 (дт,  $J$  = 8.5, 1.0 Гц, 1H), 8.40 (ддд,  $J$  = 8.4, 1.5, 0.7 Гц, 2H), 8.02 (д,  $J$  = 8.3 Гц, 1H), 7.66 (ддд,  $J$  = 8.6, 6.9, 1.5 Гц, 4H), 7.58 – 7.33 (м, 5H), 6.88 (д,  $J$  = 8.3 Гц, 2H), 4.53 (с, 2H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 189.35, 159.04, 136.51, 132.42, 131.70, 129.02, 128.75 (2C), 127.94, 127.61, 127.11 (2C), 126.62, 126.05, 124.74, 122.02, 106.94, 71.21, 31.03.

### Синтез производного пролина *трет*-бутил (*S*)-2-(4-(4-(бензилокси)нафтален-1-ил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-карбоксилата **159**



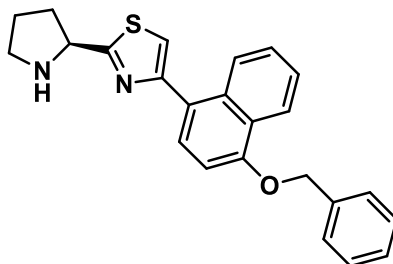
К раствору 983 мг 1-бензилокси-4-бромацетонафталина **158** (2.77 ммоль, 1.00 эквив.) и 955 мг тиоамида *N*-(*трет*-бутоксикарбонил)-*L*-пролина **151** (4.15 ммоль, 1.50 эквив.) в этиловом спирте (15 мл) прилили 223 мкл пиридина (2.77 ммоль, 1.00 эквив.) при комнатной температуре в инертной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали при 80 °С течение 1 часа. Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (8:2 → 0:1). Выделено 996 мг (74%) продукта **159** в виде желтого масла.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, смесь 2 ротамеров):  $\delta$  = 8.33 – 8.25 (м, 4H), 7.73 – 7.66 (м, 2H), 7.64 – 7.51 (м, 8H), 7.44 (т,  $J$  = 7.4 Гц, 4H), 7.40 – 7.35 (м, 2H), 7.15 (д,  $J$  = 8.1 Гц, 2H), 7.02 – 6.92 (м, 2H), 5.37 (с, 4H), 5.22 – 5.13 (м, 2H), 3.57 – 3.48 (м, 2H), 3.46 – 3.38 (м, 2H), 2.42 – 2.29 (м, 2H), 2.18 – 2.06 (м, 2H), 2.00 – 1.87 (м, 4H), 1.49 – 1.24 (м, 18H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, смесь 2 ротамеров):  $\delta$  = 173.94, 173.90, 153.88 (2C), 153.25 (2C), 136.99 (2C), 131.65 (2C), 130.13, 129.29, 128.54 (4C), 127.89 (2C), 127.80 (2C), 127.49 (4C), 126.76, 126.72, 126.20 (2C), 125.64 (2C), 125.47 (2C), 125.19, 125.13, 121.82 (2C), 116.41, 116.34, 105.42 (2C), 79.23, 79.03, 69.54 (2C), 58.88, 58.70, 46.71, 46.45, 33.69, 32.63, 28.12 (3C), 27.95 (3C), 23.46, 22.83.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  487.2, найдено 487.1.

**Синтез производного пролина *N*-(4-фторфенил)-*N*-(4-((7-(3-(3-(3-йодпропокси)пропокси)-6-метоксифинолин-4-ил)окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамида 160**



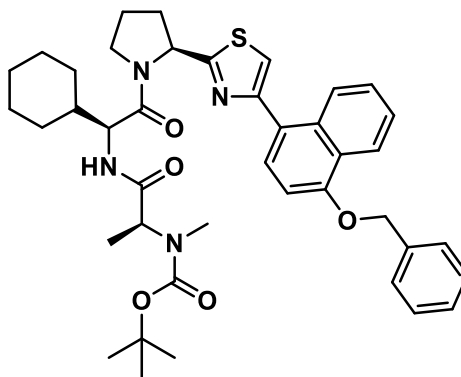
Раствор 990 мг производного **159** (2.04 ммоль, 1.00 эквив.) в смеси DCM : TFA = 1 : 1 (20 мл) перемешивали в течение полутора часов при 40°C. Затем смесь DCM и TFA удалили при пониженном давлении. Прилили насыщенный водный раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 мл), провели экстракцию ЭА (4 x 20 мл), органическую фазу сушили над сульфатом натрия. Растворитель был удален при пониженном давлении. Выделено 763 мг (97%) продукта **160** в виде желтого масла.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 8.32 – 8.26 (м, 2H), 7.62 – 7.52 (м, 6H), 7.44 (т, J = 7.5 Гц, 2H), 7.39 – 7.34 (м, 1H), 7.13 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 5.37 (с, 2H), 4.56 (дд, J = 8.2, 5.2 Гц, 1H), 4.18 – 3.57 (м, 1H), 3.04 – 2.90 (м, 2H), 2.29 – 2.17 (м, 1H), 1.96 – 1.87 (м, 1H), 1.80 – 1.70 (м, 2H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 179.02, 154.51, 153.71, 137.02, 131.65, 128.54 (2C), 127.88, 127.62, 127.48 (2C), 126.76, 125.76, 125.60, 125.40, 125.17, 121.76, 116.45, 105.40, 69.51, 58.98, 46.46, 33.75, 25.46.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> m/z 387.2, найдено 387.1.

**Синтез IAP-лиганда, *трет*-бутил ((*S*)-1-(((*S*)-2-((*S*)-2-(4-(4-(бензилокси)нафтален-1-ил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-1-циклогексил-2-оксоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)карбамата 161**



К раствору 100 мг амина **160** (0.26 ммоль, 1.00 эквив.) в DMF (5 мл) добавили 99 мг кислоты **136** (0.31 ммоль, 1.20 эквив.), 110 мкл DIPEA (0.65 ммоль, 2.50 эквив.) и 119 мг HATU (0.31 ммоль, 1.20 эквив.) в инертной атмосфере при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, после чего удалили растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ПЭ - ЭА (9:1 → 0:1). Выделено 121 мг (66%) продукта **161** в виде желтого масла.

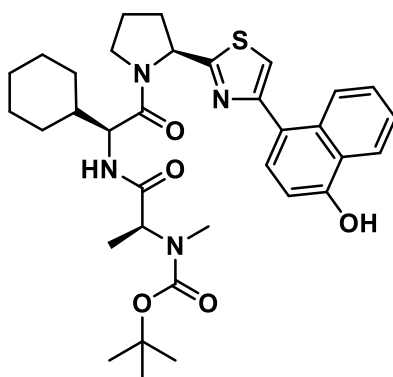
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.33 – 8.24 (м, 2H), 8.02 – 7.75 (м, 1H), 7.71 (с, 1H), 7.63 – 7.52 (м, 4H), 7.47 – 7.42 (м, 2H), 7.39 – 7.34 (м, 1H), 7.14 (д, J = 8.2 Гц, 1H), 7.02 – 6.92 (м, 1H), 5.44 (дд, J = 7.8, 2.9 Гц, 1H), 5.37 (с, 2H), 4.65 – 4.32 (м, 2H), 4.04 – 3.79 (м, 1H), 3.74 – 3.44 (м, 1H), 2.76 (с, 3H), 2.30 – 2.14 (м, 2H), 2.10 – 1.97 (м, 2H), 1.80 – 1.48 (м, 6H), 1.44 – 1.31 (м, 10H), 1.29 – 1.02 (м, 7H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 171.74, 170.39 (2C), 170.29, 153.89, 153.76, 137.02, 135.76, 131.67, 130.15, 129.31, 128.56 (2C), 127.91, 127.49 (2C), 126.74, 125.23, 125.09, 121.83, 116.56, 105.44, 79.10, 69.57, 58.34, 54.76, 47.05, 38.26, 31.85, 30.09, 29.28 (2C), 28.04 (3C), 25.76, 25.57, 25.43 (2C), 24.06, 18.89.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для C<sub>41</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> m/z 711.4, найдено 711.3.

**Синтез трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-гидрокси-нафтален-1-ил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)-карбамата 125**

В колбу Шленка с мешалкой поместили 115 мг вещества **161** (0.16 ммоль, 1.00 эквив.) и 87 мг 10% палладия на угле (0.08 ммоль, 0.50 экв), после чего дегазировали колбу и заполнили аргоном, добавили 10 мл абсолютизированного этилового спирта. Барботировали водород (P = 1 атмосфера). Реакционную смесь перемешивали в течение 72 часов при комнатной температуре. Далее отфильтровали раствор от палладия на угле при помощи фильтра Шотта. Полученный раствор сконцентрировали, продукт был очищен при помощи колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента смеси ПЭ - ЭА (9:1 → 0:1). Выделено 70 мг (70%) продукта **125** в виде твердой желтой пены.



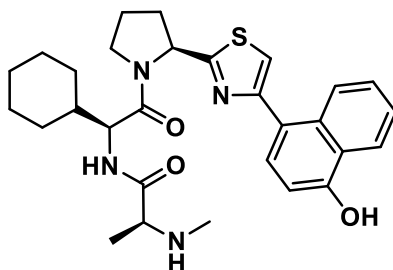
**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.36 (с, 1H), 8.24 – 8.18 (м, 2H), 8.09 – 7.93 (м, 1H), 7.63 (с, 1H), 7.62 – 7.54 (м, 1H), 7.53 – 7.45 (м, 2H), 6.91 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 5.43 (дд, J = 7.8, 2.8 Гц, 1H), 4.62 – 4.44 (м, 1H), 4.39 (д, J = 4.5 Гц, 1H), 3.83 – 3.76 (м, 1H), 3.60 – 3.52 (м, 1H), 2.76. (с, 3H), 2.32 – 2.14 (м, 2H), 2.11 – 1.95 (м, 2H), 1.79 – 1.47 (м, 6H), 1.46 – 1.33 (м, 10H), 1.27 – 1.20 (м, 7H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.12, 171.50, 170.35 (2C), 154.18, 153.57, 131.90, 128.54, 128.21, 126.50, 125.42, 124.63, 123.30, 122.25, 115.86, 107.51, 78.95, 69.54, 58.32, 54.73, 47.02, 31.82, 30.06, 28.99 (2C), 28.02 (3C), 25.74, 25.56, 25.42, 24.03, 19.99.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> m/z 620.8, найдено 620.7.

**Синтез** **(S)-N-((S)-1-циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-гидроксинафтален-1-ил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-2-(метиламино)пропанамида 162**

Раствор 61 мг соединения **161** (0.13 ммоль, 1.00 эквив.) в TFA перемешивали при 72 °С в течение 2 часов. Далее растворитель был удален при пониженном давлении. Твердый остаток растворили в 10 мл ЭА и последовательно промыли насыщенным водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 мл) и H<sub>2</sub>O (3 x 5 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Последующее фильтрование и удаление растворителя позволило выделить 61 мг целевого продукта **162** (90%) в виде твердого желтого вещества.



**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.36 (с, 1H), 8.33 – 8.14 (м, 2H), 8.09 – 7.93 (м, 1H), 7.65 – 7.59 (м, 1H), 7.53 – 7.42 (м, 2H), 7.30 – 7.22 (м, 2H), 5.45 – 5.38 (м, 1H), 4.56 – 4.46 (м, 1H), 4.23

– 3.97 (м, 1H), 3.88 – 3.76 (м, 3H), 3.73 – 3.54 (м, 1H), 3.20 (с, 3H), 3.08 – 2.94 (м, 1H), 2.30 – 2.13 (м, 1H), 2.08 – 1.98 (м, 2H), 1.80 – 1.49 (м, 6H) 1.29 – 0.90 (м, 7H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 174.89, 172.04, 170.45, 154.10, 153.41, 130.72, 128.57, 128.25, 127.74, 125.42, 124.93, 122.25, 121.39, 116.08, 107.56, 58.34, 54.76, 47.05, 35.17, 31.85, 30.09 (2C), 28.25, 25.76, 25.57, 25.43 (2C), 24.06, 18.89.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z 543.2, найдено 543.1.

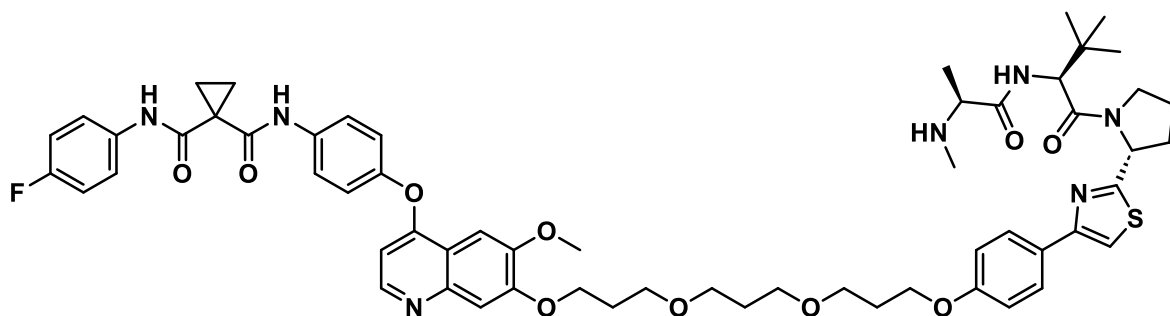
## Синтез молекул SNIPER

### Общая методика получения молекул SNIPER на основе кабозантиниба 173-176

Раствор соответствующего IAP-лиганда **143-145, 125** (1.00 эквив.) и Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.00 эквив.) в DMF (3 мл) в инертной атмосфере перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем к реакционной смеси добавили производное кабозантиниба **170**, содержащее бром на конце линкера, и перемешивали реакцию еще 12 часов при комнатной температуре. Далее растворитель был удален при пониженном давлении.

Продукты были выделены при помощи колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента смеси ЭА – MeOH (1:0 → 7:3).

**N-(4-((7-(3-(3-(3-(4-(2-((R)-1-((S)-3,3-диметил-2-((S)-2-(метиламино)пропанамидо)-бутаноил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)фенокси)пропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-N-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид**  
**173a**



Светло-желтый порошок, выход 40%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.20 (с, 1H), 10.07 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.91 (д, J = 10.0 Гц, 1H), 7.83–7.72 (м, 5H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.49 (с, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.21 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.17–7.11 (м, 2H), 6.93 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 6.41 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 5.33 (дд, J = 7.9, 1.4 Гц, 1H), 4.64 (д, J = 10.0 Гц, 1H), 4.18 (т, J = 6.2 Гц, 2H), 4.02 (т, J = 6.2 Гц, 2H), 3.92 (с, 3H), 3.76–

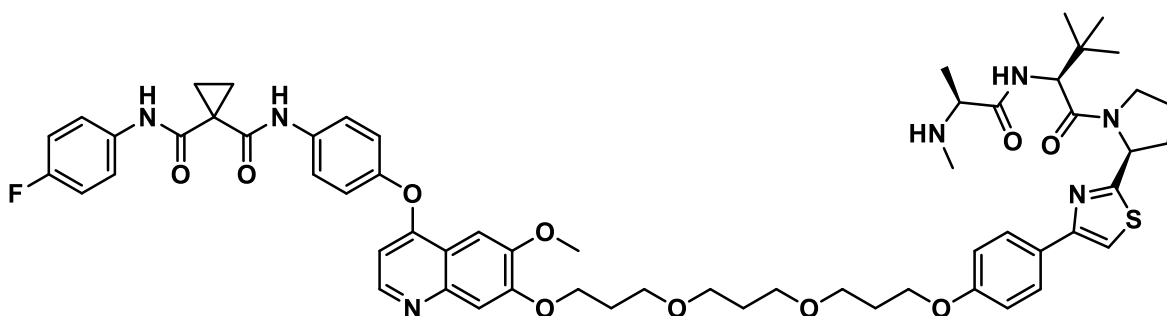
3.67 (м, 2H), 3.54 (т,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 3.56–3.50 (м, 7H), 3.30 (с, 3H), 3.05 (дд,  $J = 13.7$ , 6.9 Гц, 1H), 2.33–2.22 (м, 1H), 2.15–2.08 (м, 1H), 2.04–1.99 (м, 4H), 1.94–1.87 (м, 2H), 1.74 (п,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 1.48 (с, 4H), 1.08 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H), 0.97 (с, 9H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 172.61, 169.59$  (2C), 168.24, 168.19, 159.95, 158.38, 158.29 (д,  $J = 240.1$  Гц), 153.69, 151.85, 149.50, 149.44, 148.83, 146.42, 136.39, 135.17 (д,  $J = 2.6$  Гц), 127.27 (2C), 127.01, 122.49 (д,  $J = 7.8$  Гц, 2C), 122.20 (2C), 121.15 (2C), 115.12, 115.04 (д,  $J = 22.1$  Гц, 2C), 114.53 (2C), 111.34, 108.52, 103.04, 99.21, 67.04 (4C), 66.53, 65.42, 64.59 (2C), 58.20, 55.75, 47.41, 34.62, 31.84, 31.58, 29.60, 29.10, 28.91, 26.23 (3C), 26.14, 23.53, 19.47, 15.43 (2C).

$^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = (-118.98)–(-119.08)$  (м).

**HRMS (ESI):**  $m/z$   $[M+H]^+$  для  $\text{C}_{59}\text{H}_{70}\text{FN}_7\text{O}_{10}\text{S}$  рассчитано: 1088.4962; найдено: 1088.4943;  $[M+2H]^+$  для  $\text{C}_{59}\text{H}_{70}\text{FN}_7\text{O}_{10}\text{S}$  рассчитано: 544.7517; найдено: 544.7516.

***N*-(4-((7-(3-(3-(3-(4-(2-((*S*)-1-((*S*)-3,3-Диметил-2-((*S*)-2-(метиламино)пропанамидо)-бутаноил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)фенокси)пропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 173b**



Светло-желтый порошок, выход 48%.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 10.18$  (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.45 (д,  $J = 5.2$  Гц, H), 8.17–8.03 (м, 1H), 7.82 (д,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.78–7.74 (м, 3H), 7.66–7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.21 (д,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.17–7.12 (м, 2H), 6.95 (д,  $J = 8.9$  Гц, 2H), 6.42 (д,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.34 (дд,  $J = 7.9$ , 3.4 Гц, 1H), 4.54 (д,  $J = 9.1$  Гц, 1H), 4.19 (т,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 4.02 (т,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 3.92 (с, 3H), 3.86–3.72 (м, 2H), 3.54 (т,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 3.50–3.41 (м, 7H), 3.30 (с, 3H), 3.08–2.86 (м, 1H), 2.35–2.30 (м, 1H), 2.23–2.12 (м, 2H), 2.04–1.96 (м, 3H), 1.94–1.89 (м, 2H), 1.74 (п,  $J = 6.2$  Гц, 2H), 1.48 (с, 4H), 1.20–1.15 (м, 3H), 0.97 (с, 9H).

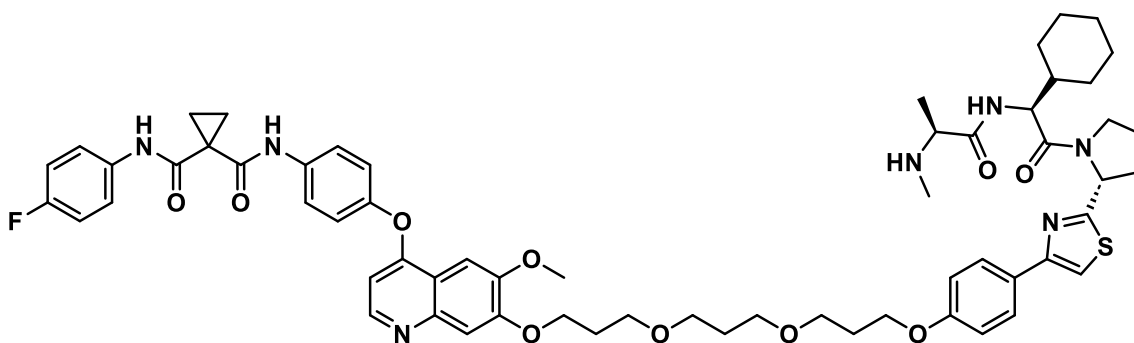
$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta = 172.01, 170.01$  (2C), 168.15, 168.10, 159.91, 158.41, 158.25 (д,  $J = 240.1$  Гц), 153.38, 151.81, 149.47, 149.40, 148.79, 146.41, 136.37, 135.15 (д,  $J = 2.5$  Гц), 127.25 (2C), 126.91, 122.40 (д,  $J = 7.7$  Гц, 2C), 122.15 (2C), 121.12 (2C), 115.09, 115.01 (д,  $J = 22.1$

Гц, 2С), 114.54 (2С), 111.66, 108.51, 103.01, 99.17, 67.01 (4С), 66.50, 65.38, 64.57 (2С), 58.27, 55.71, 47.91, 34.96, 31.64, 31.54, 29.57, 29.08, 28.88, 26.29 (3С), 26.23, 24.20, 20.76, 15.39 (2С).

<sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.99)–(-119.09) (м).

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>59</sub>H<sub>70</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S рассчитано: 1088.4962; найдено: 1088.4946; [M+2H]<sup>+</sup> для C<sub>59</sub>H<sub>70</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S рассчитано: 544.7517; найдено: 544.7528.

***N*-(4-((7-(3-(3-(3-(4-(2-((*R*)-1-((*S*)-2-Циклогексил-2-((*S*)-2-(метиламино)пропанамидо)-ацетил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)фенокси)пропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид**  
**174a**



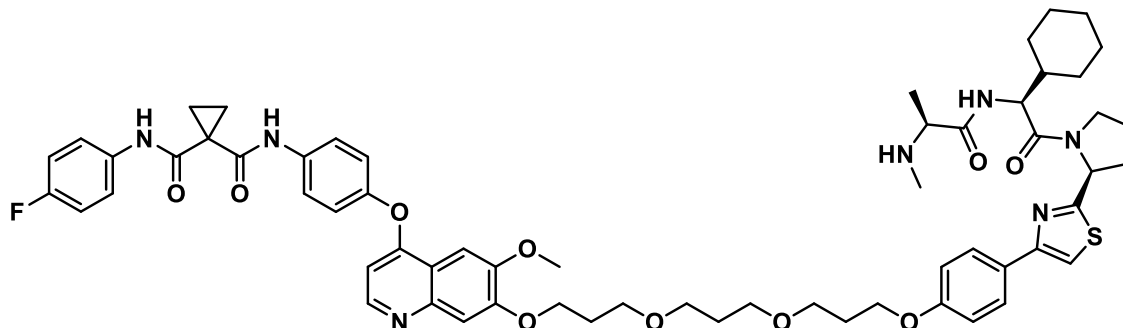
Светло-желтый порошок, выход 44%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 10.19 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.83–8.68 (м, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 7.88–7.70 (м, 5H), 7.68–7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.37 (с, 1H), 7.21 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.15 (т, J = 8.9 Гц, 2H), 6.95 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 6.42 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 5.35 (дд, J = 7.8, 1.3 Гц, 1H), 4.53–4.45 (м, 1H), 4.19 (т, J = 6.2 Гц, 2H), 4.03–3.99 (м, 2H), 3.92 (с, 3H), 3.74–3.65 (м, 2H), 3.54 (т, J = 6.0 Гц, 2H), 3.51–3.41 (м, 7H), 3.28 (с, 3H), 3.11–2.87 (м, 1H), 2.46–2.42 (м, 1H), 2.30–2.22 (м, 1H), 2.19–2.11 (м, 1H), 2.05–1.99 (м, 3H), 1.95–1.88 (м, 2H), 1.79–1.56 (м, 8H), 1.48 (с, 4H), 1.29 (д, J = 6.7 Гц, 3H), 1.24–1.06 (м, 5H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 172.44, 170.34, 169.62, 168.20, 168.14, 159.93, 158.41, 158.27 (д, J = 240.2 Гц), 153.73, 151.83, 149.48, 149.39, 148.81, 146.41, 136.38, 135.16 (д, J = 2.8 Гц), 127.33, 127.26, 122.98, 122.43 (д, J = 7.9 Гц, 2С), 122.17 (2С), 121.14 (2С), 115.11, 115.03 (д, J = 22.2 Гц, 2С), 114.55 (2С), 111.50, 108.51, 103.04, 99.19, 67.03 (4С), 66.52, 65.41, 64.60 (2С), 58.24, 55.73, 46.95, 31.78, 31.56, 29.59 (2С), 29.09 (2С), 28.89, 28.35, 25.79, 25.45, 25.37 (2С), 25.29, 23.51, 15.41 (2С).

<sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = (-118.98)–(-119.08) (м).

***N*-(4-((7-(3-(3-(3-(4-(2-((*S*)-1-((*S*)-2-Циклогексил-2-((*S*)-2-(метиламино)пропанамидо)-ацетил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)фенокси)пропокси)пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 174b**



Светло-желтый порошок, выход 39%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.18 (с, 1H), 10.04 (с, 1H), 8.45 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 8.32–8.17 (м, 1H), 7.84–7.79 (м, 2H), 7.78–7.73 (м, 3H), 7.67–7.61 (м, 2H), 7.50 (с, 1H), 7.38 (с, 1H), 7.21 (д, J = 9.0 Гц, 2H), 7.15 (т, J = 8.9 Гц, 2H), 6.95 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 6.42 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 5.35 (дд, J = 7.9, 2.7 Гц, 1H), 4.49 (т, J = 7.8 Гц, 1H), 4.19 (т, J = 6.4 Гц, 2H), 4.02 (т, J = 6.4 Гц, 2H), 3.92 (с, 3H), 3.85–3.74 (м, 2H), 3.54 (т, J = 6.3 Гц, 2H), 3.51–3.41 (м, 7H), 3.27 (с, 3H), 3.06–2.85 (м, 1H), 2.36–2.28 (м, 1H), 2.27–2.20 (м, 1H), 2.16–2.08 (м, 1H), 2.04–2.00 (м, 3H), 1.95–1.88 (м, 2H), 1.79–1.56 (м, 8H), 1.48 (с, 4H), 1.30–1.06 (м, 8H).

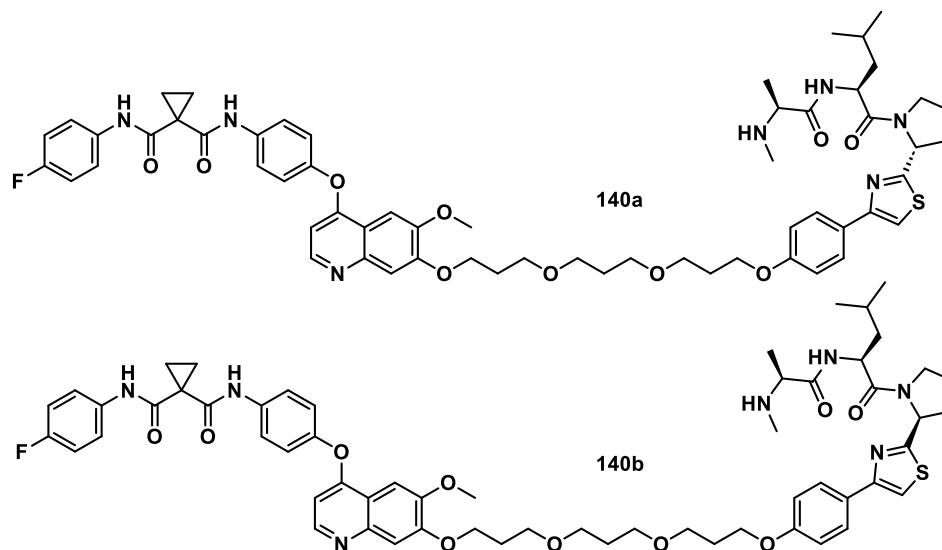
**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.28, 170.11, 169.35, 168.17, 168.11, 159.91, 158.42, 158.26 (д, J = 240.3 Гц), 153.57, 151.82, 149.47, 149.41, 148.80, 146.41, 136.37, 135.16 (д, J = 2.5 Гц), 127.25 (2C), 126.90, 122.41 (д, J = 8.0 Гц, 2C), 122.16 (2C), 121.13 (2C), 115.09, 115.02 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 114.53 (2C), 111.56, 108.50, 103.01, 99.18, 67.01 (4C), 66.50, 65.39, 64.59 (2C), 58.28, 55.72, 47.23, 31.80, 31.54, 29.58 (2C), 29.08 (2C), 28.89, 25.75, 25.59, 25.42 (2C), 25.28, 24.77, 24.00, 15.40 (2C).

**<sup>19</sup>F ЯМР** (376 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = (–118.98)–(–119.09) (м).

**Элементный анализ:** для C<sub>61</sub>H<sub>72</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S рассчитано: С, 65.75; Н, 6.51; найдено: С, 65.71; Н, 6.45.

**HRMS (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> для C<sub>61</sub>H<sub>72</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S рассчитано: 1114.5118; найдено: 1114.5100; [M+2H]<sup>+</sup> рассчитано: 557.7595; найдено: 557.7605.

Вещество 140, смесь 2 диастереомеров (140a : 140b = 1 : 1): *N*-(4-фторфенил)-*N*-(4-((6-метокси-7-(3-(3-(3-(4-(2-((*R*)-1-(метил-*L*-аланил-*L*-лейцил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)фенокси)пропокси)пропокси)пропокси)хинолин-4-ил)окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 140a, *N*-(4-фторфенил)-*N*-(4-((6-метокси-7-(3-(3-(3-(4-(2-((*S*)-1-(метил-*L*-аланил-*L*-лейцил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)фенокси)пропокси)пропокси)пропокси)хинолин-4-ил)окси)фенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид 140b.



Светло-желтый порошок, суммарный выход диастереомеров - 45%.

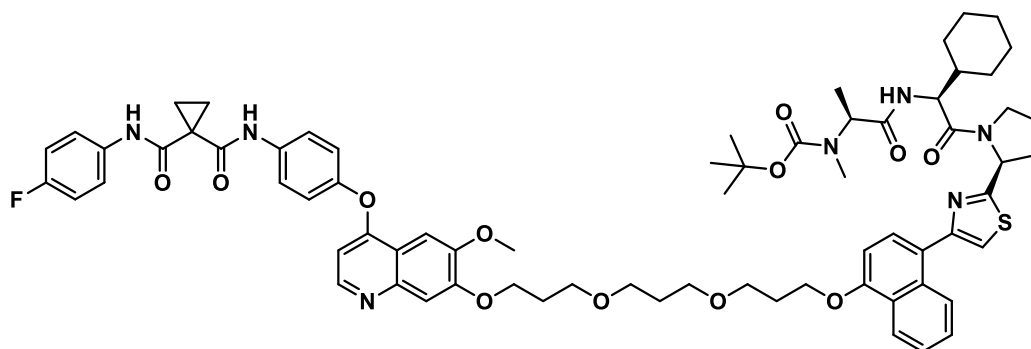
**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, смесь двух ротамеров 1:1):  $\delta$  = 10.18 (с, 2H), 10.05 (с, 2H), 8.45 (д, *J* = 5.2 Гц, 2H), 8.20–8.09 (м, 2H), 7.85–7.78 (м, 4H), 7.77–7.72 (м, 6H), 7.66–7.60 (м, 4H), 7.50 (с, 2H), 7.37 (с, 2H), 7.21 (д, *J* = 8.8 Гц, 4H), 7.15 (т, *J* = 8.9 Гц, 4H), 6.98–6.92 (м, 4H), 6.42 (д, *J* = 5.3 Гц, 2H), 5.35 (дд, *J* = 7.8, 2.3 Гц, 1H), 5.30 (дд, *J* = 7.9, 1.4 Гц, 1H), 4.77–4.64 (м, 2H), 4.19 (т, *J* = 6.3 Гц, 4H), 4.01 (т, *J* = 6.1 Гц, 4H), 3.92 (с, 6H), 3.81–3.68 (м, 4H), 3.57–3.51 (м, 4H), 3.49–3.45 (м, 14H), 3.27 (с, 6H), 3.15–3.05 (м, 2H), 2.34–2.31 (м, 2H), 2.30–2.25 (м, 2H), 2.16–2.09 (м, 2H), 2.06–1.99 (м, 10H), 1.74 (п, *J* = 6.4 Гц, 4H), 1.68–1.58 (м, 2H), 1.57–1.49 (м, 4H), 1.48 (с, 8H), 1.13 (д, *J* = 6.8 Гц, 6H), 0.94–0.88 (м, 12H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, смесь двух ротамеров 1:1):  $\delta$  = 172.33, 172.15, 170.51, 169.94, 168.59, 168.55, 168.16, 168.14, 168.11, 168.10, 160.03, 159.98, 158.27 (д, *J* = 240.1 Гц), 158.25 (д, *J* = 240.1 Гц), 157.42, 157.40, 154.26, 154.11, 152.13, 152.10, 149.56 (2C), 149.41, 149.33, 148.36, 148.33, 145.56, 145.50, 136.52, 136.49, 135.17 (д, *J* = 2.5 Гц), 135.15 (д, *J* = 2.5 Гц), 127.36 (4C), 125.52, 125.51, 122.43 (д, *J* = 7.8, 2C), 122.40 (д, *J* = 7.8, 2C), 122.17 (2C), 122.15 (2C), 121.17 (2C), 121.16 (2C), 115.41 (4C), 115.12, 115.10, 115.04 (д, *J* = 22.2 Гц, 2C), 115.01 (д, *J* = 22.2 Гц, 2C), 111.23, 111.01, 108.27, 108.03, 103.07, 103.02, 99.22, 99.18, 67.04 (4C), 67.01 (4C), 65.36

(2C), 65.10 (2C), 65.02 (2C), 59.19 (2C), 58.50, 58.41, 49.31, 48.98, 46.59, 46.51, 34.32 (2C), 31.73 (2C), 31.70, 31.65, 31.38, 30.97, 30.72, 30.68, 29.55, 29.50, 29.03 (2C), 24.27, 24.23, 24.00, 23.87, 23.21, 23.15, 21.40, 21.34, 15.85, 15.60, 15.41 (2C), 15.39 (2C).

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $C_{59}H_{70}FN_7O_{10}S$   $[M+H]^+$   $m/z$  1088.5, найдено 1088.2; рассчитано для  $C_{59}H_{70}FN_7O_{10}S$   $[M+Na]^+$   $m/z$  1110.5, найдено 1110.3.

**Трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-циклогексил-2-((S)-2-(4-(4-(3-(3-(3-((4-(4-(1-((4-фторфенил)-карбамоил)циклопропан-1-карбоксамидо)фенокси)-6-метоксихинолин-7-ил)окси)-пропокси)пропокси)пропокси)нафтален-1-ил)тиазол-2-ил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)(метил)карбамат 176**



Бежевое твердое вещество, выход 40%.

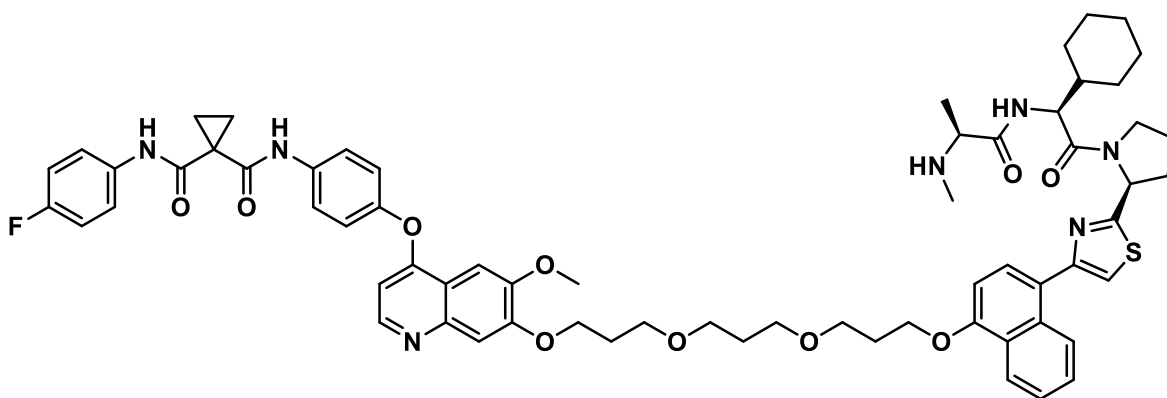
**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  = 10.18 (с, 1H), 10.05 (с, 1H), 8.45 (д,  $J$  = 5.2 Гц, 1H), 8.27 – 8.21 (м, 2H), 8.00 – 7.91 (м, 1H), 7.75 (д,  $J$  = 9.0 Гц, 2H), 7.68 – 7.61 (м, 3H), 7.58 (д,  $J$  = 8.0 Гц, 1H), 7.54 – 7.48 (м, 3H), 7.37 (с, 1H), 7.21 (д,  $J$  = 9.0 Гц, 2H), 7.18 – 7.12 (м, 2H), 6.99 (д,  $J$  = 8.2 Гц, 1H), 6.41 (д,  $J$  = 5.3 Гц, 1H), 5.42 (дд,  $J$  = 7.7, 2.9 Гц, 1H), 4.51 – 4.41 (м, 1H), 4.22 (т,  $J$  = 6.2 Гц, 2H), 4.16 (т,  $J$  = 6.3 Гц, 2H), 3.91 (с, 3H), 3.78 (т,  $J$  = 6.7 Гц, 2H), 3.60 (т,  $J$  = 6.2 Гц, 2H), 3.52 – 3.40 (м, 8H), 2.76 (с, 3H), 2.30 – 2.12 (м, 2H), 2.08 – 1.94 (м, 5H), 1.77 – 1.51 (м, 8H), 1.48 (с, 4H), 1.39 (с, 9H), 1.29 – 1.02 (м, 8H).

**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  = 171.68, 171.13, 170.37 (2C), 168.16, 168.11, 159.99, 158.27 (д,  $J$  = 240.1 Гц), 154.24, 153.81, 151.86, 149.45, 149.43, 148.72, 146.29, 136.39, 135.16 (д,  $J$  = 2.6 Гц), 131.57, 127.90 (2C), 126.77, 125.55, 125.26, 125.10, 124.73, 122.41 (д,  $J$  = 7.8 Гц, 2C), 122.15 (2C), 121.13 (2C), 116.40, 115.09, 115.02 (д,  $J$  = 22.2 Гц, 2C), 108.41, 104.65, 103.00, 99.19, 79.01, 67.07 (2C), 67.02 (2C), 66.66, 66.48, 65.38, 64.99, 58.31, 55.72, 54.72, 47.02, 35.77, 31.80, 31.54, 29.59 (2C), 29.08 (2C), 28.85, 28.01 (3C), 25.73, 25.54, 25.41 (2C), 24.03, 15.40 (2C).

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $C_{70}H_{82}FN_7O_{12}S$   $[M+H]^+$   $m/z$  1264.6, найдено 1264.3.

**Синтез** *N*-(4-((7-(3-(3-(3-((4-(2-((*S*)-1-((*S*)-2-циклогексил-2-((*S*)-2-(метиламино)пропан-амидо)ацетил)пирролидин-2-ил)тиазол-4-ил)нафтален-1-ил)окси)пропокси)-пропокси)пропокси)-6-метоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-*N*-(4-фторфенил)-циклопропан-1,1-дикарбоксамида **177**

Раствор 13 мг соединения **176** (0.01 ммоль, 1.00 эквив.) в смеси TFA : DCM = 1 : 1 (6 мл) перемешивали при 40 °С в течение 2 часов. Далее смесь растворителей удалили при пониженном давлении. Твердый остаток растворили в 10 мл ЭА и последовательно промыли насыщенным водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 мл) и H<sub>2</sub>O (2 x 5 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Последующее фильтрование и удаление растворителя позволило выделить 10 мг целевого продукта **177** (89%) в виде твердого желтого вещества.



**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.15 (с, 1H), 10.03 (с, 1H), 8.44 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 8.28 – 8.19 (м, 2H), 8.00 – 7.86 (м, 1H), 7.79 – 7.73 (м, 2H), 7.69 – 7.60 (м, 3H), 7.58 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.56 – 7.47 (м, 3H), 7.36 (с, 1H), 7.19 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 7.13 (т, J = 8.9 Гц, 2H), 6.99 (д, J = 8.2 Гц, 1H), 6.41 (д, J = 5.2 Гц, 1H), 5.43 (дд, J = 7.9, 2.8 Гц, 1H), 4.55 – 4.46 (м, 1H), 4.26 – 4.09 (м, J = 6.2 Гц, 4H), 3.91 (с, 3H), 3.84 – 3.74 (м, 2H), 3.65 – 3.56 (м, 2H), 3.53 – 3.40 (м, 8H), 3.17 (с, 3H), 3.01 – 2.93 (м, 1H), 2.31 – 2.14 (м, 2H), 2.11 – 1.95 (м, 5H), 1.79 – 1.54 (м, 8H), 1.45 (с, 4H), 1.23 (с, 3H), 1.18 – 1.01 (м, 5H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.03, 172.03, 170.35, 168.15, 168.10, 160.01, 158.25 (д, J = 240.1 Гц), 154.27, 153.80, 151.98, 149.97, 149.40, 148.70, 146.32, 136.40, 135.14 (д, J = 2.6 Гц), 131.56, 127.87 (2C), 126.85, 125.56, 125.30, 125.11, 124.75, 122.40 (д, J = 7.8 Гц, 2C), 122.15 (2C), 121.14 (2C), 116.45, 115.12, 115.01 (д, J = 22.2 Гц, 2C), 108.45, 104.56, 103.00, 99.23, 67.07 (4C), 66.60, 66.52, 65.40, 65.01, 58.34, 55.72, 54.73, 47.01, 33.72, 31.82, 31.54, 29.60 (2C), 29.08 (2C), 28.89, 25.72, 25.54, 25.42 (2C), 24.01, 15.41 (2C).

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>65</sub>H<sub>74</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S [M+H]<sup>+</sup> m/z 1164.5, найдено 1164.2; рассчитано для C<sub>65</sub>H<sub>74</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>10</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> m/z 1186.5, найдено 1186.1.

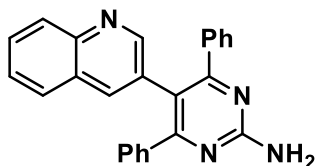
## Синтез тризамещенных аминопиридинов

Кетоны **201-207** для проведения реакции Бигинелли были синтезированы по литературным методикам, исходя из интернальных алкинов **185-188**, **193-195**, аналитические данные для этих соединений согласуются с ранее опубликованными [382–387].

### Общая методика получения 4,5,6-тризамещенных 2-аминопиримидинов **208–216**

К раствору кетона **201-207** (1.20 эквив.) в THF (5 мл) добавили соответствующий альдегид (1.20 эквив.), NaOH (3.00 эквив.) и карбонат гуанидина **197** (1.20 эквив.) и перемешивали при 70 °C в инертной атмосфере. Через 12 часов полученную смесь охладили до 0 °C и добавили 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинона (0.40 эквив.), реакцию смесь перемешивали ещё 30 минут. Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали смесь ПЭ - ЭА (1:1 → 0:1).

### 4,6-Дифенил-5-(хинолин-3-ил)пириимидин-2-амин (**208**)



Бесцветные кристаллы, выход 67%.

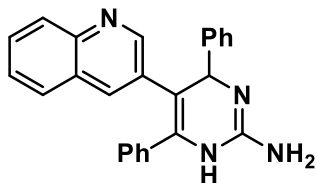
$T_{пл}$  = 183–185 °C.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.39 (д,  $J$  = 2.2 Гц, 1H), 8.19 (д,  $J$  = 8.5 Гц, 1H), 7.70–7.78 (м, 2H), 7.50–7.58 (м, 2H), 7.16–7.25 (м, 10H), 5.80 (уш. с, 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 167.72 (2C), 161.41, 150.53, 143.90, 140.31, 137.15, 131.03, 130.41 (2C), 129.63 (2C), 129.48 (4C), 128.59 (4C), 127.94, 127.82, 127.60, 127.48, 117.84.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для  $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{N}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  375.2; найдено 375.4.

### 4,6-Дифенил-5-(хинолин-3-ил)-1,4-дигидропириимидин-2-амин (**199**)



Соединение **199** получено в качестве побочного продукта при синтезе соединения **208** без использования DDQ. Белые кристаллы, выход 15%.

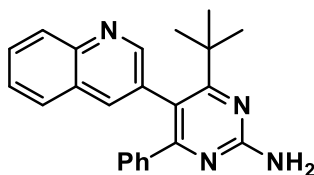
$T_{пл}$  = 192–193 °C.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10.66 (уш.с, 1H), 8.26 (д, J = 2.2 Гц, 1H), 7.91 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 7.57–7.62 (м, 2H), 7.49–7.54 (м, 1H), 7.38–7.46 (м, 3H), 7.27–7.37 (м, 3H), 7.15–7.25 (м, 5H), 5.31 (с, 1H), 3.04 (уш.с, 2H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 160.38, 150.50, 145.45, 143.87, 142.44, 140.28, 135.08, 133.74, 131.00, 129.60 (2C), 129.45 (4C), 128.56 (4C), 127.91, 127.79, 127.57, 127.45, 106.83, 61.35.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> m/z 377.2; найдено 377.4.

**4-(Трет-бутил)-6-фенил-5-(хинолин-3-ил)пиримидин-2-амин (209)**



Светло-желтый порошок, выход 15%.

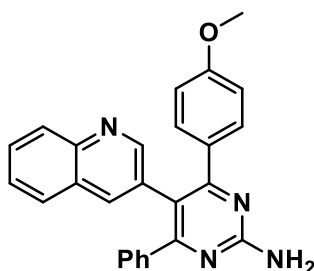
T<sub>пл</sub> = 190–192 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.94 (д, J = 2.2 Гц, 1H), 8.03–8.15 (м, 3H), 7.92–7.97 (м, 2H), 7.37–7.59 (м, 5H), 6.21 (уш.с, 2H), 1.30 (с, 9H)

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.52, 164.92, 163.32, 150.00, 147.92, 135.16, 134.53, 132.08, 130.33, 130.17, 129.28 (2C), 129.11 (2C), 129.00, 128.50, 128.13, 127.36, 29.84 (4C).

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 355.2; найдено 355.1.

**4-(4-Метоксифенил)-6-фенил-5-(хинолин-3-ил)пиримидин-2-амин (210)**



Бледно-желтый порошок, выход 49%.

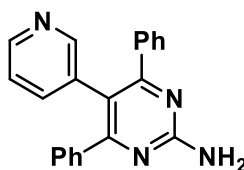
T<sub>пл</sub> = 199 – 200 °С.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 8.39 (д, J = 2.2 Гц, 1H), 7.83–7.88 (м, 2H), 7.63–7.69 (м, 2H), 7.46–7.51 (м, 1H), 7.15–7.21 (м, 7H), 6.97 (уш.с, 2H), 6.70–6.75 (м, 2H), 3.65 (с, 3H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 166.91, 165.99, 162.45, 159.23, 152.88, 145.50, 138.82, 137.52, 130.99, 130.90 (2C), 130.79, 129.28, 129.10 (2C), 128.56 (2C), 128.11, 127.85, 127.60 (2C), 126.97, 116.69, 113.08 (2C), 55.03.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $C_{26}H_{20}N_4O$   $[M+H]^+$   $m/z$  405.2; найдено 405.0.

**4,6-Дифенил-5-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-амин (211)**



Светло-желтый порошок, выход 30%.

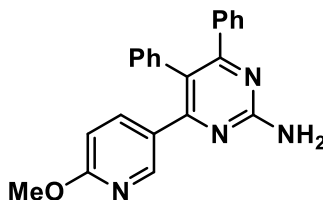
$T_{пл} > 200$  °C (разлагается).

**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  = 8.36 (д,  $J$  = 3.9 Гц, 1H), 8.11 (д,  $J$  = 0.9 Гц, 1H), 7.19–7.30 (м, 11H), 7.06–7.11 (м, 1H), 5.66 (уш.с, 2H).

**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  = 167.57 (2C), 162.14, 151.99, 147.69, 138.83, 138.27, 133.22 (2C), 129.42 (4C), 128.95 (2C), 128.22 (4C), 122.86, 118.76.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $C_{21}H_{16}N_4$   $[M+H]^+$   $m/z$  325.1; найдено 325.3.

**4-(6-Метоксипиридин-3-ил)-5,6-дифенилпиримидин-2-амин (212)**



Желтые кристаллы, выход 55%.

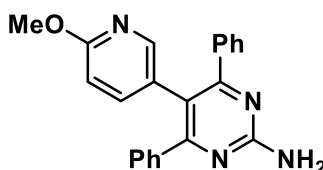
$T_{пл} > 200$  °C (разлагается).

**$^1H$  ЯМР** (400 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 7.43–7.47 (м, 1H), 7.11–7.29 (м, 10H), 6.90–6.94 (м, 1H), 6.56 (д.д,  $J$  = 8.7, 1.3 Гц, 1H), 5.87 (уш.с, 2H), 3.89 (с, 3H).

**$^{13}C$  ЯМР** (101 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 165.42, 164.64, 164.37, 159.54, 148.89, 139.70, 136.30, 135.27, 131.52, 129.72 (2C), 129.50 (2C), 128.81 (2C), 128.22 (2C), 127.79, 126.31, 122.19, 110.19, 53.90.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для  $C_{22}H_{18}N_4O$   $[M+H]^+$   $m/z$  355.2; найдено 355.3.

**5-(6-Метоксипиридин-3-ил)-4,6-дифенилпиримидин-2-амин (213)**



Желтые кристаллы, выход 63%.

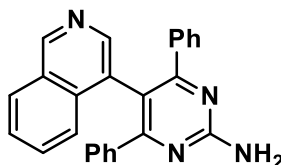
$T_{пл} > 200\text{ }^{\circ}\text{C}$  (разлагается).

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.64$  (д.д,  $J = 2.5, 0.6$  Гц, 1H), 7.26–7.32 (м, 10H), 7.03 (д.д,  $J = 8.5, 2.5$  Гц, 1H), 6.50 (д.д,  $J = 8.6, 0.6$  Гц, 1H), 5.95 (уш.с, 2H), 3.83 (с, 3H).

**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 166.56, 163.31$  (2C), 158.33, 148.88, 141.26, 135.26 (2C), 130.51 (2C), 129.62 (4C), 128.64 (4C), 123.62, 118.70, 110.85, 53.67.

**Масс-спектр (MALDI-TOF)**: рассчитано для  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  355.2; найдено 355.3.

#### 5-(Изохинолин-4-ил)-4,6-дифенилпиримидин-2-амин (214)



Светло-желтая твердая пена, выход 65%.

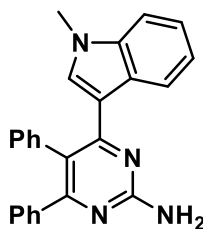
$T_{пл} > 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.04$  (с, 1H), 8.15 (с, 1H), 7.81–7.87 (м, 1H), 7.41–7.54 (м, 3H), 7.13–7.19 (м, 4H), 6.98–7.11 (м, 6H), 5.50 (уш.с, 2H).

**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 168.41$  (2C), 162.59, 151.95, 145.96, 138.58, 135.24 (2C), 130.60 (2C), 128.86 (3C), 128.57 (4C), 128.01, 127.94 (4C), 127.22, 124.57, 116.62.

**Масс-спектр (MALDI-TOF)**: рассчитано для  $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{N}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  375.2; найдено 375.3.

#### 5-(1-Метил-1H-индол-1-ил)-4,6-дифенилпиримидин-2-амин (215)



Светло-желтый порошок, выход 52%.

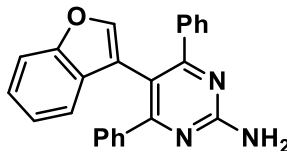
$T_{пл} = 185 - 186\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**$^1\text{H}$  ЯМР** (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.41$ –7.44 (м, 1H), 7.19–7.32 (м, 8H), 7.07–7.14 (м, 2H), 7.02–7.06 (м, 1H), 6.92–6.96 (м, 2H), 6.13 (с, 1H), 5.63 (уш.с, 2H), 3.74 (с, 3H).

**$^{13}\text{C}$  ЯМР** (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165.83, 160.48, 160.26, 131.26$  (2C), 129.51 (4C), 129.15, 128.35 (2C), 128.08 (4C), 128.35 (2C), 127.31, 127.23, 123.19, 121.59, 119.96, 119.67, 109.85, 101.48, 31.97.

**Масс-спектр (MALDI-TOF)**: рассчитано для  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4$   $[\text{M}]^+$   $m/z$  376.2; найдено 376.4.

### 5-(Бензофуран-3-ил)-4,6-дифенилпиримидин-2-амин (216)



Белый порошок, выход 15%.

$T_{пл} = 187 - 188^{\circ}C$

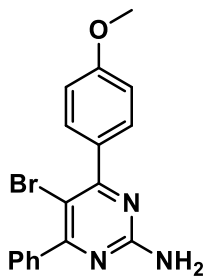
$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7.28-7.52$  (м, 8H),  $7.16-7.25$  (м, 4H),  $7.13$  (с, 1H),  $6.86-7.09$  (м, 2H),  $5.94$  (уш.с, 2H).

$^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 168.59$  (2C),  $163.36$ ,  $154.94$ ,  $144.44$ ,  $135.02$  (2C),  $130.90$  (2C),  $128.85$  (4C),  $128.54$  (4C),  $128.32$ ,  $126.92$ ,  $124.93$ ,  $123.28$ ,  $119.88$ ,  $116.22$ ,  $111.77$ .

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для  $C_{24}H_{17}N_3O$   $[M+H]^+$   $m/z$  364.1; найдено 364.1.

2-Амино-4-(4-метоксифенил)-6-фенилпиримидин (219) был синтезирован по литературной методике [388], аналитические данные согласуются с ранее опубликованными.

### 2-Амино-5-бromo-4-(4-метоксифенил)-6-фенилпиримидин (220)

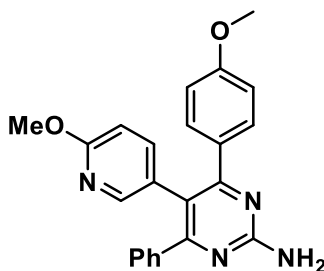


К раствору 500 мг производного **219** (1.80 ммоль, 1.00 эквив.) в MeCN (10 мл) по каплям добавили раствор 390 мг *N*-бромсукцинимид (2.20 ммоль, 1.20 эквив.) в MeCN (10 мл) при  $0^{\circ}C$  в инертной атмосфере. Реакционную смесь оставили нагреваться до комнатной температуры, и перемешивали в течение 12 часов. Растворитель был удален при пониженном давлении, к твердому остатку добавили 10 мл  $H_2O$  и провели экстракцию ЭА ( $3 \times 15$  мл). Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$ . После фильтрования и удаления растворителя при пониженном давлении продукт был выделен при помощи колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали смесь ПЭ – ЭА (1:1). Выделено 670 мг продукта **219** (85%) в виде желтого порошка. Аналитические данные полученного соединения **219** согласуются с ранее опубликованными [389].

### Общая методика получения 4,5,6-тризамещенных 2-аминопиримидинов 221–225

Суспензию  $\text{PdCl}_2$  (0.05 эквив.) и  $\text{PPh}_3$  (0.10 эквив.) в 1,4-диоксане (5 мл) перемешивали при  $60^\circ\text{C}$  в течение 30 минут в инертной атмосфере. Затем к раствору добавили бромпроизводное **220** (1.00 эквив.),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3.00 эквив.), 0.5 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и перемешивали еще 10 минут. Затем добавили соответствующую бороновую кислоту или ее эфир (1.50 эквив.). Перемешивание продолжали 2 часа при  $100^\circ\text{C}$ . После охлаждения реакционную смесь фильтровали через целит и промывали 10 мл  $\text{EtOAc}$ . Растворитель удалили при пониженном давлении, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя в качестве элюента смесь ПЭ – ЭА (9:1  $\rightarrow$  0:1).

#### 4-(4-Метоксифенил)-5-(6-метоксипиридин-3-ил)-6-фенилпириимидин-2-амин (221)



Светло-бежевый порошок, выход 99%.

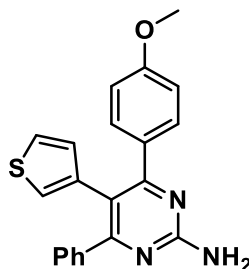
$T_{\text{пл}} > 200^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.66 (д,  $J$  = 2.4 Гц, 1H), 7.24–7.33 (м, 7H), 7.06 (д.д,  $J$  = 8.5, 2.5 Гц, 1H), 6.76–6.82 (м, 2H), 6.52–6.55 (м, 1H), 6.17 (уш.с, 2H), 3.86 (с, 3H), 3.79 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 167.32, 165.70, 163.10, 161.12, 159.36, 148.89, 141.42, 136.67, 131.51 (2C), 129.77, 129.44 (2C), 128.45 (2C), 128.14, 124.63, 118.28, 113.99 (2C), 110.74, 55.48, 53.6.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  385.2; найдено 385.0.

#### 4-(4-Метоксифенил)-6-фенил-5-(тиофен-3-ил)пириимидин-2-амин (222)



Белый порошок, 65%.

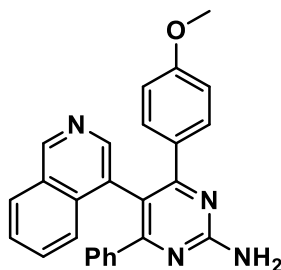
$T_{\text{пл}} > 200^\circ\text{C}$ .

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.27–7.34 (м, 7H), 7.13 (д.д, J = 5.0, 2.9 Гц, 1H), 6.76–6.81 (м, 2H), 6.71 (д.д, J = 2.9, 1.2 Гц, 1H), 6.56 (д.д, J = 4.9, 1.2 Гц, 1H), 6.00 (уш.с, 2H), 3.79 (с, 3H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.84, 165.23, 161.20, 159.09, 136.89, 135.21, 131.19 (2C), 129.88, 129.76, 129.10 (2C), 128.40, 128.21 (2C), 125.93, 125.84, 113.74 (2C), 113.74 (2C), 55.45.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> m/z 360.1; найдено 360.0.

**5-(Изохинолин-3-ил)-4-(4-метоксифенил)-6-фенилпиримидин-2-амин (223)**



Бледно-желтые кристаллы, 41%.

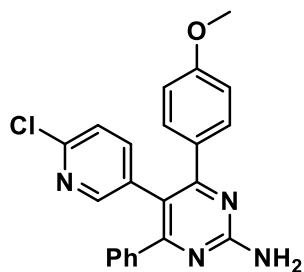
T<sub>пл</sub> = 198-199 °C.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.03 (с, 1H), 8.14 (с, 1H), 7.78–7.85 (м, 1H), 7.41–7.54 (м, 3H), 7.14–7.17 (м, 4H), 6.89–7.09 (м, 3H), 6.67 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 3.71 (с, 3H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 168.39, 165.59, 162.58, 159.32, 151.93, 145.95, 138.56, 135.22, 131.42, 130.58 (2C), 129.06 (2C), 128.84 (2C), 128.56 (2C), 128.00, 127.93 (2C), 127.21, 124.55, 116.60, 114.06, 55.27.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup> m/z 405.2; найдено 405.0.

**5-(6-Хлорпиридин-3-ил)-4-(4-метоксифенил)-6-фенилпиримидин-2-амин (224)**



Бледно-желтый порошок, 37%.

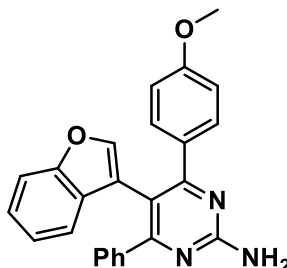
T<sub>пл</sub> > 200°C.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.89 (д, J = 1.9 Гц, 1H), 7.25–7.34 (м, 4H), 7.05–7.23 (м, 5H), 7.03–7.13 (м, 1H), 6.77–6.81 (м, 2H), 6.15 (уш.с, 2H), 3.79 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 166.97, 164.54, 162.07, 157.19, 151.45, 150.80, 141.22, 136.95, 134.16, 131.71 (2C), 130.91, 129.69, 129.34 (2C), 128.74 (2C), 125.03, 124.16, 116.68, 114.34, 55.46.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  389.1; найдено 389.0.

**5-(Бензофуран-3-ил)-4-(4-метоксипиридин-3-ил)-6-фенилпиримидин-2-амин (225)**



Желтые кристаллы, 35%.

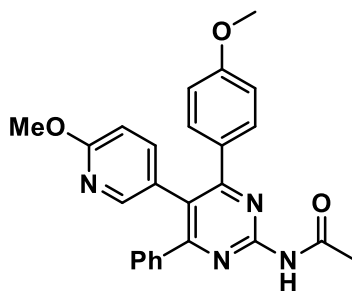
$T_{\text{пл}} > 200^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.31–7.40 (м, 5H), 7.13–7.24 (м, 4H), 7.10 (с, 1H), 6.91–7.04 (м, 2H), 6.69 (д,  $J$  = 8.8 Гц, 2H), 5.78 (уш.с, 2H), 3.73 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 169.82, 167.15, 163.29, 160.75, 154.95, 144.03, 132.07, 130.50 (2C), 129.35, 128.57 (2C), 128.16 (2C), 127.66, 126.01, 125.79, 124.49, 122.95, 120.31, 116.71, 113.65 (2C), 111.52, 55.38.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для  $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  393.4; найдено 394.1.

**Синтез** *N*-(4-(4-метоксифенил)-5-(6-метоксипиридин-3-ил)-6-фенилпиримидин-2-ил)ацетамида (226)



К раствору 200 мг производного **221** (0.50 ммоль, 1.00 эквив.) в 5 мл 1,4-диоксана добавили 139 мкл (1.00 ммоль, 2.00 эквив.)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 6 мг (0.05 ммоль, 0.01 эквив.) DMAP и 355 мкл  $\text{AcCl}$  (5.00 ммоль, 10.00 эквив.) при  $0^\circ\text{C}$  в инертной атмосфере. Реакционную смесь нагрели до  $100^\circ\text{C}$  и перемешивали в течение 2 часов. Затем растворитель был удален при пониженном давлении, твердый остаток растворили в 30 мл ЭА и последовательно промывали насыщенным водным раствором карбоната натрия ( $2 \times 15$  мл) и  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 15$  мл). Органический слой сушили над

безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, удалили растворитель при пониженном давлении. Продукт был выделен методом колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента смеси ПЭ : ЭА (1:1). Выделено 130 мг продукта **226** (61%) в виде бледно-желтых кристаллов.

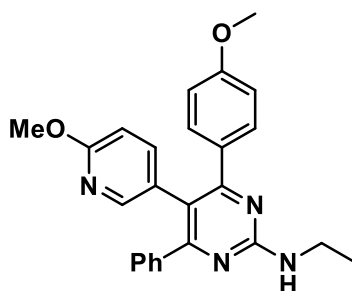
T<sub>пл</sub> > 200 °C.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.42 (уш.с, 2H), 7.72–7.75 (м, 1H), 7.27–7.37 (м, 7H), 7.13–7.18 (м, 1H), 6.77–6.83 (м, 2H), 6.59–6.64 (м, 1H), 3.92 (с, 3H), 3.80 (с, 3H), 2.61 (с, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.68, 166.46, 166.11, 163.23, 161.98, 153.89, 147.74, 141.86, 135.19, 132.21 (2C), 130.70, 129.79 (2C), 128.79 (2C), 127.23, 124.07, 122.16 (2C), 114.31, 111.46, 55.58, 54.39, 25.63.

Масс-спектр (MALDI-TOF): рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 426.4; найдено 427.0.

**Синтез N-этил-(4-(4-метоксифенил)-5-(6-метоксипиридин-3-ил)-6-фенилпиримидин-2-амин** (**227**)



К раствору 130 мг производного **226** (0.30 ммоль, 1.00 эквив.) в 5 мл тетрагидрофурана добавили по каплям 300 мкл 2.3М раствора LiAlH<sub>4</sub> в 2-метилтетрагидрофуране (0.75 ммоль, 2.50 эквив.) при 0 °C в инертной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали при 65°C в течение 2 часов. По окончании реакции смесь нейтрализовали насыщенным водным раствором хлорида аммония и экстрагировали ЭА (3×7 мл), органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После удаления растворителя при пониженном давлении продукт выделяли колоночной хроматографией. В качестве элюента использовали смесь петролейного эфира и EtOAc (от 7:3 до 1:1). Выделено 52 мг продукта **227** (42%) в виде бледно-желтого порошка.

T<sub>пл</sub> > 200°C (разлагается).

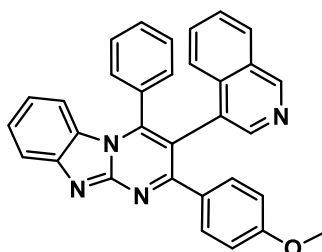
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.65 (д-д, J = 2.4, 0.5 Гц, 1H), 7.23–7.30 (м, 7H), 7.05 (д-д, J = 8.5, 2.5 Гц, 1H), 6.74–6.80 (м, 2H), 6.52 (д-д, J = 8.5, 0.6 Гц, 1H), 6.18–6.42 (м, 1H), 3.86 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.57–3.65 (м, 2H), 1.31 (т, J = 7.2 Гц, 3H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.41, 165.18, 162.66, 160.52, 160.26, 148.90, 141.71, 131.34 (2C), 129.53 (2C), 128.81 (2C), 128.13 (2C), 126.20, 117.02, 113.59 (2C), 110.34, 55.39, 53.32, 36.57, 15.19.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> m/z 412.4; найдено 413.0.

Общая методика получения пиримидинов **229**, **230** аналогична методике, описанной для соединений **208-216**, где вместо карбоната гуанидина **197** был использован 2-аминобензимидазол **228**.

**3-(Изохинолин-4-ил)-2-(4-метоксифенил)-4-фенилбензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидин 229**



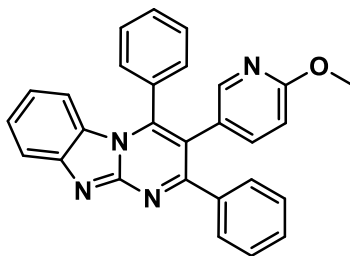
Элюент ПЭ – ЭА (1:1 → 0:1). Бежевый порошок, выход 34%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 9.08 (с, 1H), 8.50 (с, 1H), 7.98–7.81 (м, 4H), 7.66–7.44 (м, 5H), 7.33–7.29 (м, 2H), 7.25–7.00 (м, 4H), 6.77 (dd, J = 8.6, 2.6 Гц, 1H), 6.14 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 3.70 (с, 3H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (101 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 165.39, 160.95, 159.70, 152.86, 151.30, 149.91, 146.32, 145.01, 139.13, 135.51, 132.08, 131.61, 129.72 (2C), 129.21, 128.75, 128.52, 128.34 (2C), 128.07, 127.87, 127.00, 125.35, 123.80, 122.26, 120.66, 119.88, 116.36, 115.20, 115.07, 114.95, 55.93.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>32</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup> m/z 479.2, найдено 479.2.

**3-(6-Метоксипиридин-3-ил)-2,4-дифенилбензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидин 230**



Элюент ПЭ – ЭА (1:1 → 0:1). Бежевый порошок, выход 36%.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.91–7.86 (м, 2H), 7.60–7.55 (м, 4H), 7.47–7.42 (м, 4H), 7.38–7.28 (м, 4H), 7.01 (ддд, J = 8.4, 7.2, 1.1 Гц, 1H), 6.56 (дд, J = 8.5, 0.6 Гц, 1H), 5.99 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 3.70 (с, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ = 163.97, 162.12, 150.14, 148.87, 148.34, 144.91, 141.88, 138.63, 130.35, 129.48 (2C), 129.28 (2C), 129.02 (2C), 127.89 (2C), 127.26, 125.74, 124.08, 121.07, 119.40, 117.04, 114.18, 109.31, 52.99.

**Масс-спектр (MALDI-TOF):** рассчитано для C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup> m/z 429.2, найдено 429.0.

### Проведение докинг-исследований

*Подготовка белка.* Для докинга была использована структура белка ALK5 из Protein Data Bank, PDB ID: 2WOT: разрешение 1.85 Å [360]. Подготовка к исследованию включала оптимизацию структуры белка, удаление молекул воды и лиганда, добавление полярных атомов водорода и эталонных зарядов по методу Коллмана при помощи программы AutoDock Tools. После этого структура белка была сохранена в формате PDBQT, подходящем для дальнейшей работы.

*Подготовка лиганда.* Геометрия соединений была оптимизирована при использовании универсального силового поля (UFF) в программе Avogadro. Полученные PDB-файлы лигандов были переведены в PDBQT формат с использованием Auto Dock Tools [390]. При проведении докинга для известного лиганда GW855857 (**232**) была использована кристаллическая структура PDB ID: 3HMM, разрешение 1.70 Å [360].

*Молекулярный докинг.* Непосредственно для проведения докинга задействовали программу AutoDock Vina [391]. Подобранные параметры сетки области докинга (grid box): center\_x = 4.734, center\_y = 7.220, center\_z = 4.660, size\_x = 60, size\_y = 60, size\_z = 60. При помощи AutoDock для каждого из исследуемых лигандов были получены различные конформации с вычисленной энергией связывания. Наиболее энергетически выгодные конформации принимали во внимание при анализе положения лиганда в кармане белка. Для визуализации и анализа полученных данных использовали программу Pymol.

### Биология

#### Материалы и методы для изучения активности соединений 208–216, 221–227

*Клеточные линии* человека Colo357, A549, K562, MCF7 и мыши EL-4, RAW264.7 и L929 выращивали в RPMI-1640<sup>25</sup> или DMEM<sup>26</sup> с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки

---

<sup>25</sup> RPMI — аббревиатура от Roswell Park Memorial Institute, где была впервые разработана питательная среда RPMI-1640

<sup>26</sup> DMEM — модифицированная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium

(FCS) и pen-strep-glut<sup>27</sup> (PanEco, РФ). Адгезивные клетки пассировали путем трипсинизации с использованием раствора трипсин/EDTA<sup>28</sup> (PanEco, РФ) два раза в неделю.

*Антипролиферативный эффект* соединений оценивали с помощью стандартного теста с 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромидом (МТТ, Sigma). Для этого клетки переносили в плоскодонный 96-луночный планшет по  $5 \times 10^3$  клеток на лунку, в котором предварительно титровали препараты. Планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 часов. В течение последних 3 часов в каждую лунку добавляли по 250 мкг/мл 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромида (МТТ, Sigma) в количестве 10 мкл. После инкубации питательную среду удаляли и в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида. Планшеты инкубировали при встряхивании в течение 15 мин для растворения формазана. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Titertek (Великобритания) при 540 нм. Результаты были проанализированы с помощью пакета Excel (Microsoft). Ингибирование пролиферации (индекс ингибирования) рассчитывали как  $[1 - (OD_{\text{experiment}} / OD_{\text{control}})]$ , где OD - оптическая плотность МТТ.

**Материалы и методы для изучения активности соединений 121a-d, 122a-b, 123a-d, 143, 144a-b, 145a-b, 162, 173a-b, 174a-b, 175, 177**

*Клеточные линии* (A-431, A549, HeLa, T47D, MDA-MB-231, SKBR3, HCC1954, MCF7, SkBr-3, Jurkat, K562, A172, EA.hy926, HaCat) использованные при проведении исследования, полученные от центра ATCC (American Type Culture Collection), инкубировали в условиях, рекомендованных производителем (Thermo Fisher Scientific – Gibco, США). *Пост клеток* оценивали с помощью модифицированного теста с 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромидом (МТТ, AppliChem) [392] согласно описанному ранее методу [393]. Посев опухолевых клеток проводили в 24-луночные планшеты (TPP), используя 900 мкл соответствующей среды. Для растворения соединений непосредственно перед экспериментами применяли ДМСО (AppliChem, Германия) в концентрации 10 мМ. Затем полученные растворы разбавляли в среде DMEM до необходимых доз. Растворы исследуемых соединений в различных концентрациях в объеме 100 мкл среды DMEM добавляли через день после посева, клеточные культуры были инкубированы в течение 72 часов. После культивирования клеток среду DMEM удаляли, и в каждую лунку добавляли краситель МТТ в составе среды до конечной концентрации 0.2 мг/мл и дополнительно инкубировали в течение 2

---

<sup>27</sup> Pen-strep-glut — Penicillin-Streptomycin-Glutamine, L-глутамин-пенициллин-стрептомицин

<sup>28</sup> EDTA — ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота

часов. Во все лунки вносили ДМСО в объеме 350 мкл для растворения фиолетовых кристаллов формазана. Для измерения оптической плотности растворов при длине волны 571 нм использовали анализатор MultiScan (ThermoFisher, США). Выживаемость клеток оценивали после вычитания значения фонового сигнала (абсорбции в каждой лунке без клеток) из всех значений во всех лунках. Все тесты проводили трижды (в трех повторностях). Исследование кривых "доза-эффект" выполняли с использованием регрессионного анализа и сигмOIDных кривых (зависимость логарифма концентрации от нормализованной оптической плотности). Для определения полумаксимальных ингибирующих концентраций ( $IC_{50}$ ) использовали программу GraphPad Prism.

*Проведение иммуноблоттинга.* Для подготовки образцов для иммуноблоттинга клетки высевали на чашки Петри диаметром 100 мм (Corning, США). В экспериментах с клетками рака молочной железы HCC1954 через 24 часа после посева питательную среду заменяли свежей средой с добавлением исследуемых соединений. Для приготовления клеточных экстрактов клеточные культуры дважды промыли фосфатно-солевым буфером (PBS) и инкубировали в лизисном буфере в течение 10 минут на льду. Указанный буферный раствор, имеющий значение  $pH = 7.5$ , содержит Tris-HCl<sup>29</sup> (50 мМ), NaCl (150 мМ), Igepal CA-630<sup>30</sup> (0.5%), DTT (1 мМ), EDTA (1 мМ), ортованадат натрия (0.1 мМ), PMSF<sup>31</sup> (1 мМ) и пепстатин, леупептин, апротинин (1 мкг/мл каждого) в соответствии с описанной ранее методикой [394]. Для определения уровня белка был использован метод БрэДФорда [395]. Клеточные экстракты разделяли электрофорезом белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE, 10%) в восстанавливающих условиях и затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE, США). С целью предотвратить неспецифическое связывание белков, мембраны помещались в блокирующий раствор, содержащий 5% сухого молока в буфере TBS. Указанный буфер содержит Tris-HCl (20 мМ), NaCl (500 мМ) и Tween-20 (0.1%). После этого мембраны инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4 °C. Антитела к c-Met и phospho-c-Met (Tyr1234/1235, Tyr1003) были произведены фирмой Cell Signaling Technology (США). Антитела к тубулину, произведенные той же фирмой, были использованы в качестве контроля. Антитела козы к IgG (H+L) кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (Goat

---

<sup>29</sup> Tris-HCl — гидрохлорид трис(гидроксиметил)аминометана

<sup>30</sup> Igepal CA-630 — неионное детергентное средство, не вызывающее денатурации белков

<sup>31</sup> PMSF — фенилметилсульфонил фторид

Anti-Rabbit IgG (HRP) - Jackson ImmunoResearch, США) были использованы в качестве вторичных антител. После инкубации с антителами мембраны обрабатывали хемилюминесцентным реагентом ECL, и сигналы визуализировали на системе ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, США) согласно протоколу [396]. Денситометрический анализ проводился с помощью программы ImageJ (NIH, США).

*Изучение клеточного цикла*, в том числе определение доли апоптотических клеток, проводилось путем окрашивания клеток раствором аннексина V и пропидиум йодида (PI) с последующим анализом методом проточной цитометрии в соответствии с описанной в [397] методикой. Клетки HaCat высеяли ( $1 \times 10^6$  клеток) в стерильные культуральные флаконы (Eppendorf T-25), некоторые группы клеток были обработаны исследуемыми соединениями в указанных концентрациях (**Рис. 37-39**), другая часть не имела обработки (контроль). Все тесты проводили трижды (в трех повторностях). После 48 часов инкубирования, клетки собрали, включая клетки в супернатанте и клетки, отслоившиеся после трипсинизации, объединив их в одной пробирке. Собранные клетки дважды промыли фосфатно-солевым буфером (PBS) и центрифугировали (5 мин при 400 g), после чего ресуспендировали осадок клеток в 400 мкл PBS. Клетки были разделены на группы. Группа экспериментальных клеток - 400 мкл клеток + 100 мкл инкубационного буфера с 2 мкл аннексина (1 мг/мл) и 2 мкл пропидиум йодида (PI) (1 мг/мл). Группа контрольных неокрашенных клеток - 400 мкл клеток + 100 мкл инкубационного буфера. Группа контрольных клеток с окрашиванием только аннексином V - 400 мкл клеток + 100 мкл инкубационного буфера с 2 мкл аннексина (1 мг/мл) Группа контрольных клеток с окрашиванием только пропидиум йодидом - 400 мкл клеток + 100 мкл инкубационного буфера с 2 мкл PI (1 мг/мл). Клетки инкубировали в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. Дальнейший анализ осуществляли, не промывая клетки, при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSAria III (Becton Dickinson).

## Выводы

1) Получены три серии PROTAC-молекул на основе кабозантиниба – лиганда к белку c-Met и лигандов к белкам VHL и CRBN, связанных линкерами различной химической природы, длины, конформационной подвижности, гидро- и липофильности с суммарными выходами 2-6% в расчете на 12 стадий. Наибольшую антипролиферативную активность ( $IC_{50} \sim 6 - 28 \mu M$ ) на клетках A-431, T47D, MCF-7, HCC1954 и SkBr-3, с различным уровнем экспрессии белка c-Met, показали конъюгаты кабозантиниба и лиганда для белка VHL, содержащие линкеры на основе этиленгликоля и пропандиола-1,3. Методом вестерн-блоттинга установлено, что эти соединения, являясь эффективными ингибиторами фосфорилирования белка c-Met в концентрационном диапазоне 10-300 нМ, не вызывают его расщепления, и, таким образом, не выполняют функции PROTAC-деградеров.

2) Осуществлен дизайн и проведен 7-8 стадийный синтез шести новых пептидомиметиков - потенциальных лигандов для белков ингибиторов апоптоза IAP, из них пять молекул получены в диастереомерно чистом виде и одна в виде смеси диастереомеров. Изучение клеточного цикла на клетках HaCat показало увеличение доли апоптотических клеток (на 30% по сравнению с контролем) в присутствии одного из полученных пептидомиметиков при его концентрации 25 мкМ. Этот факт подтверждает апоптоз-индуцирующую активность синтезированных соединений и косвенно свидетельствует об их способности выступать в качестве лигандов к белкам ингибиторам апоптоза (IAPs), ответственным за резистентность раковых клеток к противоопухолевой терапии.

3) Исходя из полученных нами пептидомиметиков и производных кабозантиниба, в 12-13 стадий синтезированы шесть молекул SNIPER с суммарными выходами 9-12%. Полученные конъюгаты обладают антипролиферативной активностью в микромолярном диапазоне концентраций ( $IC_{50} \sim 1 - 200 \mu M$ ) на клеточных линиях EA.hy926, Jurkat, K-526, A-172 и SkBr-3. При помощи вестерн-блоттинга установлено, что соединение - лидер расщепляет целевой белок c-Met в клетках A549 и HeLa в концентрации 1  $\mu M$  и способен выполнять функцию деградера.

4) Осуществлен дизайн и проведен синтез ряда новых тризамещенных аминопиримидинов, потенциальных ингибиторов белка ALK5 – важной мишени в противоопухолевой терапии. Антипролиферативная активность синтезированных производных, изученная на клетках A549, K562, EL-4, Colo357, MCF-7, L-929 и RAW264.7 находится в микромолярном диапазоне концентраций ( $IC_{50} \sim 6 - 200 \mu M$ ). Проведен докинг полученных соединений, а также виртуальных библиотек молекул в сайт связывания белка

ALK5. Выявлены потенциальные соединения-лидеры, для которых будут проведены биохимические исследования на их способность к связыванию с мишенью ALK5.

## Список литературы

1. Itoh Y. et al. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. // J. Am. Chem. Soc. United States, 2010. Vol. 132, № 16. P. 5820–5826.
2. Sakamoto K.M. et al. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. Vol. 98, № 15. P. 8554–8559.
3. Kim J. et al. Targeted protein degradation directly engaging lysosomes or proteasomes // Chem. Soc. Rev. 2024. Vol. 53, № 7. P. 3253–3272.
4. Han X., Sun Y. PROTACs: A novel strategy for cancer drug discovery and development // MedComm. 2023. Vol. 4, № 3.
5. Cornu M. et al. PROTAC 2.0: Expanding the frontiers of targeted protein degradation // Drug Discov. Today. 2025. Vol. 30, № 6. P. 104376.
6. Békés M., Langley D.R., Crews C.M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue // Nat. Rev. Drug Discov. 2022. Vol. 21, № 3. P. 181–200.
7. Galla M.S. et al. Recent insights of PROTAC developments in inflammation-mediated and autoimmune targets: a critical review // RSC Med. Chem. 2024. Vol. 15, № 8. P. 2585–2600.
8. Kannan M.P. et al. Advancement of Targeted Protein Degradation Strategies As Therapeutics for Undruggable Disease Targets // Future Med. Chem. 2023. Vol. 15, № 10. P. 867–883.
9. Williams R.M. et al. Harnessing nanotechnology to expand the toolbox of chemical biology // Nat. Chem. Biol. 2021. Vol. 17, № 2. P. 129–137.
10. Hershko A. et al. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1980. Vol. 77, № 4. P. 1783–1786.
11. KENTEN J.H., ROBERTS S.F. Controlling protein levels in eucaryotic organisms. US: WELLSTAT BIOCATALYSIS LLC OP - US 34528103 A OP - US 88013201 A OP - US 40678199 A OP - US 11985199 P, 2007.
12. Yin S.-Q. et al. The Development of MetAP-2 Inhibitors in Cancer Treatment // Curr. Med. Chem. 2012. Vol. 19, № 7. P. 1021–1035.
13. Cornelius P. et al. Pharmacological Characterization of SDX-7320/Evexomostat: A Novel Methionine Aminopeptidase Type 2 Inhibitor with Anti-tumor and Anti-metastatic Activity // Mol. Cancer Ther. 2024. Vol. 23, № 5. P. 595–605.

14. Rutherford K.A., McManus K.J. PROTACs: Current and Future Potential as a Precision Medicine Strategy to Combat Cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2024. Vol. 23, № 4. P. 454–463.
15. Callis J. The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System // *Arab. B.* 2014. Vol. 12. P. e0174.
16. Salas-Lloret D., González-Prieto R. Insights in Post-Translational Modifications: Ubiquitin and SUMO // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 6. P. 3281.
17. Swatek K.N., Komander D. Ubiquitin modifications // *Cell Res.* 2016. Vol. 26, № 4. P. 399–422.
18. Tokunaga F. et al. SHARPIN is a component of the NF- $\kappa$ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex // *Nature*. 2011. Vol. 471, № 7340. P. 633–636.
19. French M.E., Koehler C.F., Hunter T. Emerging functions of branched ubiquitin chains // *Cell Discov.* 2021. Vol. 7, № 1. P. 6.
20. Manohar S. et al. Polyubiquitin Chains Linked by Lysine Residue 48 (K48) Selectively Target Oxidized Proteins In Vivo // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. Vol. 31, № 15. P. 1133–1149.
21. Sadowski M. et al. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes // *IUBMB Life*. 2012. Vol. 64, № 2. P. 136–142.
22. Liu T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017. Vol. 2, № 1. P. 17023.
23. Ohtake F. et al. The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- $\kappa$ B Signaling // *Mol. Cell*. 2016. Vol. 64, № 2. P. 251–266.
24. Dósa A., Csizmadia T. The role of K63-linked polyubiquitin in several types of autophagy // *Biol. Futur.* 2022. Vol. 73, № 2. P. 137–148.
25. Ben-Saadon R. et al. The Polycomb Protein Ring1B Generates Self Atypical Mixed Ubiquitin Chains Required for Its In Vitro Histone H2A Ligase Activity // *Mol. Cell*. 2006. Vol. 24, № 5. P. 701–711.
26. Gregor J.B., Xu D., French M.E. Assembly and disassembly of branched ubiquitin chains // *Front. Mol. Biosci.* 2023. Vol. 10.
27. Schneckloth J.S.J. et al. Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2004. Vol. 126, № 12. P. 3748–3754.
28. Hon W.-C. et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 $\alpha$  by pVHL // *Nature*. 2002. Vol. 417, № 6892. P. 975–978.

29. Buckley D.L. et al. Small-Molecule Inhibitors of the Interaction between the E3 Ligase VHL and HIF1 $\alpha$  // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2012. Vol. 51, № 46. P. 11463–11467.
30. Zengerle M., Chan K.-H., Ciulli A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4 // *ACS Chem. Biol.* 2015. Vol. 10, № 8. P. 1770–1777.
31. Bondeson D.P. et al. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs // *Nat. Chem. Biol.* 2015. Vol. 11, № 8. P. 611–617.
32. Ito T. et al. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity // *Science* (80-. ). 2010. Vol. 327, № 5971. P. 1345–1350.
33. Zhao L. et al. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. Vol. 7, № 1. P. 113.
34. Hinterndorfer M. et al. Targeted protein degradation for cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.* 2025. Vol. 25, № 7. P. 493–516.
35. Wang S. et al. From PROTAC to TPD: Advances and Opportunities in Targeted Protein Degradation // *Pharmaceuticals.* 2024. Vol. 17, № 1. P. 100.
36. Wang C. et al. New-generation advanced PROTACs as potential therapeutic agents in cancer therapy // *Mol. Cancer.* 2024. Vol. 23, № 1. P. 110.
37. Hsia O. et al. Targeted protein degradation via intramolecular bivalent glues // *Nature.* 2024. Vol. 627, № 8002. P. 204–211.
38. Lv L. et al. Discovery of a molecular glue promoting CDK12-DDB1 interaction to trigger cyclin K degradation // *Elife.* 2020. Vol. 9.
39. XIANGBIN Q.I. et al. A MOLECULAR GLUE REGULATING CDK12-DDB1 INTERACTION TO TRIGGER CYCLIN K DEGRADATION. WO: NAT INSTITUTE OF BIOLOGICAL SCIENCES BEIJING OP - CN 2020095482 W, 2021.
40. Park S. et al. Discovery of a novel molecular glue degrader targeting GSPT1/2 with a non-IMiD-based CRBN binder // *Eur. J. Med. Chem.* 2025. Vol. 291. P. 117642.
41. Yang Z. et al. Merging PROTAC and molecular glue for degrading BTK and GSPT1 proteins concurrently // *Cell Res.* 2021. Vol. 31, № 12. P. 1315–1318.
42. Pance K. et al. Modular cytokine receptor-targeting chimeras for targeted degradation of cell surface and extracellular proteins // *Nat. Biotechnol.* 2023. Vol. 41, № 2. P. 273–281.
43. Cotton A.D. et al. Development of Antibody-Based PROTACs for the Degradation of the Cell-Surface Immune Checkpoint Protein PD-L1 // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. Vol. 143, № 2. P. 593–598.
44. Kiss L. et al. Trim-Away ubiquitinates and degrades lysine-less and N-terminally acetylated

substrates // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14, № 1. P. 2160.

45. Kunishige R., Murata M., Kano F. Targeted protein degradation by Trim-Away using cell resealing coupled with microscopic image-based quantitative analysis // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. Vol. 10.
46. Sathe G., Sapkota G.P. Proteomic approaches advancing targeted protein degradation // *Trends Pharmacol. Sci.* 2023. Vol. 44, № 11. P. 786–801.
47. Kargbo R.B. Emerging Proteolysis Targeting Antibodies (PROTABs) for Application in Cancer Therapy // *ACS Med. Chem. Lett.* 2022. Vol. 13, № 12. P. 1833–1834.
48. Marei H. et al. Antibody targeting of E3 ubiquitin ligases for receptor degradation // *Nature.* 2022. Vol. 610, № 7930. P. 182–189.
49. Wei J. et al. Harnessing the E3 Ligase KEAP1 for Targeted Protein Degradation // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. Vol. 143, № 37. P. 15073–15083.
50. Hickey C.M. et al. Co-opting the E3 ligase KLHDC2 for targeted protein degradation by small molecules // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2024. Vol. 31, № 2. P. 311–322.
51. Setia N., Almuqdad H.T.A., Abid M. Journey of Von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase in PROTACs design: From VHL ligands to VHL-based degraders // *Eur. J. Med. Chem.* 2024. Vol. 265. P. 116041.
52. Feller F. et al. Development of the First-in-Class FEM1B-Recruiting Histone Deacetylase Degradors // *J. Med. Chem.* 2025. Vol. 68, № 2. P. 1824–1843.
53. Sinatra L. et al. Solid-Phase Synthesis of Cereblon-Recruiting Selective Histone Deacetylase 6 Degradors (HDAC6 PROTACs) with Antileukemic Activity // *J. Med. Chem.* 2022. Vol. 65, № 24. P. 16860–16878.
54. Luo X. et al. Profiling of diverse tumor types establishes the broad utility of VHL-based ProTaCs and triages candidate ubiquitin ligases // *iScience.* 2022. Vol. 25, № 3. P. 103985.
55. Cieślak M., Słowianek M. Cereblon-Recruiting PROTACs: Will New Drugs Have to Face Old Challenges? // *Pharmaceutics.* 2023. Vol. 15, № 3. P. 812.
56. Gooding S. et al. Multiple cereblon genetic changes are associated with acquired resistance to lenalidomide or pomalidomide in multiple myeloma // *Blood.* 2021. Vol. 137, № 2. P. 232–237.
57. Bird S.A., Pawlyn C. IMiD Resistance in Multiple Myeloma: Current Understanding of the Underpinning Biology and Clinical Impact // *Blood.* 2023.
58. Dizman N., Philip E.J., Pal S.K. Genomic profiling in renal cell carcinoma // *Nat. Rev. Nephrol.* 2020. Vol. 16, № 8. P. 435–451.

59. Xu S. et al. Development of a PAK4-targeting PROTAC for renal carcinoma therapy: concurrent inhibition of cancer cell proliferation and enhancement of immune cell response // *eBioMedicine*. 2024. Vol. 104. P. 105162.
60. Li F. et al. Kidney cancer biomarkers and targets for therapeutics: survivin (BIRC5), XIAP, MCL-1, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , NRF2, MDM2, MDM4, p53, KRAS and AKT in renal cell carcinoma // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2021. Vol. 40, № 1. P. 254.
61. Varfolomeev E. et al. IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B Activation, and TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis // *Cell*. 2007. Vol. 131, № 4. P. 669–681.
62. Salvesen G.S., Duckett C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2002. Vol. 3, № 6. P. 401–410.
63. Wang C. et al. Recent advances in IAP-based PROTACs (SNIPERs) as potential therapeutic agents // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2022. Vol. 37, № 1. P. 1437–1453.
64. Ma Z. et al. Specific non-genetic IAP-based protein erasers (SNIPERs) as a potential therapeutic strategy // *Eur. J. Med. Chem*. 2021. Vol. 216. P. 113247.
65. Zhang X. et al. Discovery of IAP-recruiting BCL-XL PROTACs as potent degraders across multiple cancer cell lines // *Eur. J. Med. Chem*. 2020. Vol. 199. P. 112397.
66. Crook N.E., Clem R.J., Miller L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif // *J. Virol*. 1993. Vol. 67, № 4. P. 2168–2174.
67. Herman M.D. et al. Structures of BIR domains from human NAIP and cIAP2 // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun*. 2009. Vol. 65, № 11. P. 1091–1096.
68. Wu G. et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO // *Nature*. 2000. Vol. 408, № 6815. P. 1008–1012.
69. Mace P.D., Shirley S., Day C.L. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins // *Cell Death Differ*. 2010. Vol. 17, № 1. P. 46–53.
70. Gambini L. et al. Stability and Cell Permeability of Sulfonyl Fluorides in the Design of Lys-Covalent Antagonists of Protein-Protein Interactions // *ChemMedChem*. 2020. Vol. 15, № 22. P. 2176–2184.
71. Vucic D. Targeting IAP (Inhibitor of Apoptosis) Proteins for Therapeutic Intervention in Tumors // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2008. Vol. 8, № 2. P. 110–117.
72. Dubrez L., Berthelet J., Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology // *Onco. Targets. Ther*. 2013. P. 1285.
73. Kumar S. et al. The Multiple Roles of the IAP Super-family in cancer // *Pharmacol. Ther*. 2020. Vol. 214. P. 107610.

74. Liang J. et al. Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer // BMC Med. Genomics. 2020. Vol. 13, № 1. P. 7.
75. Vischioni B. et al. Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues // Hum. Pathol. 2006. Vol. 37, № 1. P. 78–86.
76. Cetraro P. et al. A Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 7. P. 1671.
77. Cong H. et al. Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Antagonists in Anticancer Agent Discovery: Current Status and Perspectives // J. Med. Chem. 2019. Vol. 62, № 12. P. 5750–5772.
78. Dynek J.N., Vucic D. Antagonists of IAP proteins as cancer therapeutics // Cancer Lett. 2013. Vol. 332, № 2. P. 206–214.
79. Wang S. Design of Small-Molecule Smac Mimetics as IAP Antagonists. 2010. P. 89–113.
80. Du C. et al. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition // Cell. 2000. Vol. 102, № 1. P. 33–42.
81. Fulda S., Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer // Nat. Rev. Drug Discov. 2012. Vol. 11, № 2. P. 109–124.
82. Liu Z. et al. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain // Nature. 2000. Vol. 408, № 6815. P. 1004–1008.
83. Pemmaraju N. et al. Final Results of Phase 2 Clinical Trial of LCL161, a Novel Oral SMAC Mimetic/IAP Antagonist, for Patients with Intermediate to High Risk Myelofibrosis // Blood. 2019. Vol. 134, № Supplement\_1. P. 555–555.
84. Johnson M.L. et al. A Phase Ib Dose-Escalation Study of LCL161 Plus Oral Topotecan for Patients With Relapsed/Refractory Small Cell Lung Cancer and Select Gynecologic Malignancies // Oncologist. 2023. Vol. 28, № 7. P. 640–e559.
85. Menapree P. et al. CDK4/6 inhibitors upregulate cIAP1/2, and Smac mimetic LCL161 enhances their antitumor effects in cholangiocarcinoma cells // Sci. Rep. 2025. Vol. 15, № 1. P. 6826.
86. Ye Q. et al. Targeting the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) to combat drug resistance in cancers // Front. Pharmacol. 2025. Vol. 16.
87. Sun H. et al. Structure-Based Design of Potent, Conformationally Constrained Smac Mimetics // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2004. Vol. 126, № 51. P. 16686–16687.
88. Sun H. et al. Structure-Based Design, Synthesis, and Evaluation of Conformationally Constrained Mimetics of the Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase That Target the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein/Caspase-9 Interaction Site // J. Med. Chem. 2004.

Vol. 47, № 17. P. 4147–4150.

89. Kansal V. et al. The expanding role of IAP antagonists for the treatment of head and neck cancer // *Cancer Med.* 2023. Vol. 12, № 13. P. 13958–13965.
90. Barroso T. et al. Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins to Overcome Chemotherapy Resistance—A Marriage between Targeted Therapy and Cytotoxic Chemotherapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 17. P. 13385.
91. Zhang B. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Tricyclic, Conformationally Constrained Small-Molecule Mimetics of Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases // *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, № 23. P. 7352–7355.
92. Nikolovska-Coleska Z. et al. Design and characterization of bivalent Smac-based peptides as antagonists of XIAP and development and validation of a fluorescence polarization assay for XIAP containing both BIR2 and BIR3 domains // *Anal. Biochem.* 2008. Vol. 374, № 1. P. 87–98.
93. Sun W. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Potent, Nonpeptidic Mimetics of Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52, № 3. P. 593–596.
94. Li L. et al. A Small Molecule Smac Mimic Potentiates TRAIL- and TNF $\alpha$ -Mediated Cell Death // *Science* (80-. ). 2004. Vol. 305, № 5689. P. 1471–1474.
95. Gao Z. et al. A Dimeric Smac/Diablo Peptide Directly Relieves Caspase-3 Inhibition by XIAP // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 42. P. 30718–30727.
96. Varfolomeev E. et al. X Chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis Regulates Cell Death Induction by Proapoptotic Receptor Agonists // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 50. P. 34553–34560.
97. Vetma V. et al. Examining the In Vitro Efficacy of the IAP Antagonist Birinapant as a Single Agent or in Combination With Dacarbazine to Induce Melanoma Cell Death // *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* 2017. Vol. 25, № 9. P. 1489–1494.
98. Alicke B. et al. IAP antagonist GDC-0917 is more potent than Debio1143 in promoting cell death, c-IAP1 degradation and tumor growth inhibition // *Cell Death Dis.* 2022. Vol. 13, № 9. P. 831.
99. Wang S. et al. Preparation of bivalent diazabicyclic Smac mimetics as inhibitors of IAP proteins and therapeutic methods of using them. // *PCT Int. Appl. WO: REGENTIS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN OP - US 201261692429 P*, 2014. № WO2014031487A1. P. 91pp.
100. Liu F.-R. et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAP) inhibitor APG-1387 monotherapy or in

- combination with programmed cell death 1 (PD-1) inhibitor toripalimab in patients with advanced solid tumors: results from two phase I trials // *ESMO Open*. 2024. Vol. 9, № 8. P. 103651.
101. Sekine K. et al. Small Molecules Destabilize cIAP1 by Activating Auto-ubiquitylation // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 14. P. 8961–8968.
  102. Kim H.W. et al. Bestatin, A Pluripotent Immunomodulatory Small Molecule, Drives Robust and Long-Lasting Immune Responses as an Adjuvant in Viral Vaccines // *Vaccines*. 2023. Vol. 11, № 11. P. 1690.
  103. Blomgren H. Bestatin, a new immunomodulator // *Clin. Immunol. Newsl.* 1983. Vol. 4, № 2. P. 15–18.
  104. Bhatt L. et al. Recent advances in clinical development of leukotriene B4 pathway drugs // *Semin. Immunol.* 2017. Vol. 33. P. 65–73.
  105. Zhao J., Merl M.Y., Foss F. Tolinapant. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) antagonist, Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP) antagonist, Treatment of advanced solid tumors and lymphomas // *Drugs Future*. 2021. Vol. 46, № 6. P. 451.
  106. Manavalan J.S. et al. Tolinapant, a Non-Peptidomimetic Antagonist of Inhibitors of Apoptosis Proteins, cIAP1/2 and XIAP, in Combination with the Hypomethylating Agents, Azacytidine and Decitabine Are Highly Synergistic in in Vitro Models of T Cell Lymphoma // *Blood*. 2022. Vol. 140, № Supplement 1. P. 11552–11553.
  107. Hoskin P. et al. Dose escalation of tolinapant (ASTX660) in combination with standard radical chemoradiotherapy in cervical cancer : a study protocol for a phase 1b TITE-CRM clinical trial (CRAIN) in UK secondary care centres // *BMC Cancer*. 2024. Vol. 24, № 1. P. 702.
  108. Ward G.A. et al. ASTX660, a Novel Non-peptidomimetic Antagonist of cIAP1/2 and XIAP, Potently Induces TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis in Cancer Cell Lines and Inhibits Tumor Growth // *Mol. Cancer Ther.* 2018. Vol. 17, № 7. P. 1381–1391.
  109. Demizu Y. et al. Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand. // *Bioorg. Med. Chem. Lett. England*, 2016. Vol. 26, № 20. P. 4865–4869.
  110. Shibata N. et al. Development of Protein Degradation Inducers of Androgen Receptor by Conjugation of Androgen Receptor Ligands and Inhibitor of Apoptosis Protein Ligands // *J. Med. Chem.* 2018. Vol. 61, № 2. P. 543–575.
  111. Li K., Crews C.M. PROTACs: past, present and future // *Chem. Soc. Rev.* 2022. Vol. 51, № 12. P. 5214–5236.

112. Yang N. et al. Recent advances in targeted protein degraders as potential therapeutic agents // *Mol. Divers.* 2024. Vol. 28, № 1. P. 309–333.
113. Negi A., Kesari K.K., Voisin-Chiret A.S. Estrogen Receptor- $\alpha$  Targeting: PROTACs, SNIPERs, Peptide-PROTACs, Antibody Conjugated PROTACs and SNIPERs // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 11. P. 2523.
114. Demizu Y. et al. Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. Vol. 22, № 4. P. 1793–1796.
115. Ohoka N. et al. In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs) // *J. Biol. Chem.* 2017. Vol. 292, № 11. P. 4556–4570.
116. Negi A., Voisin-Chiret A.S. Strategies to Reduce the On-Target Platelet Toxicity of Bcl-x L Inhibitors: PROTACs, SNIPERs and Prodrug-Based Approaches // *ChemBioChem*. 2022. Vol. 23, № 12.
117. Zorba A. et al. Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. United States*, 2018. Vol. 115, № 31. P. E7285–E7292.
118. Ohoka N. et al. Different degradation mechanisms of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) by the specific and nongenetic IAP-dependent protein EraSEr (SNIPER) // *Chem. Pharm. Bull.* 2019. Vol. 67, № 3. P. 203–209.
119. Su S. et al. Potent and Preferential Degradation of CDK6 via Proteolysis Targeting Chimera Degraders. // *J. Med. Chem. United States*, 2019. Vol. 62, № 16. P. 7575–7582.
120. Zhang X. et al. Design and synthesis of selective degraders of EGFR(L858R/T790M) mutant. // *Eur. J. Med. Chem. France*, 2020. Vol. 192. P. 112199.
121. Cao J. et al. Development of a Bestatin-SAHA Hybrid with Dual Inhibitory Activity against APN and HDAC. // *Molecules. Switzerland*, 2020. Vol. 25, № 21.
122. Tsukumo Y. et al. Protocols for Synthesis of SNIPERs and the Methods to Evaluate the Anticancer Effects. // *Methods Mol. Biol. United States*, 2021. Vol. 2365. P. 331–347.
123. Ohoka N. et al. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. // *Cell Death Dis. England*, 2014. Vol. 5, № 11. P. e1513.
124. Shah R.R. et al. Hi-JAK-ing the ubiquitin system: The design and physicochemical optimisation of JAK PROTACs. // *Bioorg. Med. Chem. England*, 2020. Vol. 28, № 5. P. 115326.
125. Wang C. et al. Discovery of a Proteolysis-Targeting Chimera Degradator of JAK2 as a Potential

Therapeutic Agent for JAK2-Mediated Myeloproliferative Neoplasms // J. Med. Chem. 2025. Vol. 68, № 11. P. 12085–12099.

126. Tomoshige S. et al. Discovery of Small Molecules that Induce the Degradation of Huntingtin. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Germany, 2017. Vol. 56, № 38. P. 11530–11533.
127. Ohoka N. et al. Development of a peptide-based inducer of protein degradation targeting NOTCH1. // Bioorg. Med. Chem. Lett. England, 2017. Vol. 27, № 22. P. 4985–4988.
128. Donovan K.A. et al. Mapping the Degradable Kinome Provides a Resource for Expedited Degradation Development. // Cell. United States, 2020. Vol. 183, № 6. P. 1714-1731.e10.
129. Gadd M.S. et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation // Nat. Chem. Biol. 2017. Vol. 13, № 5. P. 514–521.
130. Li L. et al. Discovery of KRas G12C-IN-3 and Pomalidomide-based PROTACs as degraders of endogenous KRAS G12C with potent anticancer activity // Bioorg. Chem. 2021. Vol. 117. P. 105447.
131. Cheng J. et al. Making Protein Degradation Visible: Discovery of Theranostic PROTACs for Detecting and Degrading NAMPT // J. Med. Chem. 2022. Vol. 65, № 23. P. 15725–15737.
132. Burslem G.M. et al. Enhancing Antiproliferative Activity and Selectivity of a FLT-3 Inhibitor by Proteolysis Targeting Chimera Conversion // J. Am. Chem. Soc. 2018. Vol. 140, № 48. P. 16428–16432.
133. Zhao H.-Y. et al. Discovery of potent small molecule PROTACs targeting mutant EGFR // Eur. J. Med. Chem. 2020. Vol. 208. P. 112781.
134. Wang Y. et al. In vitro and in vivo degradation of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) by a proteolysis targeting chimera (PROTAC) // Bioorg. Chem. 2021. Vol. 111. P. 104833.
135. Potjewyd F. et al. Degradation of Polycomb Repressive Complex 2 with an EED-Targeted Bivalent Chemical Degradation // Cell Chem. Biol. 2020. Vol. 27, № 1. P. 47-56.e15.
136. Qiu X. et al. Chemoselective Synthesis of Lenalidomide-Based PROTAC Library Using Alkylation Reaction // Org. Lett. 2019. Vol. 21, № 10. P. 3838–3841.
137. McCoull W. et al. Development of a Novel B-Cell Lymphoma 6 (BCL6) PROTAC To Provide Insight into Small Molecule Targeting of BCL6 // ACS Chem. Biol. 2018. Vol. 13, № 11. P. 3131–3141.
138. Goracci L. et al. Understanding the Metabolism of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs): The Next Step toward Pharmaceutical Applications // J. Med. Chem. 2020. Vol. 63, № 20. P. 11615–11638.
139. Zografou-Barredo N.A. et al. A beginner's guide to current synthetic linker strategies towards

- VHL-recruiting PROTACs // *Bioorg. Med. Chem.* 2023. Vol. 88–89. P. 117334.
140. David L. et al. Prediction of Chameleonic Efficiency // *ChemMedChem*. 2021. Vol. 16, № 17. P. 2669–2685.
141. Khan S. et al. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity // *Nat. Med.* 2019. Vol. 25, № 12. P. 1938–1947.
142. Zhou Z. et al. Discovery of a Potent, Cooperative, and Selective SOS1 PROTAC ZZ151 with In Vivo Antitumor Efficacy in KRAS-Mutant Cancers // *J. Med. Chem.* 2023. Vol. 66, № 6. P. 4197–4214.
143. Lu M. et al. Discovery of a Keap1-dependent peptide PROTAC to knockdown Tau by ubiquitination-proteasome degradation pathway // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 146. P. 251–259.
144. He S. et al. Enhanced Tumor Targeting and Penetration of Proteolysis-Targeting Chimeras through iRGD Peptide Conjugation: A Strategy for Precise Protein Degradation in Breast Cancer // *J. Med. Chem.* 2023. Vol. 66, № 24. P. 16828–16842.
145. Uk B. et al. Combining task- and data parallelism to speed up protein folding on a desktop grid platform // *CCGrid 2003. 3rd IEEE/ACM International Symposium on Cluster Computing and the Grid*, 2003. Proceedings. IEEE, 2003. P. 240–247.
146. Tinworth C.P. et al. PROTAC-Mediated Degradation of Bruton's Tyrosine Kinase Is Inhibited by Covalent Binding // *ACS Chem. Biol.* 2019. Vol. 14, № 3. P. 342–347.
147. Lebraud H. et al. Protein Degradation by In-Cell Self-Assembly of Proteolysis Targeting Chimeras // *ACS Cent. Sci.* 2016. Vol. 2, № 12. P. 927–934.
148. Cao Z. et al. Attenuation of NLRP3 Inflammasome Activation by Indirubin-Derived PROTAC Targeting HDAC6 // *ACS Chem. Biol.* 2021. Vol. 16, № 12. P. 2746–2751.
149. He Y. et al. Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 1996.
150. Winter G.E. et al. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation // *Science (80-. )*. 2015. Vol. 348, № 6241. P. 1376–1381.
151. Salami J. et al. Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance // *Commun. Biol.* 2018. Vol. 1, № 1. P. 100.
152. Han X. et al. Discovery of Highly Potent and Efficient PROTAC Degradators of Androgen Receptor (AR) by Employing Weak Binding Affinity VHL E3 Ligase Ligands // *J. Med. Chem.* 2019. Vol. 62, № 24. P. 11218–11231.

153. Gockel L.M. et al. Design, synthesis, and characterization of PROTACs targeting the androgen receptor in prostate and lung cancer models // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2022. Vol. 355, № 5.
154. Liu X. et al. Discovery of XL01126: A Potent, Fast, Cooperative, Selective, Orally Bioavailable, and Blood–Brain Barrier Penetrant PROTAC Degradar of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. Vol. 144, № 37. P. 16930–16952.
155. Nunes J. et al. Targeting IRAK4 for Degradation with PROTACs // *ACS Med. Chem. Lett.* 2019. Vol. 10, № 7. P. 1081–1085.
156. Testa A. et al. Structure-Based Design of a Macrocyclic PROTAC // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2020. Vol. 59, № 4. P. 1727–1734.
157. Yang C., Tripathi R., Wang B. Click chemistry in the development of PROTACs // *RSC Chem. Biol.* 2024. Vol. 5, № 3. P. 189–197.
158. Xia L.-W. et al. Triazol: A Privileged Scaffold for Proteolysis Targeting Chimeras // *Future Med. Chem.* 2019. Vol. 11, № 22. P. 2919–2973.
159. Han X. et al. Discovery of ARD-2051 as a Potent and Orally Efficacious Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradar of Androgen Receptor for the Treatment of Advanced Prostate Cancer // *J. Med. Chem.* 2023. Vol. 66, № 13. P. 8822–8843.
160. Li Y. et al. Application and challenges of nitrogen heterocycles in PROTAC linker // *Eur. J. Med. Chem.* 2024. Vol. 273. P. 116520.
161. Zheng C. et al. Structure-activity relationship study of RSL3-based GPX4 degraders and its potential noncovalent optimization // *Eur. J. Med. Chem.* 2023. Vol. 255. P. 115393.
162. Bhela I.P. et al. A Versatile and Sustainable Multicomponent Platform for the Synthesis of Protein Degradars: Proof-of-Concept Application to BRD4-Degrading PROTACs // *J. Med. Chem.* 2022. Vol. 65, № 22. P. 15282–15299.
163. Guo L. et al. A platform for the rapid synthesis of proteolysis targeting chimeras (Rapid-TAC) under miniaturized conditions // *Eur. J. Med. Chem.* 2022. Vol. 236. P. 114317.
164. Petrylak D.P. et al. First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI). // *J. Clin. Oncol.* 2020. Vol. 38, № 15\_suppl. P. 3500–3500.
165. Gough S.M. et al. Oral Estrogen Receptor PROTAC Vepdegestrant (ARV-471) Is Highly Efficacious as Monotherapy and in Combination with CDK4/6 or PI3K/mTOR Pathway Inhibitors in Preclinical ER+ Breast Cancer Models // *Clin. Cancer Res.* 2024. Vol. 30, № 16. P. 3549–3563.

166. Rathkopf D.E. et al. Safety and clinical activity of BMS-986365 (CC-94676), a dual androgen receptor ligand-directed degrader and antagonist, in heavily pretreated patients with metastatic castration-resistant prostate cancer // *Ann. Oncol.* 2025. Vol. 36, № 1. P. 76–88.
167. Song J. et al. Targeted protein degradation in drug development: Recent advances and future challenges // *Eur. J. Med. Chem.* 2023. Vol. 261. P. 115839.
168. Gabizon R. et al. Efficient Targeted Degradation via Reversible and Irreversible Covalent PROTACs // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2020. Vol. 142, № 27. P. 11734–11742.
169. Gabizon R., London N. The rise of covalent proteolysis targeting chimeras // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2021. Vol. 62. P. 24–33.
170. Kubryń N. et al. PROTAC Technology as a New Tool for Modern Pharmacotherapy // *Molecules*. 2025. Vol. 30, № 10. P. 2123.
171. Simpson L.M. et al. Target protein localization and its impact on PROTAC-mediated degradation // *Cell Chem. Biol.* 2022. Vol. 29, № 10. P. 1482-1504.e7.
172. Yu X. et al. Novel Allosteric Inhibitor-Derived AKT Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Enable Potent and Selective AKT Degradation in KRAS/BRAF Mutant Cells // *J. Med. Chem.* 2022. Vol. 65, № 20. P. 14237–14260.
173. Jang J. et al. Mutant-Selective Allosteric EGFR Degraders are Effective Against a Broad Range of Drug-Resistant Mutations // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2020. Vol. 59, № 34. P. 14481–14489.
174. Chen Y. et al. Dual-ligand PROTACS mediate superior target protein degradation in vitro and therapeutic efficacy in vivo // *Chem. Sci.* 2024. Vol. 15, № 42. P. 17691–17701.
175. Luo H. et al. Advancing Design Strategy of PROTACs for Cancer Therapy // *MedComm*. 2025. Vol. 6, № 7.
176. Asimgil H. et al. Targeting the undruggable oncogenic KRAS: the dawn of hope // *JCI Insight*. 2022. Vol. 7, № 1.
177. Duffy M.J. et al. MYC as a target for cancer treatment // *Cancer Treat. Rev.* 2021. Vol. 94. P. 102154.
178. Pradeepkiran J.A., Reddy P.H. Phosphorylated tau targeted small-molecule PROTACs for the treatment of Alzheimer's disease and tauopathies // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2021. Vol. 1867, № 8. P. 166162.
179. Raina K. et al. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. Vol. 113, № 26. P. 7124–7129.
180. Edmondson S.D., Yang B., Fallan C. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in 'beyond

rule-of-five' chemical space: Recent progress and future challenges // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019. Vol. 29, № 13. P. 1555–1564.

181. Tashima T. Proteolysis-Targeting Chimera (PROTAC) Delivery into the Brain across the Blood-Brain Barrier // *Antibodies*. 2023. Vol. 12, № 3. P. 43.
182. Matsson P., Kihlberg J. How Big Is Too Big for Cell Permeability? // *J. Med. Chem.* 2017. Vol. 60, № 5. P. 1662–1664.
183. Cecchini C. et al. From Conception to Development: Investigating PROTACs Features for Improved Cell Permeability and Successful Protein Degradation // *Front. Chem.* 2021. Vol. 9.
184. Pike A. et al. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective // *Drug Discov. Today*. 2020. Vol. 25, № 10. P. 1793–1800.
185. Chen Y. et al. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) delivery system: advancing protein degraders towards clinical translation // *Chem. Soc. Rev.* 2022. Vol. 51, № 13. P. 5330–5350.
186. Sobierajski T. et al. The impact of E3 ligase choice on PROTAC effectiveness in protein kinase degradation // *Drug Discov. Today*. 2024. Vol. 29, № 7. P. 104032.
187. Paik H. et al. ELiAH: the atlas of E3 ligases in human tissues for targeted protein degradation with reduced off-target effect // *Database*. 2024. Vol. 2024.
188. Chang M. et al. Bioorthogonal PROTAC Prodrugs Enabled by On-Target Activation // *J. Am. Chem. Soc.* 2023. Vol. 145, № 25. P. 14155–14163.
189. Gao J. et al. Engineered bioorthogonal POLY-PROTAC nanoparticles for tumour-specific protein degradation and precise cancer therapy // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 4318.
190. Si R. et al. Discovery of novel protein degraders based on bioorthogonal reaction-driven intracellular self-assembly strategy // *Bioorg. Chem.* 2023. Vol. 135. P. 106497.
191. Xie S. et al. In Vivo Self-Assembly of PROTACs by Bioorthogonal Chemistry for Precision Cancer Therapy // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2025. Vol. 64, № 11.
192. Scaranti M. et al. Exploiting the folate receptor  $\alpha$  in oncology // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020. Vol. 17, № 6. P. 349–359.
193. Liu J. et al. Cancer Selective Target Degradation by Folate-Caged PROTACs // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. Vol. 143, № 19. P. 7380–7387.
194. Chen H. et al. Folate-Guided Protein Degradation by Immunomodulatory Imide Drug-Based Molecular Glues and Proteolysis Targeting Chimeras // *J. Med. Chem.* 2021. Vol. 64, № 16. P. 12273–12285.
195. Sincere N.I. et al. PROTACs: Emerging Targeted Protein Degradation Approaches for

- Advanced Druggable Strategies // *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 10. P. 4014.
196. Yan M. et al. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients // *Cancer Metastasis Rev.* 2015. Vol. 34, № 1. P. 157–164.
197. Pillow T.H. et al. Antibody Conjugation of a Chimeric BET Degradator Enables in vivo Activity // *ChemMedChem*. 2020. Vol. 15, № 1. P. 17–25.
198. Maneiro M. et al. Antibody–PROTAC Conjugates Enable HER2-Dependent Targeted Protein Degradation of BRD4 // *ACS Chem. Biol.* 2020. Vol. 15, № 6. P. 1306–1312.
199. Vartak R. et al. Cetuximab-based PROteolysis targeting chimera for effectual downregulation of NSCLC with varied EGFR mutations // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. Vol. 252. P. 126413.
200. Dragovich P.S. et al. Antibody-mediated delivery of chimeric protein degraders which target estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020. Vol. 30, № 4. P. 126907.
201. Chan K. et al. Antibody-Proteolysis Targeting Chimera Conjugate Enables Selective Degradation of Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 2 in HER2+ Cell Lines // *Bioconjug. Chem.* 2023. Vol. 34, № 11. P. 2049–2054.
202. You J. et al. RIPK2: a promising target for cancer treatment // *Front. Pharmacol.* 2023. Vol. 14.
203. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017. Vol. 16, № 3. P. 181–202.
204. Van den Avont A., Sharma-Walia N. Anti-nucleolin aptamer AS1411: an advancing therapeutic // *Front. Mol. Biosci.* 2023. Vol. 10.
205. Fan R. et al. Application of aptamer-drug delivery system in the therapy of breast cancer // *Biomed. Pharmacother.* 2023. Vol. 161. P. 114444.
206. Chen M. et al. Inducible Degradation of Oncogenic Nucleolin Using an Aptamer-Based PROTAC // *J. Med. Chem.* 2023. Vol. 66, № 2. P. 1339–1348.
207. Weng W., Xue G., Pan Z. Development of visible-light-activatable photocaged PROTACs // *Eur. J. Med. Chem.* 2024. Vol. 265. P. 116062.
208. Sarabando S.N. et al. Photomodulation Approaches to Overcome Antimicrobial Resistance // *Pharmaceuticals*. 2023. Vol. 16, № 5. P. 682.
209. Xue G. et al. Light-Induced Protein Degradation with Photocaged PROTACs // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141, № 46. P. 18370–18374.
210. Kounde C.S. et al. A caged E3 ligase ligand for PROTAC-mediated protein degradation with light // *Chem. Commun.* 2020. Vol. 56, № 41. P. 5532–5535.
211. Liu J. et al. Light-induced control of protein destruction by opto-PROTAC // *Sci. Adv.* 2020. Vol. 6, № 8.

212. Naro Y., Darrah K., Deiters A. Optical Control of Small Molecule-Induced Protein Degradation // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. Vol. 142, № 5. P. 2193–2197.
213. Reynders M. et al. PHOTACs enable optical control of protein degradation // *Sci. Adv.* 2020. Vol. 6, № 8.
214. Jin Y.-H. et al. Azo-PROTAC: Novel Light-Controlled Small-Molecule Tool for Protein Knockdown // *J. Med. Chem.* 2020. Vol. 63, № 9. P. 4644–4654.
215. Pfaff P. et al. Reversible Spatiotemporal Control of Induced Protein Degradation by Bistable PhotoPROTACs // *ACS Cent. Sci.* 2019. Vol. 5, № 10. P. 1682–1690.
216. Liu J., Peng Y., Wei W. Light-Controllable PROTACs for Temporospatial Control of Protein Degradation // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9.
217. Xu H. et al. Photo-regulated PROTACs: A novel tool for temporal control of targeted protein degradation // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2024. Vol. 107. P. 129778.
218. Cheng J. et al. Photoswitchable PROTACs for Reversible and Spatiotemporal Regulation of NAMPT and NAD<sup>+</sup> // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2024. Vol. 63, № 12.
219. Yang C. et al. Radiotherapy-Triggered Proteolysis Targeting Chimera Prodrug Activation in Tumors // *J. Am. Chem. Soc.* 2023. Vol. 145, № 1. P. 385–391.
220. An K. et al. Stimuli-Responsive PROTACs for Controlled Protein Degradation // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2023. Vol. 62, № 39.
221. Liu Y. et al. Ultrasound-Activated PROTAC Prodrugs Overcome Immunosuppression to Actuate Efficient Deep-Tissue Sono-Immunotherapy in Orthotopic Pancreatic Tumor Mouse Models // *Nano Lett.* 2024. Vol. 24, № 28. P. 8741–8751.
222. Chang J. et al. Enzyme-Instructed Activation of Pro-protein Therapeutics In Vivo // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141, № 45. P. 18136–18141.
223. Fouladi F., Steffen K.J., Mallik S. Enzyme-Responsive Liposomes for the Delivery of Anticancer Drugs // *Bioconjug. Chem.* 2017. Vol. 28, № 4. P. 857–868.
224. Fejerskov B., Jarlstad Olesen M.T., Zelikin A.N. Substrate mediated enzyme prodrug therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. Vol. 118. P. 24–34.
225. Liang C. et al. Enzyme-Catalyzed Activation of Pro-PROTAC for Cell-Selective Protein Degradation // *CCS Chem.* 2022. Vol. 4, № 12. P. 3809–3819.
226. Zhou Z. et al. Glutathione-responsive PROTAC for targeted degradation of ER $\alpha$  in breast cancer cells // *Bioorg. Med. Chem.* 2023. Vol. 96. P. 117526.
227. Cheng W. et al. Development of hypoxia-activated PROTAC exerting a more potent effect in tumor hypoxia than in normoxia // *Chem. Commun.* 2021. Vol. 57, № 95. P. 12852–12855.

228. Shi S. et al. Rational Design for Nitroreductase (NTR)-Responsive Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Selectively Targeting Tumor Tissues // *J. Med. Chem.* 2022. Vol. 65, № 6. P. 5057–5071.
229. Cheng W. et al. Design, synthesis and biological evaluation of the tumor hypoxia-activated PROTACs bearing caged CRBN E3 ligase ligands // *Bioorg. Med. Chem.* 2023. Vol. 82. P. 117237.
230. Xie B. et al. Discovery of estrogen receptor  $\alpha$  targeting caged hypoxia-responsive PROTACs with an inherent bicyclic skeleton for breast cancer treatment // *Bioorg. Chem.* 2023. Vol. 137. P. 106590.
231. Liu H. et al. Reactive oxygen species-responsive Pre-PROTAC for tumor-specific protein degradation // *Chem. Commun.* 2022. Vol. 58, № 72. P. 10072–10075.
232. Yu D. et al. Hydrogen Peroxide-Inducible PROTACs for Targeted Protein Degradation in Cancer Cells // *ChemBioChem.* 2023. Vol. 24, № 17.
233. Ash C. et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods // *Lasers Med. Sci.* 2017. Vol. 32, № 8. P. 1909–1918.
234. Ruggiero E. et al. Upconverting nanoparticles for the near infrared photoactivation of transition metal complexes: new opportunities and challenges in medicinal inorganic photochemistry // *Dalt. Trans.* 2016. Vol. 45, № 33. P. 13012–13020.
235. Majeed H., Gupta V. *Adverse Effects of Radiation Therapy*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
236. Ahmadi M. et al. Package delivered: folate receptor-mediated transporters in cancer therapy and diagnosis // *Chem. Sci.* 2024. Vol. 15, № 6. P. 1966–2006.
237. Delplace V. Rethinking Click and Bioorthogonal Chemistry for Biomedical Applications // *ACS Mater. Lett.* American Chemical Society, 2024. Vol. 6, № 1. P. 153–158.
238. de Roode K.E., Rossin R., Robillard M.S. Toward Realization of Bioorthogonal Chemistry in the Clinic // *Top. Curr. Chem.* 2025. Vol. 383, № 2. P. 12.
239. Hu D. et al. Recent advances in reactive oxygen species (ROS)-responsive drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer // *Acta Pharm. Sin. B.* 2024. Vol. 14, № 12. P. 5106–5131.
240. Hughes S.J. et al. The rise and rise of protein degradation: Opportunities and challenges ahead // *Drug Discov. Today.* 2021. Vol. 26, № 12. P. 2889–2897.
241. Qu L. et al. Discovery of PT-65 as a highly potent and selective Proteolysis-targeting chimera degrader of GSK3 for treating Alzheimer's disease // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. Vol. 226. P.

242. Ferris R.L. et al. Inhibiting the inhibitors: Development of the IAP inhibitor xevinapant for the treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck // *Cancer Treat. Rev.* 2023. Vol. 113. P. 102492.
243. Naito M., Ohoka N., Shibata N. SNIPERs—Hijacking IAP activity to induce protein degradation // *Drug Discov. Today Technol.* 2019. Vol. 31. P. 35–42.
244. Baker I.M. et al. Comprehensive Transcriptomic Analysis of Novel Class I HDAC Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) // *Biochemistry.* 2023. Vol. 62, № 3. P. 645–656.
245. Ohoka N. et al. Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor  $\alpha$  degradation // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293, № 18. P. 6776–6790.
246. Goyal R. et al. Insights on aspects of apoptosis in neurodegenerative disorders: a comprehensive review // *Explor. Med.* 2024. P. 89–100.
247. Ishikawa M. et al. Selective Degradation of Target Proteins by Chimeric Small-Molecular Drugs, PROTACs and SNIPERs // *Pharmaceuticals.* 2020. Vol. 13, № 4. P. 74.
248. Zheng Q. et al. Lysosome-targeting chimera (LYTAC): A silver bullet for targeted degradation of oncogenic membrane proteins // *MedComm – Oncol.* 2024. Vol. 3, № 1.
249. Zhou X., Xiao Y., Gao Y. Challenges and opportunities for lysosome-targeting chimeras // *Cell Reports Phys. Sci.* 2025. Vol. 6, № 8. P. 102778.
250. Stevens C.M. et al. Development of Oligomeric Mannose-6-phosphonate Conjugates for Targeted Protein Degradation // *ACS Med. Chem. Lett.* 2023. Vol. 14, № 6. P. 719–726.
251. Zhou Y. et al. Development of Triantennary N-Acetylgalactosamine Conjugates as Degradation for Extracellular Proteins // *ACS Cent. Sci.* 2021. Vol. 7, № 3. P. 499–506.
252. Zhang X. et al. Site-Specific Chemoenzymatic Conjugation of High-Affinity M6P Glycan Ligands to Antibodies for Targeted Protein Degradation // *ACS Chem. Biol.* 2022. Vol. 17, № 11. P. 3013–3023.
253. Banik S.M. et al. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins // *Nature.* 2020. Vol. 584, № 7820. P. 291–297.
254. Miao Y. et al. Bispecific Aptamer Chimeras Enable Targeted Protein Degradation on Cell Membranes // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2021. Vol. 60, № 20. P. 11267–11271.
255. Hamada K. et al. Development of a bispecific DNA-aptamer-based lysosome-targeting chimera for HER2 protein degradation // *Cell Reports Phys. Sci.* 2023. Vol. 4, № 3. P. 101296.
256. Yang J.L. et al. Directed evolution of genetically encoded LYTACs for cell-mediated delivery

// Proc. Natl. Acad. Sci. 2024. Vol. 121, № 13.

257. Zhang H. et al. Covalently Engineered Nanobody Chimeras for Targeted Membrane Protein Degradation // J. Am. Chem. Soc. 2021. Vol. 143, № 40. P. 16377–16382.
258. Kougentakis C. et al. Catalytic degradation of circulating targets with FcRn-mediated cycling LYTACs. 2025.
259. Takahashi D., Arimoto H. Targeting selective autophagy by AUTAC degraders // Autophagy. 2020. Vol. 16, № 4. P. 765–766.
260. Takahashi D., Arimoto H. Selective autophagy as the basis of autophagy-based degraders // Cell Chem. Biol. 2021. Vol. 28, № 7. P. 1061–1071.
261. Takahashi D. et al. AUTACs: Cargo-Specific Degraders Using Selective Autophagy // Mol. Cell. 2019. Vol. 76, № 5. P. 797-810.e10.
262. Gong R. et al. GPX4-AUTAC induces ferroptosis in breast cancer by promoting the selective autophagic degradation of GPX4 mediated by TRAF6-p62 // Cell Death Differ. 2025.
263. Ding Y. et al. Emerging degrader technologies engaging lysosomal pathways // Chem. Soc. Rev. 2022. Vol. 51, № 21. P. 8832–8876.
264. Ding Y. et al. Perspectives of autophagy-tethering compounds (ATTECs) in drug discovery // Med. Plus. 2024. Vol. 1, № 1. P. 100004.
265. Li Z. et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT–LC3 linker compounds // Nature. 2019. Vol. 575, № 7781. P. 203–209.
266. Li Z. et al. ATTEC: a potential new approach to target proteinopathies // Autophagy. 2020. Vol. 16, № 1. P. 185–187.
267. Pei J. et al. Developing potent LC3-targeting AUTAC tools for protein degradation with selective autophagy // Chem. Commun. 2021. Vol. 57, № 97. P. 13194–13197.
268. Gasparrini M. et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) in cancer: a patent review // Expert Opin. Ther. Pat. 2024. Vol. 34, № 7. P. 565–582.
269. Galli U. et al. Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy // Front. Pharmacol. 2020. Vol. 11.
270. Fu Y. et al. Degradation of lipid droplets by chimeric autophagy-tethering compounds // Cell Res. 2021. Vol. 31, № 9. P. 965–979.
271. Ji C.H. et al. The AUTOTAC chemical biology platform for targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system // Nat. Commun. 2022. Vol. 13, № 1. P. 904.
272. Lee J. et al. Targeted degradation of  $\alpha$ -synuclein aggregates in Parkinson's disease using the AUTOTAC technology (Molecular Neurodegeneration, (2023), 18, 1, (41), 10.1186/s13024-

023-00630-7) // Mol. Neurodegener. 2023. Vol. 18, № 1. P. 69.

- 273. Lee Y.J. et al. Chemical modulation of SQSTM1/p62-mediated xenophagy that targets a broad range of pathogenic bacteria // Autophagy. 2022. Vol. 18, № 12. P. 2926–2945.
- 274. Paudel R.R. et al. Targeted Protein Degradation via Lysosomes // Biochemistry. 2023. Vol. 62, № 3. P. 564–579.
- 275. Pan Z. et al. Research Advances in Chaperone-Mediated Autophagy (CMA) and CMA-Based Protein Degradation // J. Med. Chem. 2025. Vol. 68, № 3. P. 2314–2332.
- 276. Yao R., Shen J. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases // MedComm. 2023. Vol. 4, № 5.
- 277. Fan X. et al. Rapid and reversible knockdown of endogenous proteins by peptide-directed lysosomal degradation // Nat. Neurosci. 2014. Vol. 17, № 3. P. 471–480.
- 278. ZHANG J. et al. Chaperone-mediated autophagy targeting chimeras (CMATAC) for the degradation of ER $\alpha$  in breast cancer // BIOCELL. 2020. Vol. 44, № 4. P. 591–595.
- 279. Shao J. et al. Targeted Degradation of Cell-Surface Proteins via Chaperone-Mediated Autophagy by Using Peptide-Conjugated Antibodies // Angew. Chemie Int. Ed. 2024. Vol. 63, № 18.
- 280. Wang J. et al. A Novel Lysosome Targeting Chimera for Targeted Protein Degradation via Split-and-Mix Strategy // ACS Chem. Biol. 2024. Vol. 19, № 5. P. 1161–1168.
- 281. Bauer P.O. et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein // Nat. Biotechnol. 2010. Vol. 28, № 3. P. 256–263.
- 282. Xie S. et al. Small-Molecule Hydrophobic Tagging: A Promising Strategy of Druglike Technology for Targeted Protein Degradation // J. Med. Chem. 2023. Vol. 66, № 16. P. 10917–10933.
- 283. Gao N. et al. Hydrophobic tagging-mediated degradation of Alzheimer's disease related Tau // RSC Adv. 2017. Vol. 7, № 64. P. 40362–40366.
- 284. Gao N. et al. TDP-43 specific reduction induced by Di-hydrophobic tags conjugated peptides // Bioorg. Chem. 2019. Vol. 84. P. 254–259.
- 285. Hirai K. et al. Conversion of a PROTAC Mutant Huntingtin Degradation into Small-Molecule Hydrophobic Tags Focusing on Drug-like Properties // ACS Med. Chem. Lett. 2022. Vol. 13, № 3. P. 396–402.
- 286. Chen Z. et al. Discovery of CZY43 as a new small-molecule degrader of pseudokinase HER3 // Eur. J. Med. Chem. 2025. Vol. 285. P. 117258.
- 287. Xie S. et al. Discovery of Norbornene as a Novel Hydrophobic Tag Applied in Protein

- Degradation // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2023. Vol. 62, № 13.
288. Ma A. et al. Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader // *Nat. Chem. Biol.* 2020. Vol. 16, № 2. P. 214–222.
289. Tomoshige S., Ishikawa M. PROTACs and Other Chemical Protein Degradation Technologies for the Treatment of Neurodegenerative Disorders // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2021. Vol. 60, № 7. P. 3346–3354.
290. Clift D. et al. A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins // *Cell.* 2017. Vol. 171, № 7. P. 1692-1706.e18.
291. Benet L.Z. et al. BDDCS, the Rule of 5 and drugability // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. Vol. 101. P. 89–98.
292. Yang N.J., Hinner M.J. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. 2015. P. 29–53.
293. Alam M.M., Wasim S., Lee S.-Y. Emerging Concepts of Targeted Protein Degradation Technologies via Lysosomal Pathways // *Int. J. Mol. Sci.* 2025. Vol. 26, № 12. P. 5582.
294. Ding Y., Fei Y., Lu B. Emerging New Concepts of Degradation Technologies // *Trends Pharmacol. Sci.* 2020. Vol. 41, № 7. P. 464–474.
295. Salama A.K.A.A. et al. Targeted Protein Degradation: Clinical Advances in the Field of Oncology // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 23. P. 15440.
296. Sun X. et al. PROTACs: great opportunities for academia and industry // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2019. Vol. 4, № 1. P. 64.
297. Saraswat A.L. et al. Drug delivery challenges and formulation aspects of proteolysis targeting chimera (PROTACs) // *Drug Discov. Today.* 2023. Vol. 28, № 1. P. 103387.
298. An S., Fu L. Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs // *EBioMedicine.* 2018. Vol. 36. P. 553–562.
299. Chakraborty C. et al. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* 2017. Vol. 8. P. 132–143.
300. Lino C.A. et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches // *Drug Deliv.* 2018. Vol. 25, № 1. P. 1234–1257.
301. El-Brolosy M.A., Stainier D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms // *PLOS Genet.* / ed. Moens C. 2017. Vol. 13, № 7. P. e1006780.
302. Cullot G. et al. Genome editing with the HDR-enhancing DNA-PKcs inhibitor AZD7648 causes large-scale genomic alterations // *Nat. Biotechnol.* 2024.
303. Ali Zaidi S.S. et al. Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies // *J.*

Nanobiotechnology. 2023. Vol. 21, № 1. P. 381.

304. Kaczmarek J.C., Kowalski P.S., Anderson D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality // *Genome Med.* 2017. Vol. 9, № 1. P. 60.
305. Rosenblum D. et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 1410.
306. Tyagi A. et al. Nutraceuticals target androgen receptor-splice variants (AR-SV) to manage castration resistant prostate cancer (CRPC) // *Pharmacol. Ther.* 2024. Vol. 264. P. 108743.
307. Kulac I., Roudier M.P., Haffner M.C. Molecular Pathology of Prostate Cancer // *Clin. Lab. Med.* 2024. Vol. 44, № 2. P. 161–180.
308. Ho J.-Y. et al. Estrogen Enhances the Cell Viability and Motility of Breast Cancer Cells through the ER $\alpha$ - $\Delta$ Np63-Integrin  $\beta$ 4 Signaling Pathway // *PLoS One* / ed. Chen X. 2016. Vol. 11, № 2. P. e0148301.
309. Liu Y., Ma H., Yao J. ER $\alpha$ , A Key Target for Cancer Therapy: A Review // *Onco. Targets. Ther.* 2020. Vol. Volume 13. P. 2183–2191.
310. Hakem F. et al. Recent Advances in the Development of Pro-PROTAC for Selective Protein Degradation. // *Pharmaceutics.* Switzerland, 2025. Vol. 17, № 9.
311. Hélène Duparc, James Neef, BS, Janany Kandiah, MS, Maulasri Bhatta, PhD, Agathe Chédeville, PhD, Joe DeBartolo, PhD, Sara, Betty Chan, PhD Sinicropi-Yao, PhD. 3585 AUTX703, a Novel and Potent KAT2A and KAT2B Protein Degradar, Induces Differentiation and Offers Survival Advantage in a Primary Human AML Xenograft Model. 2024.
312. WEN-LIAN W.U. et al. CARBAMATE AND UREA COMPOUNDS AS MULTIKINASE INHIBITORS. WO: ANGEX PHARMACEUTICAL INC OP - US 201762608375 P, 2019.
313. Chen T. et al. Discovery of 1,6-naphthyridinone-based MET kinase inhibitor bearing quinoline moiety as promising antitumor drug candidate // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. Vol. 192. P. 112174.
314. Burslem G.M. et al. The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. // *Cell Chem. Biol.* United States, 2018. Vol. 25, № 1. P. 67-77.e3.
315. Ruffilli C. et al. Orthogonal validation of PROTAC mediated degradation of the integral membrane proteins EGFR and c-MET. // *Sci. Rep.* England, 2025. Vol. 15, № 1. P. 504.
316. Miletić N. et al. Workflow for E3 Ligase Ligand Validation for PROTAC Development. // *ACS Chem. Biol.* United States, 2025. Vol. 20, № 2. P. 507–521.
317. Tang Z. et al. Dual MET–EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer // *Br. J. Cancer.* 2008. Vol. 99, № 6. P. 911–922.
318. Sawada K. et al. c-Met Overexpression Is a Prognostic Factor in Ovarian Cancer and an

Effective Target for Inhibition of Peritoneal Dissemination and Invasion // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 4. P. 1670–1679.

319. Sun Z.-J. et al. A novel bispecific c-MET/PD-1 antibody with therapeutic potential in solid cancer // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 17. P. 29067–29079.
320. Mueller K.L. et al. EGFR/Met association regulates EGFR TKI resistance in breast cancer // *J. Mol. Signal.* 2010. Vol. 5. P. 8.
321. Wilson T.R. et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors // *Nature.* 2012. Vol. 487, № 7408. P. 505–509.
322. Yang L. et al. A recombinant human protein targeting HER2 overcomes drug resistance in HER2-positive breast cancer // *Sci. Transl. Med. American Association for the Advancement of Science*, 2019. Vol. 11, № 476. P. eaav1620.
323. Yao H.-P., Tong X.-M., Wang M.-H. Oncogenic mechanism-based pharmaceutical validation of therapeutics targeting MET receptor tyrosine kinase. // *Ther. Adv. Med. Oncol. England*, 2021. Vol. 13. P. 17588359211006956.
324. Organ S.L., Tsao M.-S. An overview of the c-MET signaling pathway. // *Ther. Adv. Med. Oncol. England*, 2011. Vol. 3, № 1 Suppl. P. S7–S19.
325. Peschard P. et al. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. // *Mol. Cell. United States*, 2001. Vol. 8, № 5. P. 995–1004.
326. Petrelli A. et al. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. // *Nature. England*, 2002. Vol. 416, № 6877. P. 187–190.
327. Jeffers M. et al. Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. // *Mol. Cell. Biol. United States*, 1997. Vol. 17, № 2. P. 799–808.
328. Yokouchi M. et al. Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. // *J. Biol. Chem. United States*, 1999. Vol. 274, № 44. P. 31707–31712.
329. Carter S., Urbé S., Clague M.J. The met receptor degradation pathway: requirement for Lys48-linked polyubiquitin independent of proteasome activity. // *J. Biol. Chem. United States*, 2004. Vol. 279, № 51. P. 52835–52839.
330. Kipp R.A. et al. Molecular targeting of inhibitor of apoptosis proteins based on small molecule mimics of natural binding partners. // *Biochemistry. United States*, 2002. Vol. 41, № 23. P. 7344–7349.
331. Tencer A.H. et al. Molecular basis for nuclear accumulation and targeting of the inhibitor of

- apoptosis BIRC2. // Nat. Struct. Mol. Biol. United States, 2023. Vol. 30, № 9. P. 1265–1274.
332. P C.A. et al. MODULATORS OF PROTEOLYSIS AND ASSOCIATED METHODS OF USE. WO: ARVINAS OPERATIONS INC, 2019.
  333. P C.A. et al. ALANINE-BASED MODULATORS OF PROTEOLYSIS AND ASSOCIATED METHODS OF USE. WO: ARVINAS INC OP - US 201562192056 P, 2017.
  334. MIKIHICO N. et al. HETEROCYCLIC COMPOUND. JP: JAPAN HEALTH SCIENCES FOUND OP - JP 2016196803 A, 2018.
  335. Chang Y.-C., Cheung C.H. An Updated Review of Smac Mimetics, LCL161, Birinapant, and GDC-0152 in Cancer Treatment // Applied Sciences. 2021. Vol. 11, № 1. P. 335.
  336. Cohen F. et al. Antagonists of inhibitor of apoptosis proteins based on thiazole amide isosteres. // Bioorg. Med. Chem. Lett. England, 2010. Vol. 20, № 7. P. 2229–2233.
  337. Gros L. et al. Evaluation of Azasterols as Anti-Parasitics // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49, № 20. P. 6094–6103.
  338. Malkov A. V et al. Formamides derived from N-methyl amino acids serve as new chiral organocatalysts in the enantioselective reduction of aromatic ketimines with trichlorosilane // Tetrahedron. 2006. Vol. 62, № 2. P. 264–284.
  339. Gurung D. et al. Proline Isomerization: From the Chemistry and Biology to Therapeutic Opportunities. // Biology (Basel). Switzerland, 2023. Vol. 12, № 7.
  340. Duengo S. et al. Epimerisation in Peptide Synthesis. // Molecules. Switzerland, 2023. Vol. 28, № 24.
  341. MIAO L.I.U. TECHNOLOGY FOR MODULAR ASSEMBLY OF CELL-PENETRATING PEPTIDE-MEDIATED POLYPEPTIDE OR MICROPROTEIN TARGETING CHIMERA, AND USE THEREOF. WO: LIU MIAO OP - CN 202110732346 A, 2023.
  342. Wang Z. et al. Design, synthesis, and antiviral activity evaluation of phenanthrene-based antofine derivatives. // J. Agric. Food Chem. United States, 2012. Vol. 60, № 35. P. 8544–8551.
  343. Wróblewska A., Młostoń G. Synthesis of New Enantiopure Thioureas Derived from (S)-Proline // Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem. Taylor & Francis, 2013. Vol. 188, № 4. P. 509–511.
  344. Just-Baringo X. et al. Highly efficient, multigram and enantiopure synthesis of (S)-2-(2,4'-bithiazol-2-yl)pyrrolidine // Tetrahedron Lett. 2011. Vol. 52, № 42. P. 5435–5437.
  345. Andrew P. Crew Michael Berlin Hanqing Dong Yimin Qian. WO2017011590A1.pdf. 2017.
  346. Sachkova A.A. et al. Design, Synthesis, and In Vitro Antiproliferative Activity of 4,5,6-Trisubstituted 2-Aminopyrimidines as Potential TGF- $\beta$  Inhibitors // Russ. J. Org. Chem. 2024. Vol. 60, № 4. P. 672–683.

347. Hagege A. et al. Targeting of c-MET and AXL by cabozantinib is a potential therapeutic strategy for patients with head and neck cell carcinoma. // Cell reports. Med. United States, 2022. Vol. 3, № 9. P. 100659.
348. Gortany N.K. et al. Foretinib induces G2/M cell cycle arrest, apoptosis, and invasion in human glioblastoma cells through c-MET inhibition. // Cancer Chemother. Pharmacol. Germany, 2021. Vol. 87, № 6. P. 827–842.
349. Сачкова А.А. et al. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО КОНЬЮГАТА SNIPER НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРА КАБОЗАНТИНИБА: pat. RU 2 838 144 C1 USA. РФ: ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, 2025.
350. Ciardiello D. et al. Clinical development of therapies targeting TGF $\beta$ : current knowledge and future perspectives // Ann. Oncol. 2020. Vol. 31, № 10. P. 1336–1349.
351. Santini V. et al. Phase II Study of the ALK5 Inhibitor Galunisertib in Very Low-, Low-, and Intermediate-Risk Myelodysplastic Syndromes // Clin. Cancer Res. 2019. Vol. 25, № 23. P. 6976–6985.
352. E. Ling L., Lee W.-C. TGF-Beta Type I Receptor (Alk5) Kinase Inhibitors in Oncology // Curr. Pharm. Biotechnol. 2011. Vol. 12, № 12. P. 2190–2202.
353. CATHERINE L. et al. PYRIMIDINE DERIVATIVES AS ALK-5 INHIBITORS. WO: NOVARTIS AG, 2008.
354. Kong Z., Hu W., Morken J.P. 1,2-Diborylsilanes: Catalytic Enantioselective Synthesis and Site-Selective Cross-coupling // ACS Catal. 2023. Vol. 13, № 17. P. 11522–11527.
355. Huang S. et al. A Novel Three-Component One-Pot Reaction Involving Alkynes, Urea or Thiourea, and Aldehydes // Org. Lett. 2005. Vol. 7, № 17. P. 3797–3799.
356. Donckele E.J. et al. The [2 + 2] Cycloaddition–Retroelectrocyclization and [4 + 2] Hetero-Diels–Alder Reactions of 2-(Dicyanomethylene)indan-1,3-dione with Electron-Rich Alkynes: Influence of Lewis Acids on Reactivity // Org. Lett. 2015. Vol. 17, № 14. P. 3506–3509.
357. Muthukrishnan I. et al. Synthesis of 5,6-Dihydrodibenzo[ b , h ][1,6]naphthyridines via Copper Bromide Catalyzed Intramolecular [4 + 2] Hetero-Diels–Alder Reactions // J. Org. Chem. 2016. Vol. 81, № 3. P. 1116–1124.
358. Lu J.-Y., Arndt H.-D. Hetero Diels–Alder Synthesis of 3-Hydroxypyridines: Access to the Nosiheptide Core // J. Org. Chem. 2007. Vol. 72, № 11. P. 4205–4212.
359. Chandravarkar A., Aneja T., Anilkumar G. Advances in Biginelli reaction: A comprehensive review // J. Heterocycl. Chem. 2024. Vol. 61, № 1. P. 5–28.

360. Goldberg F.W. et al. Rapid Generation of a High Quality Lead for Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Type I Receptor (ALK5) // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2009. Vol. 52, № 23. P. 7901–7905.
361. Gellibert F. et al. Design of novel quinazoline derivatives and related analogues as potent and selective ALK5 inhibitors // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. Vol. 19, № 8. P. 2277–2281.
362. Cao H. et al. Differential kinase activity of ACVR1 G328V and R206H mutations with implications to possible T $\beta$ RI cross-talk in diffuse intrinsic pontine glioma // Sci. Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 6140.
363. Steinebach C. et al. PROTAC-mediated crosstalk between E3 ligases // Chem. Commun. 2019. Vol. 55, № 12. P. 1821–1824.
364. CHANG G. et al. Compounds that induce degradation of anti-apoptotic bcl-2 family proteins and the uses thereof: pat. WO2017184995 USA. 2017.
365. Zhang F. et al. Discovery of a new class of PROTAC BRD4 degraders based on a dihydroquinazolinone derivative and lenalidomide/pomalidomide // Bioorg. Med. Chem. 2020. Vol. 28, № 1. P. 115228.
366. Bannen L.C. et al. c-Met modulators and methods of use: pat. US7579473B2 USA. 2009.
367. Narender T., Reddy K.P., Madhur G. NaOAc-Mediated Selective Deprotection of Aromatic Acetates and Its Application in the Synthesis of Natural Products // Synth. Commun. 2009. Vol. 39, № 11. P. 1949–1956.
368. Chen Y.-H. et al. Identification of Buctopamine and Mebuctopamine, a  $\beta$  2 Receptor Agonist and Its Metabolite, in Swine Hair and Feed Additives // J. Agric. Food Chem. 2017. Vol. 65, № 19. P. 3965–3974.
369. Santos W.C.C. et al. Evaluating Gold and Selenium Chemistry for Selective Transformations of Lignin Model Compounds // Adv. Synth. Catal. 2018. Vol. 360, № 7. P. 1376–1383.
370. Nerdinger S. et al. Crystal Structures of Intermediates in a New Synthesis of Antitumor Drug Cabozantinib // Heterocycles. 2016. Vol. 93, № 1. P. 323.
371. Saito K. et al. Practical Synthesis of Pent-4-yn-1-ol and Pent-4-en-1-ol from Tetrahydrofurfuryl Halides // Synthesis (Stuttg). 2023. Vol. 55, № 17. P. 2670–2673.
372. Steib P., Breit B. Enantioselective Rhodium-Catalyzed Dimerization of  $\omega$ -Allenyl Carboxylic Acids: Straightforward Synthesis of C 2 -Symmetric Macrodiolides // Angew. Chemie Int. Ed. 2018. Vol. 57, № 22. P. 6572–6576.
373. Placzek A.T., Hougland J.L., Gibbs R.A. Synthesis of Frame-Shifted Farnesyl Diphosphate Analogs // Org. Lett. 2012. Vol. 14, № 16. P. 4038–4041.

374. Nieves I. et al. Approaches to polyunsaturated sphingolipids: new conformationally restrained analogs with minimal structural modifications // *Tetrahedron*. 2016. Vol. 72, № 5. P. 605–612.
375. Wlodarczyk M.T. et al. Platinum(II) Complex-Nuclear Localization Sequence Peptide Hybrid for Overcoming Platinum Resistance in Cancer Therapy // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018. Vol. 4, № 2. P. 463–467.
376. Romuald C., Busseron E., Coutrot F. Very Contracted to Extended co -Conformations with or without Oscillations in Two- and Three-Station [c2]Daisy Chains // *J. Org. Chem.* 2010. Vol. 75, № 19. P. 6516–6531.
377. LaFrate A.L., Carlson K.E., Katzenellenbogen J.A. Steroidal bivalent ligands for the estrogen receptor: design, synthesis, characterization and binding affinities. // *Bioorg. Med. Chem. England*, 2009. Vol. 17, № 10. P. 3528–3535.
378. Shimokawa K. et al. Synthesis and inhibitory effect on fat accumulation of (–)-ternatin derivatives modified in the  $\beta$ -OH- <sc>d</sc> -Leu<sup>7</sup> moiety // *Org. Biomol. Chem.* 2008. Vol. 6, № 1. P. 58–60.
379. Miah A.H. et al. Optimization of a Series of RIPK2 PROTACs // *J. Med. Chem.* 2021. Vol. 64, № 17. P. 12978–13003.
380. Liu Y.-Y. et al. Graphite oxide-catalyzed acetylation of alcohols and phenols // *Chinese Chem. Lett.* 2016. Vol. 27, № 5. P. 726–730.
381. Jain N., Xu S., Ciufolini M.A. Asymmetric Oxidative Cycloetherification of Naphtholic Alcohols // *Chem. – A Eur. J.* 2017. Vol. 23, № 19. P. 4542–4546.
382. Tolkunov S. V., Dulenko V.I. Synthesis and recyclization of 4-chloromethylflavylium and 4-chloromethylbenzothiapyrilium salts // *Chem. Heterocycl. Compd.* 1987. Vol. 23, № 6. P. 633–635.
383. Biscoe M.R., Buchwald S.L. Selective Monoarylation of Acetate Esters and Aryl Methyl Ketones Using Aryl Chlorides // *Org. Lett.* 2009. Vol. 11, № 8. P. 1773–1775.
384. Robinson S.J. et al. 2-Aminopyrimidines as dual adenosine A1/A2A antagonists // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 104. P. 177–188.
385. Kaschel J. et al. Rearrangements of Furan-, Thiophene- and N -Boc-Pyrrole-Derived Donor-Acceptor Cyclopropanes: Scope and Limitations // *European J. Org. Chem.* 2013. Vol. 2013, № 21. P. 4539–4551.
386. Wang D. et al. Transition-metal-free access to 7-azaindoles // *Tetrahedron*. 2018. Vol. 74, № 30. P. 4100–4110.
387. Mathi G.R. et al. Regioselective C–H Functionalization of Heteroarene N -Oxides Enabled by

- a Traceless Nucleophile // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2020. Vol. 59, № 50. P. 22675–22683.
388. Kalčič F. et al. Polysubstituted Pyrimidines as Potent Inhibitors of Prostaglandin E<sub>2</sub> Production: Increasing Aqueous Solubility // *ChemMedChem*. 2021. Vol. 16, № 18. P. 2802–2806.
389. van Veldhoven J.P.D. et al. A new generation of adenosine receptor antagonists: From di- to trisubstituted aminopyrimidines // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, № 6. P. 2741–2752.
390. Forli S. et al. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite // *Nat. Protoc.* 2016. Vol. 11, № 5. P. 905–919.
391. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31, № 2. P. 455–461.
392. Iselt M., Holtei W., Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. // *Arzneimittelforschung*. Germany, 1989. Vol. 39, № 7. P. 747–749.
393. Volkova Y.A. et al. Access to steroidal pyridazines via modified thiohydrazides // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6, № 49. P. 42863–42868.
394. Scherbakov A.M. et al. Activation of mitogenic pathways and sensitization to estrogen-induced apoptosis: two independent characteristics of tamoxifen-resistant breast cancer cells? // *Breast Cancer Res. Treat.* 2006. Vol. 100, № 1. P. 1–11.
395. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, № 1–2. P. 248–254.
396. Mruk D.D., Cheng C.Y. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting // *Spermatogenesis*. 2011. Vol. 1, № 2. P. 121–122.
397. Lakshmanan I., Batra S. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method // *BIO-PROTOCOL*. 2013. Vol. 3, № 6.
398. Chauvin C., Salhi S., Jean-Jean O. Human Eukaryotic Release Factor 3a Depletion Causes Cell Cycle Arrest at G<sub>1</sub> Phase through Inhibition of the mTOR Pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 27, № 16. P. 5619–5629.
399. Yang W.S. et al. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4 // *Cell*. 2014. Vol. 156, № 1–2. P. 317–331.
400. Guan B., Zhang X. Aptamers as Versatile Ligands for Biomedical and Pharmaceutical Applications // *Int. J. Nanomedicine*. 2020. Vol. Volume 15. P. 1059–1071.
401. Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease // *J.*

Neurochem. 2008. Vol. 104, № 6. P. 1433–1439.

- 402. Rizk S.S. et al. Nanobodies in the fight against infectious diseases: repurposing nature's tiny weapons // World J. Microbiol. Biotechnol. 2024. Vol. 40, № 7. P. 209.
- 403. Zhang W. et al. Lipid Droplets, the Central Hub Integrating Cell Metabolism and the Immune System // Front. Physiol. 2021. Vol. 12.

## Приложение

**Таблица 19.** Результаты докинга для синтезированных пиримидинов **208-216, 221-225, 226-227**, и для модельных соединений **234-242**.

№	Соединение	Средняя энергия связывания, ккал/моль
<b>Синтезированные соединения</b>		
<b>1</b>	208	-9.5
<b>2</b>	209	-9.3
<b>3</b>	210	-9.5
<b>4</b>	211	-8.
<b>5</b>	212	-8.1
<b>6</b>	213	-8.2
<b>7</b>	214	-9.3
<b>8</b>	<b>215</b>	<b>-10.2</b>
<b>9</b>	216	-9.2
<b>10</b>	221	-8.2
<b>11</b>	222	-8.3
<b>12</b>	223	-9.4
<b>13</b>	224	-8.7
<b>14</b>	225	-9.4
<b>15</b>	226	-9.1
<b>16</b>	227	-8.3
<b>Модельные соединения для проведения докинга</b>		
<b>17</b>	234	-9.8
<b>18</b>	235	<b>-10.2</b>
<b>19</b>	236	-9.8
<b>20</b>	237	-10.1
<b>21</b>	238	-9.2
<b>22</b>	<b>239</b>	<b>-10.7</b>
<b>23</b>	240	-9.4
<b>24</b>	241	-9.9
<b>25</b>	242	-9.9