



РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ МЕТОДИКИ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ В СИНТЕЗЕ АТОЗИБАНА – АНТАГОНИСТА ОКСИТОЦИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ¹

© 2021 г. Д. В. Авдеев*, #, М. В. Овчинников*, У. С. Дудкина*, А. С. Молокеев*, А. А. Азьмуко*, М. Е. Палькеева*, М. В. Сидорова*

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Россия, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 18.02.2021 г.

После доработки 24.02.2021 г.

Принята к публикации 28.02.2021 г.

Проведен крупномасштабный твердофазный синтез Атозибана – Mpa¹-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys⁶-Pro-Orn-Gly-NH₂ циклического 1,6-дисульфида – единственного клинически используемого антагониста окситоциновых рецепторов. Подобраны условия для замыкания дисульфидной связи (S–S) в молекуле Атозибана как в растворе, так и на полимере в ходе твердофазного синтеза. Проведена сравнительная оценка образования S–S-связи в различных условиях. Изучены побочные продукты, образующиеся при замыкании дисульфидной связи как в растворе, так и на полимерном носителе. Разработана методика, позволяющая синтезировать Атозибан в укрупненном масштабе (10–20 ммоль), включающая циклизацию защищенного полупродукта с образованием S–S-связи в ходе твердофазного синтеза, при минимальном образовании побочных продуктов.

Ключевые слова: антагонист окситоциновых рецепторов, Атозибан, твердофазный синтез, замыкание дисульфидной связи

DOI: 10.31857/S013234232106004X

ВВЕДЕНИЕ

Дисульфидная связь – один из структурообразующих элементов в молекулах многих биологически активных пептидов – таких пептидных гормонов, как Окситоцин, Вазопрессин, Соматостатин, Инсулин [1, 2], нейромедиаторов, факторов роста и др. Дисульфидные мостики играют важную роль в реализации биологического эффекта многих пептидных лекарств [3]. Примеры таких соединений – агонисты вазопрессиновых и соматостатиновых рецепторов, такие как Терлипрессин,

син, Фелипрессин, Десмопрессин, Орнипрессин, Октреотид, Ланреотид и Пасиреотид. Данные пептиды содержат одну дисульфидную связь и производятся в промышленных масштабах [4–7]. К настоящему времени существует лишь один клинически используемый антагонист окситоциновых рецепторов – Атозибан, который применяется для предотвращения преждевременных родов и также производится в промышленных масштабах [8, 9]. Такие пептидные лекарства, как Линаклотид и Плеканатид, выступают агонистами гуанилатциклазы, содержат в своей структуре три и две S–S-связи соответственно [10].

В настоящее время существует достаточно большое количество способов создания дисульфидных мостиков в пептидах. При окислении тиольных предшественников используются кислород воздуха, феррицианид калия, диметилсульфоксид, перекись водорода [11]. При синтезе сложных пептидов применяют буферы, имитирующие физиологические условия, как правило, с использованием глутатионовой системы, содержащей 5 мМ восстановленный и 0.1 мМ окисленный глутатион в различных соотношениях [12]. При синтезе природных пептидов, содержащих несколько дисульфидных связей в молекуле,

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S013234232106004X для авторизованных пользователей.

Сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; Bu^t – трет-бутил; DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]-ундец-7-ен; DCM – дихлорметан; DIC – N,N'-диизопропилкарбодимид; DMF – диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; D-Tyr(OEt)-OH – D-2-амино-3-(4-этоксифенил)пропановая кислота; DTT – дитиотреитол; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; ESI – электрораспылительная химическая ионизация при атмосферном давлении; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол; MePip – 4-метилпиперидин; Mpa – 3-меркаптопропионовая кислота; i-PrOH – изопропиловый спирт; TFA – трифторуксусная кислота; TIS – триизопропилсилан; Trt – тритил.

Автор для связи: (тел.: +7 (915) 051-25-55; эл. почта: mityaavdeev93@mail.ru).

успешно применяют спонтанное замыкание S—S-мостиков с использованием мягких окислителей. Так, в работе по синтезу конотоксинов с двумя дисульфидными мостиками спонтанная циклизация тиольных предшественников кислородом воздуха приводила к преимущественному образованию природного дисульфидного изомера [13]. Альтернативный подход — прямая конверсия защищенных (Trt, AcM, Tmob, Mob и др.) линейных предшественников пептидов в циклические дисульфиды. Для этой цели наиболее часто используют иод в различных растворителях [14], реже применяют трифторацетат таллия(III) [15] или сульфоксиды в присутствии хлорсиланов [16].

Синтез природных пептидов или их аналогов, содержащих внутримолекулярные дисульфидные мостики, — до сих пор достаточно сложная задача [17]. Это обусловлено тем, что, независимо от способа (классического или твердофазного) получения соответствующего линейного предшественника, на стадии замыкания внутримолекулярного дисульфидного мостика в пептиде, во избежание межмолекулярной агрегации и образования побочных дисульфидных димеров и олигомеров, приходится работать в условиях высокого разбавления. Рабочие концентрации пептидов при циклизации, как правило, составляют 10^{-4} – 10^{-5} М (т.е. 0.1–1.0 мг/мл) [14]. Концентрирование реакционных смесей циклизации перед выделением целевого продукта — довольно длительный процесс, в ходе которого также возможно образование побочных продуктов, в частности из-за наличия в смеси остаточных количеств окислителя, приводящих к образованию продуктов более глубокого окисления серы (соответствующих сульфоксидов), а также несоблюдения рН или температурного режима. Атозибан разрешен к практическому применению в нашей стране в качестве лекарственного препарата, что диктует необходимость разработки именно крупномасштабной схемы его получения. При синтезе Атозибана мы столкнулись с рядом проблем на стадии создания дисульфидной связи.

Цель данного исследования — разработка оптимальной методики получения Атозибана в укрупненном масштабе, сравнение различных условий замыкания S—S-связи и изучение примесей, образующихся в ходе как твердофазного синтеза, так и синтеза в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Атозибан (**I**) имеет следующую структуру — $\text{Mpa}^1\text{-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys}^6\text{-Pro-Orn-Gly-NH}_2$ циклический 1,6-дисульфид. Данный антагонист был получен заменой четырех аминокислотных остатков в молекуле Окситоцина. Тирозин был заменен на алкилированный аналог D-Tyr(OEt), ци-

стеин — на дезаминоцистеин (Mpa), лейцин — на орнитин, глутамин — на треонин. Такие модификации были проведены для получения аналога — антагониста окситоциновых рецепторов — и увеличения его протеолитической устойчивости [3].

Известны различные методы промышленного получения Атозибана и, судя по литературным данным, предпочтение отдается синтезу в растворе [9, 18]. В данной работе для синтеза этого пептида был выбран твердофазный метод, т.к., по нашему мнению, он более технологичен. В сочетании с N^α -Fmoc-защитой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали кислотоллабильные защитные группы: Bu^t — для треонина, Woc — для орнитина, Trt — для аспарагина. При синтезе пептидов остаток цистеина защищали AcM- или Trt-группой, остаток меркаптопропионовой кислоты — Trt-группой. Для отщепления Fmoc-защит использовали раствор 5% 4-MePip/2% DBU/DMF [19]. Для создания пептидной связи применяли DIC/NOBt-метод. В результате твердофазного синтеза был получен линейный предшественник Атозибана — $\text{Mpa-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH}_2$ — с чистотой 76% по данным ВЭЖХ. Основополагающая стадия в синтезе Атозибана — циклизация, поэтому замыкание дисульфидного мостика изучалось нами как в растворе, так и на полимере.

Замыкание S—S-мостика в растворе. В литературе имеются отдельные упоминания о том, что введение органических растворителей в состав реакционных смесей на стадии циклизации способствует образованию внутримолекулярных дисульфидов [20]. Наши собственные данные по синтезу Окотреотида [21] показывают, что в этом случае циклизация тиольного предшественника с концентрацией 10–20 мг/мл без образования заметных количеств димеров проходит в метаноле. Мы провели серию экспериментов по получению Атозибана в водных или водно-органических растворах (H_2O /изопропиловый спирт, H_2O /диоксан, H_2O /изопропиловый спирт/ CH_3CN) с использованием нарастающих концентраций линейного SH-пептида (1.0–20.0 мг/мл) при рН 7.0–8.0 (табл. 1). Для контроля полноты протекания циклизации параллельно применяли ВЭЖХ и тест Элмана [22]. Введение органических растворителей в состав реакционной смеси при циклизации позволило нам увеличить концентрацию исходного дитиола (**II**).

Как видно из табл. 1 и рис. 1, в использованных для циклизации условиях нам не удалось избежать образования продуктов с межмолекулярными S—S-связями — параллельных и антипараллельных димеров (**III**) и (**IV**), структура которых после выделения из реакционной смеси с помощью ВЭЖХ была подтверждена методом масс-

Таблица 1. Влияние условий замыкания S–S-мостика действием H₂O₂ на содержание целевого и побочных (димерных) продуктов в реакционной смеси при получении Атозибана (I) в растворе

Концентрация SH-предшественника, мг/мл	pH	Растворитель	Состав реакционной смеси по ВЭЖХ, %		
			Атозибан (I)	SH-предшественник (II)	димеры (III) + (IV)
1	7.0	H ₂ O	74.10	0.15	10.20
5	7.0	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH 1 : 1	71.00	0.24	9.28
	7.0	H ₂ O/диоксан 1 : 1	62.20	0.17	14.20
10	7.5	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH/CH ₃ CN 5 : 3 : 1	71.80	0.30	12.83
	7.5	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH 1 : 1	73.70	0.23	10.10
20	7.5–8.0	H ₂ O/ <i>i</i> -PrOH 1 : 1	63.12	0.26	18.20

спектрометрии. В спектре ESI (+) фракции, содержащей смесь пептидов (III) и (IV), наблюдался единственный пик молекулярного иона (1988.6), соответствующий массе димерных продуктов. В дальнейшем при оценке результатов циклизации нами учитывалось суммарное количество пептидов (III) и (IV). При этом в интервале концентраций исходного SH-соединения 1–10 мг/мл содержание побочных продуктов практически не менялось и составляло ~10–14% (табл. 1). При повышении концентрации исходного соединения (II) до 20 мг/мл количество дисульфидных димеров (III) и (IV) возрастало до 18.2% (табл. 1). Как оказалось, димеры имеют более низкую растворимость, чем Атозибан, и существенно осложняют выделение целевого продукта. Лучшие результаты при замыкании S–S-мостика в растворе были получены в следующих условиях: H₂O/изопропиловый спирт при концентрации пептида 10 мг/мл. Окисление происходило в течение 15 мин. По завершении реакции pH реакционной смеси доводили до 4 с помощью уксусной кислоты, и целевой пептид, имеющий чистоту по ВЭЖХ 73.7%, выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ.

Стоит отметить, что на стадии подкисления реакционной смеси нельзя применять трифторуксусную кислоту, т.к. наличие остаточных количеств H₂O₂ может привести к образованию соответствующего сульфоксида. Такие побочные продукты были нами выделены. В масс-спектре ESI (+) наблюдается пик молекулярного иона (1010), соответствующий сульфоксиду Атозибана. Выход Атозибана-ацетата при замыкании дисульфидной связи в растворе составил 31.5% в

расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимерному носителю. Полученные результаты побудили нас продолжить поиски оптимальной методики и перейти к экспериментам замыкания дисульфидной связи на полимерном носителе.

Замыкание S–S-мостика на твердой фазе. Важный аспект замыкания S–S-мостика на твердой фазе – эффект псевдоразбавления, за счет которого при набухании пептидил-полимера в определенном растворителе расстояние между соседними пептидными цепями увеличивается, и взаимодействие между ними становится минимальным, что может имитировать разбавление в растворе. Поэтому мы предполагали, что циклизация Атозибана на полимере поможет нам обойти проблему высоких разбавлений, наблюдающихся при окислении в растворе, и сократить образование побочных продуктов, а также упростить процедуру выделения продукта. Как правило, для замыкания S–S-мостика в различных пептидах требуется подбор специальных условий [11].

Атозибан не содержит в молекуле остатка триптофана, поэтому в качестве окислителя при создании S–S-связи на полимере был выбран I₂, поскольку он хорошо растворим в органических растворителях, обеспечивающих хорошую сольватацию пептидил-полимера, и при его использовании наблюдается прямая конверсия цистеин-защищенного пептида в циклический дисульфид [11]. К настоящему моменту существует довольно большое количество работ по изучению замыкания дисульфидных мостиков на полимерном носителе [14, 23, 24], однако систематиче-

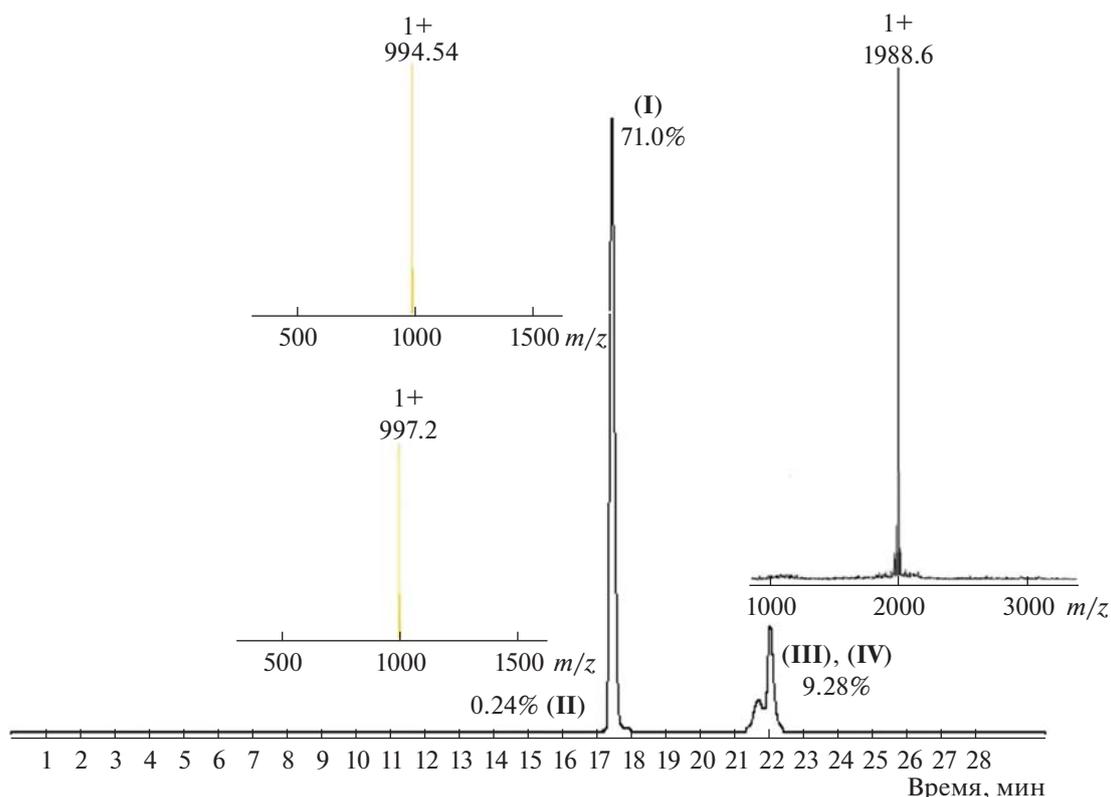
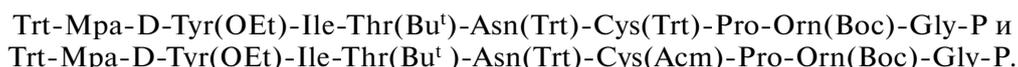


Рис. 1. Профиль аналитической ВЭЖХ и спектры ESI (+) продуктов при замыкании S–S-мостика в Атозибана в растворе в течение 15 мин действием H_2O_2 в смеси $\text{H}_2\text{O}/i\text{-PrOH}$ (1 : 1): (I) – Атозибан, (II) – линейный SH-предшественник Атозибана, (III–V) – димеры.

ских исследований по изучению зависимости количества окислителя, времени проведения циклизации и растворителя на состав образующихся примесей в синтезе Атозибана не проводилось. Мы осуществили серию экспериментов по синте-

зу Атозибана на твердой фазе, включая стадию образования дисульфидного мостика (табл. 2).

На amidном полимере Ринка с использованием двух различных защит остатка цистеина нами было синтезировано два пептидил-полимера:



Конверсию защищенного производного пептида в циклический полупродукт на твердой фазе проводили действием различных избытков иода (3–35 экв.) в таких органических растворителях, как DMF, диоксан и уксусная кислота, при комнатной температуре в течение 1–5 ч (табл. 2).

Наилучшие результаты наблюдаются при использовании в качестве растворителя DMF. При применении же диоксана и уксусной кислоты в одинаковых условиях (10-кратный избыток иода, 1 ч) всегда присутствует большое количество линейного SH-пептида и димеров. Как видно из табл. 2, при увеличении количества окислителя и времени проведения циклизации в реакционной смеси во всех случаях неожиданно нарастает содержание линейного SH-предшественника Ато-

зибана (II) и димеров. При использовании Trt-защиты наиболее полное замыкание S–S-мостика наблюдается при действии трехкратного избытка I_2 в течение 1 ч при комнатной температуре. При этом содержание SH-пептида и димеров составляет менее 7% и не наблюдается других побочных продуктов. Чистота же самого Атозибана составляет более 85%.

Для анализа реакционных смесей получения Атозибана (I) были подобраны условия ВЭЖХ, в которых наблюдалось хорошее разрешение пиков, соответствующих SH-, SS-формам пептида и побочным продуктам (рис. 2). Стоит отметить, что в тех же условиях, но с Acm-защитой на цистеине в реакционной смеси присутствует довольно большое количество SH-пептида (II). Мы

Таблица 2. Влияние условий замыкания S–S-мостика действием I₂ на содержание целевого и побочных продуктов в реакционной смеси при циклизации Атозибана (I) на твердой фазе

№	Защиты Cys и Mpa	Условия циклизации			Состав реакционной смеси по ВЭЖХ, %		
		экв. I ₂	растворитель	время, ч	Атозибан (I)	примеси	
						SH-пептид (II)	димеры (III) + (IV)
1	Trt, Trt	40	DMF	4	11.21	63.73	5.10
2	Trt, Trt	10	DMF	4	35.40	43.80	8.20
3	Trt, Trt	10	DMF	1	44.94	43.28	4.70
4	Trt, Trt	10	Диоксан	1	33.11	36.80	11.20
5	Trt, Trt	10	AcOH	1	42.36	46.80	6.20
6	Trt, Trt	5	DMF	4	67.67	11.69	3.90
7	Trt, Trt	7	DMF	1	67.50	11.80	0.57
8	Trt, Trt	3	DMF	1	85.51	3.71	4.80
9	Acм, Trt	3	DMF	1	75.70	12.90	5.30

идентифицировали продукт (II) (рис. 2), который соответствует направленно полученному SH-предшественнику Атозибана (II). В масс-спектрах ESI (+) наблюдается пик молекулярного иона (997.2), соответствующий SH-пептиду (II). При анализе ¹H-ЯМР-спектров Атозибана (I) и пептида (II) наиболее заметные изменения наблюдаются у сигналов протонов цистеина. Сигнал амидного протона линейного предшественника Атозибана (I) сместился в более сильное поле по сравнению с сигналом амидного протона Атозибана (I): в пептиде (II) – αNH, Cys (7.94 м.д.), в Атозибанае – αNH, Cys (8.44 м.д.). Такая же тенденция наблюдается и для βCH₂-протонов, а именно в пептиде (II) – βCH₂, Cys (2.60; 2.75 м.д.), в Атозибанае – βCH₂, Cys (3.02; 2.85 м.д.). Также изменились сигналы амидных протонов тирозина, треонина и орнитина в пептиде (II): в пептиде (II) – αNH, D-Тур(OEt) (8.15 м.д.), в Атозибанае – αNH, D-Тур(OEt) (8.39 м.д.); в пептиде (II) – αNH, Thr (7.78 м.д.), в Атозибанае – αNH, Thr (7.20 м.д.); в пептиде (II) – αNH, Orn (8.17 м.д.), в Атозибанае – αNH, Orn (8.08 м.д.). Стоит отметить изменение сигналов протонов при β-углеродном атоме в изолейцине: в пептиде (II) – βCH₂, Ile (1.70 м.д.), в Атозибанае – βCH₂, Ile (1.85 м.д.). Таким образом, ¹H-спектр ЯМР и масс-спектр ESI (+) побочного продукта совпадают со спектрами специально полученного сульфгидрильного производного.

При обработке реакционной смеси циклизации H₂O₂ продукт, соответствующий пику пептида (II), переходит в Атозибан (I).

На сегодняшний момент, судя по литературным данным, не существует однозначного представления о механизме замыкания S–S-мостика действием I₂ [17]. Мы предполагаем, что схематически суть происходящего можно объяснить следующим образом (схема 1). При взаимодействии защищенного производного пептида с I₂ первоначально образуется моно-иод-производное (Ib), которое с высокой скоростью внутримолекулярно превращается в циклический продукт (Id). Одновременно с учетом избытка иода образуется и некоторое количество ди-иод-производного (Ic). В пользу этого говорит тот факт, что в наших экспериментах (табл. 2) при увеличении молярного количества иода растет и количество линейного продукта со свободными SH-группами (II). При этом, видимо, ди-иод-производное (Ic) не переходит в продукт (Id), иначе мы должны были бы всегда получать главным образом циклический продукт. Из табл. 2 следует, что при 40-кратном избытке I₂ содержание SH-пептида в реакционной смеси составляло 63.73%, при 10-кратном избытке – 43.8%, а при трехкратном – 3.71%. В случае Acм-защитной группы на цистеине ситуация принципиально не меняется (табл. 2). Мы предполагаем, что скорость внутримолекулярного замыкания цикла в случае тритильного производного выше, чем в случае Acм-производного.

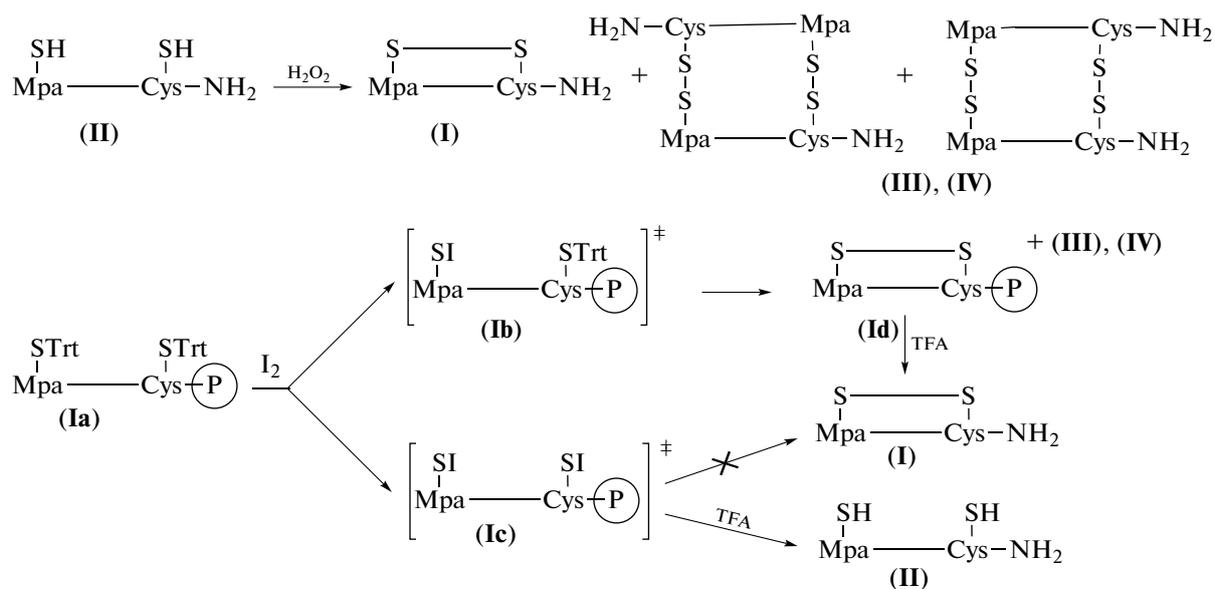


Схема 1. Схема циклизации Атозибана (I) в растворе и на твердой фазе.

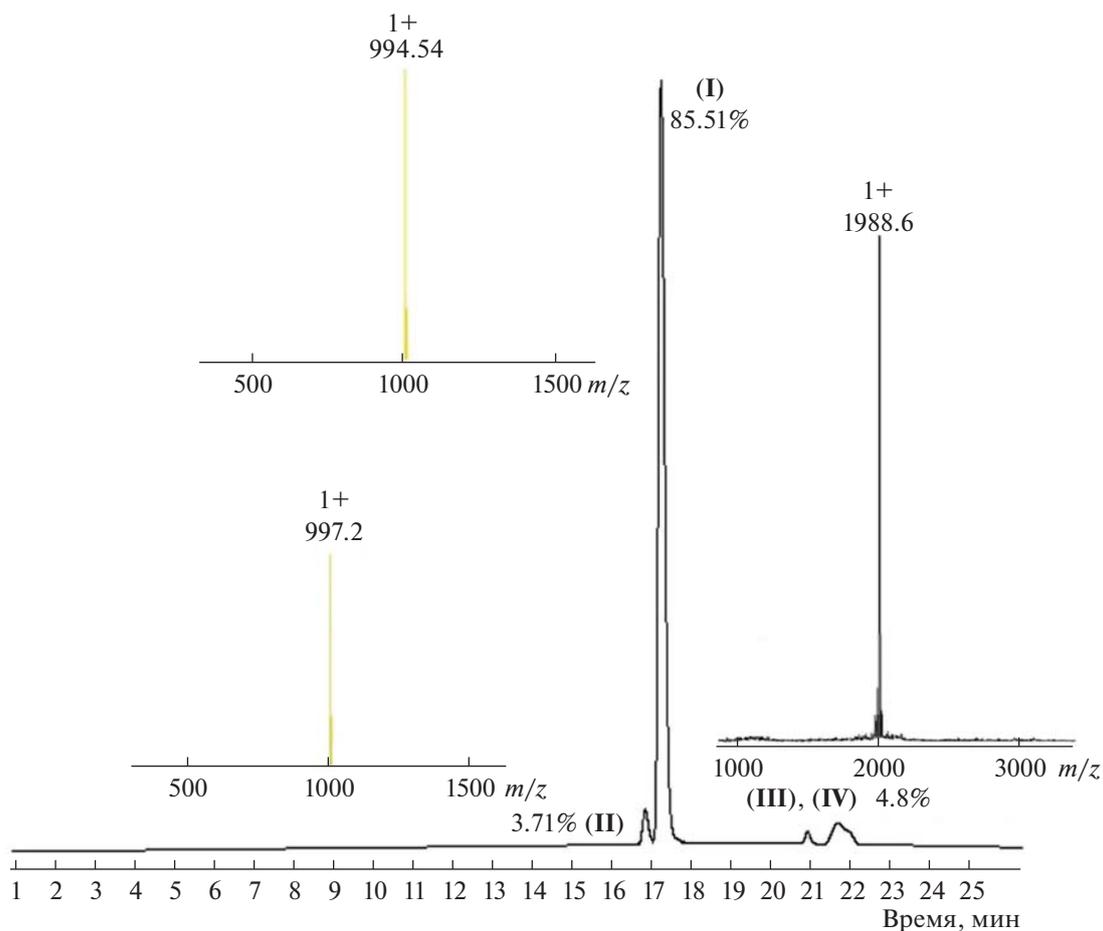


Рис. 2. Профиль аналитической ВЭЖХ и спектры ESI (+) продуктов при замыкании S–S-мостика в Атозибана (I) на твердой фазе в течение 1 ч с использованием 3 экв. I₂ в DMF: (I) – Атозибан, (II) – линейный SH-предшественник Атозибана, (III–V) – димеры.

Как видно из табл. 2, во всех случаях при циклизации в DMF содержание димеров в реакционной смеси меньше, чем при циклизации в растворе.

Выход Атозибана-ацетата (**I**) при замыкании дисульфидной связи на полимере составил 50%.

Сравнительная оценка замыкания S—S-мостика на твердой фазе и в растворе. Несмотря на то что время замыкания S—S-мостика в растворе меньше (не более 15 мин) и существует возможность контроля полноты протекания с помощью теста Элмана и ВЭЖХ, плюсов проведения окисления на твердой фазе оказалось больше: во-первых, отсутствует проблема растворимости; во-вторых, существенно упрощается процесс обработки реакционной массы, путем нескольких промывок пептидил-полимера при обычной фильтрации удается полностью удалить избыток окислителя; в-третьих, нам удалось добиться практически полного отсутствия димеров при циклизации на полимере. Возможно, уменьшение степени замещения смолы при твердофазном синтезе позволит свести к минимуму образование димеров. Главное преимущество циклизации на полимере — увеличение суммарного выхода Атозибана (**I**) на стартовую аминокислоту (50% по сравнению с 31.5% в растворе).

Разработанная методика была успешно использована для синтеза Атозибана (**I**) в укрупненном масштабе (10–20 ммоль).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот L- и D-ряда (Fluka, Швейцария); тритил-3-меркаптопропионовую кислоту (Trt-Mpa), DMF, NMM, НОВт, ТВТУ, TIS, DTNB — реагент Элмана, дихлорметан и трифторуксусную кислоту (Fluka, Швейцария); уксусную кислоту, металлический иод, аскорбиновую кислоту (о.с.ч.; Реахим, Россия). Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил (CH₃CN; Carl Roth GmbH, Германия).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Knauer 1001A (Германия) на колонке (4.6 × 250 мм) Kromasil 100-5 ODS (Швеция), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор порядка 100 Å. В качестве элюентов использовали буфер А (0.05 М КН₂РО₄, рН 3.0) и буфер Б (70%-ный ацетонитрил в буфере А), элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А (20–80% за 30 мин), детекция при длине волны 220 нм. Препаративную ВЭЖХ Атозибана осуществляли с использованием прибора Knauer 1001 (Германия) на колонке Kromasil 50 × 250 мм с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А (0.01 М водный раствор ацетата аммония, рН 4.5, содержащий 3% ацетонитрила) и буфер Б (70%-ный ацетонитрил в буфере А). Элюцию проводили со

скоростью 20 мл/мин от 100% буфера А в градиенте концентраций буфера Б (0.5%/мин). Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизировали.

¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 (500 МГц; Bruker, Германия) в DMSO-*d*₆ при 300 К, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл, химические сдвиги (δ, м.д.) измеряли относительно тетраметилсилана. Приведены значения химических сдвигов (δ, м.д.). Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводили с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Масс-спектры регистрировали на приборе Amazon (Bruker, Германия) методом электрораспылительной ионизации (ESI) в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре — 3500 В). Диапазон сканирования масс, *m/z* — 70–2200. Применяли шприцевый ввод образца, растворенного в смеси CH₃CN—вода. Газ-распылитель — азот, температура интерфейса — 100°C.

Твердофазный синтез Атозибана (I**). Получение *Trt-Mpa-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr(Bu^t)-Asn(Trt)-Cys(Trt)-Pro-Orn(Boc)-Gly-полимера (Ia).* Синтез пептида проводили в ручном режиме из 8 г (5.44 ммоль) полимера Ринка (Novabiochem, Великобритания) с содержанием аминокислотных групп 0.68 ммоль/г. Снятие Fmoc-защиты с α-аминогруппы проводили последовательно раствором 5%-ного 4-метилпиперидина и 2%-ного 1,8-дизабицикло[5.4.0.]ундец-7-ена (DBU) в DMF в течение 5 и 10 мин. Аминокислотные цепи удлиняли в соответствии со стандартными процедурами одностадийного цикла, включающего 30-минутную активацию присоединяемой аминокислоты (16.32 ммоль) в присутствии эквимольных количеств DIC и НОВт в смеси NMP и DMF (1 : 1). Цикл синтеза включал все необходимые промывки пептидил-полимера DMF и тест с нингидрином на остаточные аминокислотные группы [18]. Аликвоты пептидил-полимера (**Ia**), содержание пептида в которых составляло ~0.5 ммоль, использовали для тестовых синтезов Атозибана (**I**), условия и результаты которых представлены в табл. 1 и 2. Основную часть нонапептидил-полимера (**Ia**) с содержанием пептида 3.6 ммоль использовали для получения целевого продукта (**I**). Для оценки качества промежуточного нонапептида образец N^α-свободного пептидил-полимера (**Ia**) обрабатывали деблокирующей смесью TFA/TIS/H₂O (90 : 5 : 5 v/v/v) в течение 1 ч. После осаждения продукта диэтиловым эфиром содержание основного вещества в образце составило 89% по данным ВЭЖХ.**

Получение *Mpa*¹-*D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys*⁶-*Pro-Orn-Gly-NH₂* циклического 1,6-дисульфида (**I**).

а) Замыкание *S-S*-связи в растворе. Твердофазный синтез нонапептидил-полимера (**Ia**) проводили по описанной выше методике из 15.3 г (7.2 ммоль) амидного полимера Ринка с содержанием аминокрупп 0.48 ммоль/г. Пептидил-полимер (**Ia**) (28.5 г), полученный по окончании синтеза, суспендировали в охлажденной до 4°C смеси, содержащей 200 мл TFA, 10 мл деионизованной воды, 10 мл TIS и 10 г DTT, и перемешивали в течение 2 ч. Полимер отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2 × 30 мл), смесью CH₂Cl₂/TFA (1 : 1, 2 × 30 мл), фильтрат упаривали до маслообразного состояния. Продукт осаждали охлажденным диэтиловым эфиром, отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (2 × 30 мл), этилацетатом (2 × 30 мл), высушивали при комнатной температуре. Сырой продукт твердофазного синтеза (7.1 г) растворяли в 800 мл смеси *i*-PrOH/CH₃CN/H₂O в соотношении 2 : 1 : 5 (v/v/v). К полученному раствору при перемешивании добавляли 3 мл 2%-ного водного раствора NH₄OH (pH 8.0–9.0) и 5 мл 3%-ного водного раствора H₂O₂. Полноту образования дисульфидной связи проверяли при помощи реактива Элмана и ВЭЖХ. По окончании циклизации в реакционную смесь добавляли AcOH до pH 4.0, упаривали органические растворители в вакууме, продукт очищали с помощью ВЭЖХ. Выход Атозибана-ацетата составил 2.39 г (31.5% в расчете на стартовую аминокислоту).

Масс-спектр ESI⁺, *m/z* (*I*_{отн}, %): 994.54 (100) [*M*]⁺. Чистота (ВЭЖХ): 99.66%.

Спектр ¹H-ЯМР приведен в дополнительных материалах.

б) Замыкание *S-S*-связи на твердой фазе. К суспензии 10 г нонапептидил-полимера (**Ia**) (3.62 ммоль) в 400 мл DMF добавляли 100 мл раствора иода (10.86 ммоль) в DMF и энергично перемешивали в течение 2 ч, пептидил-полимер отфильтровывали, промывали на фильтре DMF (3 × 100 мл). Затем избыток иода удаляли 10%-ным раствором аскорбиновой кислоты в смеси DMF/H₂O 2 : 1 (2 × 100 мл), пептидил-полимер отфильтровывали, промывали на фильтре DMF (3 × 100 мл), дихлорметаном (3 × 100 мл) и высушивали. Отщепление пептида от полимера проводили в одну стадию путем обработки пептидил-полимера 85 мл смеси (90% TFA, 5% деионизованной воды, 5% TIS) при комнатной температуре в течение 1.5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2 × 40 мл). Фильтрат упаривали до маслообразного состояния, осаждали продукт 85 мл диэтилового эфира, отфильтровывали выпавший осадок, промывали диэтиловым эфиром (2 × 40 мл).

Получили 3 г белого порошка. Содержание основного вещества в образце по данным ВЭЖХ составило 85.51%. Сырой продукт растворяли в 150 мл воды, pH реакционной смеси доводили 2.5%-ным раствором аммиака до 6.5–7.5. При перемешивании к гомогенному раствору добавляли 0.6 мл 3%-ной H₂O₂. Полноту образования дисульфидной связи проверяли при помощи реактива Элмана [18] и ВЭЖХ. К раствору добавляли AcOH до pH 4.0–5.0 и очищали с помощью ВЭЖХ. Выход Атозибана-ацетата составил 1.9 г (50% в расчете на стартовую аминокислоту).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная нами методика позволяет получить технический Атозибан чистотой более 85% с образованием димерных продуктов менее 5%, что открывает возможности внедрения этой методики в промышленное производство.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО “Обнинская химико-фармацевтическая компания”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers R.D. // Peptides. 1994. V. 15. P. 367–381. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90025-6)
2. Kondo F., Okada S., Miyachi A., Kurita M., Tsuji K., Harada K. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 7. P. 1783–1791. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5635-6>
3. Schteingart C.D., Lau J.L. // Annual Reports in Medicinal Chemistry. 2017. V. 50. P. 543–586. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2017.08.003>
4. Авдеев Д.В., Сидорова М.В., Овчинников М.В., Моисеева Н.И., Осипов В.Н., Балаев А.Н., Хачатрян Д.С. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 374–379. [Avdeev D.V., Sidorova M.V., Ovchinnikov M.V., Moiseeva N.I., Osipov V.N., Balaev A.N., Khachatryan D.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 248–252.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019040034>
5. Kyncl J., Rudinger J. // J. Endocr. 1970. V. 48. P. 157–165. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0480157>

6. Gajjar K., Martin-Hirsch P.P., Bryant A., Owens G.L. // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016. V. 7. P. 1–81.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD006120.pub4>
7. Mannucci P.M. // Haemophilia. 2000. V. 6. P. 60–67.
8. Ronald F.L., Ronald Kam K.Y. // Expert Rev. 2008. Obstet. Gynecol. V. 3. P. 163–174.
<https://doi.org/10.1586/17474108.3.2.163>
9. Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Bo Nilsson, Verlander M. // Biopolymers. 2000. V. 55. P. 227–250.
[https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7)
10. Musaimi O.A., Shaer D. Al., de la Torre B.G., Albericio F. // Pharmaceuticals. 2018. V. 11. P. 1–10.
<https://doi.org/10.3390/ph11020042>
11. Кудрявцева Е.В., Сидорова М.В., Евстигнеева Р.П. // Усп. химии. 1998. Т. 67. С. 611–630.
12. Rabenstein D.L., Yeo P.L. // J. Org. Chem. 1994. V. 59. P. 4223–4229.
<https://doi.org/10.1021/jo00094a039>
13. Жмак М.Н., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Вольпина О.М., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 83–88. [Zhmak M.N., Kashesheverov I.E., Utkin Yu.N., Tsetlin V.I., Vol'pina O.M., Ivanov V.T. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2001. V. 27. P. 67–71.]
<https://doi.org/10.1023/A:1011319101676>
14. Andreu D., Albericio F., Solé N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G. // Methods Mol. Biol. 1994. V. 35. P. 91–169.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-273-6:91>
15. Fujii N., Otaka A., Funakoshi S., Bessho K., Watanabe T., Akaji K., Yajima H. // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. P. 2339–2347.
16. Koide T., Otaka A., Suzuki H., Fujii N. // Synlett. 1991. V. 345. P. 1
<https://doi.org/10.1002/chin.199205259>
17. Góngora-Benítez M., Tulla-Puche J., Albericio F. // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 901–926.
<https://doi.org/10.1021/cr400031z>
18. Bray B.L. // Nat. Rev. 2003. V. 2. P. 586–593.
<https://doi.org/10.1038/nrd1133>
19. Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Азьмуко А.А., Овчинников М.В., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Писаренко О.И. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 145–154. [Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Az'muko A.A., Ovchinnikov M.V., Molokoedov A.S., Bushuev V.N., Pisarenko O.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 18–26.]
<https://doi.org/10.1134/S106816201901014X>
20. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Азьмуко А.А., Кудрявцева Е.В., Краузе Е., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биоорг. химия. 2004. Т. 30. С. 115–125. [Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Az'muko A.A., Kudryavtseva E.V., Krause E., Ovchinnikov M.V., Bespalova Zh.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 101–110.]
<https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000023093.05123.31>
21. Moroder L., Besse D., Musiol H.-J., Rudolph-Boehner S., Sideler F. // Biopolymers. 1996. V. 40. P. 207–234.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1996\)40:2<207::aid-bip2>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1996)40:2<207::aid-bip2>3.0.co;2-#)
22. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. P. 70–77.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
23. Albericio F., Hammer R.P., García-Echeverría C., Molins M.A., Chang J.L., Munson M.C., Pons M., Giralt E., Barany G. // Int. J. Pept. Protein Res. 1991. V. 37. P. 402–413.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb00755.x>
24. Garcia-Echeverria C., Albericio F., Pons I.M., Barany G., Giralt E. // Tetrahedron Letters. 1989. V. 30. P. 2441–2444.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80422-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80422-6)

Development of an Optimal Method for Closing the Disulfide Bond in the Synthesis of Atosiban – Antagonist of Oxytocin Receptors

D. V. Avdeev*, #, M. V. Ovchinnikov*, Y. S. Dudkina*, A. S. Molokoedov*, A. A. Azmuko*, M. E. Palkeeva*, and M. V. Sidorova*

#Phone: +7 (915) 051-25-55; e-mail: mityaavdeev93@mail.ru

*National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

This work is devoted to large-scale solid-phase synthesis (SPS) of Atosiban – Mpa¹-D-Tyr(OEt)-Ile-Thr-Asn-Cys⁶-Pro-Orn-Gly-NH₂ 1,6 disulfide – the only clinically used oxytocin receptor antagonist. The conditions have been selected for the closure of the disulfide bond (S–S) in the Atosiban molecule both in solution and in the course of SPS with minimal formation of by-products. A comparative assessment of the formation of S–S bonds was carried out in various conditions. The by-products formed during the closure of the disulfide bond have been studied both in solution and on a polymer support. A technique has been developed that allows the synthesis of Atosiban on an enlarged scale, including the cyclization of a protected intermediate with the formation of an S–S bond during solid-phase synthesis, with minimal formation of by-products.

Keywords: oxytocin receptor antagonist, Atosiban, solid-phase synthesis, disulfide bond closure