

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Поляков Владислав Сергеевич

**Производные диспироиндолинонов — потенциальные молекулы
выборочного протеолиза белка (PROTAC)**

Специальность 1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре органической химии химического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Белоглазкина Елена Кимовна**

доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Зефирова Ольга Николаевна**

доктор химических наук, доцент, Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра медицинской химии и
тонкого органического синтеза, профессор

Газиева Галина Анатольевна

доктор химических наук, Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук,
лаборатория азотсодержащих соединений (№19), ведущий
научный сотрудник

Голанцов Никита Евгеньевич

кандидат химических наук, Российский университет
дружбы народов имени Патриса Лумумбы, факультет
физико-математических и естественных наук, кафедра
органической химии, доцент

Защита диссертации состоится «09» сентября 2026 г. в 11 часов 00 минут на
заседании диссертационного совета МГУ.014.1 Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские
горы, д.1, стр.3, химический факультет МГУ, аудитория 446

E-mail: maloshitskaya@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки
МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д.27 и на
портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3957>

Автореферат разослан «22» мая 2026 г. Повторно разослан «__» _____ 2026
г. в связи с переносом даты защиты.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.014.1

кандидат химических наук



Малошицкая О.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В 2001 году впервые было предложено использовать для терапии злокачественных опухолей молекулы PROTAC (от англ. «PROteolysisTArgetingChimera»), способные активировать выборочный протеолиз онкобелков. Молекула PROTAC состоит из двух фрагментов, соединенных между собой линкером: один из фрагментов является лигандом онкобелка, а второй — лигандом E3-убиквитинлигазы этого белка. При координации обоих лигандных фрагментов молекула PROTAC притягивает целевой белок к E3-убиквитинлигазе, после чего он подвергается убиквитинированию (мечению для деградации в протеасоме, так называемый «молекулярный поцелуй смерти») и далее протеасомному расщеплению на аминокислоты. После разрушения белка-мишени молекула PROTAC высвобождается и может координироваться со следующей белковой молекулой, поэтому часто эффективными для достижения цитотоксического эффекта оказываются наномолярные концентрации PROTAC-молекул, что позволяет уменьшить количество вводимого препарата и тем самым минимизировать возможные побочные реакции организма. Однако число синтезированных к настоящему времени молекул PROTAC с доказанным механизмом действия крайне ограничено. Таким образом, разработка новых молекул выборочного протеолиза белков является актуальной задачей современной органической химии.

Существуют соединения PROTAC двух структурных типов: гомо-PROTAC и гетеро-PROTAC. В молекулах гомо-PROTAC линкером соединяются два фрагмента, одновременно являющиеся и лигандами целевого белка, и лигандами E3-убиквитинлигазы; такие молекулы способны координировать две молекулы онкобелка, которые далее убиквитинируют друг друга и подвергаются протеолизу. Молекулы гетеро-PROTAC содержат два разных функциональных фрагмента, один из которых связывается с уничтожаемым белком, а второй — с E3 убиквитинлигазой.

В настоящей диссертации разработаны методы синтеза двух типов потенциальных молекул PROTAC: бис-(диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов), в которых спироциклические фрагменты соединены между собой линкерами различной длины и природы, а также несимметричных производных, в которых диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноновый фрагмент соединён с лигандом убиквитинлигазы цереблон (CRBN) — производным глутаримида.

Степень разработанности темы. В настоящее время несколько противоопухолевых препаратов, работающих по механизму PROTAC, проходят клинические исследования: 3 вещества находятся в III фазе клинических испытаний, 11 соединений во II фазе и больше 30 молекул в I фазе клинических испытаний (по состоянию на конец 2025 г.). Так, на второй

и третьей фазах клинических испытаний, соответственно, находятся соединения ARV-110 и ARV-471, предназначенные для лечения рака простаты и рака молочной железы, в которых малая молекула — лиганд андрогенового или эстрогенового рецептора — связана с производным глутаримида, являющегося известным лигандом E3-убиквитинлигазы CRBN. Однако синтез этих молекул представляет синтетическую задачу высокой сложности — например, оригинальная методика синтеза соединения ARV-741 (вепдегестранта) включает 16 стадий, что приводит к высокой стоимости конечного вещества и снижает его доступность для пациентов.

Ранее в нашей научной группе была синтезирована серия диспиро-имидазолон-пирролидин-индолинонов, которые показали высокую противоопухолевую эффективность как лиганды белка MDM2 — эндогенного ингибитора опухолевого супрессора белка p53, регулирующего клеточный цикл. Поскольку MDM2 является также и E3-убиквитинлигазой, представлялось перспективным создание молекул гомо-PROTAC и гетеро-PROTAC на основе диспироиндолинонов.

В качестве линкеров между функциональными фрагментами описанных к настоящему времени молекул PROTAC чаще всего используют гибкие полиметиленовые или амид-содержащие линкеры. В 2021 г. на примере ингибитора белка MDM2 нутлина-3 было показано, что в молекулах типа гомо-PROTAC эффективность ингибирования целевого белка зависит от числа углеродных атомов в линкере между функциональными фрагментами. Однако подробные исследования оптимальной длины и химической природы линкера в молекулах PROTAC к настоящему времени в литературе отсутствуют.

Целью работы является разработка методов синтеза двух структурных типов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов для использования в качестве молекул PROTAC. Первый тип — это молекулы гомо-PROTAC, в которых два диспироиндолиноновых фрагмента связаны между собой линкерами различной длины и природы. Второй тип представляет собой соединения типа гетеро-PROTAC, в которых фрагмент диспироиндолинона, способный связываться с целевым онкобелком MDM2, соединён линкером с ингибиторами E3-убиквитинлигазы — производными глутаримида.

Задачами работы являлись: (1) разработка методов получения бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с полиметиленовыми и триазолсодержащими линкерами между спироциклическими фрагментами; (2) разработка методов синтеза соединений типа гетеро-PROTAC, в которых фрагмент диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинона связан амид- или триазол-содержащим линкером с производным глутаримида; (3) первичное тестирование цитотоксичности и селективности действия

полученных соединений в сравнении с моно-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонами.

Объекты и предмет исследования. В качестве объекта исследования были выбраны бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны с линкерами различной длины и природы между спиросочленёнными фрагментами и конъюгаты диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с глутаримидом с амид- и триазол-содержащими линкерами между функциональными фрагментами. Предметом исследования являлось установление влияния природы, длины и положения линкера в полученных молекулах типа PROTAC на цитотоксичность соединений.

Научная новизна работы состоит в: (1) получении ранее неизвестных структурных типов молекул гомо-PROTAC и гетеро-PROTAC на основе диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов; (2) впервые предложенной методике синтеза бис-диспироиндолинонов на основе 5-арилиден-2-тиогидантоинов, соединённых между собой полиметиленовыми линкерами; (3) выявлении оптимальной для проявления цитотоксической активности длины полиметиленового линкера между спироциклическими фрагментами в бис-диспиро-индолинон-пирролидин-имидазолон-азах; (4) разработке методик получения несимметричных конъюгатов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и глутаримида с амид- и триазол-содержащими линкерами между функциональными фрагментами.

Теоретическая и практическая значимость. (1) Впервые разработаны методы получения бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с полиметиленовыми и триазольными линкерами между функциональными фрагментами; (2) разработаны методы получения молекул типа гетеро-PROTAC, в которых структурный фрагмент диспироиндолинона соединен через амид- или триазол-содержащий линкер с фрагментом ингибитора E3-убиквитинлигазы — производным глутаримида; (3) получена серия неизвестных ранее молекул структурных типов гомо-PROTAC и гетеро-PROTAC на основе производных диспироиндолинонов; (4) проведено первичное тестирование цитотоксической активности полученных молекул PROTAC различных структурных типов в сравнении с монофункциональными диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонами.

Методология диссертационного исследования. Целевые соединения были получены с использованием реакций конденсации, ацилирования, замещения, алкилирования и циклоприсоединения. Выделение и очистка полученных соединений проводилось методами экстракции, фильтрования, перекристаллизации, колоночной хроматографии и флэш-хроматографии. Структура, состав и чистота полученных

соединений определялись методами тонкослойной хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения, ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, ВЭЖХ-МС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны, в которых два одинаковых спироиндолиноновых фрагмента соединены полиметиленовыми линкерами, можно получить реакциями 1,3-диполярного циклоприсоединения из соответствующих бис-5-арилиден-2-тиогидантоинов и азометинида, генерируемого *in situ* из саркозина и изатина.
2. Бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны, в которых два различных диспироиндолиноновых фрагмента соединены триазол-содержащим линкером, можно получить реакциями азид-алкинового циклоприсоединения пропаргил-содержащих диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и азид-содержащих диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов.
3. Диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны, содержащие фрагменты глутаримида, связанные с диспироиндолиноновым фрагментом амид-содержащим линкером, можно синтезировать 6-стадийной последовательностью реакций исходя из ω -аминокарбоновых кислот, изотиоцианатоэтилацетата, бензальдегидов и помалидомида с использованием реакции пептидного синтеза на заключительной стадии.
4. Диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны, содержащие фрагменты глутаримида, связанные с диспироиндолиноновым фрагментом триазол-содержащим линкером, можно синтезировать реакциями азид-алкинового циклоприсоединения пропаргил-содержащих диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и α -азидометилглутаримида.
5. Бис-диспироиндолинон-пирролидин-имидазолон и конъюгаты диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с глутаримидом могут проявлять повышенную по сравнению с их монофункциональными аналогами цитотоксическую активность, зависящую от длины и природы линкера между функциональными фрагментами.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде докладов на следующих конференциях: XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (2021), Первая всероссийская школа по медицинской химии для молодых ученых MEDCHEMSCHOOL2021 (2021), Всероссийская

научная школа-конференция «Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней» (2025), Всероссийском Конгрессе «KOST-2025» по химии гетероциклических соединений (2025).

Личный вклад автора в публикациях 1-4 состоял в поиске и анализе литературных данных, составлении плана исследований, постановке экспериментальных задач, проведения синтетических и аналитических экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке материалов к публикации, представлении полученных результатов на конференциях.

Структура и объём работы. Диссертационное исследование включает в себя введения, обзор литературы, обсуждение результатов, заключение, список сокращений и условных обозначений, список цитируемой литературы и приложение. Библиографический список включает 242 источника. Работа изложена на 232 страницах, включая 109 рисунков и 6 таблиц.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.х.н., проф. Белоглазкиной Е. К. за чуткое руководство, всестороннюю поддержку и неоценимую помощь в ходе выполнения настоящего исследования. Автор выражает признательность д.х.н. Гришину Ю.К. (МГУ имени М.В. Ломоносова) за проведение ЯМР экспериментов, к.х.н. Тафеенко В.А. (МГУ) за проведение рентгенографических исследований, д.м.н. Штилю А.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) и к.х.н. Скворцову Д.В. (МГУ) за проведение биологических исследований. Автор признателен всему коллективу лаборатории биологически активных органических соединений, особенно к.х.н. Филькиной М.Е. и асп. Дегтяреву А.Д. Автор также выражает признательность Поляковой А.С. и Поляковой В.В. за неоценимые помощь и поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты диссертационной работы представлены в трёх разделах¹. В первом разделе описан синтез симметричных молекул гомо-PROTAC структурных типов **I-IV** (Рисунок 1), в которых два фрагмента диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинона соединены между собой полиметиленовыми линкерами различной длины. Во втором разделе описаны конъюгаты диспироиндолинонов и производных глутаримида с различными типами линкеров между функциональными фрагментами. На третьем этапе синтетические подходы, разработанные для синтеза соединений типов **VI** и **VII**,

¹ Нумерация соединений в тексте автореферата совпадает с нумерацией соединений в тексте диссертации

использованы для синтеза несимметричных бис-диспироиндолиноновых конъюгатов **VIII** и **IX**.

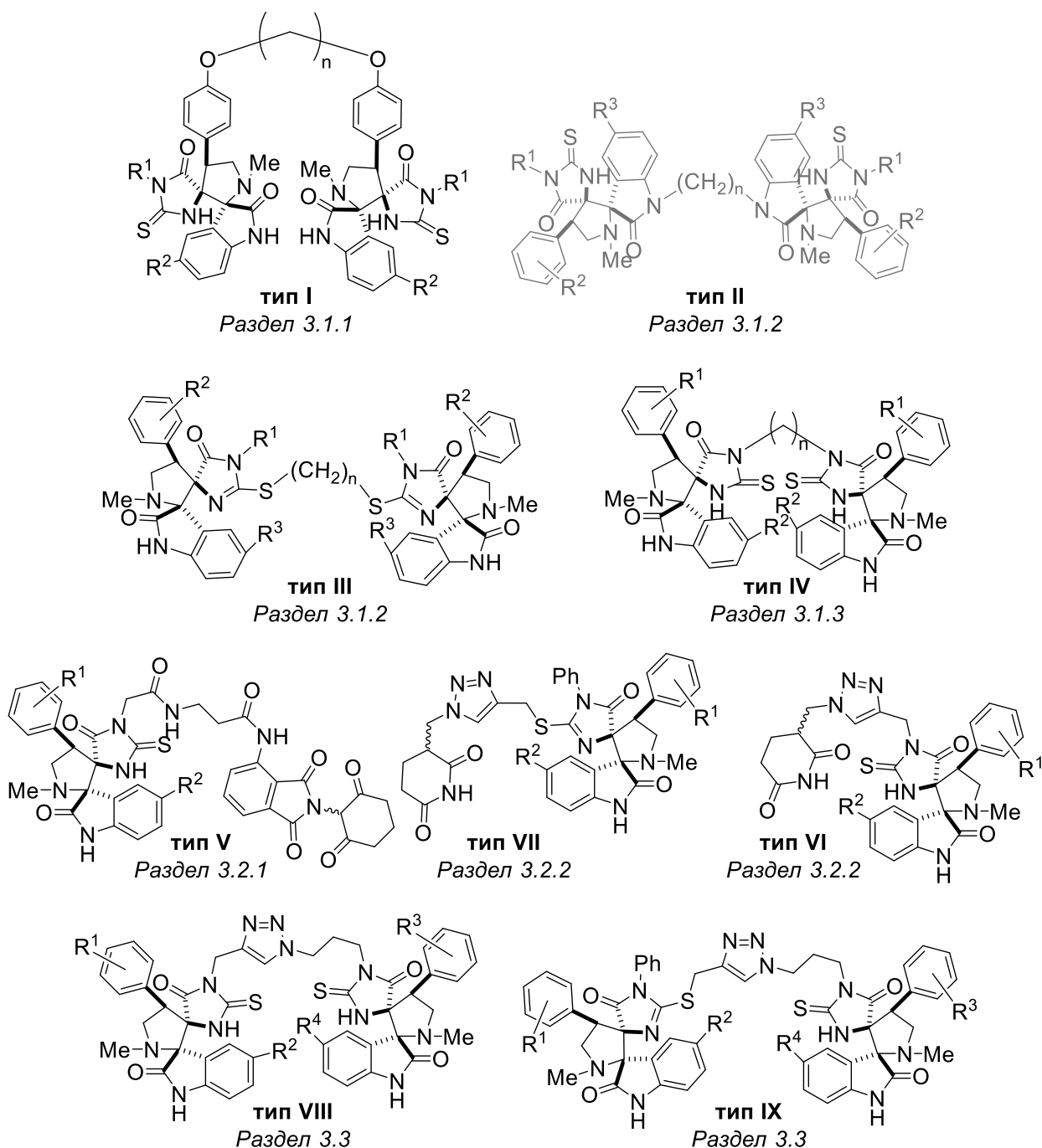


Рисунок 1. Структурные типы соединений, синтезируемых в настоящей работе. Серым цветом выделен структурный **тип II**, не полученный в индивидуальном виде.

1. Получение симметричных бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов

Два фрагмента диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинона потенциально могут быть соединены между собой полиметиленовыми линкерами четырьмя альтернативными способами (Рисунок 2).

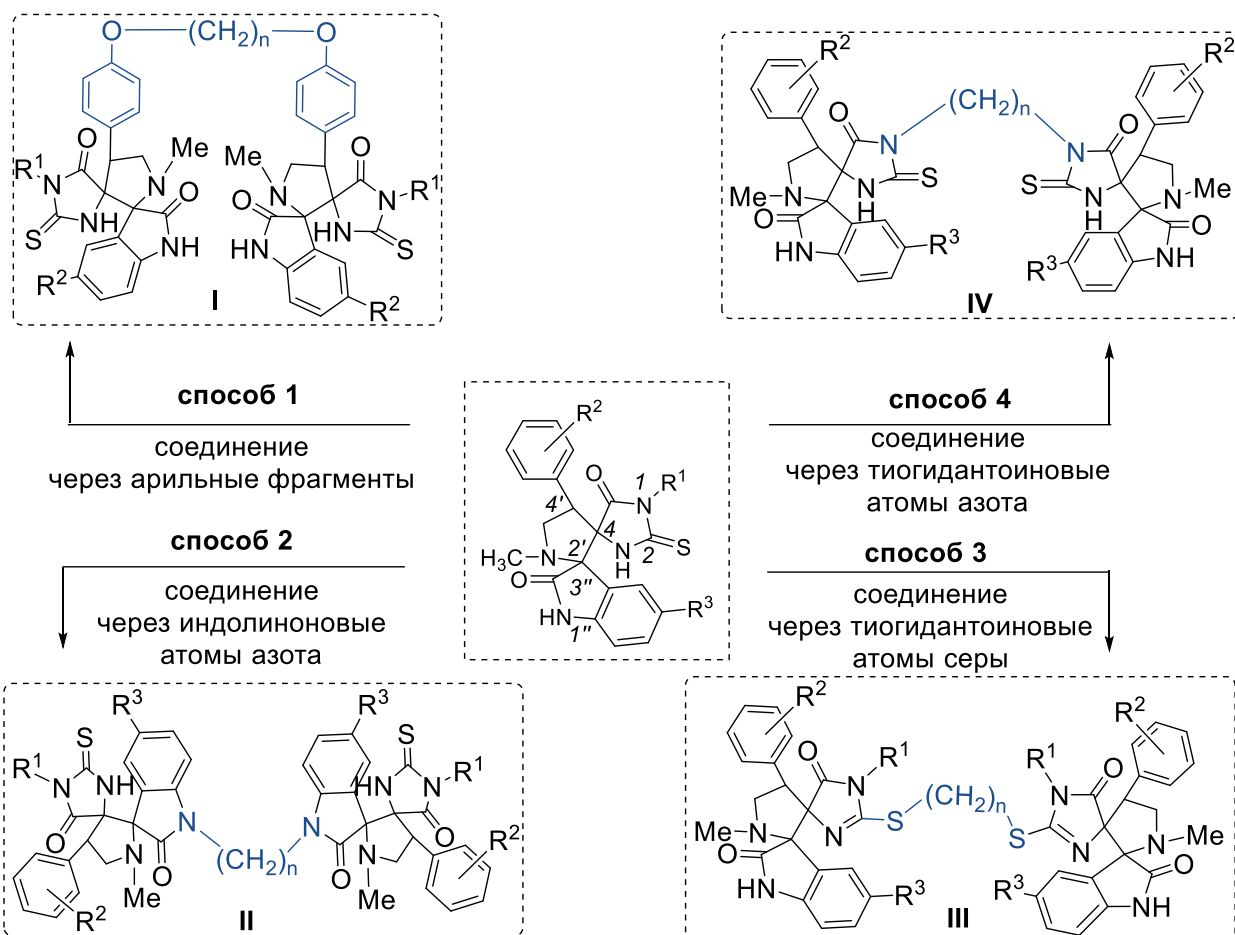


Рисунок 2. Возможные способы соединения двух диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиновых фрагментов полиметиленовыми линкерами

Соединение двух фрагментов диспироиндолинона полиметиленовыми линкерами через арильные заместители центрального пирролидинового фрагмента было осуществлено трёхстадийной последовательностью реакций, показанной на Рисунке 3.

Последней стадией синтеза является регио- и диастереоселективное (3+2)-циклоприсоединение азометинилида, генерируемого из изатина и саркозина, к обеим $C=C$ связям бис-5-арилиден-2-тиогидантоинов **5-10**. Присоединение по двум $C=C$ связям происходит диастереоселективно, но, вероятно, независимо друг от друга, что теоретически должно приводить к существованию диастереомеров получающихся соединений **11-16**: *мезо*-формы и рацемата. Однако образование таких продуктов не было обнаружено с помощью ЯМР-спектроскопии реакционных смесей, что, вероятно, обусловлено значительным расстоянием между спироциклическими системами в соединениях **11-16**.

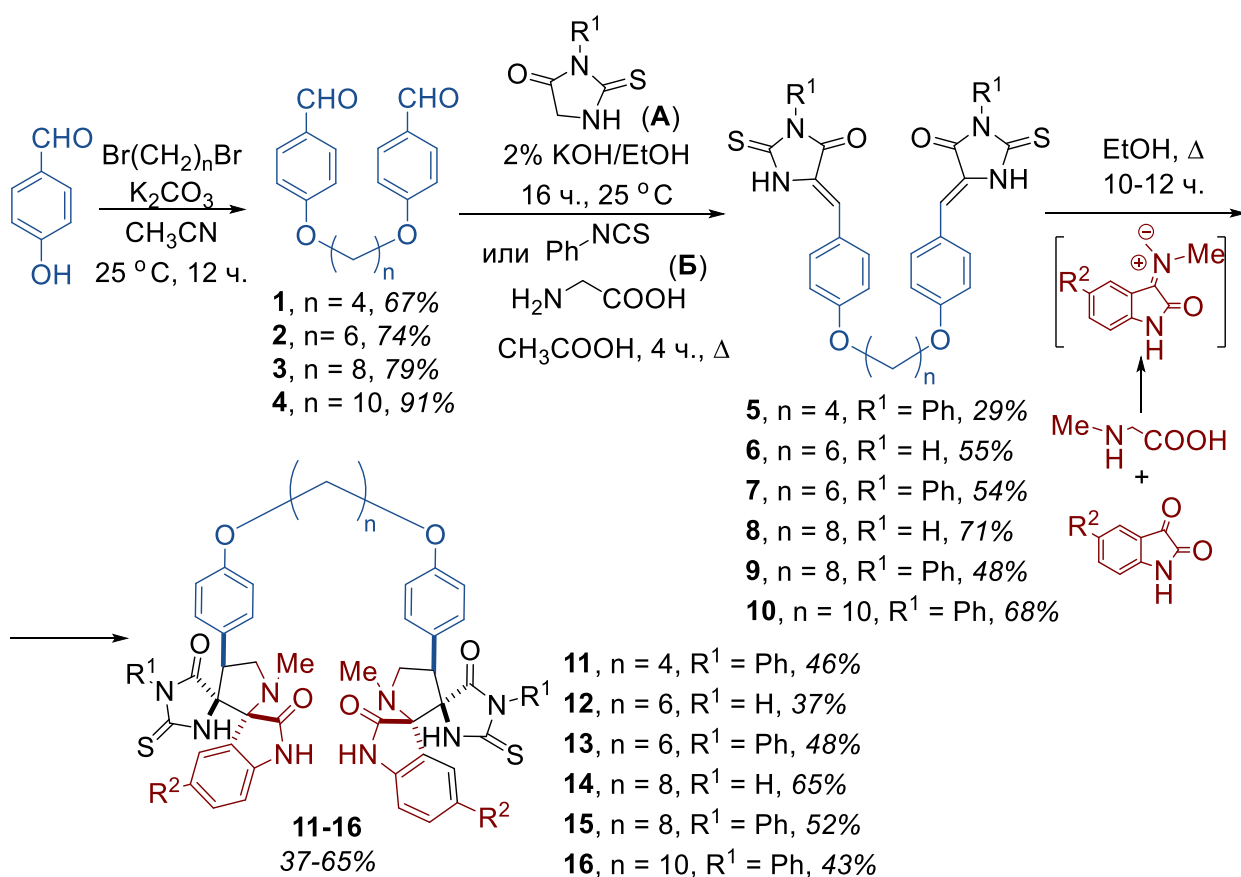


Рисунок 3. Общая схема получения бис-диспиро-тиоимидазolon-пирролидин-индолинонов **типа I**

Пытаясь получить бис-диспироиндолиноны **типа II** (Рисунок 4), мы синтезировали бис-изатин **17** по описанной методике и ввели его в реакцию с 3-фенил-5-(4-хлорбензилиден)-2-тиогидантоином и саркозином, однако конверсии исходных соединений не происходило даже спустя 24 часа кипячения реакционной смеси.

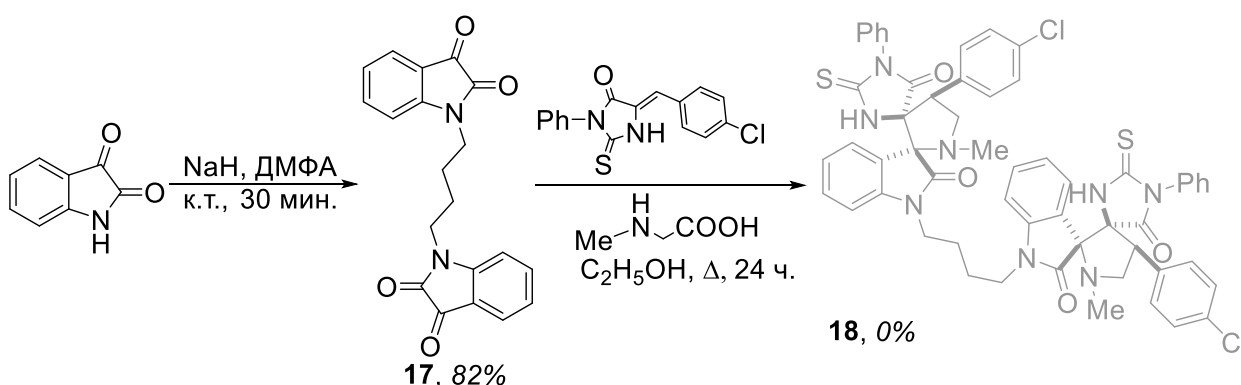


Рисунок 4. Получение бис-изатина **17** и попытка синтеза бис-диспироиндолинона

Мы также исследовали возможность получения целевого бис-диспироиндолинона **18** алкилированием диспиро-тиоимидазolon-пирролидин-индолинона (Рисунок 5). Однако основным продуктом реакции диспироиндолинона **19** с 1,4-дибромбутаном в присутствии

КОН в этаноле оказался бис-диспироиндолинон **18'** структурного **типа III**, а выделить бис-диспироиндолинон структурного **типа II** в индивидуальном виде не удалось.

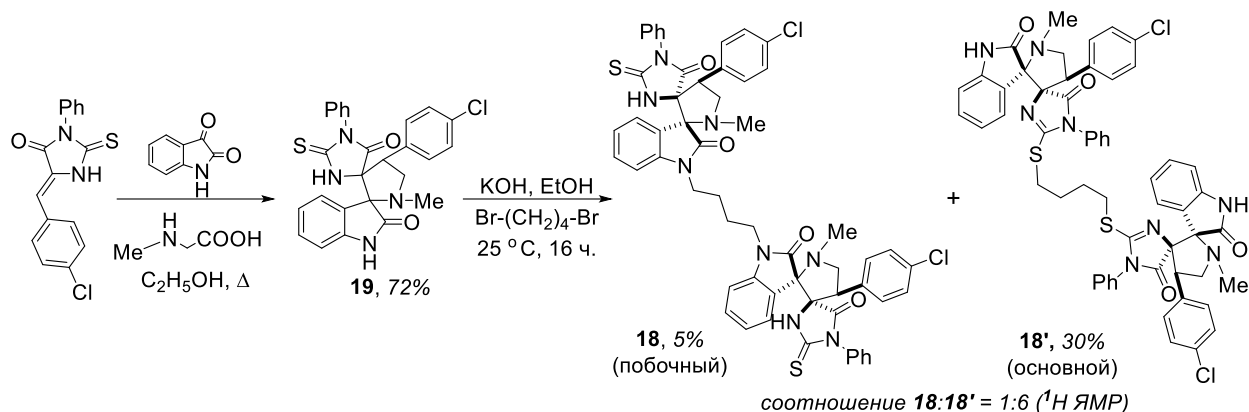


Рисунок 5. Альтернативная попытка получения бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинона **18** с линкером между атомами азота изатинового фрагмента

Бис-диспироиндолиноны **III** без примеси соединений **II** могут быть получены четырёхстадийной последовательностью реакций, показанной на Рисунке 6.

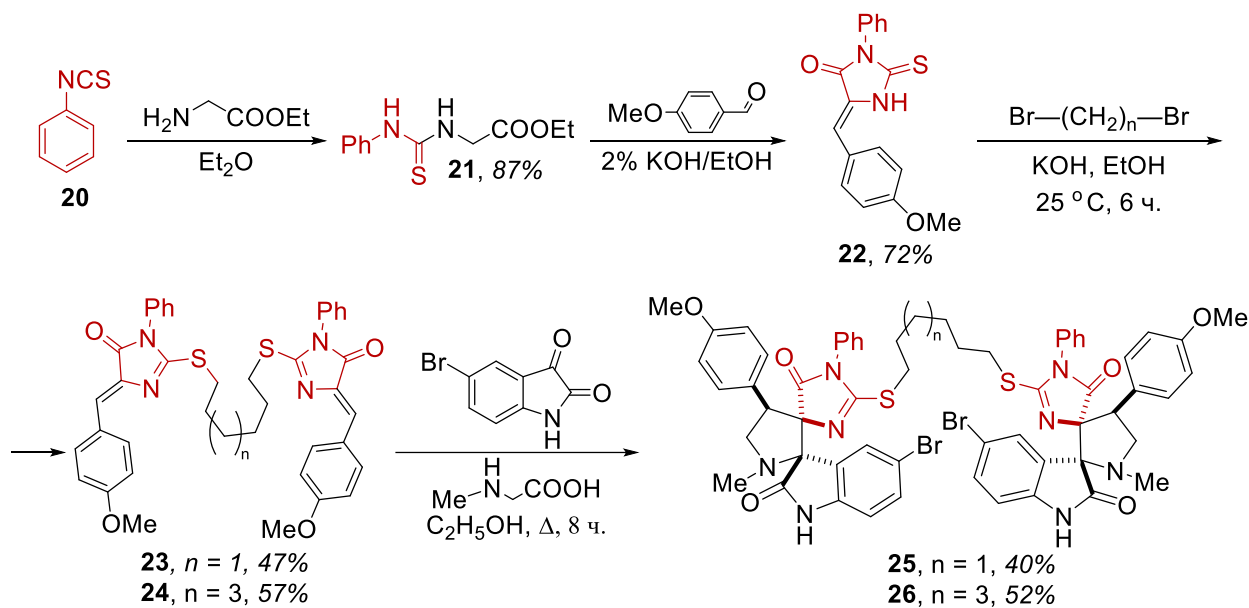


Рисунок 6. Получение бис-диспироиндолинонов структурного **типа III**

Бис-диспироиндолиноны структурного **типа IV** синтезировали в 3 стадии из доступных предшественников — α,ω -диаминоалканов, этилового эфира изотиоцианоксусной кислоты, бензальдегидов, изатинов и саркозина (Рисунок 7).

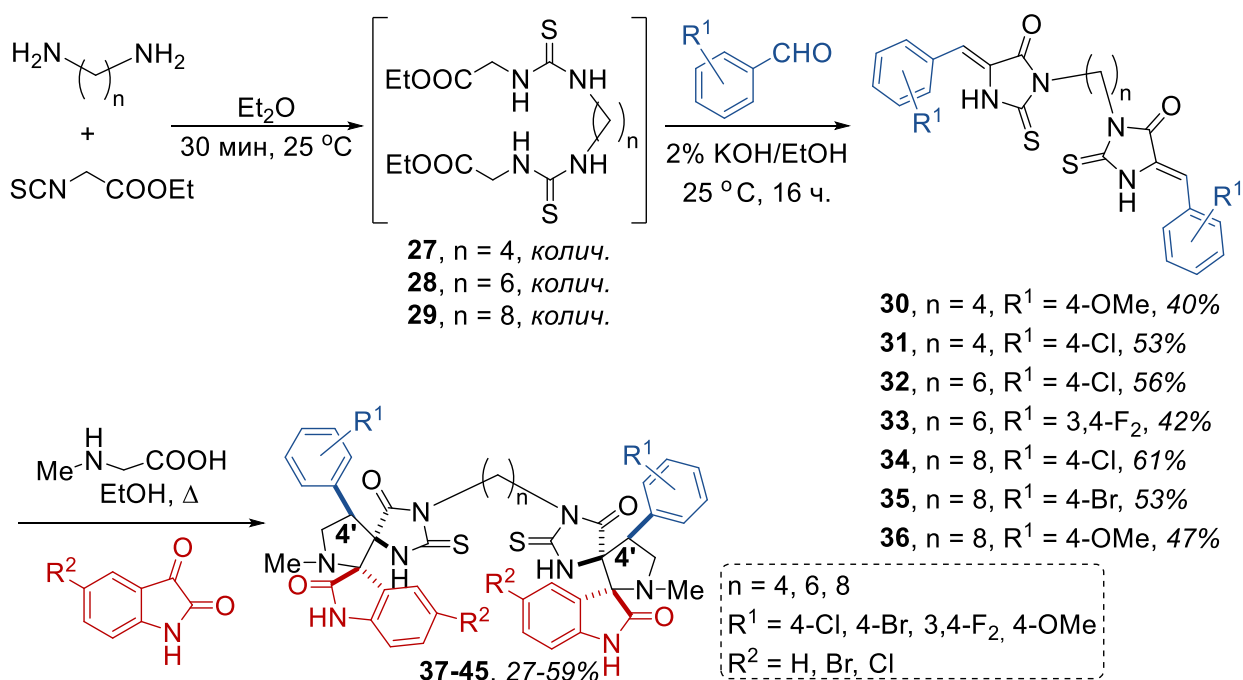


Рисунок 7. Общая схема получения бис-диспироиндолинов структурного типа IV

Соединения **37-45** (Рисунок 8) образуются в виде диастереомеров с относительной конфигурацией стереоцентров диспироиндолиновых фрагментов ($2R^*$, $4S^*$, $4'S^*$). Как и в случае соединений **11-16**, *мезо*-форма и рацемат не различаются в ЯМР-спектрах. Более высокие выходы соединений **39-45** по сравнению с соединениями **37-38** связаны, по всей видимости, с меньшими стерическими затруднениями, возникающими в ходе реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения. С увеличением длины полиметиленового линкера между атомами азота два фрагмента диполярофила находятся на максимальном удалении друг от друга, что позволяет им эффективнее вступать в реакцию с азометинилидом, образующимся из саркозина и изатина. В процессе получения соединений **37-45** образования других возможных диастереомеров по данным спектров ^1H ЯМР реакционных смесей зафиксировано не было.

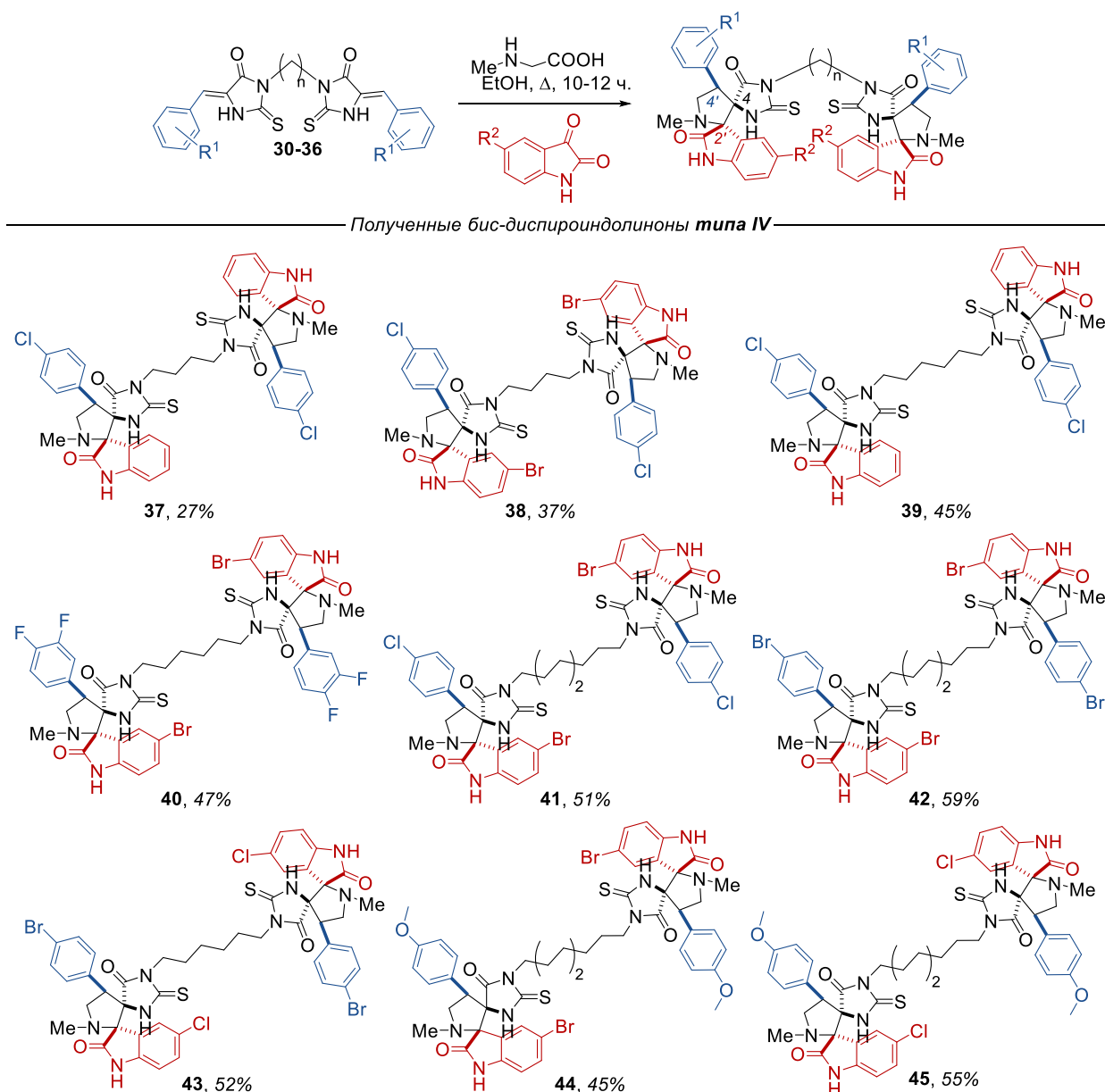


Рисунок 7. Получение бис-диспиринодолинов **37-45** типа **IV** реакцией (3+2)-циклоприсоединения

Некоторые из синтезированных бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинов структурных **типов III** и **IV** были исследованы на цитотоксичность в МТТ-тесте. Исследования проводились на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы MCF7, карциномы лёгкого A549, и на здоровых клетках лёгкого эмбрионов человека VA13 и эмбриональных почек человека HEK293T². Для сравнения биологической активности моно- и бис-диспиринодолинов мы также синтезировали тиюимидазолон-пирролидин-индолины **51-56**, содержащие те же заместители в ароматических фрагментах, что и

² Биологические исследования проведены к.х.н, с.н.с. Д.А. Скворцовым (химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова).

полученные соединения структурных типов **I-IV** (Рисунок 9). Результаты проведённого биологического тестирования представлены в Таблице 1.

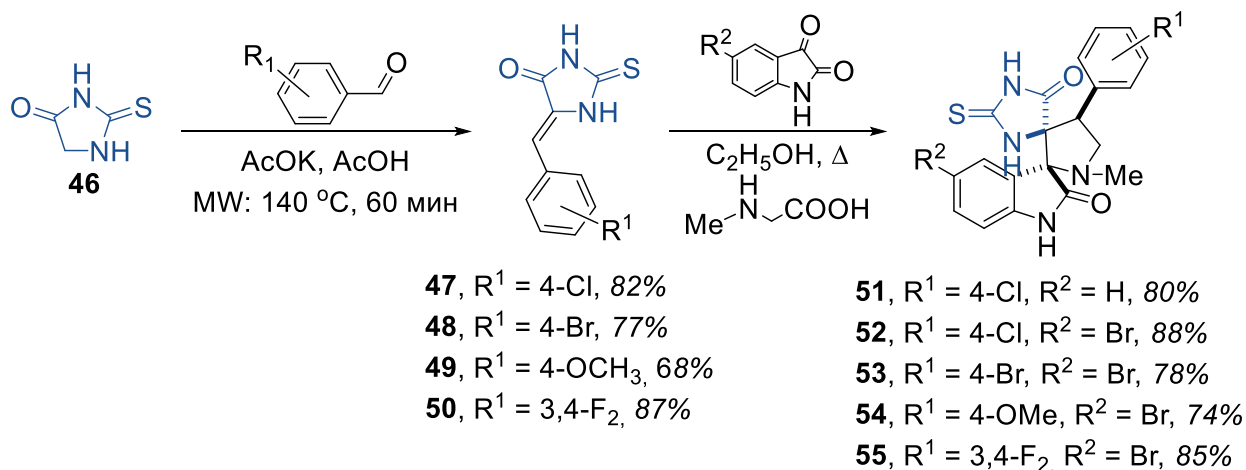


Рисунок 8. Получение моно-диспиринодолинонов **51-55**

Таблица 1. Цитотоксичность *in vitro* некоторых бис-диспиринодолинон-пирролидин-имидазолонов в экспериментах на клеточных линиях HEK293T, MCF7, VA13 и A549 (MTT тест)

Соединение	Структурный тип	Линкер	IC ₅₀ , μM			
			HEK293T	MCF7	VA13	A549
25	III	-(CH ₂) ₄ -	32.9 ± 5.6	> 100	> 100	> 100
37	IV	-(CH ₂) ₄ -	16.0 ± 5.9	> 100	> 100	23.9 ± 7.5
39	IV	-(CH ₂) ₆ -	18.8 ± 3.0	23.2 ± 5.3	6.4 ± 0.9	14.3 ± 2.3
40	IV	-(CH ₂) ₆ -	41.5 ± 8.5	> 100	44.8 ± 4.5	74.5 ± 7.9
41	IV	-(CH ₂) ₈ -	> 100	> 100	> 100	> 100
42	IV	-(CH ₂) ₈ -	> 100	> 100	> 100	> 100
43	IV	-(CH ₂) ₈ -	> 100	> 100	72.1 ± 16.8	> 100
51	моно-аналог 39	-	60.3 ± 6.9	> 100	50.7 ± 9.7	> 100
52	моно-аналог 41	-	70.2 ± 10.9	48.8 ± 6.6	69.9 ± 6.1	80.4 ± 7.3
53	моно-аналог 42	-	28.4 ± 3.8	18.2 ± 1.7	51.5 ± 5.5	32.5 ± 3.2
54	моно-аналог 37	-	30.3 ± 4.6	45.5 ± 4.6	57.8 ± 7.2	51.8 ± 5.8

Из данных, представленных в Таблице 1, видно, что большая часть исследованных бис-диспиринодолинонов проявляет более низкую цитотоксичность, чем соответствующие им моно-производные. Исключением является соединение **39** с линкером (CH₂)₆, обладающее заметно большей цитотоксичностью на всех исследованных клеточных линиях (для клеток **A549** почти на порядок) по сравнению со своим моно-аналогом **51**. Этот факт подтверждает определяющее влияние длины линкера между функциональными фрагментами в молекулах PROTAC на эффективность их биологического действия.

2. Получение конъюгатов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с производными глутаримида

На первом этапе разработки молекул гетеро-PROTAC мы изучили возможность синтеза конъюгатов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с помалидомидом структурного типа V (Рисунок 10).

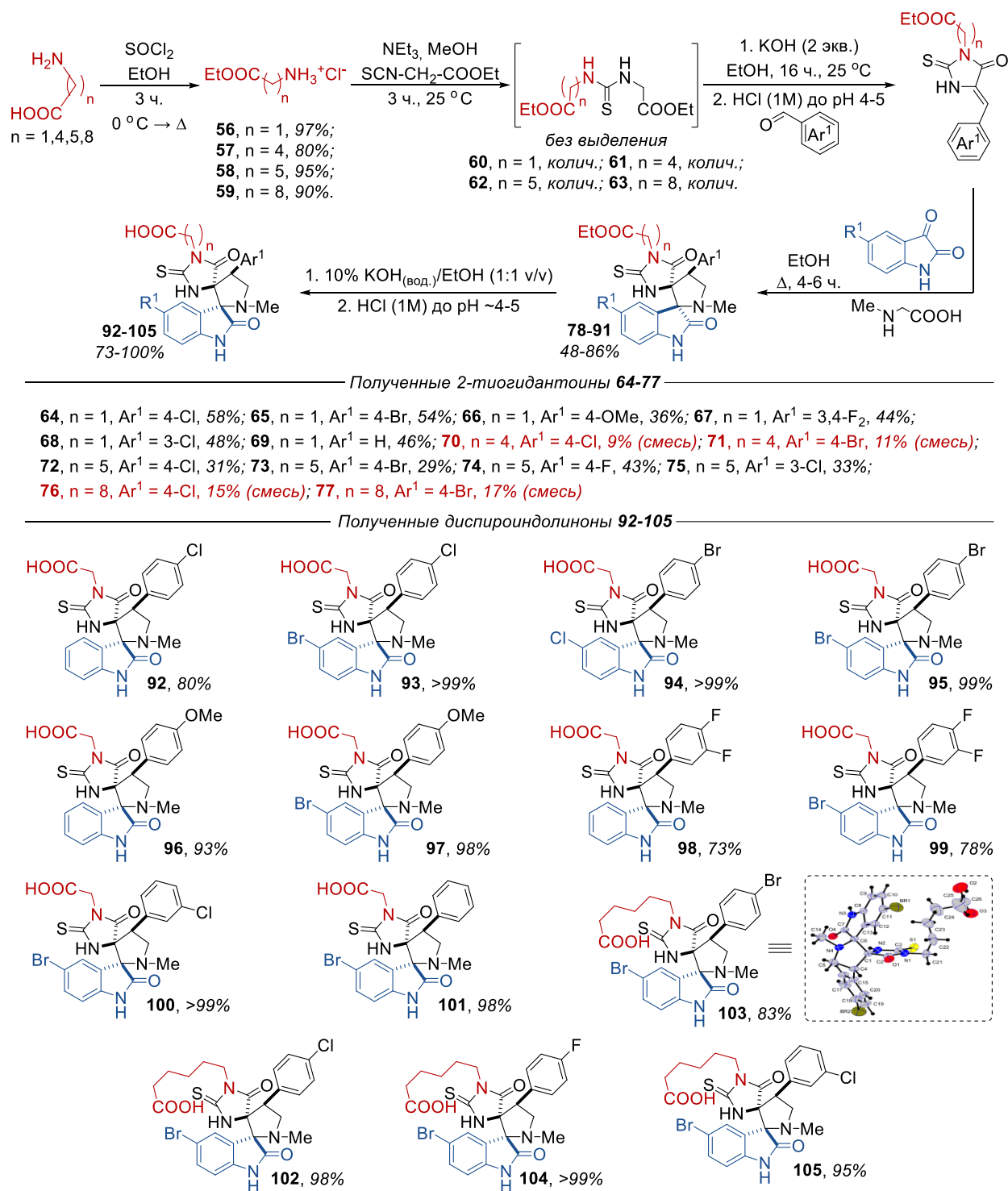


Рисунок 9. Получение диспироиндолинонов с карбоксильной группой 92-105. Красным цветом среди соединений 64-77 выделены 2-тиогидантоины, которые не удалось выделить в индивидуальном виде

Для этого, исходя из ω -аминокарбоновых кислот с различной длиной полиметиленового фрагмента, кипячением с SOCl_2 в этаноле были получены гидрохлориды соответствующих этиловых эфиров **56-59**, которые затем депротонировали триэтиламинном и присоединяли к изотиоцианатоэтилацетату с получением тиомочевин **60-63**, циклизующихся в 5-арилметилен-2-тиогидантоины при обработке KOH в этаноле.

Из полученных тиогидантоинов **64-69** и **72-75**, изатинов и саркозина по стандартной методике с хорошими выходами была получена серия сложных эфиров **78-91** (Рисунок 10), которые подвергали гидролизу с получением соответствующих кислот. Структура диспироиндолинона **103** дополнительно была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа³, который подтвердил относительную конфигурацию атомов центрального пирролидинового цикла ($2'R^*$, $3'S^*$, $4'S^*$).

Далее были проведены попытки синтеза конъюгата кислоты **92** с помалидомидом, используя NATU в качестве активатора карбоксильной группы, однако целевой продукт **V** таким образом получить не удалось, вероятно, в связи с низкой нуклеофильностью ароматической амино-группы помалидомида. Поэтому далее на основе помалидомида был синтезирован первичный амин **108** (Рисунок 11), использование которого для конъюгации с бис-диспироиндолинонами имеет два преимущества: 1) атом азота алифатической амино-группы в **108** более нуклеофилен по сравнению с анилиновым атомом азота исходного помалидомида; 2) удлинение линкера между фрагментом помалидомида и диспироиндолиноновым фрагментом в целевом конъюгате может положительно сказаться на биологической активности.

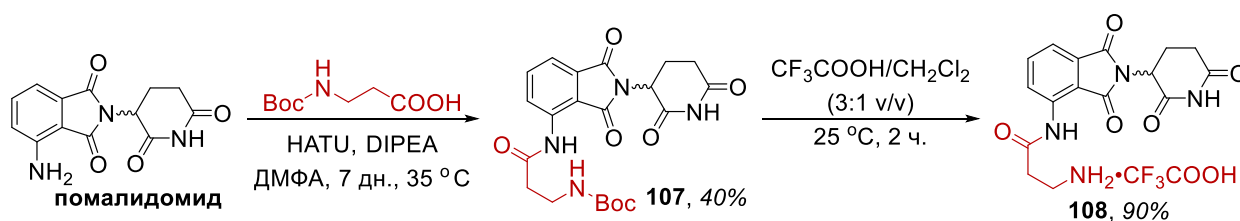


Рисунок 10. Получение амина **110** из помалидомида и N-Вос- β -аланина

Конъюгаты диспироиндолинонов и помалидомида структурного типа **V** (соединения **109-111**, Рисунок 12) были получены из кислот **93**, **97** и **98** и амина **108**.

Синтетические сложности при использовании помалидомида, связанные с низкой нуклеофильностью его ароматической амино-группы и необходимостью дополнительной модификации, стимулировали нас на поиск других лигандов ЕЗ-убиквитинлигазы CRBN , лишённых этого недостатка. В качестве такого соединения был выбран лиганд белка

³ Рентгенографическое исследование здесь и далее проведено к.х.н. Тафеенко В.А. (МГУ имени М.В. Ломоносова)

цереблону α -азидометилглутаримид, удобный для использования в реакциях азид-алкинового циклоприсоединения с пропаргилзамещенными диспиропроизводными.

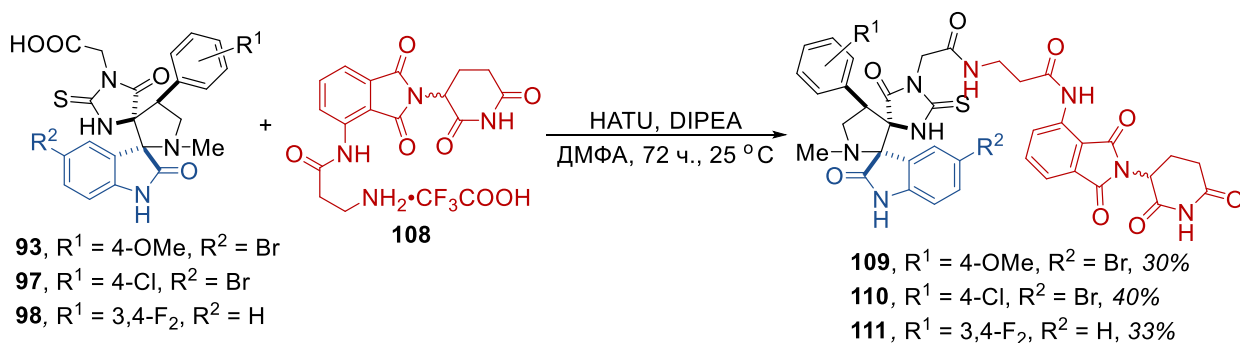


Рисунок 11. Получение конъюгатов диспироиндолинонов и помалидомида структурного типа V на основе диспироиндолинонов **93,97** и **98** и β -аланил-помалидомида **108**

Для получения конъюгатов структурного типа VI, исходя из пропаргиламина, была разработана синтетическая схема (Рисунок 13), включающая стадии образования тиомочевины, её конденсацию с замещёнными бензальдегидами и регио- и стереоселективное (3+2)-циклоприсоединение азометинида, генерируемого *in situ* из изатина и саркозина.

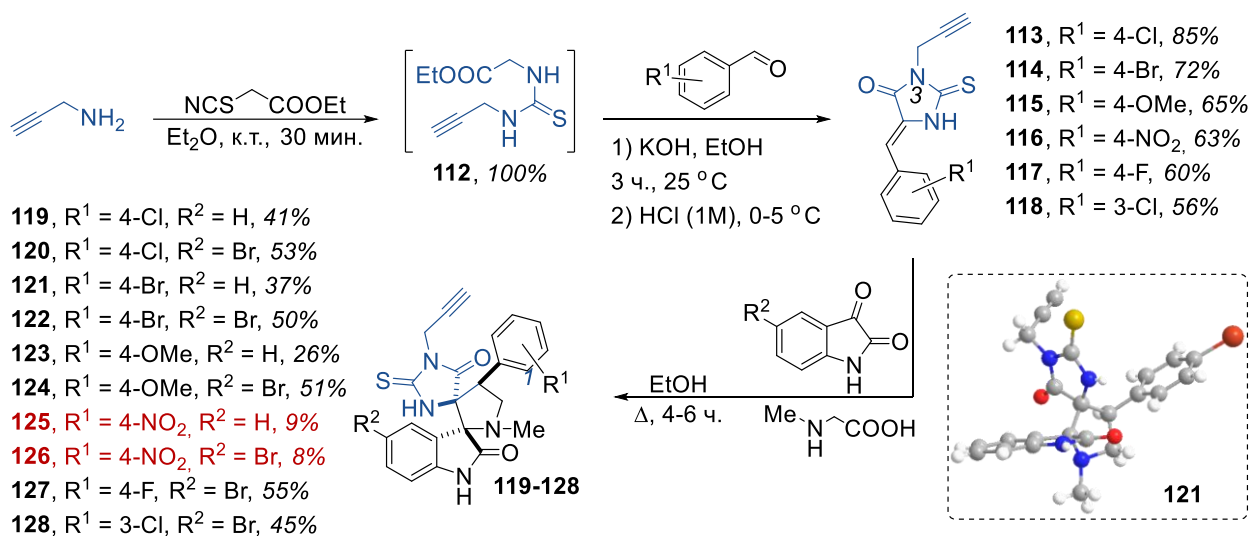


Рисунок 12. Получение N(1)-пропаргил-диспироиндолинонов **119-128**

Для получения конъюгатов структурного типа VII (Рисунок 14) были синтезированы N(3)-фенил-5-арилиден-2-тиогидантоины, которые затем алкилировали пропаргилбромидом. Полученные S-пропаргиллированные имидазолидины **135-140** вводили в реакцию (3+2)-циклоприсоединения с изатином и саркозином.

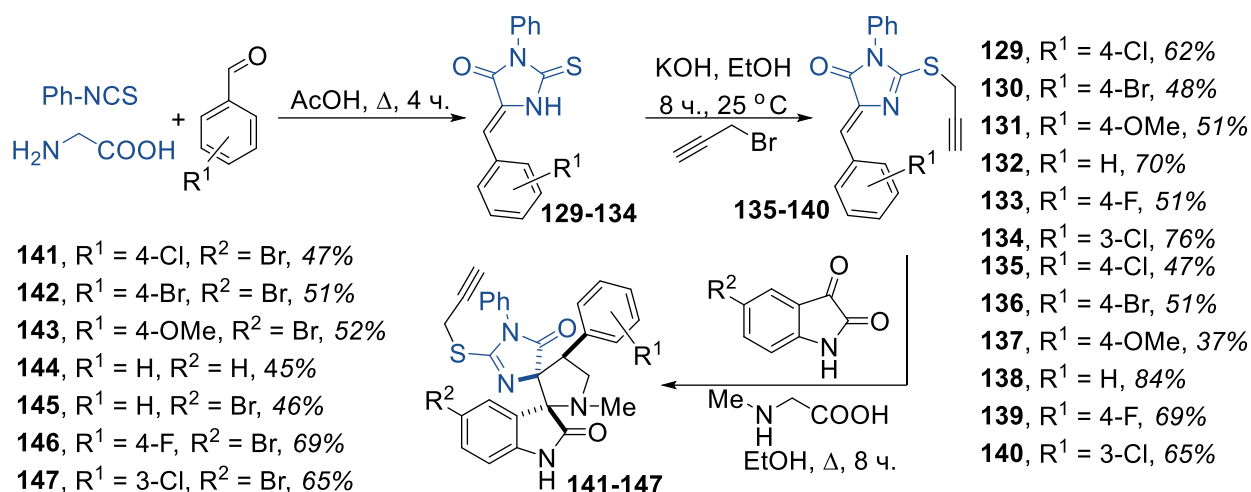


Рисунок 13. Получение S-пропаргил-диспироиндолинонов **141-147**

α -Азидометилглутаримид **153** — известный лиганд E3-убиквитинлигазы CRBN — был получен по схеме, показанной на Рисунке 15.

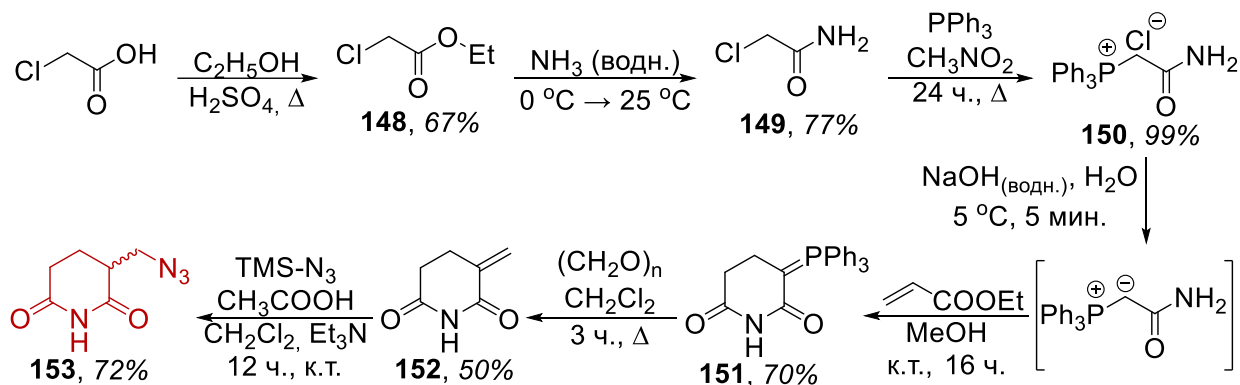


Рисунок 14. Получение производного glutаримида **153**

На финальной стадии синтеза диспириндолинон-глутаримидных конъюгатов были проведены реакции азид-алкинового циклоприсоединения пропаргил-модифицированных диспироиндолинонов к α -азидометилглутаримиду **153** в присутствии ТБТА (Рисунок 16).

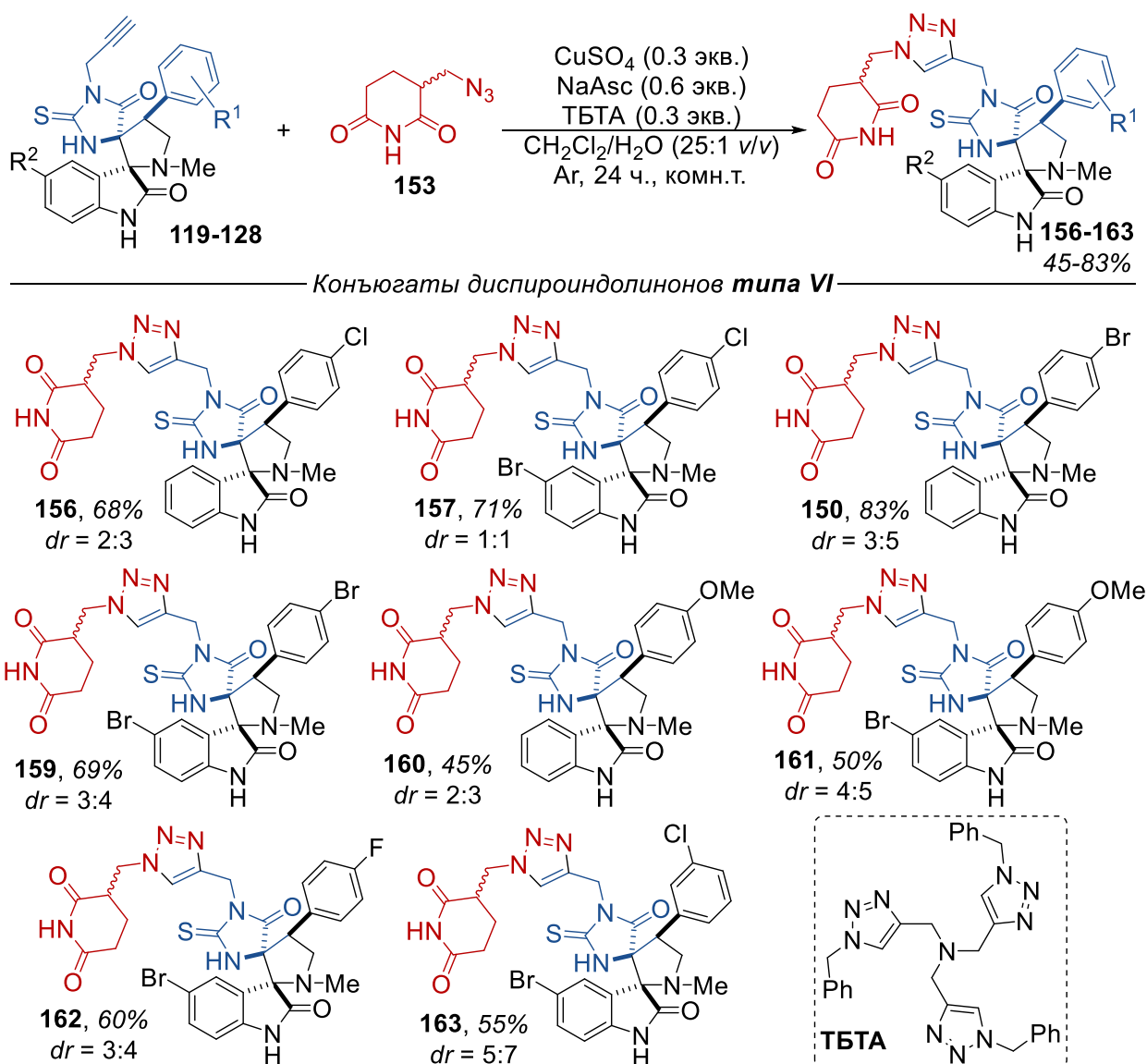
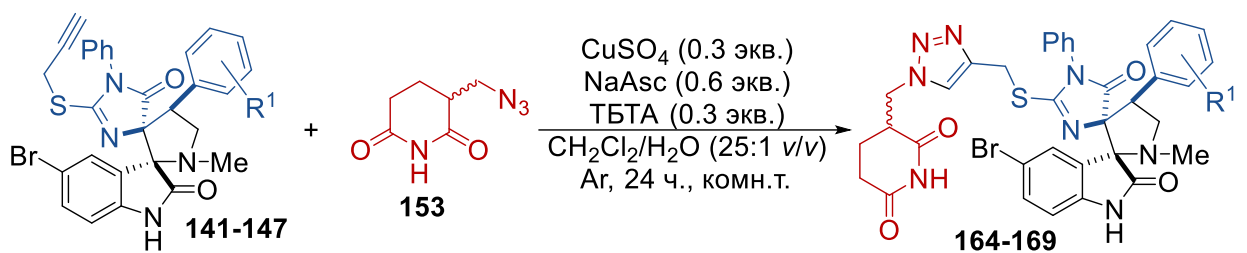


Рисунок 15. Получение конъюгатов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и glutаримида структурного **типа VI**

Было получено 8 конъюгатов диспироиндолинонов и glutаримида **типа VI** (соединения **156-163**, Рисунок 16) и 6 конъюгатов диспироиндолинонов и glutаримида **типа VII** (соединения **164-169**, Рисунок 17). Продукты **156-169** были выделены в виде смеси двух диастереомеров, т.к. исходные диспироиндолиноны **119-128**, **141-147** представляют собой смесь двух энантиомеров, а α -азидометилglutarимид **153** также имеет хиральный атом углерода в α -положении карбонильной группы. Строение всех полученных конъюгатов определяли с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения, также для некоторых соединений были зарегистрированы 2D ЯМР-спектры HMBC, HSQC и COSY, с помощью которых удалось провести полное соотнесение сигналов.



Конъюгаты диспироиндолинонов *типа VII*

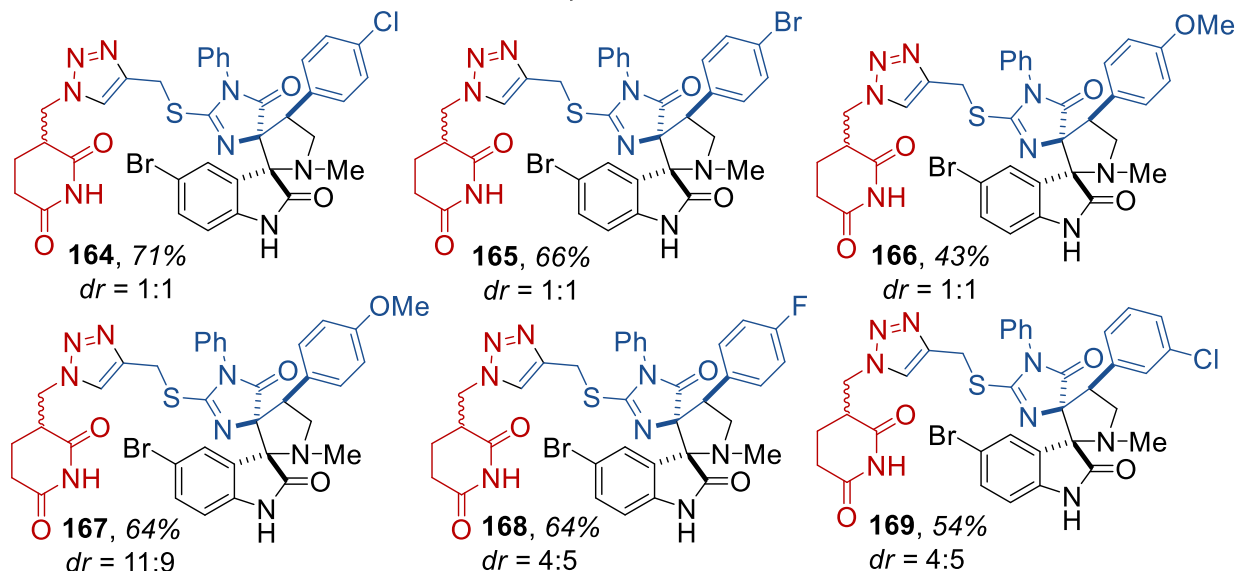


Рисунок 16. Получение конъюгатов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и глутаримида структурного **типа VII**

Соединения структурных типов **VI** и **VII** имеют в составе триазолсодержащий линкер общей длиной в 7 атомов (из атомов углерода и азота), что близко к длине линкера (6 углеродных атомов) в соединении **39**; проявившем наиболее высокую цитотоксичность в ходе биологических исследований бис-диспироиндолинонов (стр. 13).

Полученные диспироиндолиноны **типов VI** и **VII**, а также их аналоги — диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны **51-55** были исследованы на цитотоксическую активность по отношению к клеточными линиям аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 (p-53-экспрессирующая линия)⁴. Чтобы определить роль белка p53 в механизме цитотоксического действия, для трёх соединений (**164**, **165** и **51**) были проведены дополнительные испытания на сублинии HCT116p53^{-/-}, из которой были удалены обе аллели гена p53 (Таблица 2). Соединения **157** и **51** показали более высокие значения IC₅₀ на клеточной линии с нокаутом p53 (для конъюгата **157** IC₅₀ различались более чем в 2 раза) — это подтверждает, что их цитотоксическое действие связано с влиянием на p53-MDM2 взаимодействие.

⁴ Биологические исследования проведены д.м.н. Штилем А.А. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

Таблица 2. Цитотоксичность *in vitro* некоторых полученных конъюгатов типов **VI** и **VII** глутаримида в экспериментах на клеточной линии HCT116 (MTT тест)

Соединение	Структурный тип	IC ₅₀ , μ M	
		HCT116	HCT116KO _{p53}
156	VI	>50	—
157	VI	38	—
159	VI	38	—
164	VII	10.2 $\pm$ 2.3	11.1 $\pm$ 2.2
165	VII	15.5 $\pm$ 3.4	33 $\pm$ 3.2
167	VII	22.5 $\pm$ 3.3	—
51	N(1)-незамещённый аналог 151 и 157	13.0 $\pm$ 2.3	21.0 $\pm$ 3.1
53	N(1)-незамещённый аналог 148	44.3 $\pm$ 3.2	—

Также расширенная серия диспироиндолинон-глутаримидных конъюгатов структурных типов **VI** и **VII** (соединения **156-159**, **162**, **163**, **166**, **167**) была исследована на цитотоксическую активность методом FCCT теста на клеточных линиях аденокарциномы лёгкого человека A549, фибробластов лёгкого человека VA13, аденокарциномы молочной железы человека MCF7 и иммортализованной эпителиальной линии молочной железы человека MCF10A⁵. Большинство соединений продемонстрировало низкую цитотоксичность (IC₅₀ > 50 μ M), за исключением соединения **158** структурного типа **VII** (IC₅₀ = 14-28 μ M на разных клеточных линиях).

Таким образом, по результатам биологического тестирования было показано, что соединения **156-163** структурного типа **VI** с линкером при атоме азота тиюимидазолон проявляют близкую или даже более низкую цитотоксичность по сравнению со своими аналогами, не содержащими глутаримидного фрагмента. В то же время, соединения **165-167** структурного типа **VII** с триазольным линкером при атоме серы тиюимидазолонового цикла продемонстрировали более высокую селективность действия при одинаковой цитотоксичности по сравнению со своими моно-диспироиндолиноновыми аналогами.

3. Получение несимметричных бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов

Методики получения соединений типа **I-IV**, описанные в разделе 3.1, позволяют получать только симметричные бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны. В данном разделе нами были разработаны способы получения несимметричных молекул двух структурных типов **VIII** и **IX** (Рисунок 1) ряда бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения.

⁵ Биологические исследования методом FCCT теста здесь и далее проведены к.х.н, с.н.с. Д.А. Скворцовым (химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова).

Для получения азидосодержащих диспироиндолинонов **174-177** была реализована четырёхстадийная синтетическая последовательность, показанная на Рисунке 18.

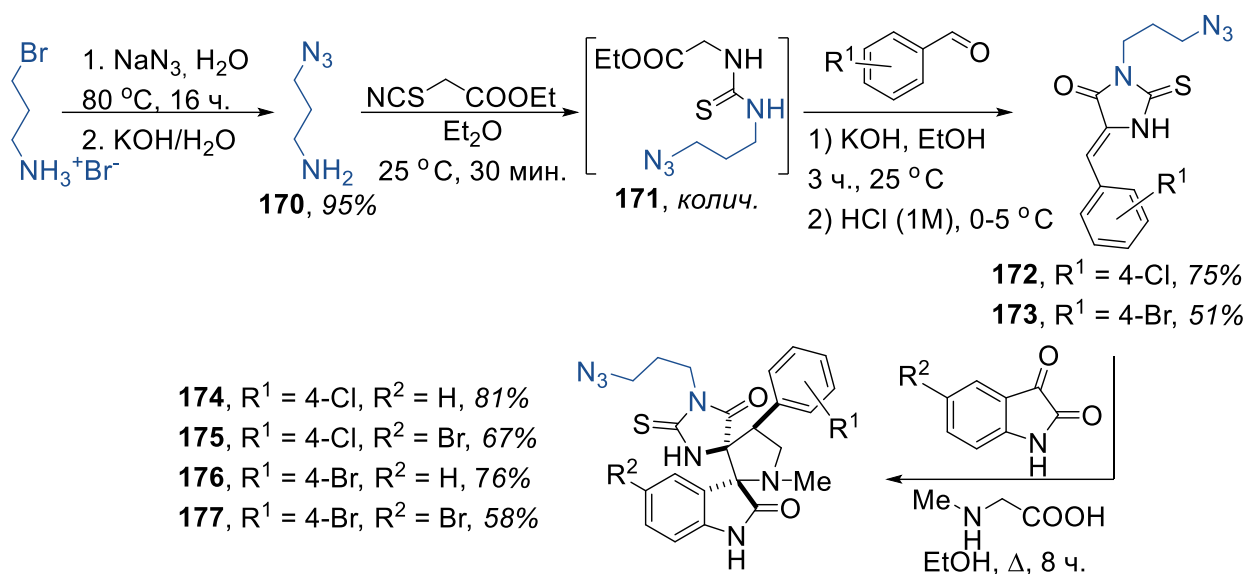


Рисунок 17. Получение диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов **174-177** с 3-азидопропильным заместителем при атоме азота N(1) имидазолидина

Получение диспироиндолинонов **170-179** осуществляли реакциями пропаргил-модифицированных диспироиндолинонов **119-128** или **141-147** с азид-содержащими производными **174-177** (Рисунок 19) с получением 8 соединений структурного типа **VIII** и 2 соединений структурного типа **IX** (Рисунок 20).

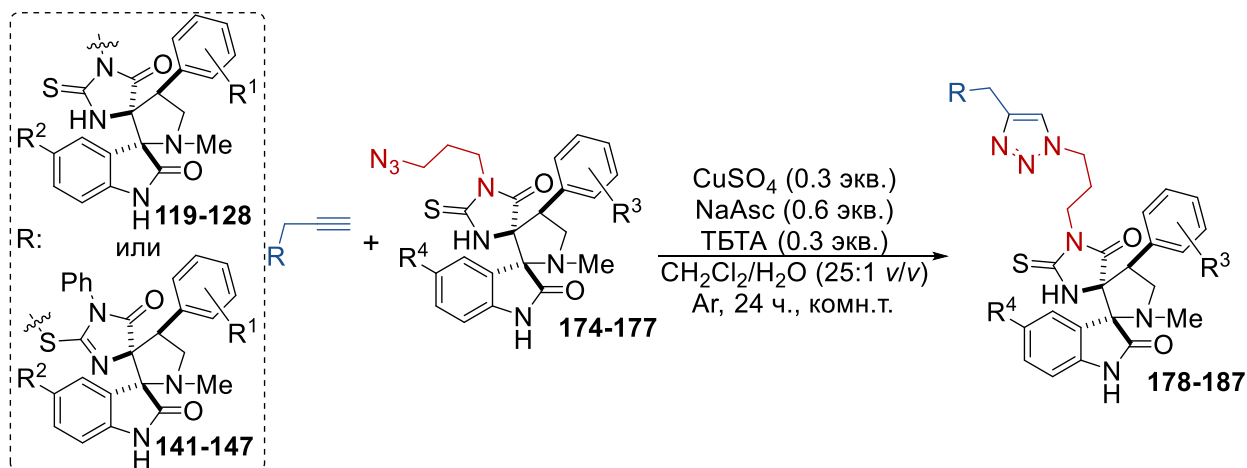


Рисунок 18. Получение несимметричных молекул гомо-PROTAC на основе диспиро-тиоимидазолин-пирролидин-индолинонов типов **VIII** и **IX**

Аналогично диспироиндолинон-глутаримидным конъюгатам структурных типов **VII** и **VIII**, бис-диспироиндолиноны **VIII** и **IX** получают в виде пар диастереомеров, соотношение которых определяли по характеристичному пику протона при N(3) имидазолидина, находящемуся в области 9.5 – 10.0 м.д.

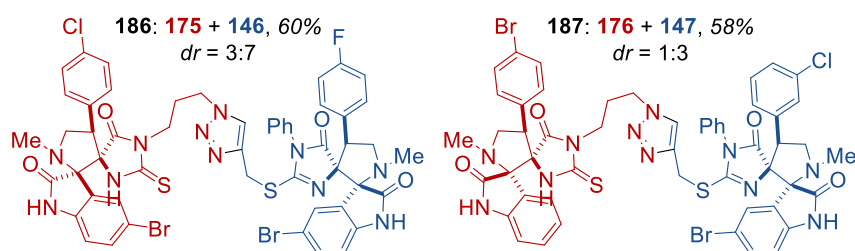
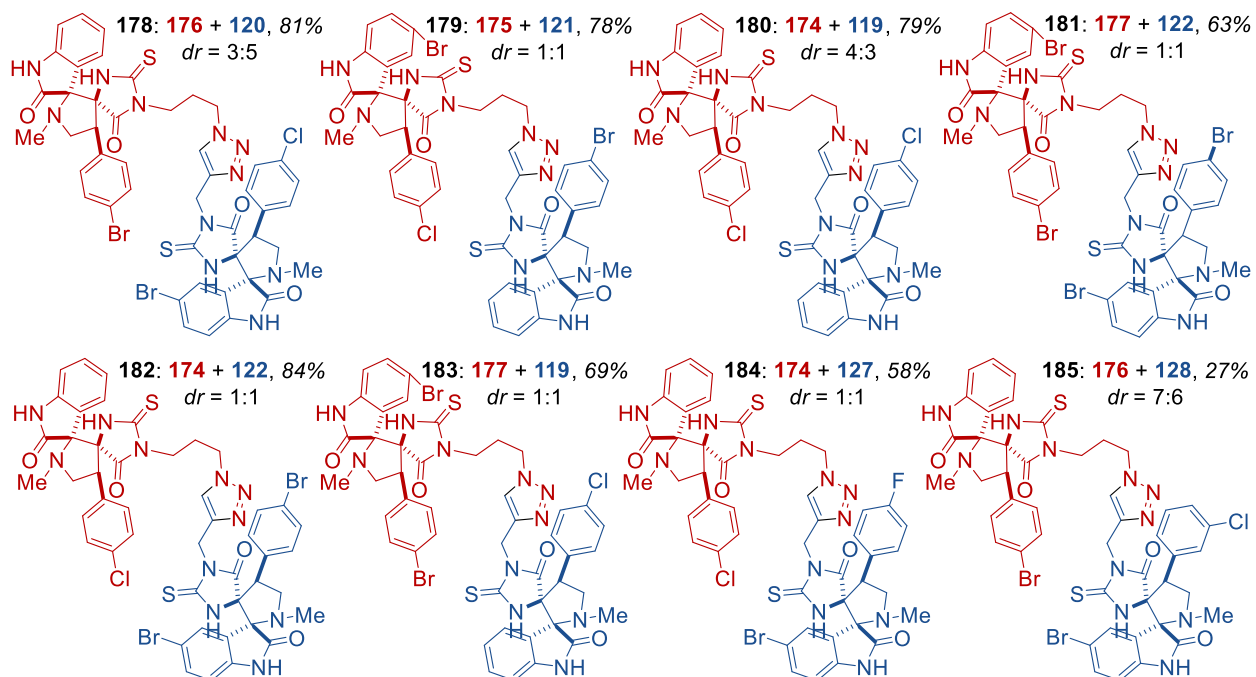


Рисунок 19. Полученные бис-диспироиндолиноны типов VIII и IX

Соединения **178-183** (структурный **тип VIII**) были исследованы на цитотоксическую активность методом FCCT теста на клеточных линиях аденокарциномы лёгкого человека A549, фибробластов лёгкого человека VA13, аденокарциномы молочной железы человека MCF7 и иммортализованной эпителиальной линии молочной железы человека MCF10A. Все исследованные соединения проявляли меньшую цитотоксическую активность ($CC_{50} > 50 \mu M$) по сравнению со своими моно-диспироиндолиновыми аналогами, аналогично молекулам с триазольным линкером структурного **типа VI**, также содержащим линкер при атоме N(1) имидазолидинового цикла.

Таким образом, была получена библиотека конъюгатов восьми различных структурных типов (**I, III-IX**) на основе диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов — потенциальных молекул выборочного протеолиза белка типов гомо- и гетеро-PROTAC: симметричные бис-диспироиндолиноны с полиметиленовыми линкерами, конъюгаты диспироиндолинонов и glutarimide с амидными и триазольными линкерами, а также несимметричные бис-диспироиндолиноны с триазол-содержащим линкером.

По результатам проведенных биологических исследований соединений структурных типов **III**, **IV**, **VI-VIII** методами FCCT- и МТТ-тестов наибольшую цитотоксичность и селективность действия продемонстрировали соединения **39** и **165** структурных типов **IV** и **VII**, соответственно, (Рисунок 21) с 6- или 7-атомным линкером при атоме N(1) имидазолидинового цикла (для бис-диспироиндолинонов) или при атоме серы этого цикла (для конъюгатов диспироиндолинонов с глутаримидом) между двумя лигандными фрагментами.

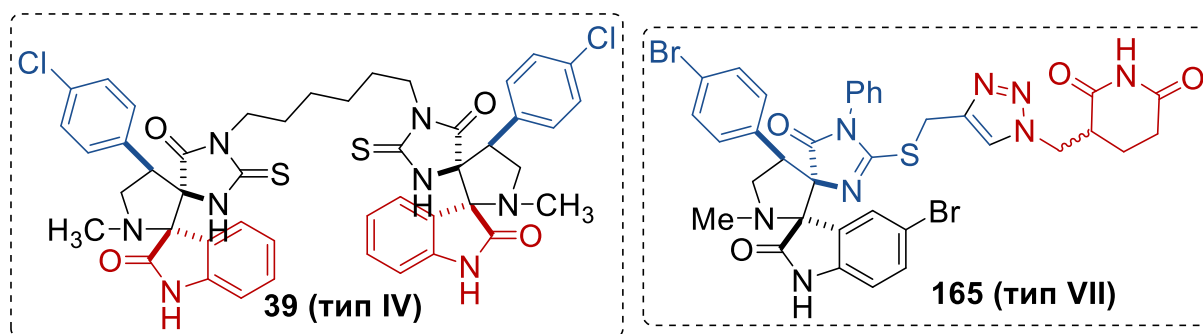


Рисунок 20. Структуры соединений-лидеров, полученных в данной работе и проявивших наибольшую цитотоксичность и селективность в исследованиях *in vitro*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Впервые разработана методика получения бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов, в которых два одинаковых спироиндолиноновых фрагмента соединены полиметиленовыми линкерами.
2. С использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения пропаргил-содержащих диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и азид-содержащих диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов впервые синтезированы бис-диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолиноны, в которых два различных диспироиндолиноновых фрагмента соединены триазол-содержащим линкером.
3. Разработана методика синтеза диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов, содержащих фрагменты помалидомида, связанные с диспироиндолиноновым фрагментом амид-содержащим линкером.
4. Предложен метод получения конъюгатов диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с глутаримидом с помощью реакции азид-алкинового циклоприсоединения пропаргил-содержащих диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов и α -азидометилглутаримида.
5. Выявлены бис-диспироиндолинон-пирролидин-имидазолон и конъюгаты диспиро-тиоимидазолон-пирролидин-индолинонов с глутаримидом с наиболее высокой и

селективной цитотоксической активностью, зависящей от длины и природы линкера между функциональными фрагментами.

Перспективы дальнейшего развития:

Разработанные в данной работе синтетические подходы могут быть применены при синтезе молекул сходных структурных типов, содержащих спиро-сочленённые системы. Полученные данные о влиянии длины, природы и положения линкера в конъюгатах, содержащих фрагменты индолинона и глутаримида, на цитотоксическую активность, могут быть использованы при разработке молекул PROTAC различных структурных типов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.3. Органическая химия (химические науки):

- 1) **В. С. Поляков**, Е. В. Первакова, Н. В. Зык, Е. К. Белоглазкина. Синтез бис(диспиро[индолинон-пирролидин-имидазолонов]) // *Известия Академии наук. Серия химическая*. — 2025. — Т. 74. — № 7. — С. 2092–2101. EDN: FUGALG. Импакт-фактор 0,831 (РИНЦ). [**Polyakov V.S.**, Pervakova E. V, Zyk N. V, Beloglazkina E.K. Synthesis of bis(dispiro[indolinone-pyrrolidine-imidazolones]) // *Russian Chemical Bulletin*. — 2025. — vol. 74., № 7. — pp. 2092-2101. EDN: HJJOGL]. Объём 1,0 п.л.
- 2) **V.S. Polyakov**, E.V. Pervakova, Yu.K. Grishin, E.K. Beloglazkina. Bis-dispiro-indolinone-pyrrolidine-imidazolones with polymethylene linkers between imidazolone fragments // *Tetrahedron Letters*. — 2025. — vol. 162. — P. 155589. EDN: OPIVBG. Импакт-фактор 1,5 (JIF). Объём 0,5 п.л
- 3) **V. S. Polyakov**, A. A. Barashkin, Y. K. Grishin, E. A. Tarasenko, E. K. Beloglazkina. Synthesis of Chiral Dispiro-Indolinone-Pyrrolidine-Imidazolones Using (R) or (S)-1-(2,4-Dimethoxyphenyl)Ethyl Amine // *ChemistrySelect*. — 2025. — vol. 10, № 21. — P. e01276. EDN: MLRDWB. DOI: 10.1002/slct.202501276. Импакт-фактор 2,0 (JIF). Объём 0,7 п.л.
- 4) **Polyakov V.S.**, Grishin Yu.K., Tafeenko V.A., Ivanova E.S., Pogodaeva S.S., Moldavskii D.V., Shtil A.A., Beloglazkina E.K. Dispiroindolinone-Glutarimide Conjugates: Synthesis and Evaluation as Potential Hetero-PROTACs for p53 Reactivation // *Molecules*. — 2026. — vol. 31, № 10. — P. 1602. DOI: 10.3390/molecules31101602. Импакт-фактор 4.6 (JIF). Объём 1,5 п.л.