

ФИО соискателя – Авдеев Дмитрий Викторович

Название диссертации: Новый подход к синтезу биологически активных пептидов с дисульфидными связями

Шифр специальности – 1.4.9. – Биоорганическая химия, химические науки

Шифр диссертационного совета – 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института <http://zioc.ru/>

14 декабря 2023 года

Дата приема к защите 27 декабря 2023 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК

<https://vak.minobrnauki.gov.ru>

28 декабря 2024 года

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КАРДИОЛОГИИ ИМ. АКАДЕМИКА Е.И. ЧАЗОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



АВДЕЕВ ДМИТРИЙ ВИКТОРОВИЧ

**НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ПЕПТИДОВ С ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ**

1.4.9 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва — 2024

Работа выполнена в лаборатории синтеза пептидов федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Сидорова Мария Владимировна**
кандидат химических наук, руководитель
лаборатории синтеза пептидов НИИЭК имени
академика В.Н. Смирнова ФГБУ «НМИЦ
кардиологии имени академика Е.И. Чазова»
МЗ РФ

Официальные оппоненты: **Левашов Павел Андреевич**
доктор химических наук, ведущий научный
сотрудник кафедры химической энзимологии
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова

Рубина Алла Юрьевна
кандидат химических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории биологических
микрочипов, руководитель группы белковых
биочипов ФГБУН «Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгарда» Российской
академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального
медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «13 марта» 2024 г. в 11⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.092.01 в федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН) по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН и на официальном сайте ИОХ РАН: <http://zioc.ru/>. Автореферат размещён на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: <https://vak.minobrnauki.gov.ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета 24.1.092.01,
доктор химических наук



Г.А. Газиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Пептидная терапия играет заметную роль в медицинской практике с момента появления инсулинотерапии. В настоящее время более 60 пептидных препаратов зарегистрированы Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration – FDA) в США и на других крупных фармацевтических рынках. Будучи эндогенными лигандами для ряда молекулярных мишеней, пептиды являются естественной отправной точкой для создания лекарств и продолжают устойчивыми темпами входить в клиническую практику. Фармацевтический рынок пептидных препаратов довольно многообразен, за последние 20 лет он увеличился вдвое и ежегодно пополняется новыми молекулами.

Отдельную группу среди биологически активных пептидов и пептидных лекарств представляют соединения, содержащие в своей структуре дисульфидный мостик. Это гормоны и рилизинг-факторы (окситоцин, вазопрессин, инсулин, кальцитонин, соматостатин и др.), натрийуретические пептиды и эндотелины сердечно-сосудистой системы и др. Пептиды этой группы принимают участие в регуляции обмена веществ, водно-солевого баланса, роста и дифференциации тканей и органов, гемодинамики и сердечной деятельности, секреции и моторики желудочно-кишечного тракта, функций центральной нервной системы и многих других физиологических процессов.

Хорошо известными примерами зарегистрированных препаратов с дисульфидными связями являются атозибан, терлипрессин и октреотид. Эти молекулы демонстрируют высокий терапевтический потенциал благодаря повышенной химической и ферментативной стабильности, рецепторной избирательности и улучшенным фармакокинетическим и фармакодинамическим свойствам. В последние годы наблюдается рост числа молекул с дисульфидной связью – потенциальных кандидатов для терапии новых и редких заболеваний.

В настоящее время подавляющее большинство пептидных терапевтических препаратов получают химическим синтезом. Химический синтез пептидов с внутримолекулярными дисульфидными связями до сих пор является достаточно сложной задачей. Это обусловлено тем, что на стадии замыкания внутримолекулярного дисульфидного мостика в пептиде, во избежание образования побочных димеров и олигомеров, приходится работать в условиях высокого разбавления. Рабочие

концентрации пептидов при циклизации, как правило, составляют 10^{-4} - 10^{-5} М (т.е. 0.1 – 1 мг/мл) и выходы целевых продуктов колеблются от 10 до 30 %.

Несмотря на высокий интерес к теме пептидной фармацевтики в течение последних 70 лет и увеличивающееся с каждым годом количество пептидных препаратов с дисульфидной связью, до сих пор не существует универсальной, высокотехнологичной методики для крупномасштабного получения таких пептидов с высокими выходами. Поэтому разработка высокоэффективного способа получения циклических пептидов такой структуры является актуальной задачей фармацевтической химии.

Цели и задачи

Целью работы является разработка нового высокоэффективного подхода к синтезу биологически активных пептидов с внутримолекулярными дисульфидными связями.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие **задачи**:

- Изучение и подбор оптимальных условий замыкания S-S связи в процессе твердофазного синтеза.
- Синтез окситоцина, вазопрессина, их аналогов и аналогов гормона соматостатина.
- Изучение влияния N-концевой аминокислотной группы на выход продукта циклизации при замыкании S-S мостика на твёрдой фазе иодом.
- Масштабирование технологического процесса получения циклических дисульфидов с целью их промышленного производства.

Научная новизна работы

В ходе настоящего исследования разработан универсальный, высокоэффективный полностью твердофазный подход к синтезу пептидов с одной внутримолекулярной дисульфидной связью, отличающийся простой обработкой, удобным методом выделения и очистки, применимый как в лабораторных, так и промышленных масштабах. Впервые экспериментально и с помощью молекулярного моделирования показано влияние свободной и Boc-защищённой N-концевой аминокислотной группы на выход продукта при I_2 -опосредованной прямой конверсии Trt-защищённого предшественника в циклический дисульфид.

Практическая значимость работы

Разработанная методология, сочетающая преимущества твёрдофазного синтеза с замыканием дисульфидной связи прямой конверсией защищённых тиолов в цикл, может быть применима для синтеза циклических дисульфидов, в том числе включая пептиды, содержащие чувствительные к окислению тирозин и триптофан.

Также метод пригоден для синтеза циклических пептидов, конъюгированных с соединениями не пептидной природы: хелаторами, хромофорами и т.п., – которые находят широкое применение в медико-биологических исследованиях. Разработанные методы могут быть использованы в органической, биоорганической, медицинской химии и фармацевтической промышленности.

Личный вклад автора заключается в проведении всего объёма синтетической работы, физико-химических исследований и интерпретации полученных результатов. Автором проанализирован массив данных, полученных в ходе экспериментальной и теоретической работы, сформулированы цель, задачи и выводы работы, а также подготовлены и написаны научные статьи.

Структура диссертации

Работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, включает 27 рисунков, 7 схем, 8 таблиц.

Апробация работы

Результаты, полученные в диссертационной работе, были представлены на следующих всероссийских и международных научных конференциях в виде устных докладов: Всероссийская конференция с международным участием: X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, 2021 год); Международная Конференция: «Mendeleev 2021», The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists. (Санкт-Петербург, 2021 год); «MedChem-Russia 2021» 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021». 2021 год (Онлайн 2022); «МОБИ-ХимФарма 2023», VIII Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийская научно-практическая конференция «Кардиология на марше 2023» (Москва, 2023 год).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных журналов ВАК

и в международных базах цитирования Web of Science и Scopus, и 4 тезиса докладов на российских и международных конференциях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость работы.

В литературном обзоре (**Глава 1**) впервые структурирована информация по пептидам исключительно с внутримолекулярной S-S связью. Упор сделан на молекулы, либо являющиеся лекарственными препаратами (Рисунок 1), либо проходящими доклинические или клинические исследования.

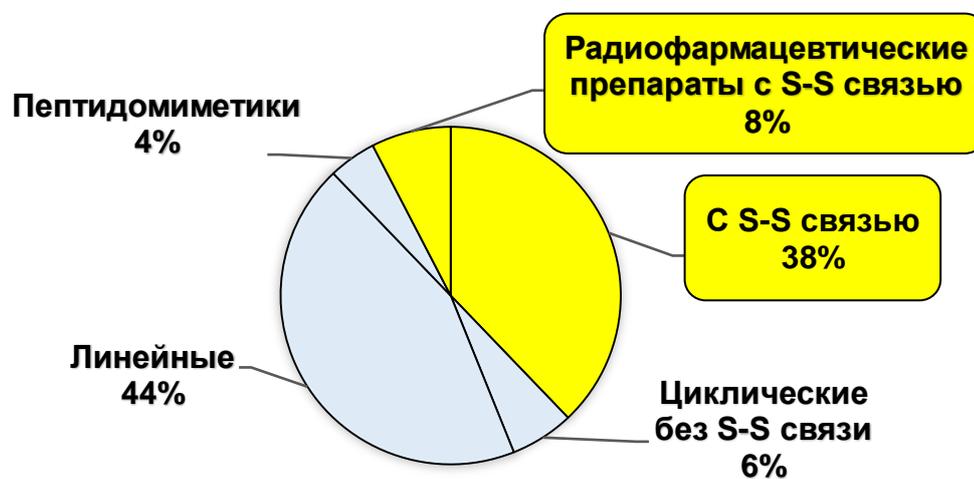


Рисунок 1. Структурные особенности пептидных препаратов, разрешённых к применению FDA.

В обзоре затронуты история открытия пептидных гормонов с дисульфидным мостиком, описаны регуляторные функции, которые в живых организмах выполняют эти гормоны и другие пептиды с S-S связью, проанализирована роль дисульфидных связей в стабилизации структуры и реализации биологической активности пептидов.

Отдельная глава посвящена новым перспективным молекулам с S-S мостиком, предназначенным для лечения широкого круга заболеваний.

Глава 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования нами были выбраны пептиды, применяющиеся для терапии и диагностики широко распространённых патологий, что диктует необходимость разработки их синтеза в препаративных количествах. Выбранные пептиды являются аналогами природных гормонов окситоцина, вазопрессина и соматостатина.

Так, атозибан (Рисунок 2) является единственным фармакологическим антагонистом окситоциновых рецепторов, который применяется для предотвращения преждевременных родов, а потребность в данном препарате в год составляет ~ 3 кг. Двумя другими объектами исследования являются аналоги Arg⁸-вазопрессина и Lys⁸-вазопрессина – десмопрессин и терлипрессин (Рисунок 2), соответственно.

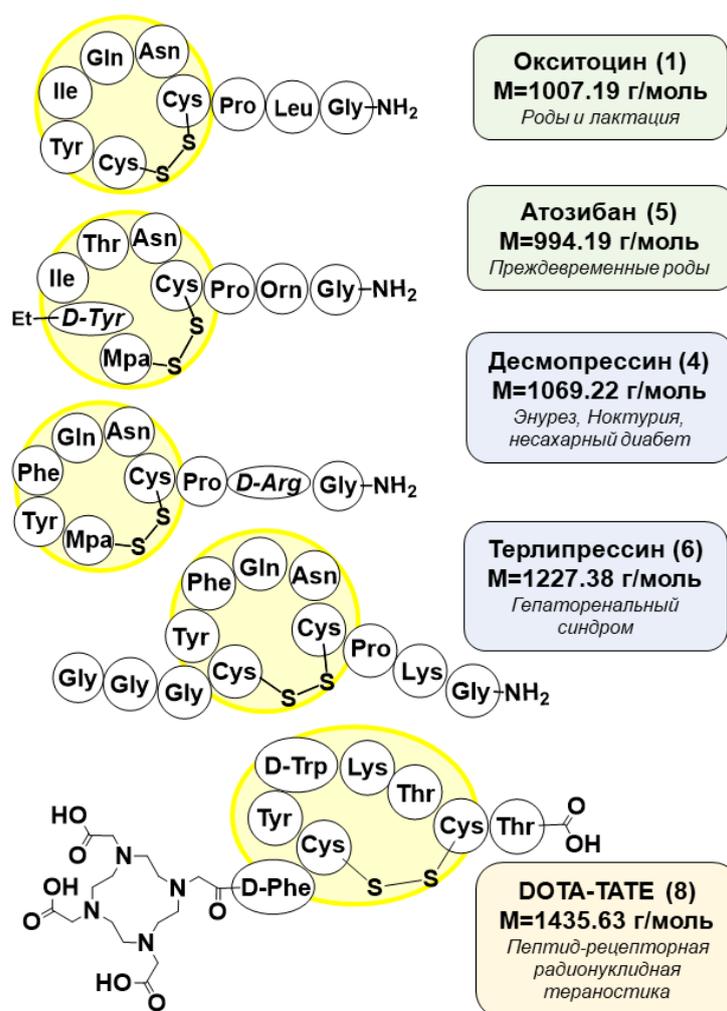


Рисунок 2. Структурная формула, молекулярная масса и показания к применению основных объектов диссертационной работы.

Терлипрессин – агонист вазопрессиновых рецепторов – является стандартом лечения для пациентов с гепаторенальным синдромом (ГРС), осложнённым циррозом печени. По различным данным количество больных ГРС в среднем составляет от 9 000 до 18 000 человек в год, что показывает необходимость в Терлипрессине ~ 100 г в год.

Десмопрессин является агонистом второго типа вазопрессиновых рецепторов и применяется, в основном, для лечения несахарного диабета и ночного энуреза. Количество больных несахарным диабетом в России достигло практически 3 000 человек с 2004 года. А так как доза этого пептида для лечения этих патологий составляет 0.1–0.05 мг два раза в день перорально, потребность в десмопрессине в России составляет ~ 50 г в год.

В качестве объекта исследования нами был также выбран аналог соматостатина Туг³-окреотэйт и прекурсор на его основе DOTA-TATE (Рисунок 2), применяемый для пептид-рецепторной радионуклидной диагностики и терапии. Этот пептид в качестве адресной части входит в состав радиофармацевтических препаратов (РФП) – «Lutathera», «Netspot» и «Detecnet». DOTA-TATE образует комплекс с такими радионуклидами, как ⁶⁸Ga («Netspot») и ⁶⁴Cu («Detecnet»), и используется для диагностики различных опухолей с помощью ПЭТ-визуализации.

Зарегистрированный в 2021 году препарат «Lutathera», представляющий комплекс DOTA-TATE с ¹⁷⁷Lu, является первым в своём классе терапевтическим радионуклидным препаратом. Применяемые в составе РФП дозы пептидов ничтожно малы. Потребность в прекурсоре DOTA-TATE в России составляет всего лишь ~ 5 г в год.

Получение пептидов с внутримолекулярными дисульфидными связями является непростой задачей, особенно в крупном масштабе. Критической стадией является именно замыкание S-S мостика. Детальное понимание особенностей этого процесса важно для решения препаративных задач, когда чистота и выход конечного продукта, а также простота, удобство и воспроизводимость проведения процесса являются первостепенной задачей.

2.2. МЕТОДЫ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Для выбора наиболее подходящего реагента для крупномасштабного синтеза нами была проведена сравнительная оценка различных окислителей для замыкания S-S связи. В зависимости от наличия свободной или защищённой сульфгидрильной группы линейного предшественника применяются различные окислители.

При замыкании S-S мостика окислением линейного предшественника с незащищёнными сульфгидрильными группами применяются такие реагенты как O₂, H₂O₂, DMSO, K₃[Fe(CN)₆], система глутатиона, различные реагенты, иммобилизованные на полимерных носителях и комплекс Pt(IV), нанесённый на наносферы.

При создании S-S связи путём прямой конверсии S-защищённого тиольного предшественника, при котором на двух сульфгидрильных остатках присутствуют одинаковые защитные группы, в качестве окислителей применяют иод и трифторацетат таллия (III). При замыкании дисульфидной связи в результате реакции тиол-дисульфидного обмена между активированной тиольной группой одного остатка цистеина и свободной тиольной группой другого, в качестве активаторов –SH группы являются различные 2-пиридинсульфиды.

При использовании любого из перечисленных методических подходов на качество получаемого циклического дисульфида критически влияют такие факторы, как pH среды, природа окислителя, особенно, когда исходят из тиольных предшественников, температура, время, растворитель и концентрация пептида.

Наш экспериментальный опыт показал, что предложенные методы в растворе не всегда воспроизводимы и поэтому не дают удовлетворительных результатов.

СИНТЕЗ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ, ИХ АНАЛОГОВ И АНАЛОГОВ ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА

К настоящему времени известны различные методы синтеза нейрогипофизарных гормонов – окситоцина (1) и вазопрессина – и их аналогов – дезаминоокситоцина (2), D-Arg⁸-вазопрессина (3), десмопрессина (4), атозибана (5) и терлипрессина (6) и аналогов гормона соматостатина – Туг³-окреотэйти (7) и DOTA-TATE (8) – однако, судя по литературным данным, предпочтение, в основном, отдаётся синтезу в растворе, включая стадию замыкания S-S мостика.

В данной работе для синтеза пептидов (1–8) мы решили изучить применимость твёрдофазного метода, так как, по нашему мнению, он гораздо более прост в исполнении, может быть легко стандартизирован и автоматизирован, что очень важно при разработке технологии крупномасштабного синтеза.

Так как пептиды (1–6) являются амидами, в качестве твёрдой фазы, мы выбрали полимеры «Ринка» с различным начальным содержанием аминокрупп (0.47–1.1 ммоль/г). Для пептидов (7) и (8) был выбран полимер «Ванга» с начальным

содержанием оксигрупп 0.68 ммоль/г, так как эти пептиды содержат С-концевую карбоксильную группу. Для отщепления $-Fmoc$ защит использовали раствор 5% 4-MePip/2% DBU/DMF. Для создания пептидной связи применяли DIC/HOBt-метод.

При синтезе пептидов остаток цистеина и 3-меркаптопропионовой кислоты защищали Ttt-группой. Замыкание внутримолекулярного S-S мостика обычно проводят в условиях высокого разбавления, однако для крупномасштабных синтезов это нетехнологично, т.к. объем реакционных смесей резко возрастает (так, при циклизации 10 г тиольного предшественника пептида объем реакционной смеси составит 10 л), поэтому мы решили проводить циклизацию на полимере.

Главное отличие твёрдофазной циклизации от циклизации в растворе – это возможность проведения реакции в очень концентрированных растворах (10 г ~ 0.1 л), за счёт эффекта псевдоразведения. Для замыкания S-S связи использовали в качестве окислителя иод (I_2), поскольку он хорошо растворим в органических растворителях, обеспечивающих хорошую сольватацию пептидилполимера, при его использовании происходит прямая конверсия цистеин-защищённого пептида в циклический дисульфид.

Так как в выбранных объектах работы присутствуют чувствительные к окислению аминокислоты: тирозин в пептидах (1–6) и тирозин и триптофан в пептидах (7) и (8), наличие которых при замыкании дисульфидной связи служит источником образования ряда побочных продуктов и приводит к низким выходам целевых дисульфидов, важно было разработать универсальный технологичный подход.

Мы изучили условия замыкания S-S мостика (1.5–30 эквивалентов I_2 , время, растворитель) при твёрдофазной циклизации. Кроме того, мы оценили влияние статуса N-концевой аминогруппы на протекание процесса замыкания внутримолекулярной S-S связи как экспериментально, так и с помощью молекулярного моделирования.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЗАМЫКАНИЯ S-S СВЯЗИ В НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНАХ, ИХ АНАЛОГАХ И АНАЛОГАХ ГОРМОНА СОМАТОСТАТИНА

Несмотря на то что создание S-S мостика изучается более 50 лет, механизм этой реакции является дискуссионным. Кроме того, в зависимости от используемого подхода (окислитель, растворитель, концентрация, использование различных защит на сульфгидрильных группах) механизм циклизации, по-видимому, будет различен.

Для моделирования замыкания дисульфидной связи на полимере мы выбрали одностадийную прямую конверсию пептидполимерного Cys(Trt)-предшественника в циклический дисульфид. Следуя предполагаемому механизму данной реакции, исходя из защищённого Cys(Trt)-предшественника, используя в качестве окислителя I₂ (Рисунок 3), мы предположили, что S-S связь в пептидах 1–8 образуется в промежуточном продукте ПС1 (Рисунок 3), содержащем тритильную группу на одном атоме серы и иод на другом.

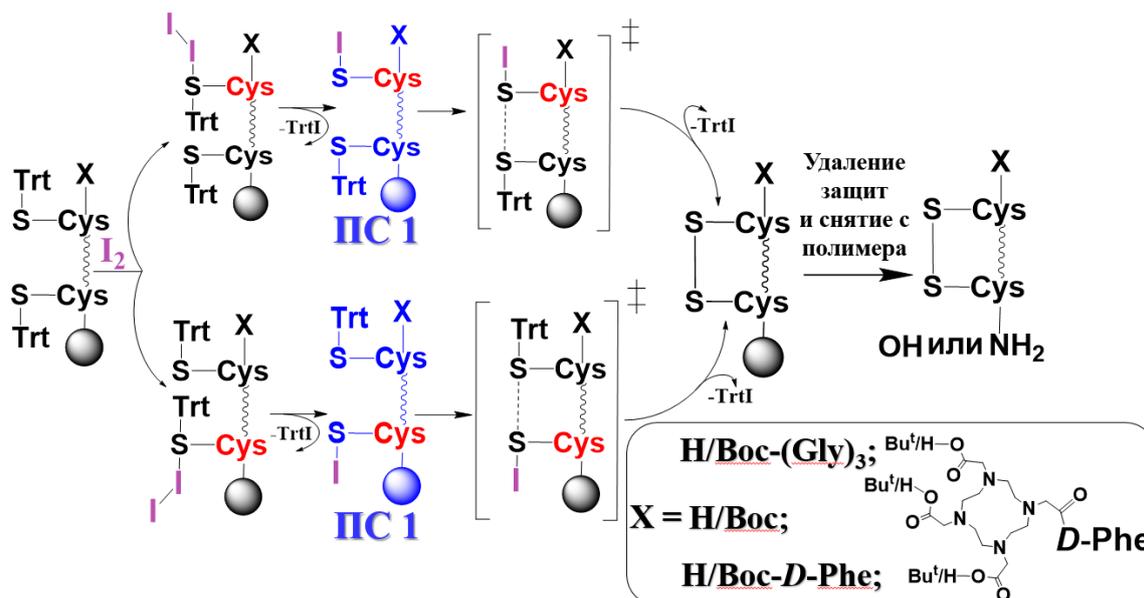


Рисунок 3. Предполагаемая схема замыкания S-S связи в пептидах (1-8) иодом на полимерном носителе, исходя из Cys(Trt)-предшественника.

Согласно предполагаемому механизму, иод присоединяется только к одному из атомов серы, поэтому реакция может протекать в двух направлениях, что мы и постарались доказать с помощью молекулярного моделирования в Maestro 10.6 (Schrodinger), используя силовое поле OPLS3 и модель неявного растворителя ($\epsilon(\text{DMF}) = 36.71$).

Поскольку силовое поле OPLS3 не позволяет безопасно моделировать переходные состояния, а упрощение системы, позволяющее моделировать ее методами квантовой химии, может привести к потере важных взаимодействий, мы решили оценить преактивационные энергии, т.е. переход в состояние готовности к реакции (СГР) (Рисунок 4), в котором атомы серы в ПС1 сближаются на 4 ангстрема, следуя гипотезе о том, что изменения конформаций защищённых предшественников соединений (1–8), необходимые при сближении атомов серы друг с другом, ответственны за разницу в энергиях активации образования S-S связи в этих пептидах.

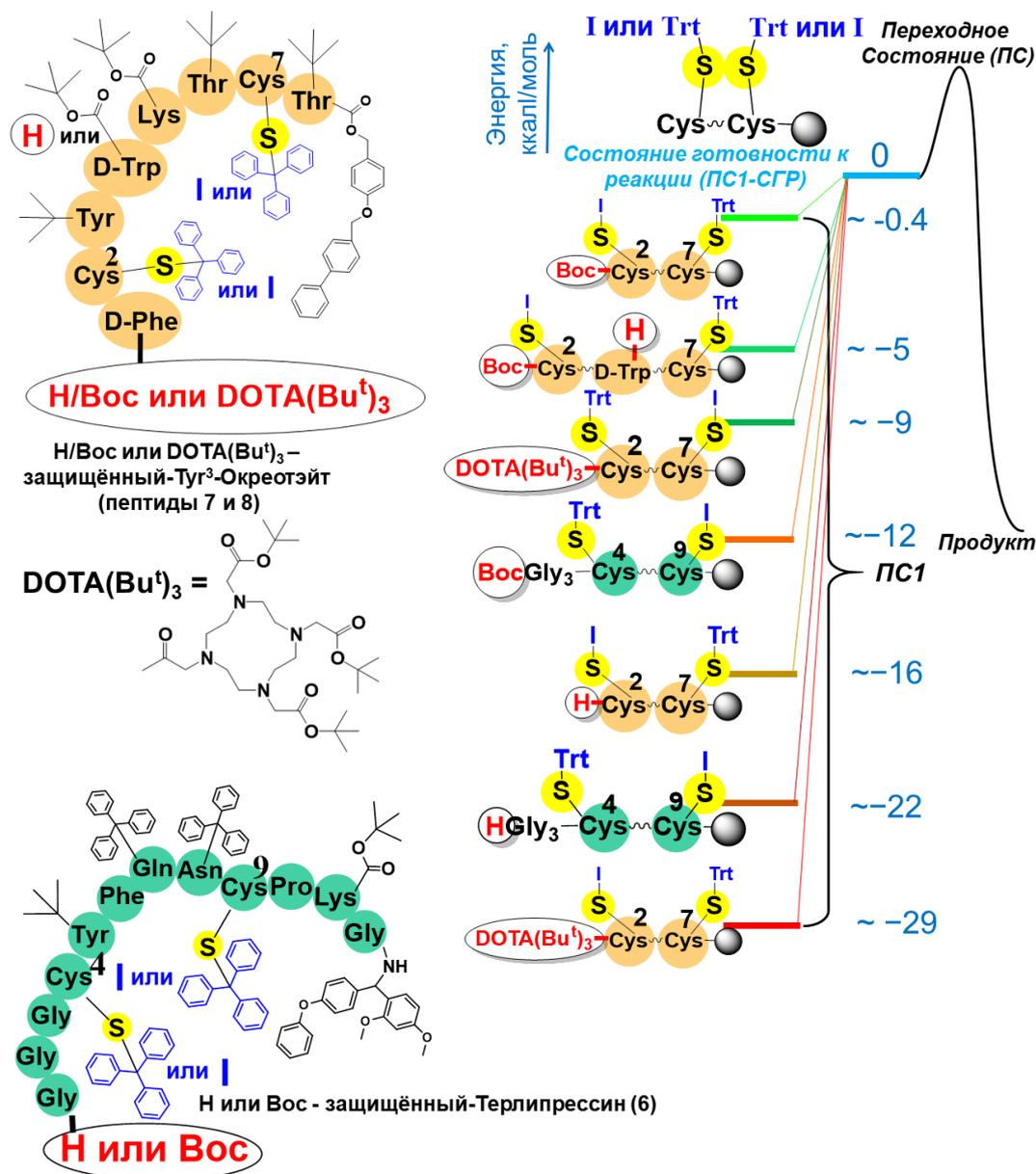


Рисунок 4. Сравнение энергетических уровней, соответствующих сближению двух атомов серы в защищённых предшественниках терлипессина (6), Тур³-окреотэита (7) и DOTA-TATE (8) в зависимости от наличия/отсутствия Вос-защиты или DOTA(Bu^t)₃ на Nα-концевой аминогруппе.

Конформационный поиск в низкочастотном режиме был выполнен в макромоделе Шредингера для двух состояний (PC1 и PC1-CGP на Рисунке 4) обоих защищённых предшественников пептидов (1–8) с альтернативными расположениями Trt группы и I на атомах серы.

Молекулярное моделирование показало, что энергия предварительной активации ($E_{pre-act}$) для сближения атомов серы на расстояние 4 Å для всех объектов работы (1–8) зависит от места присоединения иода к сульфгидрильной группе цистеина или 3-меркаптопропионовой кислоты. Во всех расчётах было показано, что отсутствие

N-концевой α -аминогруппы (в дезаминоаналогах нейрогипофизарных гормонов **3–5**) или присутствие на ней Вос-защиты (в пептидах **1, 2, 6, 7**) изменяет геометрию молекулы так, что $E_{\text{pre-act}}$, необходимая для взаимодействия атомов серы, снижается на 10–20 ккал/моль.

Для аналогов соматостатина – Туг³-окреотэита (**7**) и DOTA-TATE (**8**) с помощью молекулярного моделирования мы установили, что отсутствие Вос-защиты на индольном атоме азота триптофана увеличивает $E_{\text{pre-act}}$ на 5 ккал/моль, тем самым показали влияние данной защитной группы на протекание циклизации за счёт конформационных особенностей молекулы.

Интересно, что энергия предварительной активации Cys²-иодированного ПС в пространственно-затруднённой молекуле DOTA(Bu^t)₃ резко повышается – 29 ккал/моль.

Экспериментальное проведение твёрдофазной циклизации N α -защищенных п.п. Вос-NH-защищенных объектов работы (**1**), (**2**), (**6**), (**7**) полностью подтвердило результаты расчётов (Рисунок 5).

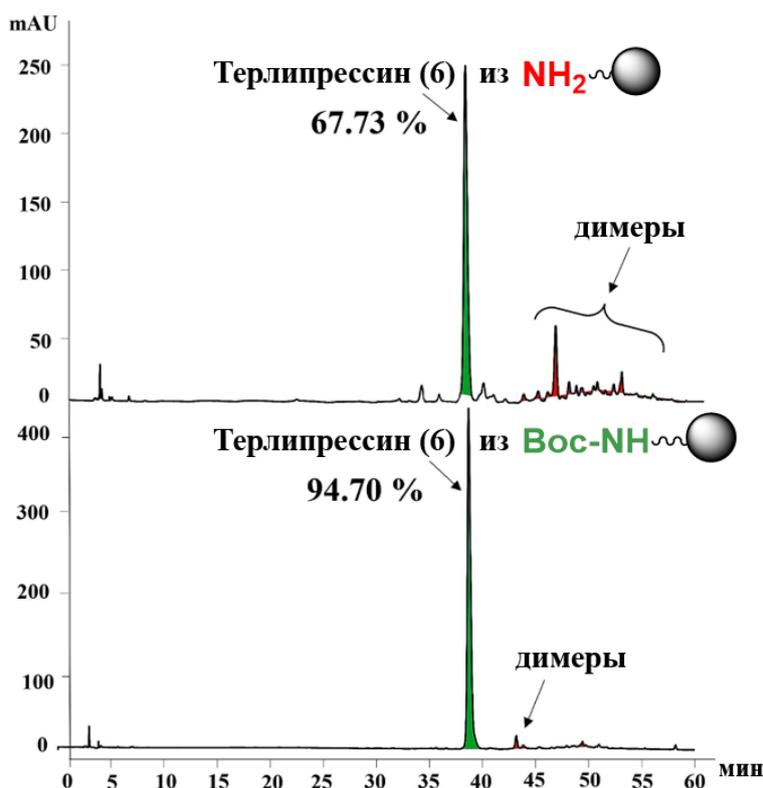


Рисунок 5. Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в терлипрессине (**6**) действием 5 экв. I₂ в DMF на твёрдой фазе в течение 60 мин.

**РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
УНИВЕРСАЛЬНОЙ МЕТОДИКИ ЗАМЫКАНИЯ S-S СВЯЗИ
АНАЛОГОВ НЕЙРОГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ (2), (4), (5), (6)
И СОМАТОСТАТИНА (7), (8)**

Конверсия полностью защищённых производных пептидов (2), (4), (5), (6), (7) и (8) в циклические дисульфиды проводилась действием различных избытков иода (1.5–30 экв.) в DMF в течение 1–3 часов.

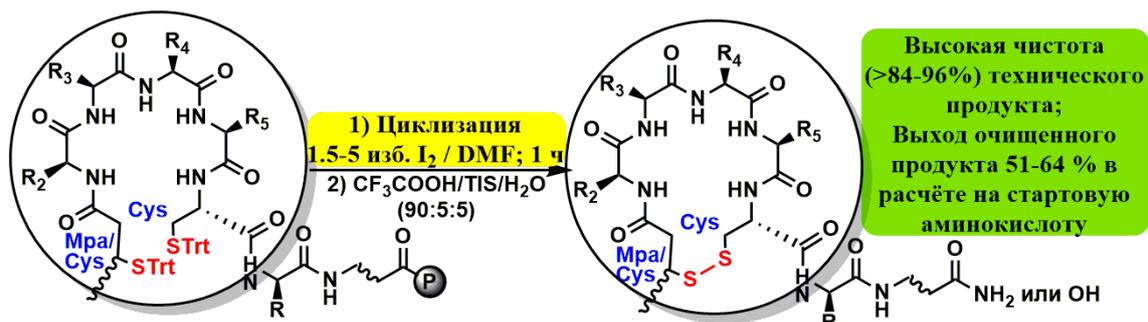


Рисунок 6. Оптимизированная методика замыкания дисульфидной связи.

Таблица 1

**СОСТАВ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ ЦИКЛИЗАЦИИ АТОЗИБАНА (5),
ДЕСМОПРЕССИНА (4) И ДЕЗАМИНООКСИТОЦИНА (2)
НА ТВЁРДОЙ ФАЗЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ 1.5–10 ЭКВ. I₂
В DMF В ТЕЧЕНИЕ 1 Ч ПО ДАННЫМ ВЭЖХ**

Название пептида	Количество экв. I ₂	S-S-пептид, %	SH-предшественник, %	Димеры, %
Атозибан (5)	1.5	92.11	-	3.57
Десмопрессин (4)		96.94	-	-
Дезаминокситоцин (2)		93.52	-	3.90
Атозибан (5)	3	85.51	3.71	4.80
Десмопрессин (4)		88.73	2.14	3.26
Дезаминокситоцин (2)		87.41	2.84	4.96
Атозибан (5)	5	71.22	11.21	4.93
Десмопрессин (4)		81.86	9.31	3.11
Дезаминокситоцин (2)		78.65	10.08	5.82
Атозибан (5)	10	44.94	43.28	12.31
Десмопрессин (4)		57.94	34.07	3.40
Дезаминокситоцин (2)		53.14	33.54	6.05

Замыкание S-S мостика для пептидов (2), (4), (5), (6) проводили в концентрированном растворе (12.6 ммоль в 250 мл растворителя), тогда как для такого же масштаба циклизации в растворе потребовалось бы от 6 до 12 литров растворителя.

Замыкание дисульфидной связи в соединениях (7) и (8) в масштабе ~2.72 ммоль проводилось в 80 мл, тогда как для такого же масштаба циклизации в растворе потребовалось бы от 1.5 до 3 литров растворителя. Увеличение времени проведения циклизации до 180 минут никак не влияло на качество продуктов (1–8), поэтому подбор допустимого диапазона избытков иода проводили в течение 60 минут для всех объектов.

Интересно, что для дезаминоаналогов нейрогипофизарных гормонов (2), (4), (5) только при использовании низких количеств окислителя (1.5 экв. I₂) (Таблица 1) в DMF в течение 1 часа, удалось достичь чистоты технических продуктов (2), (4), (5) выше 92 % (Таблица 1) и выхода более 52 % (для загрузки в 12.6 ммоль). В этих соединениях уже при использовании 3 экв. I₂ наблюдается появление SH-предшественника, что усложняет дальнейшую очистку и уменьшает выход. Для Tug³-окреотэйти (7) 1.5 экв. I₂ было недостаточно для полной конверсии в циклический дисульфид – наблюдалось наличие SH-предшественника Tug³-окреотэйти (7) до 10.78 %. В диапазоне от 3 до 30 эквивалентов иода качество технических дисульфидов (7) было сходным (86 – 88 %) и не наблюдалось линейного SH-пептида и димерных продуктов.

В дальнейшем мы решили применить данный подход для замыкания дисульфидной связи в DOTA-TATE (8). Используя трёхкратный избыток I₂, проводя циклизацию в DMF в течение 60 минут, нам удалось получить технический продукт (8) чистой 84.63 %, что облегчило дальнейшую очистку до фармакопейного качества (Рисунок 7) с высоким выходом (таблица 2).

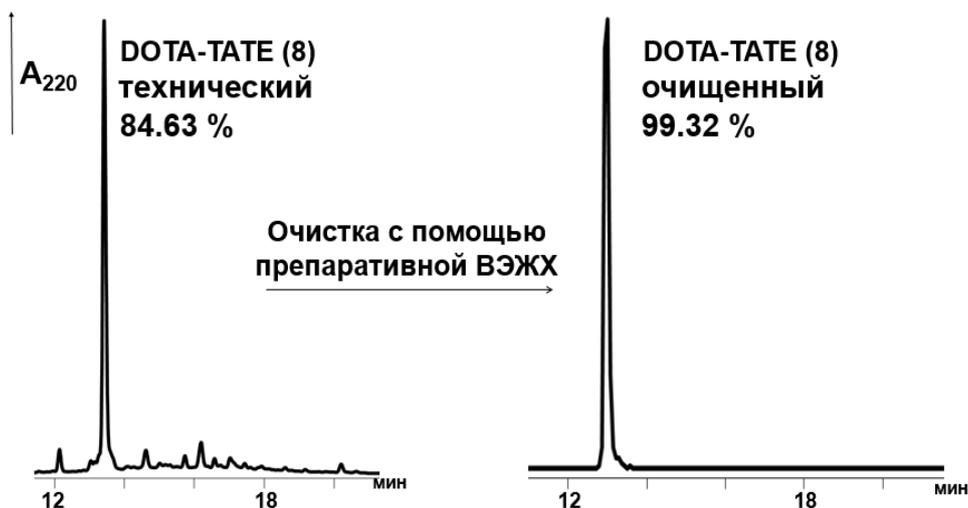


Рисунок 7. Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ технического и очищенного DOTA-TATE (8).

Представлялось важным оценить влияние высоко и низкозамещённых полимеров Ринка на чистоту терлипрессина. Его синтез проводили на полимерах Ринка с начальным содержанием аминогрупп 0.47, 0.84 и 1.1 ммоль/г. Независимо от используемого полимерного носителя содержание целевого терлипрессина (6) в продукте ТФС было высоким (от 88 до 94%), во всех случаях в качестве основных примесей были идентифицированы дисульфидные димеры, содержание которых при циклизации на низко- и высокозамещённых амидных смолах было примерно одинаковым и составляло менее 4 %.

Данные эксперименты ещё раз подтверждают, что при циклизации на твёрдой фазе, благодаря эффекту псевдоразбавления, степень замещения полимера стартовой аминокислотой не влияет на чистоту целевого продукта.

Для оптимизации способа получения терлипрессина была проведена серия экспериментов по подбору количества иода, необходимого для замыкания дисульфидной связи. Циклизацию проводили на полимере Ринка с начальным содержанием аминогрупп 0.84 ммоль/г в DMF на основе Вос-защищенного терлипрессина с использованием избытков I_2 в диапазоне от 1.5 до 30-кратных (Рисунок 8). После окончательного отщепления от полимера оценивали содержание SH-линейного предшественника и побочных димеров в техническом продукте по данным ВЭЖХ.

Таким образом, полная конверсия в циклический дисульфид наблюдается в диапазоне от 5 до 10 эквивалентов иода (Рисунок 8). Когда избыток окислителя для терлипрессина увеличивается выше 10 эквивалентов, содержание S-S пептида снижается. В наших опытах оказалось, что образование димерных продуктов

не зависит от количества использованного иода (их содержание было менее 4 %), тогда как при использовании 30 экв. иода в реакционной смеси содержание линейного предшественника увеличивается до 15.37 % (Рисунок 8).

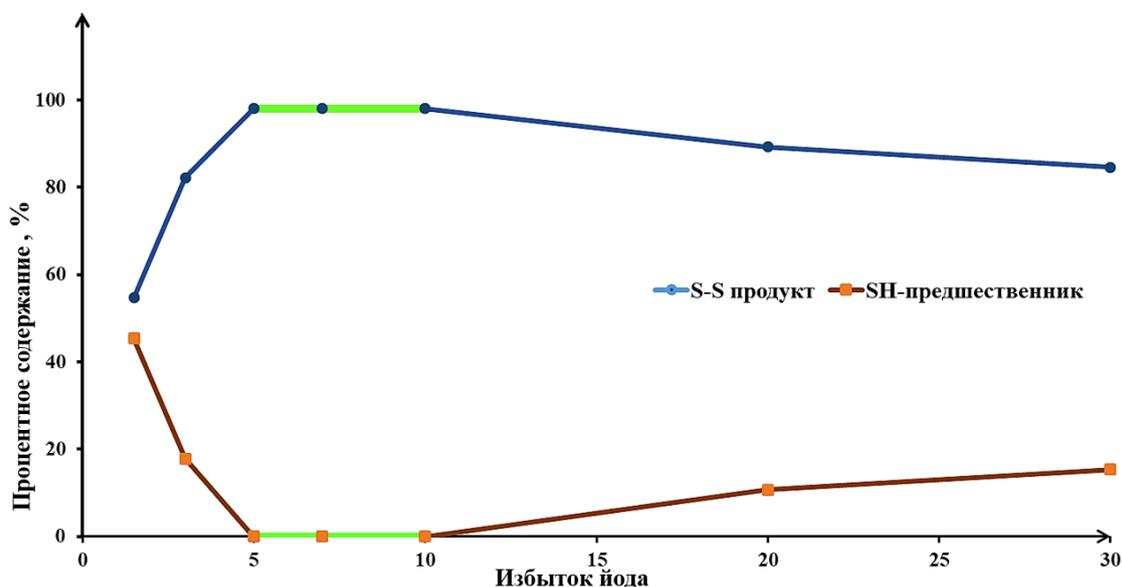


Рисунок 8. Зависимость полноты замыкания S-S связи терлипрессина на твёрдой фазе от количества иода в DMF в течение 1 часа при 25°C. Оптимальный диапазон реакции отмечен зеленым цветом.

Мы также экспериментально сравнили время образования дисульфидной связи на смоле для терлипрессина и десмопрессина в оптимальных условиях. Для обоих пептидов через 10 минут образуется более 95 % S-S продукта и количество линейного предшественника составляет менее 3 %. В крупномасштабном синтезе очень важно добиться полной конверсии предшественника в циклический пептид, так как присутствие даже следовых количеств линейного предшественника существенно осложняет выделение целевого дисульфида из реакционной смеси методом ВЭЖХ.

При анализе качества твердофазного продукта циклизации терлипрессина с помощью ВЭЖХ мы столкнулись с необходимостью подбора специальных условий, при которых исходные SH- и целевые S-S-пептиды хорошо разрешались.

Мы экспериментально изучили влияние времени на содержание целевого терлипрессина и его устойчивость в течение 3 часов в оптимальных условиях. Содержание дисульфидов в реакционной смеси не увеличивалось по сравнению с их содержанием при циклизации в течение 60 минут; кроме того, не наблюдалось появления линейного терлипрессина и других побочных продуктов. Наши эксперименты по циклизации терлипрессина (6) и десмопрессина (4) показывают важность проведения циклизации для всех объектов работы (1–8) при

крупномасштабном синтезе не менее 1 часа, поскольку именно полное превращение в циклический пептид позволяет избежать проблем с выделением и очисткой необходимого продукта.

Также нами было изучено влияние растворителей на процесс замыкания дисульфидной связи. В наших экспериментах по синтезу терлипрессина (6) прослеживается следующая тенденция: при уменьшении значения диэлектрической постоянной растворителя, понижается и чистота технического терлипрессина. По-видимому, только в DMF наблюдается достаточная стабилизация переходного состояния ПС1 (Рисунок 3) за счёт высокого значения диэлектрической постоянной ($\epsilon = 36.7$) по сравнению с другими растворителями.

Как видно из экспериментов, набухание смолы не играет важной роли для полноценного замыкания S-S мостика. Большее значение, по-видимому, имеет вязкость растворителя и его способность не только стабилизировать переходное состояние ПС1, сольватировать полимерную матрицу, но и растворять защищённый пептид. Поэтому при использовании NMP, обладающего близкой диэлектрической проницаемостью, но существенно большей вязкостью, чем DMF, чистота технического терлипрессина понижается на 20 %.

По всей вероятности, результат, полученный при циклизации в хлористом метиле, можно объяснить низкой растворимостью защищённого пептида в этом растворителе. В сходных экспериментах по замыканию дисульфидной связи в Туг³-окреотэйте (7) в NMP при комнатной температуре наблюдается похожий с терлипрессином результат, при котором количество SH-предшественника составляет 18.73 % (Рисунок 10).

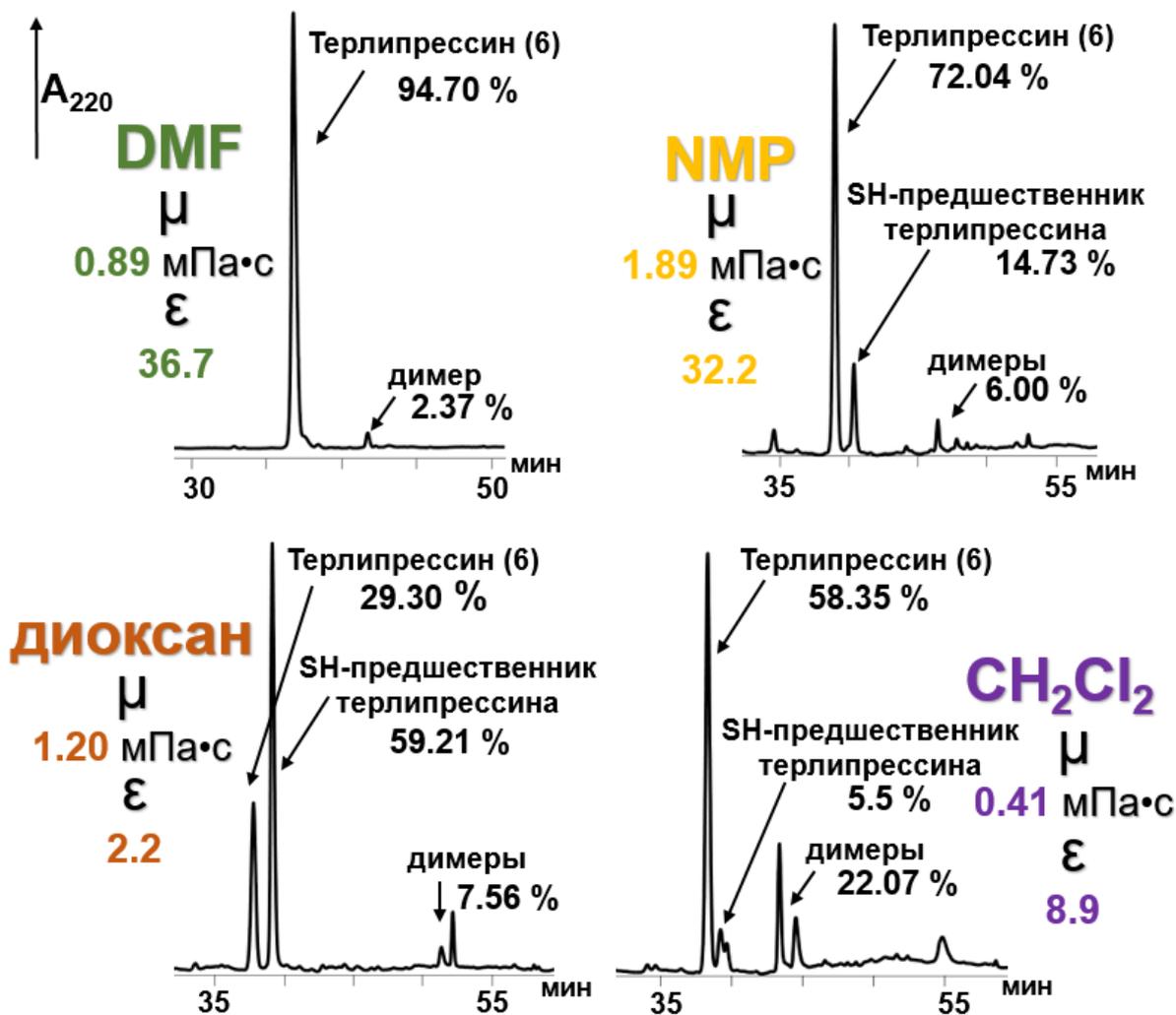


Рисунок 9. Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов замыкания S-S мостика в терлипрессине (6) действием 5 экв. I₂ в различных растворителях на твёрдой фазе в течение 60 мин, исходя из Вос-защищённого предшественника.

Мы предположили, что, уменьшив вязкость путём повышения температуры реакции циклизации до 45 градусов, получится добиться более полного замыкания дисульфидной связи. Наша гипотеза полностью подтвердилась экспериментально. Чистота технического Тур³-окреотэита при этом увеличилась почти на 20 %, однако всё равно наблюдались остаточные количества линейного предшественника, что подтверждает влияние вязкости среды, температуры и значения диэлектрической постоянной растворителя на проведение замыкания S-S связи (Рисунок 10).

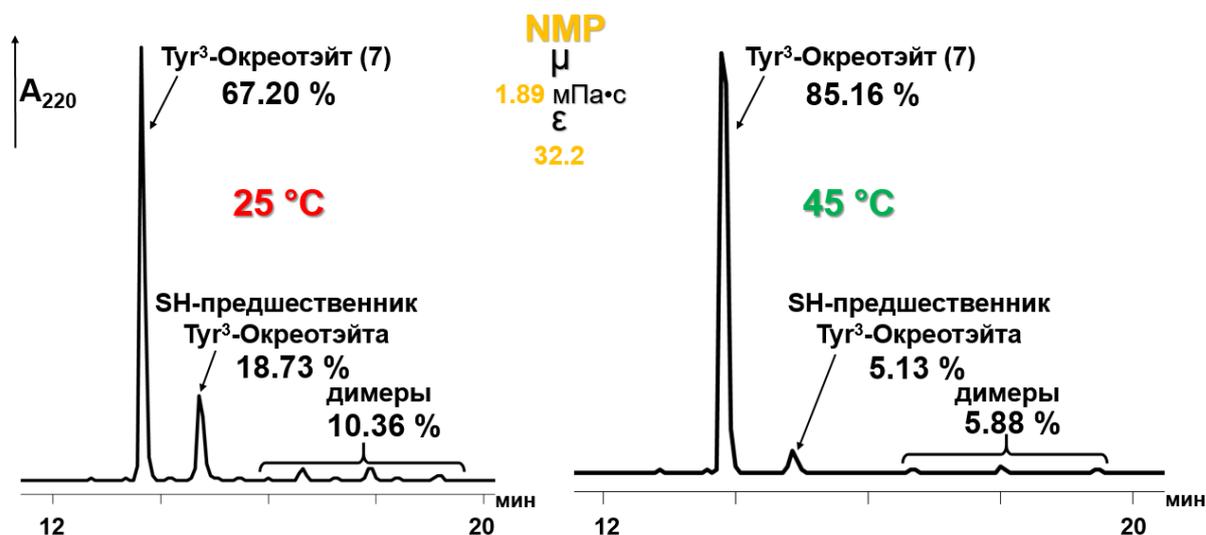


Рисунок 10. Фрагменты профилей аналитических ВЭЖХ продуктов при замыкании S-S мостика в Tyr³-окреотэйте действием 3 экв. I₂ в NMP на твёрдой фазе, исходя из Вос-защищённого предшественника в зависимости от температуры.

Таким образом, нами оптимизирована методика твёрдофазной циклизации и ещё раз показана необходимость проведения замыкания дисульфидной связи именно в DMF при комнатной температуре в течение одного часа. Данные условия являются универсальными для замыкания S-S связи во всех объектах работы (1–8).

Глава 3. МАСШТАБИРОВАНИЕ ТВЁРДОФАЗНОЙ ЦИКЛИЗАЦИИ

Масштабирование синтеза пептидов (1–8) проводилось при оптимальных условиях замыкания внутримолекулярной S-S связи, подобранных в главе 2 (Таблица 2).

Соединения были охарактеризованы с помощью ВЭЖХ, масс-спектрометрии и сравнении с коммерческими образцами окситоцина (CAS № 50-56-6), дезаминоокситоцина (CAS № 113-78-0), десмопрессина (CAS № 16679-58-6), атозибана (CAS № 90779-69-4), терлипрессина (CAS № 14636-12-5), Tyr³-окреотэита (CAS № 302794-43-0) и DOTA-TATE (CAS № 177943-88-3).

Все соединения (1–8) были очищены до фармакопейного качества (Таблица 2). Отметим, что выход конечного продукта после очистки с помощью препаративной ВЭЖХ соответствует общему выходу, включая твёрдофазный синтез, циклизацию на твёрдой фазе, отщепление от полимера и очистку.

Таблица 2

ТАБЛИЦА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Название пептида	Содержание аминокрупп, ммоль/г	Масштаб синтеза, ммоль	Избыток I ₂ , моль / моль	Чистота технического продукта по ВЭЖХ, %	Чистота целевого продукта по ВЭЖХ, %	Кол-во продукта г (ммоль)	Выход на стартовую аминокислоту, %
Окситоцин (1)	0.84	12.60	5	94.58	99.23	7.1 (6.65)	52.7 %
<i>D-Arg</i> ⁸ -Вазопрессин (2)	0.84	12.60	5	92.26	99.40	7.8 (6.48)	51.42 %
Дезаминоокситоцин (3)	0.84	12.60	1.5	93.52	99.31	7.02 (6.67)	52.93 %
Десмопрессин (4)	0.84	12.60	1.5	96.94	99.52	8.17 (7.24)	57.46 %
Атозибан (5)	0.84	12.60	1.5	92.11	99.66	7.51 (7.12)	56.51 %
Терлипрессин (6)	0.47	7.05	5	88.47	98.70	5.14 (3.79)	54.18 %
				94.70	99.62	8.71 (6.47)	51.34 %
	0.84	12.60	7	94.50	99.44	8.92 (6.63)	52.61 %
			10	94.34	99.12	8.21 (6.10)	48.41 %
	1.1	16.5	5	92.46	98.87	11.42 (8.48)	51.39 %
Тур ³ -окреотэйт (7)	0.68	2.72	3	88.72	98.84	1.74 (1.57)	57.60 %
ДОТА-ТАТЕ (8)		0.55		84.63	99.32	0.54 (0.36)	65.45 %

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработан новый подход к замыканию внутримолекулярной дисульфидной связи в регуляторных пептидах на полимерном носителе, который отличается простотой проведения эксперимента, воспроизводимостью результатов, и может быть применен для получения фармакопейных препаратов в промышленных масштабах.

2. Изучены и оптимизированы условия замыкания S-S мостика на полимере для аналогов соматостатина и нейрогипофизарных гормонов: окситоцина, D-Arg⁸-вазопрессина, дезаминоокситоцина, атозибана, десмопрессина, терлипрессина, Tyr³-окреотэйти и DOTA-TATE.

3. Показано, что высокая чистота технических продуктов твёрдофазной циклизации (более 90 % по данным ВЭЖХ) позволяет легко получить препараты фармакопейного качества.

4. С помощью молекулярного моделирования была подтверждена предлагаемая схема замыкания внутримолекулярной S-S связи, что найдет применение при изучении любых аналогов соматостатина и нейрогипофизарных гормонов.

5. Проведено масштабирование процесса циклизации с целью получения нейрогипофизарных гормонов, их аналогов и аналогов гормона соматостатина с высокими выходами.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ

1. **Авдеев Д.В.** Разработка оптимальной методики замыкания дисульфидной связи в синтезе Атозибана – антагониста окситоциновых рецепторов / **Д.В. Авдеев**, М.В. Овчинников, У.С. Дудкина, А.С. Молокоедов, А.А. Азьмуко, М.Е. Палькеева, М.В. Сидорова // Российский журнал биоорганической химии. – **2021**. – Т. 47. – № 6. – С.806-804. <https://doi.org/10.31857/S013234232106004X>

2. **Авдеев Д.В.** Препаративный твердофазный метод замыкания S–S-связи в дезаминоаналогах нейрогипофизарных гормонов / **Д.В. Авдеев**, М.В. Овчинников, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова // – Химико-фармацевтический журнал. – **2022**. – Т. 56. – № 9– С. 59-63. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-9-59-63>

3. **Avdeev D.** Formation of a Disulfide Bridge on the Resin during Solid-Phase Synthesis of Terlipressin: Influence of Boc-protected and free N-terminal amino group / **D. Avdeev**, M.V. Ovchinnikov, M.G. Medvedev, A.S. Molokoedov, M.V. Sidorova // – Organic Process Research & Development. – **2023**. – V. 27. – № 9. – P. 1624-1630. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00142>

4. **Avdeev D.V.** Study of the cyclization of Oxytocin and Desaminoxytocin in the solid support / **D.V. Avdeev**, M.V. Ovchinnikov, A. S. Molokoedov, M. V. Sidorova // Book of abstracts of XII International conference on Chemistry for Young Scientists («MENDELEEV 2021»), Saint Petersburg, Russia – **2021**. – С. 512. (Устный доклад)

5. **Авдеев Д.В.** Изучение замыкания S–S связи в синтезе аналогов нейрогипофизарных гормонов / **Д.В. Авдеев**, М.В. Овчинников, У.С. Дудкина, А.А. Азьмуко, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова // Материалы III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов России. VII Съезда биохимиков России. X Российского симпозиума «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ». VII Съезда физиологов СНГ, Сочи, Россия – **2021**. – С. 134. (Устный доклад).

6. **Авдеев Д.В.** Разработка методики синтеза атозибана и десмопрессина высокой чистоты для промышленного производства / **Д.В. Авдеев**, М.В. Овчинников, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова // Материалы 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021», Волгоград, Россия – **2021**. – С. 205. (Устный доклад).

7. **Авдеев Д.В.** Новый подход к замыканию S-S связи в биологически активных циклических пептидах / **Д.В. Авдеев**, М.В. Овчинников, М.Г. Медведев, А.С. Молокоедов, М.В. Сидорова // Материалы Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» («МОБИ-ХимФарма» 2023), Санкт-Петербург, Россия – **2023**. – С. 5. (Устный доклад)