

博士論文

論文題目 保護基と縮合剤の使用を最小限に抑えた
クリーンなペプチド合成法の開発研究

氏名 松本 拓也

Contents

Abbreviations	iii
Chapter 1. Chemical Synthesis of Peptides	1
1.1. Background	1
1.2. Strategy	3
Chapter 2. Development of Straightforward Synthesis of Peptidyl Thioacid Using Thioacetic Acid	6
2.1. Background	6
2.2. Strategy	6
2.3. Development of Straightforward Synthesis of Peptidyl Thioacid Using Thioacetic Acid	7
2.4. Isolation of Peptidyl Thioacid	14
2.5. Summary of Chapter 2	17
2.6. Experimental	18
Chapter 3. Total Synthesis of Leuprorelin through Iterative Peptide Fragment Coupling Reaction between 2,4-Dinitrobenzenesulfonamide and Thiocarboxylic Acid	
3.1. Background	21
3.2. Strategy	28
3.3. Total Synthesis of Leuprorelin	29
3.4. Study for the Application to Peptide Chain Elongation Process from One by One Residue by Using 2,4-Dinitrobenzenesulfonylamino Acid	37
3.5. Summary of Chapter 3	38
3.6. Experimental	39

Chapter 4. Development of Peptide Bond Forming Reaction between Peptidyl Thioacid and Non-Protected Amino Acid	43
4.1. Background & Preliminary Experiment	43
4.2. Metal Complex for Thioacid Activation	45
4.2.1. Optimizing Reaction Conditions	45
4.2.2. Scope & Limitation	61
4.2.3. Unsuccessful Attempts for Catalytic Activation	63
4.3. Oxidant for Thioacid Activation	65
4.4. Thiosulfinate, Thiosulfonate, and Disulfide for Thioacid Activation	68
4.4.1. Catalyst Design	68
4.4.2. Search for Catalyst Moiety	69
4.4.3. Search for Epimerization-Suppressing Moiety	74
4.5. Trifluoroacetophenone Imine for Thioacid Activation	78
4.6. Summary of Chapter 4	81
4.7. Experimental	82
Conclusion	92
Acknowledgement	94

Abbreviations

AA	amino acid
Ac	acetyl
Ala	alanine
Ar	aryl or argon
Arg	arginine
Asn	asparagine
bipy	2,2'-bipyridyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamide
C18	octadecylsilyl
cat.	catalyst or catalytic amount
Cbz	benzyloxycarbonyl
Cys	cysteine
DCM	dichloromethane
DIH	1,3-diiodo-5,5-dimethylhydantoin
DIPCI	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine (Hünig base)
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	2,4-dinitrobenzenesulfonyl
eq.	equivalents
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
FT	Fourier transform
GFP	green fluorescent protein
Gly	glycine
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
His	histidine
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole

HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOObt	3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-one
HPLC	high performance liquid chromatography
h	hour
Ile	isoleucine
IPA	2-propanol
Leu	leucine
LPPS	liquid-phase peptide synthesis
M	molar
<i>m</i> CPBA	3-chloroperoxybenzoic Acid
Me	methyl
Met	methionine
min.	minute
MS	mass spectrometry
ⁿ Bu	<i>normal</i> -butyl
NCL	native chemical ligation
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimide
n.d.	not detected
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
ODS	octadecylsilyl
Oxone [®]	2KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄
Oxyrna	ethyl (hydroxyimino)cianoacetate
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	polyethylene glycol
PG	protecting group
pGlu	pyroglutamic acid or 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid
Ph	phenyl
Phe	phenylalanine
phen	1,10-phenanthroline
Pro	proline
RP	reverse-phase
r.t.	room temperature
Ser	serine

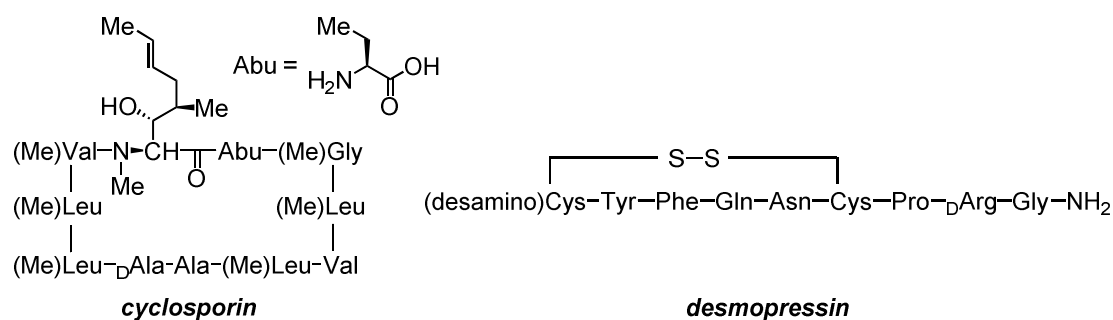
S.M.	starting material
SPPS	solid-phase peptide synthesis
TBA	tetrabutylammonium
TBP	tetrabutylphosphonium
^t Bu	<i>tertiary</i> -butyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
TIPS	triisopropylsilane
TLC	thin layer chromatography
T.M.	target material
Tmob	2,4,6-trimethoxybenzyl
TMS	trimethylsilyl
tR	retention time
Trp	tryptophan
Trt	trityl (triphenylmethyl)
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
Tyr	tyrosine
WSCl	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide

Chapter 1 Chemical Synthesis of Peptides

1.1. Background

ペプチドは生体内で多様な機能を果たしている¹。創薬分野においてもペプチドは、小分子薬の有する、経口投与可能性・低製造コストという利点と、生物製剤の有する、高選択的・高有効性・低毒性という利点を併せ持つ化合物群として注目を集めている²。ペプチドの医薬品応用を考えた場合、DNA にコードされた 20 種類の *L*-アミノ酸のみで構成されたペプチドでは、(1) 主鎖アミド基を含めた多数の極性官能基の水素結合供与・受容能に起因する細胞膜透過性の低さ、(2) 生体内に存在する種々の酵素による加水分解や酸化反応を受けやすいが故の代謝安定性の低さ、に難があり物性の改善が必要となる。これらの問題には、*D*-アミノ酸や *N*-アルキルアミノ酸といった非 DNA コードアミノ酸の導入やペプチド鎖の環化などが有効とされている。例えば、経口投与可能なペプチド医薬として、免疫抑制剤であるシクロスポリンやバソプレシン誘導体であるデスマプレシンなどが挙げられる (Figure 1)。シクロスポリンでは、アミノ酸 11 残基の内 7 残基が *N*-メチルアミノ酸から構成され水素結合供与能が消失していると同時に、残りのアミド基 NH プロトンに関しても環状構造を採ることによる分子内の強固な水素結合形成によりその水素結合供与能が減ぜられている。デスマプレシンでは、ジスルフィド結合により環状構造を採ると同時に、1 残基目のシステインアミノ基の欠損、8 残基目のアルギニンの *D* 体への変異を導入することで天然のホルモンに比べ高い生体内持続性を実現している。

Figure 1. Structures of cyclosporin and desmopressin



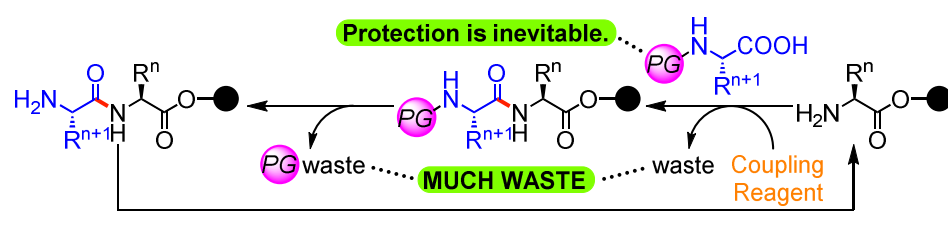
¹ Dewick, P. M. *Medicinal Natural Product: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed., Chapter 7; Wiley, 2009.

² ペプチド医薬についての総説: (a) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. "Peptide therapeutics: current status and future directions", *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122. (b) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. "The future of peptide-based drugs", *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136. 製薬会社における近年のペプチド医薬の開発状況について: (c) Kaspar, A. A.; Reichert, J. M. "Future directions for peptide therapeutics development", *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 807. (d) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatskiy, M. "Synthetic therapeutic peptides: science and market", *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 40.

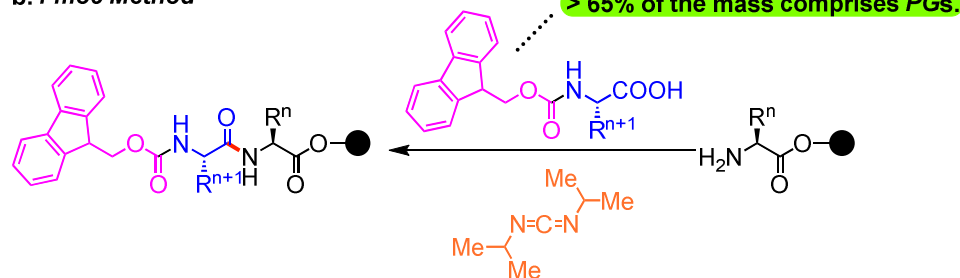
自然界においても、リボソーム系・非リボソーム系経路に関わらず広くこれらの特殊構造を有するペプチドは数多く見られるが¹、一切の制限なく自在にペプチド鎖へと組み込む方法としては化学合成法が現在のところ唯一の手段である。しかしながら既存の合成法では、縮合剤や保護基由来の廃棄物が大量に産生するため合成プロセスの原子効率が低く、環境負荷や製造コストの上昇が問題となっている³ (Scheme 1a)。例えば、研究室規模での探索段階から工場規模の医薬品製造段階までにわたり最もよく用いられる Fmoc 法では、原料となるアミノ酸源の平均分子量比でおよそ 65%が Fmoc 保護基である(Scheme 1b)^{3a}。ペプチド化学合成法は、1963 年に Merrifield より報告されたペプチド固相合成法⁴の登場以来、その基本構造をほぼ変えずに発展を遂げ現在に至る(Scheme 1a)。総工程数は多くなるものわずか数種類の基本反応のみからなるペプチド合成プロセスを環境負荷や製造コストの点で革新し、ペプチド医薬を全世界に遍く行き届けるためには、最も基本となるペプチド結合形成反応の根本的な改善が極めて重要になる。

Scheme 1. Conventional peptide synthesis

a. C-Terminal to N-Terminal Elongation & Coupling Reagents



b. Fmoc Method



³ (a) Bray, B. L. “Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis”, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 587. (b) Thundimadathil, J. “Challenges in the large scale production of peptides”, *Speciality Chemicals Magazine* **2013**, 26.

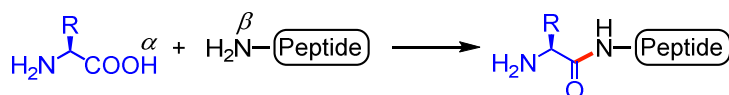
⁴ (a) Merrifield, R. B. “Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide”, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149. (b) Merrifield, R. B. “Solid Phase Peptide Synthesis”, *Science* **1986**, 232, 341.

1.2. Strategy

アミドは、最も一般的にはカルボン酸とアミンを脱水縮合することで得られる。しかしながらこれらの化合物を混ぜるのみでは、酸 - 塩基反応による塩形成が熱力学的に最も有利であるため、自然にアミドが生成することはない。脱水縮合を促進するために、少なくとも一方の官能基で何らかの活性化が必要となる⁵。ペプチド鎖の伸長を考えた場合、仮に片方の官能基のみを活性化するとしても、活性化点として 4 つの可能性が考えられる (Scheme 2)。

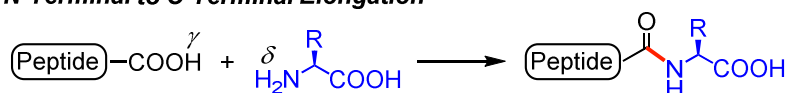
Scheme 2. Possible activation patterns in peptide-bond formation

C-Terminal to N-Terminal Elongation



- a. activation at the carboxyl group of amino acid (α position)
- b. activation at the amino group of peptide (β position)

N-Terminal to C-Terminal Elongation



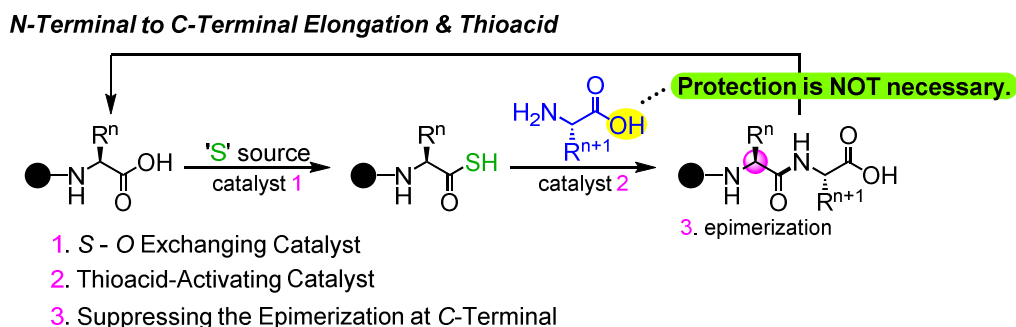
- c. activation at the carboxyl group of peptide (γ position)
- d. activation at the amino group of amino acid (δ position)

この中で既存法は、*N*末端保護アミノ酸のカルボキシル基活性化型反応である (Scheme 2a)。アミノ酸活性化型反応 (Scheme 2a, 2d) ではいずれも、生成物ペプチドと出発物ペプチド間の反応点の区別が原理的に困難であるため、単一の生成物を与えるプロセスへ導くには適切なアミノ酸保護が必要となる。しかしこれは原子効率の観点で欠点となる。残る二つのペプチド活性化型反応 (Scheme 2b, 2c) のうち、活性化前駆体 (カルボン酸もしくはアミン) から活性化型への直接的官能基変換が比較的容易だと考えられるカルボキシル基活性化型 (Scheme 2c) が、開発反応の原子効率の観点からより優れた方法になり得るのではないかと考えた。つまり、ペプチド *C* 末端を一度別の活性化型に変えることにより、生成物ペプチド *C* 末端酸素原子との必要最小限の区別が可能になるため、主鎖無保護アミノ酸を利用した原子効率に優れたペプチド鎖伸長が可能になると考えた。しかしながらこの場合、エピ化というペプチド化学合成において最大の問題に直面する可能性がある (後述)。

⁵ Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. "Rethinking about amide bond synthesis", *Nature* **2011**, 480, 471.

以上の背景および戦略を踏まえ、私は本学博士課程において、縮合剤及び主鎖保護基の使用を回避するために、チオカルボン酸(以下、チオ酸)を経る従来法とは逆方向の *N* 末端から *C* 末端へとペプチド鎖を伸長する、ペプチド合成プロセスの開発に取り組んだ(Scheme 3)。

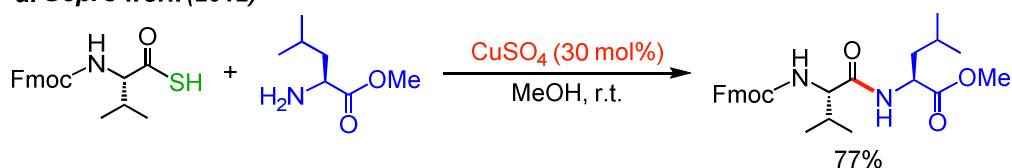
Scheme 3. Reaction design & issues



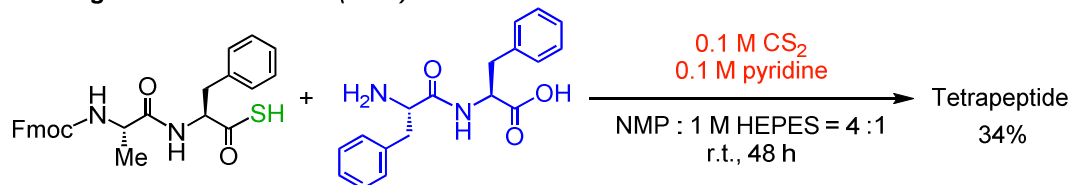
チオカルボキシル基は、カルボキシル基と比較しても一原子のみの違いである一方、これまでに数多くのチオカルボキシル基特有の活性化法によるアミド結合形成反応が報告されている⁵。特に近年では、Gopi らによる硫酸銅を用いた触媒的ペプチド結合形成反応(Scheme 4a)⁶や、Houghten・Yu らによる安価な二硫化炭素を用いた無保護アミノ酸も基質とするペプチド結合形成反応(Scheme 4b)⁷などが報告されている。カルボキシル基からチオカルボキシル基への変換反応の原子効率に難を残してはいた(Chapter 2 参照)ものの、活性型カルボキシル基としてチオカルボキシル基は最適であると考えた。

Scheme 4. Selected peptide bond forming reactions using peptidyl thioacid

a. Gopi's work (2012)



b. Houghten' and Yu's work (2013)



⁶ Mali, S. M.; Jadhav, S. V.; Gopi, H. N. "Copper(II) mediated facile and ultra-fast peptide synthesis in methanol", *Chem. Commun.* **2012**, 48, 7085.

⁷ Chen, W.; Shao, J.; Hu, M.; Yu, W.; Giulianotti, M. A.; Houghten, R. A.; Yu, Y. "A traceless approach to amide and peptide construction from thioacids and dithiocarbamate-terminal amines", *Chem. Sci.* **2013**, 4, 970.

目的とするペプチド合成プロセス実現のために私は、(1) 原子効率に優れたペプチドチオ酸の合成法の開発、(2) ペプチドチオ酸の触媒的活性化法の開発、(3) ペプチド C 末端活性化に付随した分子内環化(オキサゾロン中間体形成)によるエピ化過程の抑制、という三つの課題を設定し研究に着手した(Scheme 3)。この中でも特にエピ化過程の抑制については長年の未解決問題⁸であり、C 末端活性化型ペプチドを経由した N 末端から C 末端への逐次的ペプチド鎖伸長法の実現を阻む最大の難関となっている⁹。

以下、まず Chapter 2 では、チオ酢酸を硫黄源として用いたペプチドチオ酸の直截的新規合成法の開発研究について述べる。Chapter 3 では、開発したペプチドチオ酸合成法の実用性を示すべく、ジニトロベンゼンスルホニルペプチドとのカップリング反応を利用した非天然型ペプチド医薬リユープロレリンの収束的合成について述べる。そして Chapter 4 では、新規ペプチド伸長法の実現を見据えた、ペプチドチオ酸と主鎖無保護アミノ酸間の縮合反応の開発研究について述べる。

⁸ 問題の解決に向けた取り組みとして、例えば Chan-Lam-Evans カップリングを利用した、報告(Popovic, S.; Bieräugel, H.; Detz, R. J.; Kluwer, A. M.; Koole, J. A. A.; Streefkerk, D. E.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. “Epimerization-free C-terminal peptide activation”, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16934.)などがあるが、実際の応用には程遠いものとなっている。

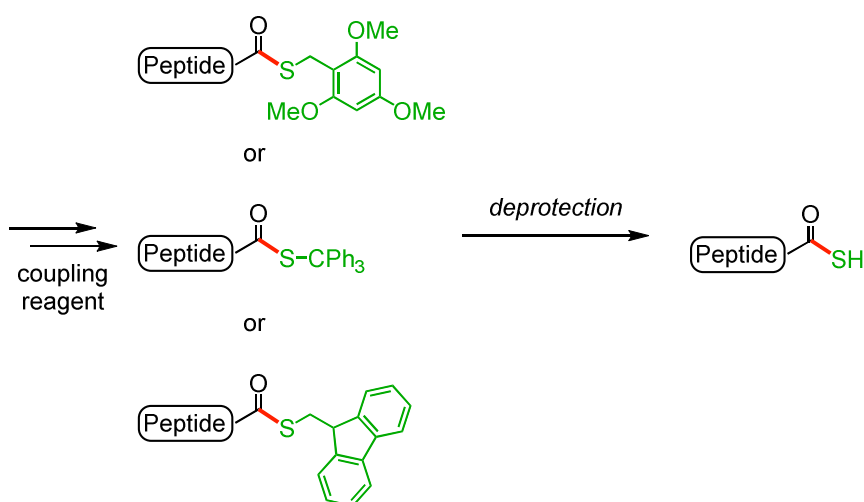
⁹ 固相合成法では、古くは Merrifield らによりアシルアジドを経由した方法(Felix, A. M.; Merrifield, R. B. “Azide solid phase peptide synthesis”, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1385.)が報告され、近年では Cu(OBT)₂ と DIPCDI を利用した Albericio らの取り組み(Thieriet, N.; Guibé, F. Albericio F. “Solid-phase peptide synthesis in the reverse (N → C) direction”, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1815.)などがある。液相合成法では、Katritzky らによるアシルベンゾトリアゾールを経由した方法((a) Abdelmajeid, A.; Tala, S. R.; Amine, M. S.; Katritzky, A. R. “Tri-, tetra- and pentapeptidoylbenzotriazoles: Novel synthetic intermediates”, *Synthesis* **2011**, *18*, 2995. (b) Katritzky, A. R.; Angrish, P.; Todadze, E. “Chiral acylation with N-(protected α-aminoacyl)benzotriazoles for advantageous syntheses of peptides and peptide conjugates”, *Synlett* **2009**, *15*, 2392.)が報告されている。エピ化抑制のためには厳密な温度調整を必要とするが、無保護のアミノ酸を繰り返し用いてエピ化が問題となり得る配列のペプチドを N 末端から C 末端へと伸長している点で、今回の研究内容と最も関連性の高い論文の一つであるといえよう。

Chapter 2 Development of Straightforward Synthesis of Peptidyl Thioacid Using Thioacetic Acid

2.1. Background

従来のペプチドチオ酸合成法は、チオエステルを経た複数工程を要するものであり、原子効率に乏しいという問題があった(Scheme 5)¹⁰。具体的には、まず縮合剤を用いてチオ酸を保護体(トリメトキシベンジルチオエステル、トリフェニルメチルチオエステル、フルオレニルメチルチオエステルなど)として得た後、チオエステルの精製と引き続き脱保護を行い、チオ酸を得ている。多くの場合、チオ酸は単離精製することなく次反応へと用いられる。Scheme3 で示したペプチド合成法の実現に向け、まずは保護・脱保護過程を経ない直截的ペプチドチオ酸合成法の開発が必要だと考えた。

Scheme 5. Conventional peptidyl thioacid synthesis



2.2. Strategy

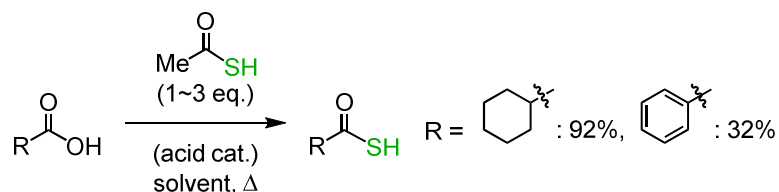
榊三協化成のグループは、(ブレンステッド・ルイス)酸触媒存在下の化学平衡に基づく、チオ酢酸を硫黄源として用いたカルボキシル基をチオカルボキシル基へと一段階で変換する方法を報告している(Scheme 6)¹¹。適応基質の中にペプチドは報告されていなかったが、無保護のヒドロキシル基やアミノ基存在下でも反応が進行するという高い官能基許容性についても言及されている。原子効率に優れたこの方法を参考に、ペプチドチオ酸合成条件

¹⁰ 例外として例えば Yudin らは、報告中一例のみだが硫化ナトリウムと CDI を用いてジペプチドチオ酸を得ている(Assem, N.; Natarajan, A.; Yudin, A. K. “Chemoselective peptidomimetic ligation using thioacid peptides and aziridine templates”, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10986.). この報告でもチオ酸の単離精製や解析などは行われず次の反応へと用いられている。

¹¹ JP2011051959 (A)

の最適化を行うこととした¹²。

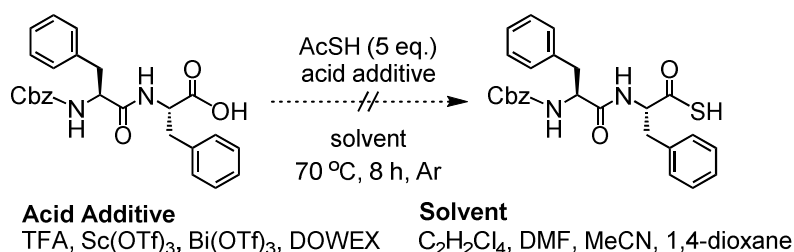
Scheme 6. Thioacid synthesis using thioacetic acid by Sankyo Kasei



2.3. Development of Straightforward Synthesis of Peptidyl Thioacid Using Thioacetic Acid

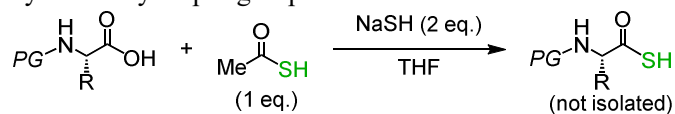
まず初めに、三協化成グループの条件でペプチドチオ酸が生成されるかどうかの確認を行った(Scheme 7)¹³。報告では、炭化水素系溶媒もしくはハロゲン系溶媒を用いると共に、酸触媒の添加が有効とされていた。しかしながら、*N*末端が Cbz 保護されたジペプチド Cbz-Phe-Phe-OH を基質とした場合、同条件下では対応するチオ酸は得られなかった。また、ジペプチドの溶解性を向上させる目的でいくつかの極性溶媒でも検討を行ってみたものの、やはりジペプチドチオ酸は得られなかった。

Scheme 7. Initial trials of peptidyl thioacid formation in Sankyo Kasei's conditions



¹² なお、我々が研究を行っている最中に Gopi らのグループによって、チオ酢酸と硫化水素ナトリウムを用いたアミノ酸誘導体のチオ酸合成法が報告された(Mali, S. M.; Gopi, H. N. "Thioacetic acid/NaSH-mediated synthesis of *N*-protected amino thioacids and their utility in peptide synthesis", *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2377.). しかしながら、この報告では基質としてペプチドは用いられておらず、チオ酸の単離精製も行っていない。

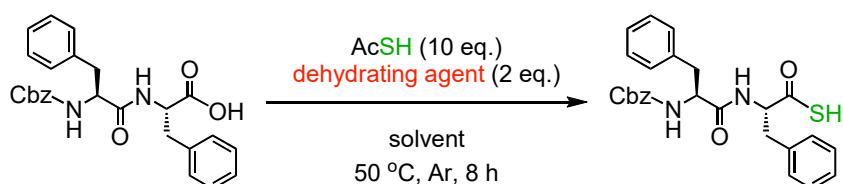
Scheme A. Thioacid synthesis by Gopi's group



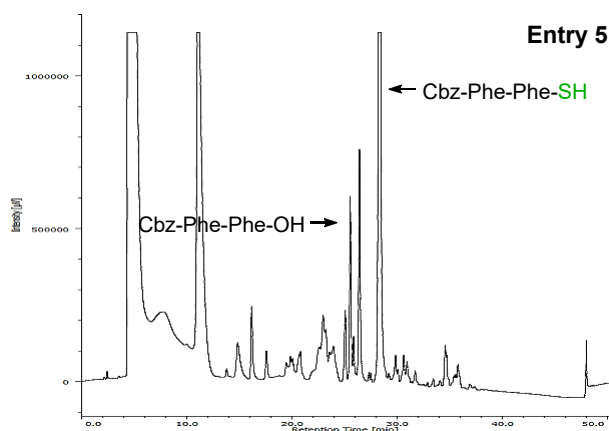
¹³ ペプチドでの検討前に、シクロヘキサンカルボン酸を用いて特許記載条件(Scheme 6)の再現性を確認した。その結果 NMR 収率 57%で対応するチオ酸の生成を確認することができた。

そこで、酸素-硫黄原子交換を促進するために脱水剤の添加を試みた(Table 1)。無水酢酸誘導体の添加を試した結果、ジアセチルスルフィドを添加した際に、反応系は複雑化したものの、目的のチオ酸が主生成物として得られることを見出した(entry 5~6)。

Table 1. Screening of dehydrating agents



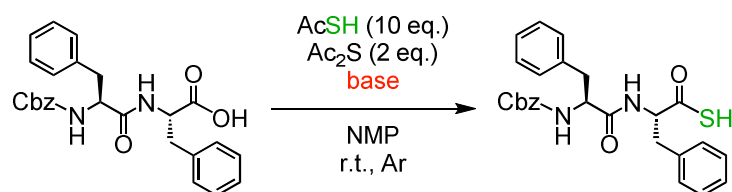
Entry	dehydrating agent	solvent	comments
1	TFAA	C ₂ H ₂ Cl ₄	S.M. was major.
2	TFAA	dioxane	no reaction
3	Cl ₃ CCOCl	C ₂ H ₂ Cl ₄	S.M. was major.
4	Cl ₃ CCOCl	dioxane	no reaction
5	Ac ₂ S	C ₂ H ₂ Cl ₄	Thioacid was major.
6	Ac ₂ S	dioxane	Thioacid was major.



ジアセチルスルフィドに対するペプチドやチオ酢酸の反応性を高めるため、次に特許報告の酸性条件とは反対に塩基の添加を試みた(Table 2)。なお、将来的なペプチド基質適応範囲の拡大を見据え、(側鎖保護)ペプチド一般に対して溶解性の懸念が小さい DMF や NMP を溶媒とし、室温下で条件の最適化を行うこととした。まず初めに、チオ酢酸から市販のチオ酢酸カリウム塩に変更し反応を行ったところ、DMF や NMP 中室温下で目的のチオ酸が主生成物として観測された(entry 0)。期待した通り、塩基の添加が効果的であると判断し、次に陽イオンの違いによる反応性の違いを見る検討を行った(entry 1~4)。その結果、entry 4 に示すように炭酸セシウムを用いた場合に、50%以上の収率でジペプチドチオ酸が得られた。

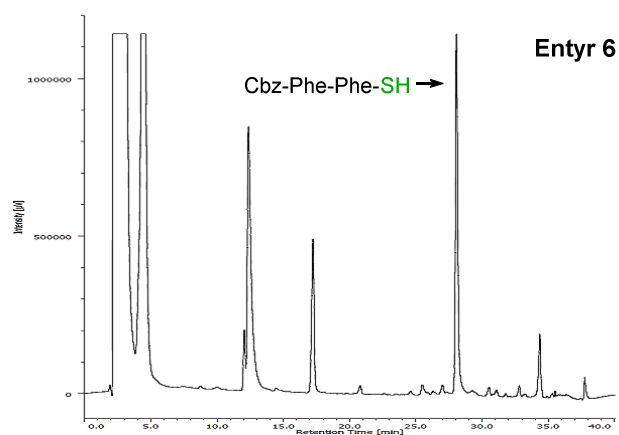
また特筆すべき点として、副生成物の生成も大幅に抑制されることが観測された。これらの状況の改善が、陽イオンの違いではなく、塩基の陰イオンの違いに起因したのではないかと考え、次にリチウムもしくはナトリウムの炭酸塩を用いて検討を行った(entry 5~6)。その結果、炭酸ナトリウムを用いた場合、炭酸セシウム以上の結果が得られることが判った(entry 6)。

Table 2. Addition of bases



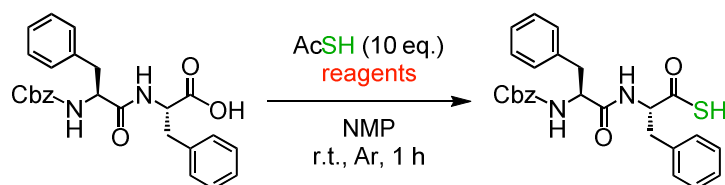
Entry	base	yield ^a
0	AcSK (instead of AcSH)	Thioacid was major.
1	LiOtBu (10 eq.)	48%
2	NaOtBu (10 eq.)	no T.M.
3	KOtBu (10 eq.)	46%
4	Cs ₂ CO ₃ (5 eq.)	61%
5	Li ₂ CO ₃ (5 eq.)	37%
6	Na ₂ CO ₃ (5 eq.)	77%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.



対照実験の結果(Table 3)、ジアセチルスルフィド非添加時でも炭酸ナトリウムを添加したのみでジペプチドチオ酸が生成し得ることが確認された(entry 2)ものの、ジアセチルスルフィドの添加により大幅な収率の向上が見られた(entry 1)。その一方、ジアセチルスルフィド添加時(entry 1)に比べジアセチルスルフィド非添加時(entry 2)では副生成物の生成がより抑えられていることが HPLC 分析より判ったため、次にジアセチルスルフィドを含めた各添加剤の量を低減させる検討を行った(Table 4)。

Table 3. Control experiment



Entry	reagents	yield ^a
1	Ac ₂ S (2 eq.), Na ₂ CO ₃ (10 eq.)	82 %
2	Na ₂ CO ₃ (10 eq.)	34 %
3	Ac ₂ S (2 eq.)	0 %

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

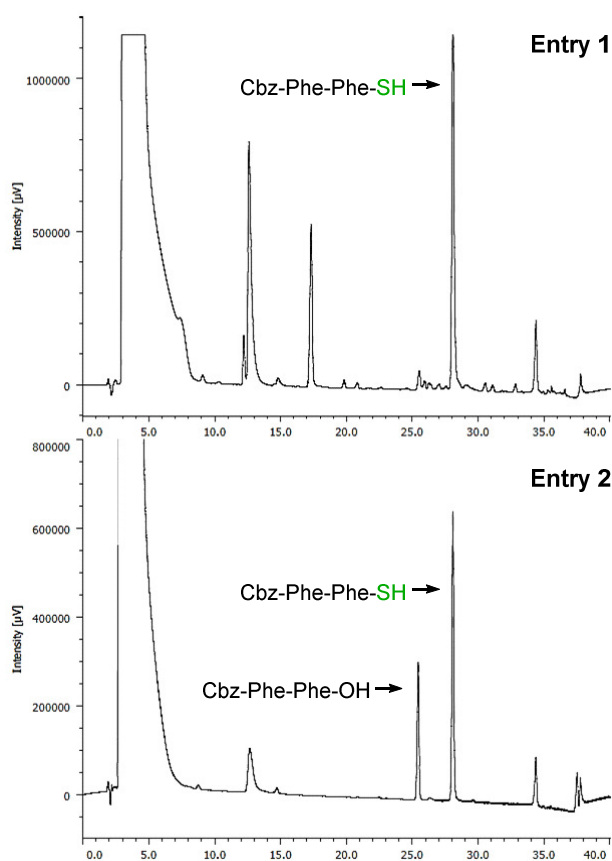
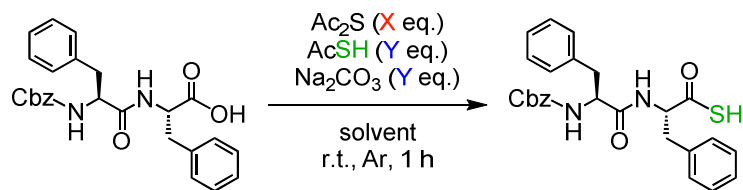


Table 4. Amount of each reagent



Entry	solvent	X	Y	yield ^a
1	NMP	2	5	80%
2	NMP	1	5	78%
3	NMP	1	3	70%
4	NMP	1	1	63%
5	NMP	0.5	3	80%
6	NMP	0.2	3	82%
7	DMF	0.2	3	95%
8 ^b	DMF	0.2	3	95%

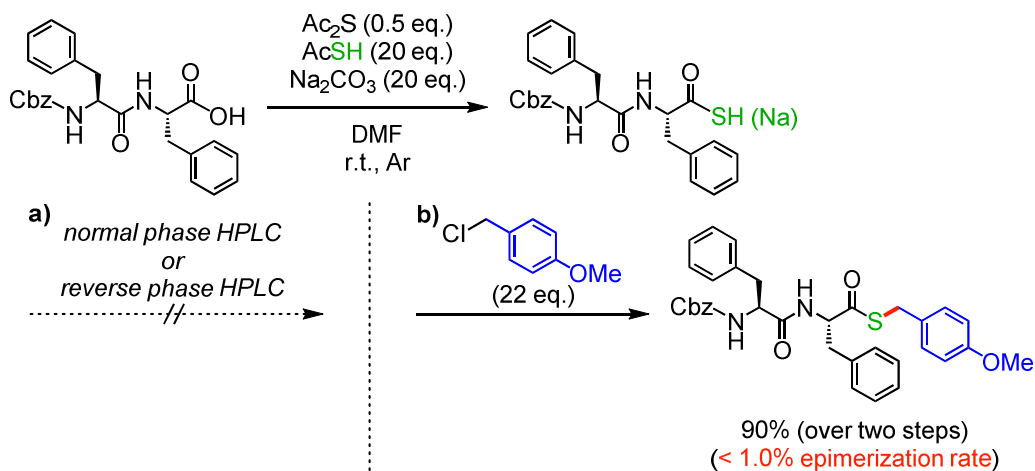
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b Ac₂O was used instead of Ac₂S.

その結果、各添加剤の量を低減させても目的物の収率に大きく影響はなく (entry 1~4)、ジアセチルスルフィドを触媒量にまで低減させるとより収率が向上することが判った (entry 5~6)。HPLC による解析から、高反応性物質であるジアセチルスルフィドによる副反応が最小限に抑えられているためだと考えている。最終的には、溶媒を DMF に変更することで、95%収率で目的のジペプチドチオ酸を得ることに成功した (entry 7)。なお、ジアセチルスルフィドの代わりに無水酢酸を用いても、ペプチド基質の反応性に違いは観測されなかった (entry 8)。

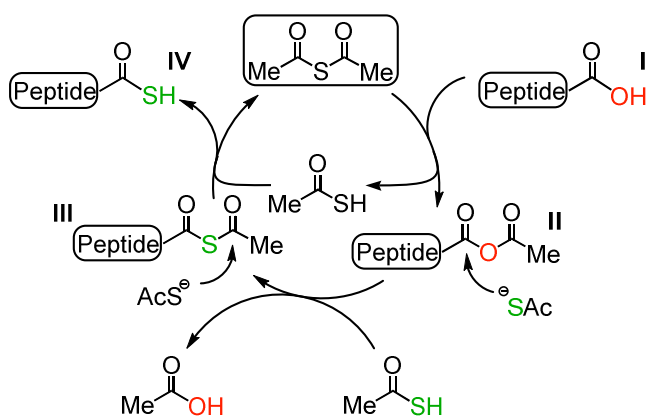
これまでに、共同研究者である東京大学薬学部有機合成化学教室 平野遼氏の協力を得て、反応系中のジペプチドチオ酸のエピ化率の定量を行っている(Scheme 8)。まず、トリメトキシベンジルチオエステル経由によりジペプチドチオ酸と C 末端フェニルアラニンがエピ化したジペプチドチオ酸の標品合成を行い直接的な定量を試みた。しかしながら、逆相の HPLC 分析においては、種々のカラムや遊離液の検討を行ったものの最適な分離条件を見つけることができなかった(Scheme 8a)。また、順相の HPLC 分析においても、両エピマーの分離は可能であったものの、反応溶媒である DMF の影響により、やはりチオ酸のエピ化率の直接的な定量を行うことが困難であった(Scheme 8a)。そこで次に、反応液中に存在するジペプチドチオ酸への影響を最小限に抑えつつより解析しやすくする方法として、ペプチドチオ酸のアルキル化によるチオエステル形成を行い、チオエステルのエピ化率から間接的にチオ酸のエピ化率を定量することとした(Scheme 8b)。具体的には、反応混合液に過剰量の *p*-メトキシベンジルクロリドを加えてチオ酸を *p*-メトキシベンジルチオエステルへと変換し各ジアステレオマーの HPLC ピーク面積の比較で定量した。その結果、エピ化率は 1%以下に抑えられていることが確認できた。

Scheme 8. Calculating the epimerization rate of peptidyl thioacid in the reaction mixture



現在想定しているジアセチルスルフィド触媒の役割は、ペプチド酸無水物中間体の形成を経た、チオ酢酸硫黄原子とペプチド C 末端酸素原子の交換促進作用であると考えている (Scheme 9)。具体的にはまず、ジアセチルスルフィドがペプチド(I)と反応しペプチド酸無水物(II)を形成する。次に、チオ酢酸アニオンによるペプチド側カルボニル基に対する求核攻撃によりペプチドジアシルスルフィド(III)が生成する。最後に、再びチオ酢酸アニオンによる末端アセチル基への求核攻撃により、ペプチドチオ酸部位(IV)の脱離と触媒の再生が起きると考えている。一連の過程が、系中に過剰量含まれるチオ酢酸アニオンの高い求核能により、分子内環化に比べ速い速度で進行するためエピ化が抑えられていると考えている。

Scheme 9. Plausible catalytic cycle

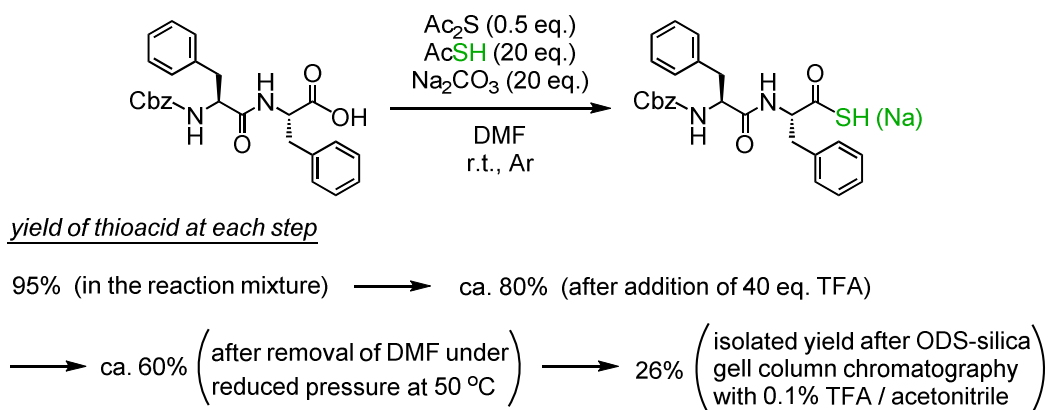


2.4. Isolation of Peptidyl Thioacid

得られたジペプチドチオ酸の単離精製についても検討を行った。一般にチオカルボキシル基は不安定な官能基である¹⁴とされており、2.1.で述べたようにこれまでの報告では、単離精製をすることなく用いられてきた。しかしながら今回開発した方法の場合、過剰のチオ酢酸(正確にはチオ酢酸塩)が反応液中に含まれているため、その後の反応への影響を避けるために反応混合物から取り除く必要がある。本手法がペプチド固相合成法に適用されているのならば、過剰量のチオ酢酸は容易に除去可能であるため精製過程での問題は少ない。しかしながら、ペプチド液相合成法に起用しようとした場合に精製法の確立が必要になる。

塩基に対し当量のトリフルオロ酢酸を加えてチオ酢酸塩を中和した後、続く減圧加熱濃縮によりチオ酢酸と DMF の除去を試みた(Scheme 10)。中和の段階では収率換算で 80%以上のペプチドチオ酸が残っており、減圧加熱濃縮の段階でも 60%程度の収率で残存していた。しかしながら、その後の逆相シリカゲルと遊離液としてアセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸水溶液用いたカラムクロマトグラフィー精製の段階で、最終的に 26%まで単離収率が低下してしまった。

Scheme 10. Isolation of peptidyl thioacid from the reaction mixture

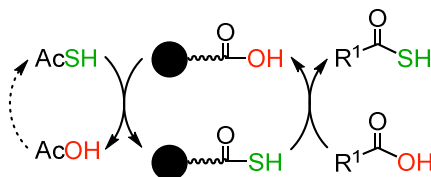


¹⁴ 最適化した反応液中では、アルゴン雰囲気下、室温で3か月以上経っても HPLC チャートに変化は見られず、ジペプチドチオ酸の分解などが生じていないことを確認している。

そこで次に、ペプチド固相合成法の原理から着想を得て、固相合成法とは反対に、液相にはペプチドをそして固相上に硫黄源となるチオ酸を担持させる手法の開発を試みた (Figure 2a)。固相担持型チオ酸の前駆体として、市販されている PEG ポリマーとつながった直鎖カルボン酸を用いることとした。

Figure 2. Polymer-supported thioacid

a. Reaction Design



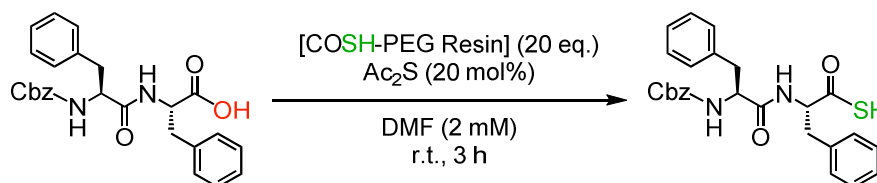
b. Preliminary Experiment

(step 1)



Work up: washed with DMF X 10

(step 2)



Entry	'S' source (step 1)	comment
1	AcSK	no reaction
2	AcSH + Na ₂ CO ₃	no reaction

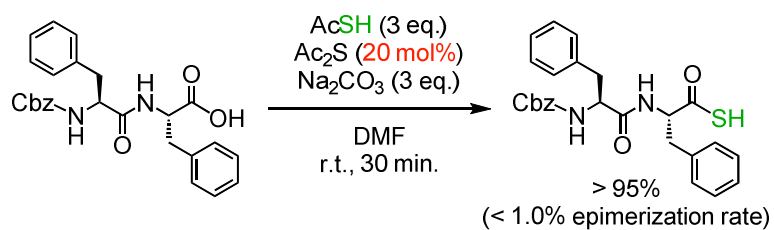
初期検討の結果 (Figure 2b)、まず、ポリマー中に含まれるカルボキシル基に対して、(1) チオ酢酸と炭酸ナトリウムをそれぞれ 20 当量ずつ、もしくは、(2) チオ酢酸カリウム塩を単独で 20 当量、と更にそれぞれに 0.5 当量のジアセチルスルフィドを加え、ポリマー中のカルボキシル基のチオカルボキシル基への変換を行った (step 1)。この段階での変換が定量的に進行したと仮定し、次に DMF によるポリマーの洗浄後、ポリマー中のチオカルボキシル基が 20 当量となるようにジペプチドを添加し、またジペプチドに対して 0.5 当量のジアセチルスルフィドを改めて加え混合した (step 2)。しかしながらこの場合、いずれの系においてもジペプチドチオ酸は一切観測されず、出発物であるジペプチドが回収されたのみであった。今後は、一段階目の固相担持型チオ酸を調整する手法の樹立をまずは行い、その後

実際にペプチドチオ酸合成へと適応できるか検討していく予定である¹⁵。

¹⁵ また、溶媒の極性次第でペプチド配列に依らず固体 - 液体状態を変化させうる保護基の導入なども積極的に行っていきたい。これまで注力的に開発されてきたものは、低極性溶媒に溶解し、高極性溶媒には不溶化するものであったが(一例として、Okada, Y.; Suzuki, H.; Nakae, T.; Fujita, S.; Abe, H.; Nagano, K.; Yamada, T.; Ebata, N.; Kim, S.; Chiba, K. “Tag-assisted liquid-phase peptide synthesis using hydrophobic benzyl alcohols as supports”, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 320.)、これとは逆の高極性溶媒に溶解し、低極性溶媒には不溶化するものも報告されており((a) Miao, W.; Chan, T. H. “Synthesis of Leu⁵-enkephalin”, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3251. (b) He, X.; Chan, T. H. “Structurally defined imidazolium-type ionic oligomers as soluble/solid support for peptide synthesis”, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2681.)、開発した新規ペプチドチオ酸合成への適用が可能であると考えている。

2.5. Summary of Chapter 2

チオ酢酸を硫黄源として、ジアセチルスルフィドを酸素 - 硫黄原子交換触媒として用いたペプチド C 末端カルボキシル基のチオカルボキシル基への直截的変換反応を開発した。反応は、アルカリ金属炭酸塩存在中室温下で円滑に進行し、1 時間以内に完結する。また、エピ化も 1.0%以下に抑えられていることを確認した。今後の課題として、(1) 反応混合液からのペプチドチオ酸の単離・精製手法の開発、(2) 固相上に担持したペプチドに対する反応条件の最適化、が残されている。



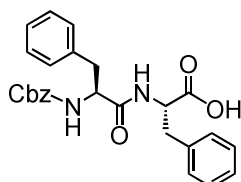
2.6. Experimental

A. General Method

NMR spectra were recorded on a JEOL ECX500 or a JEOL ECA400 spectrometer, operating at 500 or 400 MHz for ^1H NMR respectively. Chemical shifts were reported in ppm on the δ scale relative to residual CHCl_3 ($\delta = 7.26$), CHD_2OD ($\delta = 3.31$), $\text{CHD}_2\text{SOCD}_3$ ($\delta = 2.56$) as an internal reference, respectively. ESI-MS spectra were measured on Waters-ZQ4000. Column chromatography was performed with silica gel Merck 60 (230-400 mesh ASTM). Preparative thin-layer chromatography was performed with silica gel Merck 60 F254. The chemical yield or epimerization rate were determined by HPLC. HPLC analysis was performed at 40 °C on JASCO HPLC systems (LC Net II/ADC) containing of following: pump, PU-2080 plus; detector, UV-2075 plus, measured at 230 nm; solvent degasser, DG-2080-54; solvent mixer, MX-2080-32; column oven, CO-2065 plus; auto sampler, AS-2055 plus; column, YMC-Triart C18 (TA12S05-1546WT); mobile phase, MeCN / H_2O (0.1% TFA (v/v)); flow rate, 1.0 mL/min, unless otherwise stated. Reactions were carried out in dry solvents in flamed-dry glassware under an argon atmosphere, unless otherwise stated. Dry solvents were purchased from KANTO CHEMICAL. Co., Inc. or Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Other reagents were used as received from commercial sources, unless otherwise stated.

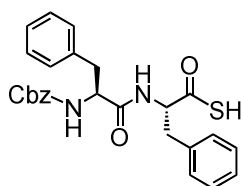
B. Materials

((benzyloxy)carbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-phenylalanine (Cbz-Phe-Phe-OH)



This compound was synthesized from Cbz-Phe-OH and phenylalanine by SPPS using WSCI-HCl and HOSu. **HPLC** (H_2O 2 min. then 0-100% MeCN / H_2O over 40 min.) tR 25.3 min.; **^1H NMR** (CD_3OD , 500 MHz) δ 7.32 – 7.14 (m, 15H), 5.00 (dd, $J = 12, 12.5$ Hz, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.18 (dd, $J = 5.0, 14$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 5.0, 14$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 8.0, 14$ Hz, 1H), 2.75 (dd, $J = 8.0, 14$ Hz, 1H); **ESI-MS** m/z 469.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

((benzyloxy)carbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-phenylalanine *S*-acid (Cbz-Phe-Phe-SH)



Authentic Cbz-Phe-Phe-SH was synthesized from Cbz-Phe-Phe-STmob: To a stirred solution of

Cbz-Phe-Phe-OH (220 mg, 0.5 mmol) and (2,4,6-trimethoxyphenyl)methanethiol¹⁶ (Tmob-SH, 214 mg, 1 mmol) in DMF (10 ml), WSCI-HCl (115 mg, 0.6 mmol) and DMAP (6.1 mg, 0.05 mmol) was added at room temperature. The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. AcOEt and brine were added, and organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (SiO₂, Hexane / AcOEt = 7 / 3) to give Cbz-Phe-Phe-STmob (230 mg, 71%) perhaps as a diastereo mixture at C-terminal phenylalanine. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.34 – 6.96 (m, 15H), 6.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.08 (s, 2H), 5.04 – 4.99 (m, 2H), 4.96 – 4.90 (m, 2H), 4.19 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 6H), 3.03 – 2.96 (m, 4H); **ESI-MS** *m/z* 642.2 [M+Na]⁺. To a stirred solution of Cbz-Phe-Phe-STmob (68 mg, 0.1 mmol) in 40% TFA (v/v) solution of DCM (2 ml), Et₃SiH (160 μl, 1 mmol) was added at room temperature. The resulting solution was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was diluted with AcOEt and solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in AcOEt then washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified with preparative thin-layer chromatography (SiO₂, Hexane / AcOEt / AcOH = 95 / 5 / 0.5) to give Cbz-Phe-Phe-SH (10 mg, 21% yield) as a white powder. **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 40 min.) tR 28.1 min.; **ESI-MS** *m/z* 484.9 [M+Na]⁺, 461.3 [M]⁻.

C. General Procedure of Study for Peptidyl Thioacid Synthesis Using Thioacetic Acid

To a stirred solution of Cbz-Phe-Phe-OH (44 mg, 0.1 mmol), Na₂CO₃ (32 mg, 0.3 mmol) and AcSH (21 μl, 0.3 mmol) in DMF (2 ml), Ac₂S (2.1 μl, 0.02 mmol) was added at room temperature. After stirred at room temperature for 1 h, the crude mixture was directly injected into HPLC systems for analysis. The yield was calculated based on a calibration curve.

D. Scale Up and Isolation of Peptidyl Thioacid (Scheme 10)

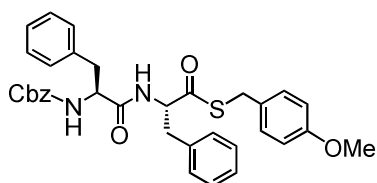
To a stirred solution of Cbz-Phe-Phe-OH (446 mg, 1 mmol), Na₂CO₃ (530 mg, 5 mmol) and AcSH (346 μl, 5 mmol) in DMF (20 ml), Ac₂S (54 μl, 0.5 mmol) was added at room temperature. After stirred for 1 h at room temperature, the solution was cooled in an ice cold bath. TFA (745 μl, 10 mmol) was added, and the mixture was stirred for 30 min at the same temperature. The mixture was concentrated under reduced pressure at 50 °C. The residue was purified with silica gel column chromatography by Yamazen EPCLC systems (acetonitrile / H₂O (0.1% TFA (v/v)) = 2 / 98 to 40 / 60 over 5 min., 40 / 60 to 80 / 20 over 40 min., ODS, 20 ml/min, 230 nm) to give Cbz-Phe-Phe-SH (120 mg, 26% yield) as an off white solid. **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 40 min.) tR 28.1 min.; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.31 – 7.18 (m, 15H), 7.06 (d, *J* = 7 Hz, 1H) 4.99 (s, 2H), 4.77 (br, 1H), 4.36 (br, 1H), 3.22 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 5.0, 13.5 Hz, 1H), 2.96 – 2.83 (m, 1H), 2.76 – 2.61 (m, 1H); **ESI-MS** *m/z* 463.1 [M+H]⁺.

¹⁶ (a) Barany, G. *et al. J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3013. (b) Vetter, S. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 3219.

E. Calculation of Epimerization Rate of Peptidyl Thioacid (Scheme 8)

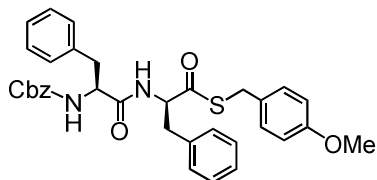
To a stirred solution of Cbz-Phe-Phe-OH (11 mg, 25 μmol), Na_2CO_3 (53 mg, 500 μmol) and AcSH (35 μl , 500 μmol) in DMF (500 μl), Ac_2S (1.3 μl , 12 μmol) was added at room temperature. After stirred for 1 h at room temperature, the solution was added 4-methoxybenzyl chloride (82 μl , 600 μmol) then stirred for 3 h at room temperature. The crude mixture was directly injected into HPLC systems for analysis. The epimerization rate was calculated based on the relative area ratio of each diastereomer (Each diastereomer's peak was identified by ESI-MS analysis and by comparison with that of each authentic sample synthesized by LPPS).

Cbz-Phe-Phe-S-PMB



HPLC (DAICEL CHIRALPAK IB (P/N 81325), EtOH / Hexane = 5 / 95) tR 17.7 min.; **$^1\text{H NMR}$** (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.34 – 7.11 (m, 15H), 6.91 (d, J = 13 Hz, 2H) 6.82 (d, J = 13 Hz, 2H), 6.24 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.09 (br, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.89 (q, J = 7.0, 14 Hz, 1H), 4.38 – 4.34 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.07 (dd, J = 6.0, 14 Hz, 1H), 3.03 – 2.95 (m, 3H); **ESI-MS** m/z 605.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Cbz-Phe-D-Phe-S-PMB



HPLC (DAICEL CHIRALPAK IB (P/N 81325), EtOH / Hexane = 5 / 95) tR 23.5 min.; **$^1\text{H NMR}$** (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.34 – 7.09 (m, 15H), 6.85 (d, J = 15 Hz, 2H) 6.81 (d, J = 15 Hz, 2H), 6.28 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.14 (br, 1H), 5.07 – 5.01 (m, 2H), 4.93 – 4.89 (m, 1H), 4.41 – 4.35 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.06 – 3.01 (m, 3H), 2.91 (dd, J = 5.5, 14 Hz, 1H); **ESI-MS** m/z 605.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

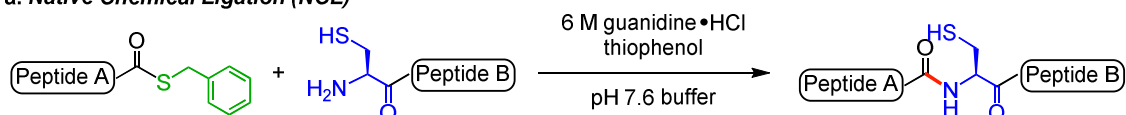
Chapter 3 Total Synthesis of Leuprorelin through Iterative Peptide Fragment Coupling Reaction between 2,4-Dinitrobenzenesulfonamide and Thiocarboxylic Acid

3.1. Background

収束的合成は合成行程数の削減に直結し、目的物の収率向上に寄与する。ペプチドの場合においてもその戦略の有用性は変わらない。現在、ペプチドのフラグメントカップリングとして用いられる手法は大きく分けて4種類存在する(Scheme 11)⁵。

Scheme 11. Methods for chemo-selective amide forming ligation for peptides

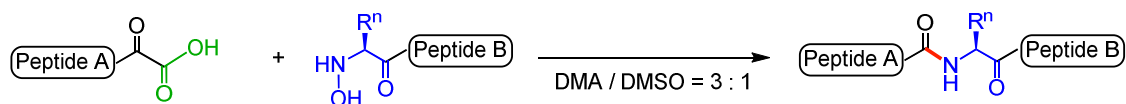
a. Native Chemical Ligation (NCL)



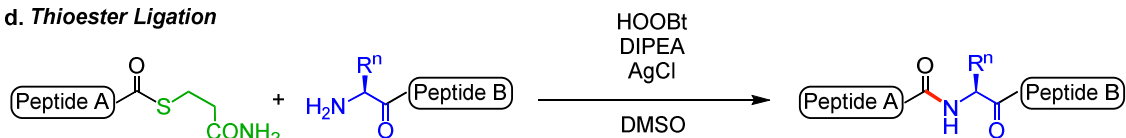
b. Traceless Staudinger Ligation



c. Ketoacid-Hydroxylamine Ligation



d. Thioester Ligation



C-terminal residue is limited to Gly or Pro.

この内の3つ(Scheme 11a~c)は、ペプチドフラグメント双方に特別な反応点を導入しておくことで、完全無保護ペプチド鎖間での選択的なペプチド結合形成反応が可能になる。その中でも最も汎用されているのが、ネイティブ・ケミカル・ライゲーション(Native chemical ligation, NCL)である(Scheme 11a)¹⁷。NCLでは、中性・水系中の非常に温和な条件でC末端チオエステルペプチドとN末端システインペプチドとの間の反応が進行する。しかしながら、NCLではC末端側フラグメントのN末端残基がシステインに限定される点¹⁸や、C

¹⁷ (a) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H. "Synthesis of proteins by native chemical ligation", *Science* **1994**, *266*, 776. (b) Malins, L. R.; Payne, R. J. "Recent extensions to native chemical ligation for the chemical synthesis of peptides and proteins", *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 70.

¹⁸ この問題を解決するために、システイン残基をNCL後に脱硫し、アラニン残基へと変換

末端カルボキシル基のチオエステル基への変換の煩雑さ故に連続的フラグメントカップリングへの適用が困難である点¹⁹が制限となっている。同様に、C末端ホスフィノチオエステル基とN末端アジド基間の Staudinger 反応を利用した Staudinger ライゲーション(Scheme 11b)²⁰、及びC末端 α ケトカルボキシル基とN末端ヒドロキシルアミノ基間の脱炭酸的縮合反応を利用したケト酸-ヒドロキシルアミン・ライゲーション(Scheme 11c)²¹においても、フラグメントカップリング後にC末端カルボキシル基を活性型の特殊官能基へと直接変換することが困難である事から、やはり連続的フラグメントカップリングへの適応は容易ではない。また、両方法とも事前にN末端側反応点として特殊修飾されたアミノ酸が必要となる点も制限となっている²²。4つ目のチオエステル法(Scheme 11d)では、C末端チオエステル部位を銀イオンで活性化してN末端アミノ基との間の直接的なペプチド結合形成を行う。求核ペプチドのN末端側のアミノ酸残基に制限はないが、求電子ペプチドC末端側がエピ化の可能性のないグリシンやプロリンに限られる²³。以上の背景により、特殊アミノ酸を用いることなく、また反応点のアミノ酸残基にも制限のない、連続的ペプチドフラグメントカップリングへと適用可能な方法論の開発が必要だと考えた。そして、Chapter 2 で開発し

する方法が報告されている: Yan, L. Z.; Dawson, P. E. "Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization", *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526. 著者らは、アラニンがタンパク質に最も多く含まれる残基の一つであるため、この手法により NCL の適応範囲が大幅に広がると主張している。また、この報告を参考にチオール基を導入した特殊アミノ酸の設計が数多く報告されている(ref. 16b)。更に、N末端アミノ部位にチオール基を含んだ特殊ベンジル基を導入することで、アミノ酸個々の特殊設計に依らない反応部位の開発も行われている: Loibl, S. F.; Harpaz, Z.; Seitz, O. "A type of auxiliary for native chemical peptide ligation beyond cysteine and glycine junctions", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15055.

¹⁹ 近年C末端チオエステルの前駆体として、ビス(2-スルファニルエチル)アミド基が導入されることにより、連続的NCLへの応用も適用され始めている: (a) Ollivier, N.; Vicogne, J.; Vallin, A.; Drobecq, H.; Desmet, R.; Mahdi, O. E.; Leclercq, B.; Goormachtigh, G.; Fafeur, V.; Melnyk, O. "A one-pot three-segment ligation strategy for protein chemical synthesis", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 209. (b) Raibaut, L.; Adihou, H.; Desmet, R.; Delmas, A. F.; Aucagne, V.; Melnyk, O. "Highly efficient solid phase synthesis of large polypeptides by iterative ligations of bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA) peptide segments", *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4061.

²⁰ (a) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. "Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide", *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939. (b) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. "A "Traceless" staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds", *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141. (c) Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. "Staudinger ligation of α -azido acids retains stereochemistry", *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993.

²¹ (a) Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D. "Chemoselective amide ligations by decarboxylative condensations of N-alkylhydroxylamines and α -ketoacids", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248. (b) Pusterla, I.; Bode, J. W. "The mechanism of the α -ketoacid-hydroxylamine amide-forming ligation", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 513.

²² 更に Staudinger ライゲーションでは、N末端アジドアミノ酸残基としてグリシンとその他のアミノ酸で反応性が大きく異なることが報告されている: Soellner, M. B.; Tam, A.; Raines, R. T. "Staudinger ligation of peptides at non-glycyl residues", *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824.

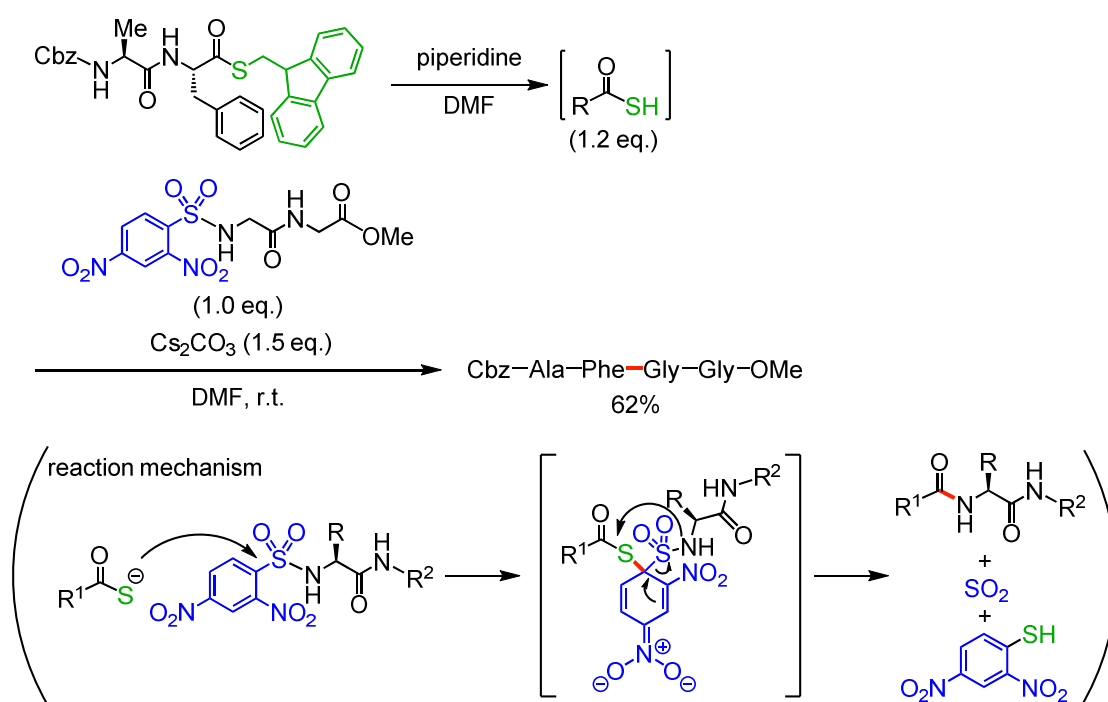
²³ (a) Blake, J.; Li, C. H. "New segment-coupling method for peptide synthesis in aqueous solution: application to synthesis of human [Gly17]- β -endorphin", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4055. (b) Aimoto, S. "Polypeptide synthesis by the thioester method", *Biopolymers* **1999**, *51*, 247.

た、エピ化を抑えつつペプチド C 末端カルボキシル基をチオカルボキシル基へと変換する手法がその起点になり得ると考えた。

これまでに、チオ酸を用いたペプチドフラグメントカップリングも幾つか報告されている(Scheme 12)。Crich らは、Tomkinson らによって報告されていたチオカルボキシル基と2,4-ジニトロベンゼンスルホンアミド基(DNS アミド基)との間のマイゼンハイマー錯体を経由したアミド結合形成反応²⁴を利用して、ジペプチド間のフラグメントカップリングを報告した(Scheme 12a)²⁵。Crich らは更にこの報告を発展させ、ベンゼンスルホンアミド芳香環上の電子密度を改良すること、もしくは保護チオ酸を用い、連続的フラグメントカップリングへの適用も報告している²⁶。

Scheme 12. Peptide fragment coupling using peptidyl thioacid

a. 2,4-Dinitrobenzenesulfonamide



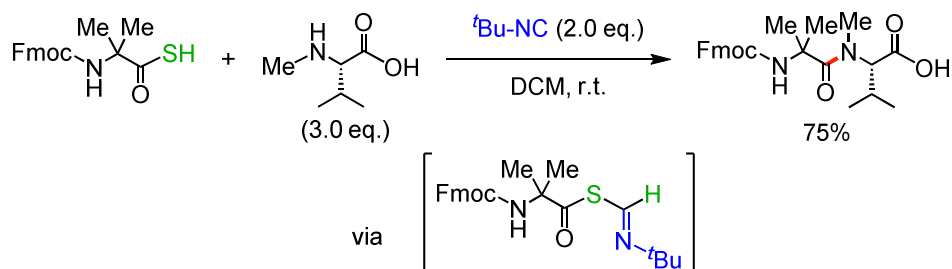
²⁴ Messeri, T.; Sternbach, D. D.; Tomkinson, N. C. O. "A novel deprotection / functionalisation sequence using 2,4-dinitrobenzenesulfonamide : Part 1", *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1669.

²⁵ Crich, D.; Sana, K.; Guo, S. "Amino acid and peptide synthesis and functionalization by the reaction of thioacids with 2,4-dinitrobenzenesulfonamides", *Org. Lett.* **2007**, 9, 4423.

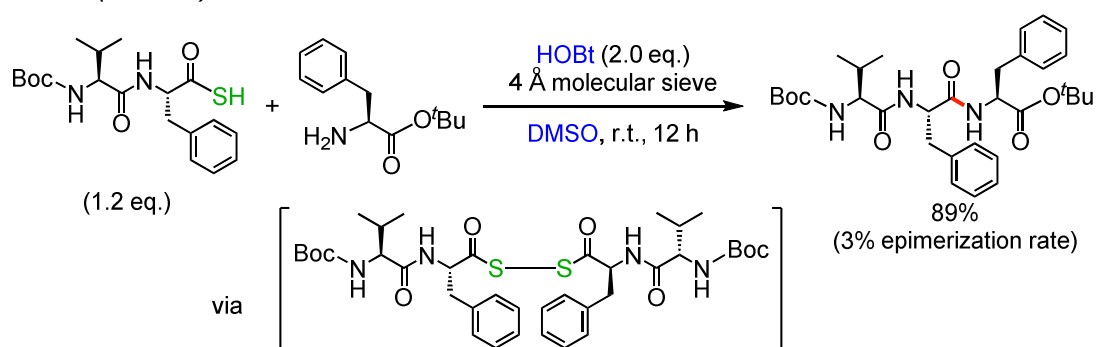
²⁶ Crich, D.; Sharma, I. "Triblock peptide and peptide thioester synthesis With reactivity-differentiated sulfonamides and peptidyl thioacids", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7591.

Scheme 12. (Continued)

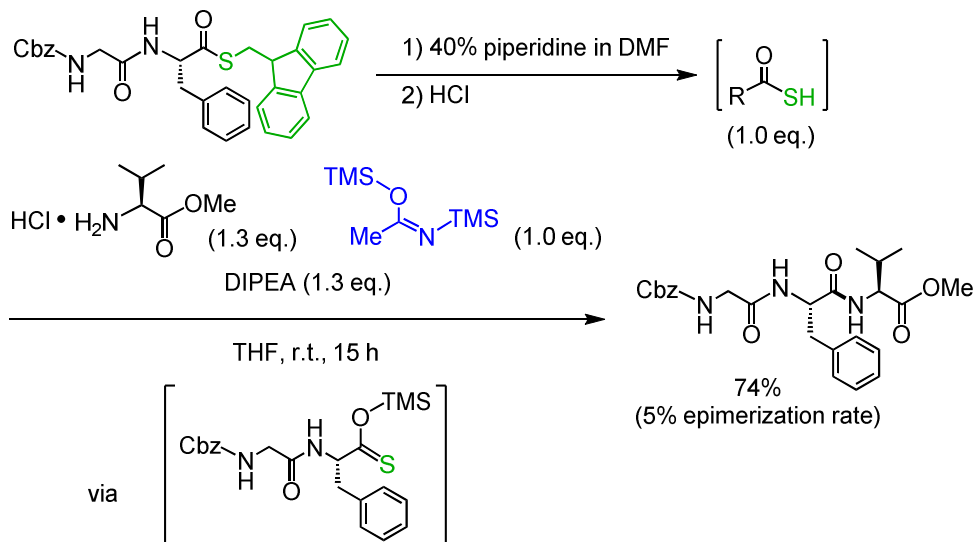
b. Isonitrile



c. HOBt (& DMSO)



d. Silicon



他にも、Danishefskyらはチオ酸活性化剤としてイソニトリル(Scheme 12b)²⁷やHOBtもしく

²⁷ (a) Rao, Y.; Li, X. C.; Danishefsky, S. J. "Thio FCMA intermediates as strong acyl donors: a general solution to the formation of complex amide bonds", *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12924. (b) Roberts, A. G.; Johnston, E. V.; Shieh, J. H.; Sondey, J. P.; Hendrickson, R. C.; Moore, M. A. S.; Danishefsky, S. J. "Fully synthetic granulocyte colony-stimulating factor enabled by

はヨウ素(Scheme 12c)²⁸を用いた方法を報告している。また、Liebeskindらは*N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)を用いた活性化法を報告している(Scheme 12d)²⁹。そして、Chapter 1で述べたHoughten・Yuらによる二硫化炭素を用いたチオ酸の活性化の報告でも基質としてペプチドが用いられている⁷。

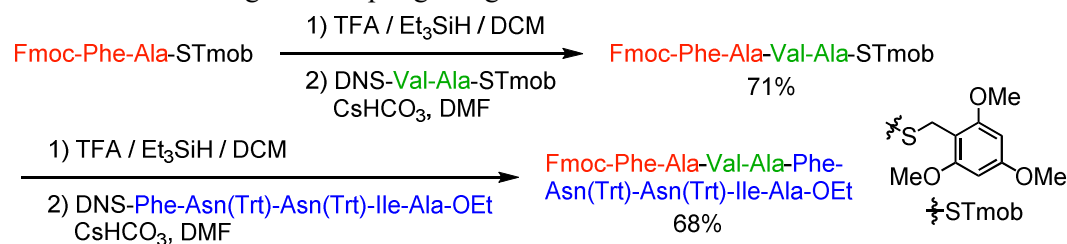
isonitrile-mediated coupling of large, side-chain-unprotected peptides”, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13167.

²⁸ Wang, P.; Danishefsky, S. J. “Promising general solution to the problem of ligating peptides and glycopeptides”, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17045.

²⁹ Wu, W.; Zhang, Z.; Liebeskind, L. S. “In situ carboxyl activation using a silatropic switch: A new approach to amide and peptide constructions”, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14256.

以上のように、チオ酸を用いたペプチドフラグメントカップリングも幾つか報告されているが、この中でも特に DNS アミドを用いた方法(Scheme 12a)に着目した。Fmoc 固相合成法の最終段階で C 末端側フラグメントの N 末端部位へ DNS 基を予め導入することが可能³⁰であり、また特殊アミノ酸の必要性やアミノ酸残基の制限も存在しないためである。また、反応も迅速に完結し²⁶、エピ化も抑制されている³⁰ことから、フラグメントカップリングとして最適であると考えた。しかしながら、チオ酸-DNS 法を用いたペプチドフラグメントカップリングは、2009 年の Crich らの報告(Scheme 13)²⁶を最後に途絶えている。この報告では、C 末端チオ酸部位をトリメトキシベンジルエステルとして保護した N 末端 DNS ペプチドを用いることで連続的フラグメントカップリングを行っている。事前のチオエステル合成と反応直前の脱保護の必要性ゆえに他の方法と比べ利点が見出しづらく、実用性に乏しい手法に留まっていたことが、その後の本方法論の発展の阻害になっていると考えた。ペプチド C 末端をチオ酸化する最適な方法論の欠如という、このカップリング反応の制約が、私が開発したペプチドチオ酸合成法により解決されうると考えた。

Scheme 13. Iterative fragment coupling using thioacids and DNS-amides

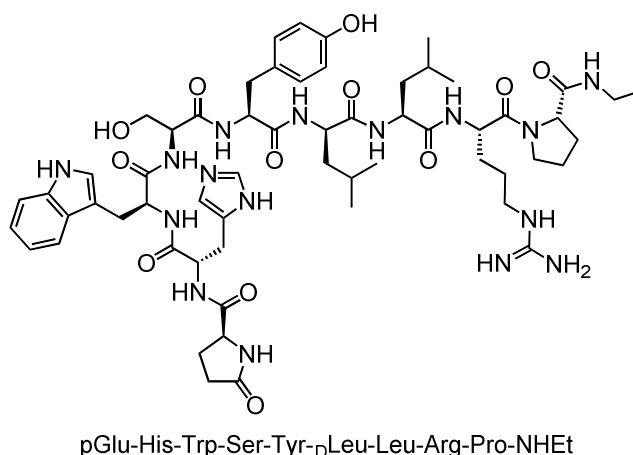


³⁰ Karmakar, P.; Talan, R. S.; Sucheck, S. J. "Mixed-phase synthesis of glycopeptides using a N-peptidyl-2,4-dinitrobenzenesulfonamide-thioacid ligation strategy", *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5298.

3.2. Strategy

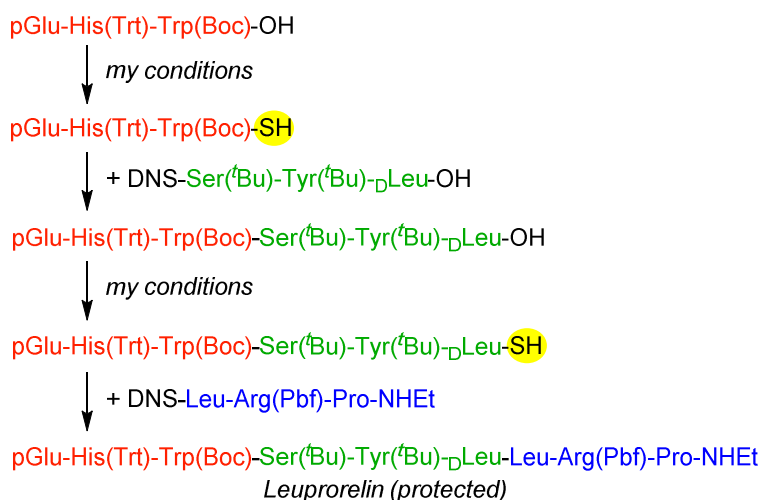
Chapter 2 で開発したペプチドチオ酸合成の方法論を用い 9 残基の非天然型ペプチド医薬であるリュープロレリンの合成を行った。リュープロレリンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの誘導体であり、6 残基目のグリシンが *D* 体のロイシンに変わり、10 番目のグリシンが欠損した非天然型人工ペプチドである(Figure 3)。前立腺癌・乳癌・子宮筋腫などの治療に主に用いられ、全世界での売り上げが 1000 億円を超えるブロックバスター医薬である。

Figure 3. Structure of Leuprorelin



今回の合成では、リュープロレリンを 3 残基ずつ 3 つのフラグメントに分け、*N* 末端から *C* 末端方向への連続的フラグメントカップリングにより合成を行った。具体的には、側鎖を保護した各フラグメント *C* 末端カルボキシル基を開発した手法でチオ酸化し、対応する *N* 末端 DNS 化トリペプチドとのフラグメントカップリングを順次行った(Scheme 14)。

Scheme 14. Synthetic Scheme



3.3. Total Synthesis of Leuprorelin

まず、Chapter 2 で開発した方法がリュプロレリンの各フラグメントに対してもそれぞれ適応可能かどうかを確認するための初期検討を行った(Figure 4)。その結果、逆相 HPLC 上でそれぞれのフラグメントのピークの直ぐ低極性側に対応するチオ酸と思われるピークが主生成物として観測された。

Figure 4. Preliminary experiment of thioacid formation of leuprorelin fragments

a. Tripeptide

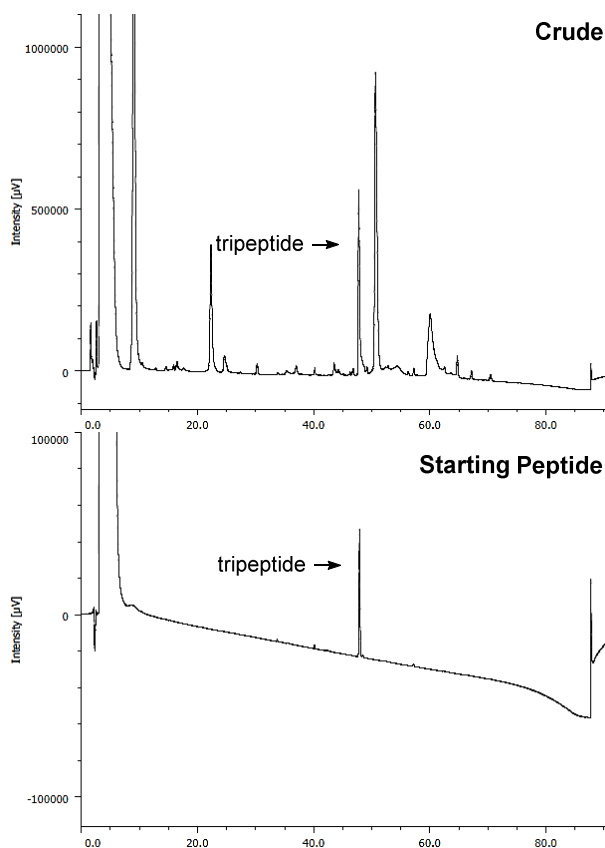
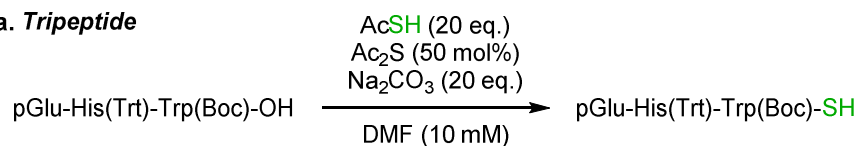
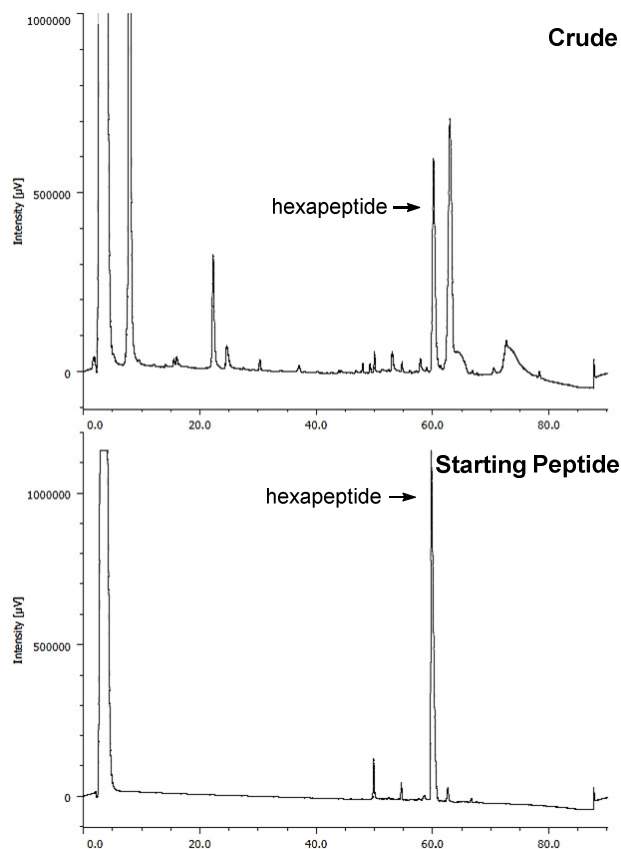
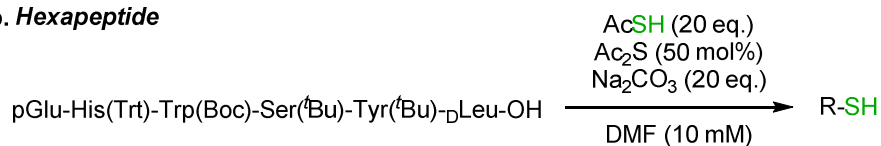


Figure 4. (Continued)

b. Hexapeptide

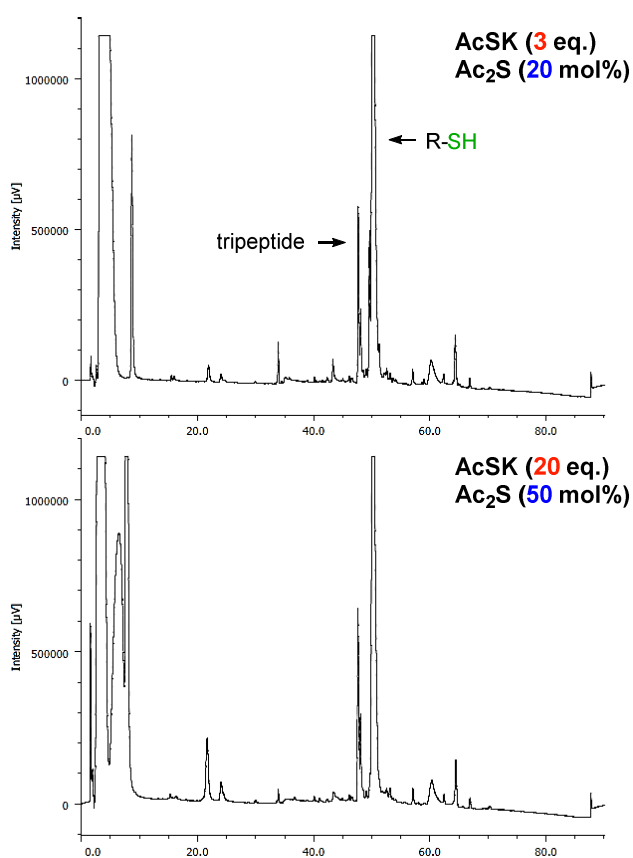
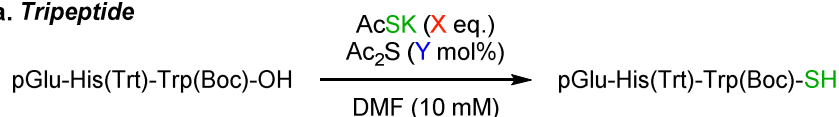


これらのピークが実際に目的チオ酸由来であることを確認する目的、及び次段階のフラグメントカップリングに向け、単離精製を行った(Scheme 15)。しかしながら、単離精製は困難を極めた。例えば、反応液を過剰量の 0.5%トリフルオロ酢酸水溶液に加えペプチドを沈殿させた後に遠心沈殿もしくは凍結乾燥を行った場合、出発物のペプチドのみが観測されチオ酸と思われるピークは消失した(Scheme 15a)。液性の pH 値によらず水との接触が問題であると考え次に、0.5%トリフルオロ酢酸の DMF 溶液を加え塩基を中和し、50°Cでの遠心減圧濃縮によりチオ酢酸と DMF の除去を行った(Scheme 15b)。しかしながらこの場合も目的のピークは消失した。また、HPLC 分析中はピークが消失せずに存在していたという観測結果を踏まえ、逆相シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによる精製も試みた(Scheme 15c)。チオ酸合成反応液を逆相シリカゲルに直接吸着し、HPLC 分析で用いた際と同じ遊離液(0.5%トリフルオロ酢酸水溶液 / アセトニトリル)を用いた。HPLC の解析結果を参考に、まず 0.5%トリフルオロ酢酸水溶液 / アセトニトリル = 8 : 2 の組成比の溶液を流し、

まず、フラグメントカップリング時にフラグメントチオ酸との競合反応を最小限に抑えるため、チオ酢酸の当量の検討を行った(Figure 5)。その結果、分子量が 1000 を超えるヘキサペプチドに対しても、チオ酢酸カリウムの量を 3 当量・ジアセチルスルフィドの量を 20 mol%にまで減じて、チオ酢酸カリウムを 20 当量・ジアセチルスルフィドを 50 mol%用いた場合と同等の効率でペプチドチオ酸へと変換され得ることが判った³²。

Figure 5. Reducing the amount of potassium thioacetate

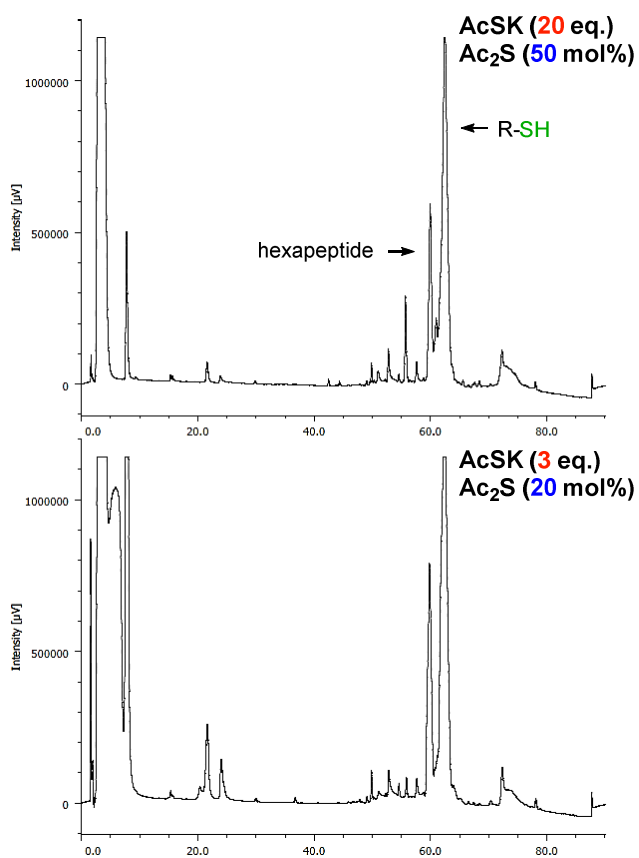
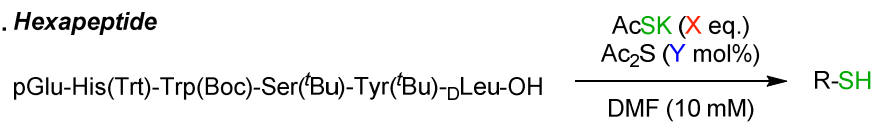
a. Tripeptide



³² なお更なる検討の結果、チオ酸への変換効率はジアセチルスルフィドの量に依存することが示唆されている。トリペプチドでの検討では、チオ酢酸カリウムの量を 3 当量に固定し、ジアセチルスルフィドの量を 5 mol%にまで低減させたところ、およそ半分の変換率でペプチドチオ酸が観測された。次に、ジアセチルスルフィドの量を 5 mol%に固定し、チオ酢酸カリウムの量を 1 当量にまで低減させたところ、この場合も先程とほぼ同じくおよそ半分の変換率でペプチドチオ酸が観測された。

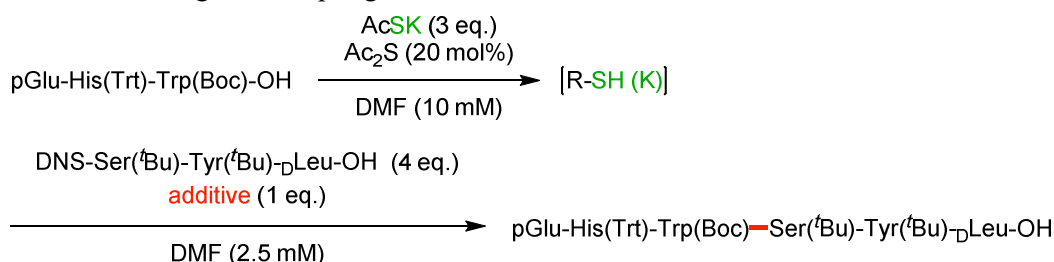
Figure 5. (Continued)

b. Hexapeptide



ワンポットでのフラグメントカップリングに向けたチオ酸合成法の最適化を達成したので、次に続く DNS ペプチドを用いたフラグメントカップリングの検討を行った。まず一段階目のフラグメントカップリングで条件の最適化を行った(Table 5)。その結果、チオ酸合成の反応液に *N* 末端 DNS ペプチドを加えるのみで反応が進行することが判った(entry 1)。また、エピ化抑制剤も同時に添加すること(entry 2~3)で、収率とエピ化の改善が見られ、特に HOOBt を用いた場合に 85%収率、2.7%のエピ化でヘキサペプチドが得られた(entry 3)。

Table 5. The first fragment coupling

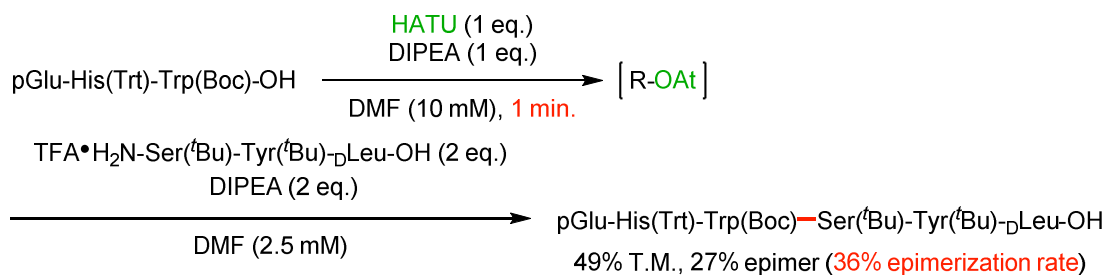


Entry	additive	T.M. ^a	epimerization rate ^a
1	-	57%	10%
2	HOAt	76%	5.6%
3	HOOBt	85%	2.7%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

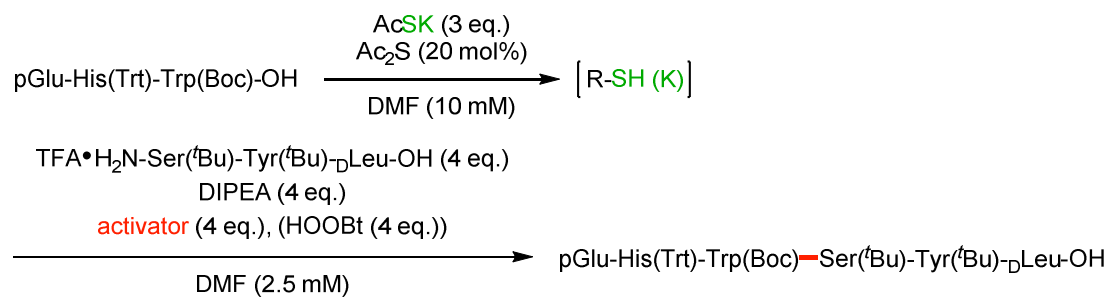
対照実験として、ペプチド化学で頻用される HATU と Hünig 塩基を用いて同じヘキサペプチドの合成を行った(Scheme 16)。その際、求核ペプチド *C* 末端側が無保護であるため、求電子ペプチドを事前に 1 分間活性化し縮合した。その結果、高い変換効率でヘキサペプチドは得られたものの、30%以上のエピ化が観測された。この結果より、カルボキシル基存在下、チオカルボキシル基選択的に反応を進行させることのできる本カップリング反応の有用性が示されたと考えている。

Scheme 16. Fragment coupling using HATU (control experiment)



また、Danishefsky らにより報告されたイソニトリル²⁷もしくはヨウ素²⁸を用いたペプチドチオ酸のフラグメントカップリング反応も試みた(Table 6)。その結果、イソニトリルを用いた場合反応はほとんど進行せず(entry 1~2)、ヨウ素を用いた場合でも、DNS ペプチドを加えた場合に比べ、収率とエピ化の点で低い結果に留まった(entry 3~4)。

Table 6. Fragment coupling using isonitrile or iodine (control experiment)

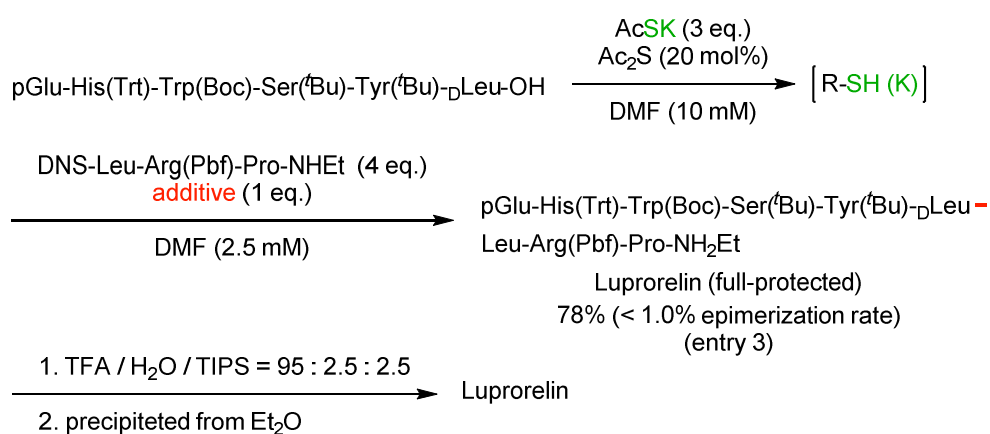


Entry	activator	HOObt	T.M. ^a	epimerization rate ^a
1	<i>t</i> BuNC	O	8.5%	13%
2	<i>t</i> BuNC	X	4.2%	15%
3	I ₂	O	70%	2.9%
4	I ₂	X	40%	2.2%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

次に二段階目のフラグメントカップリングについての結果を示す(Table 7)。反応は一段階目同様に円滑に進行した。チオ酸への変換後、連続するカップリング反応により側鎖保護リュープロレリンを得て、側鎖脱保護後にエーテルで沈殿させることによりリュープロレリンを得た。特に、先ほど良好な結果が得られた HOObt を用いた場合、縮合段階では 78% 収率、1%以下のエピ化で側鎖保護リュープロレリンの生成を確認し、脱保護後にエーテルで沈殿し単離した段階では、55%の単離収率、検出限界以下のエピ化でリュープロレリンを得た(entry 3)。なお、この段階の縮合反応では C 末端側が D 体のロイシンだが、酵素反応などとは異なり特別な問題なく一連の反応は進行した。

Table 7. The second fragment coupling



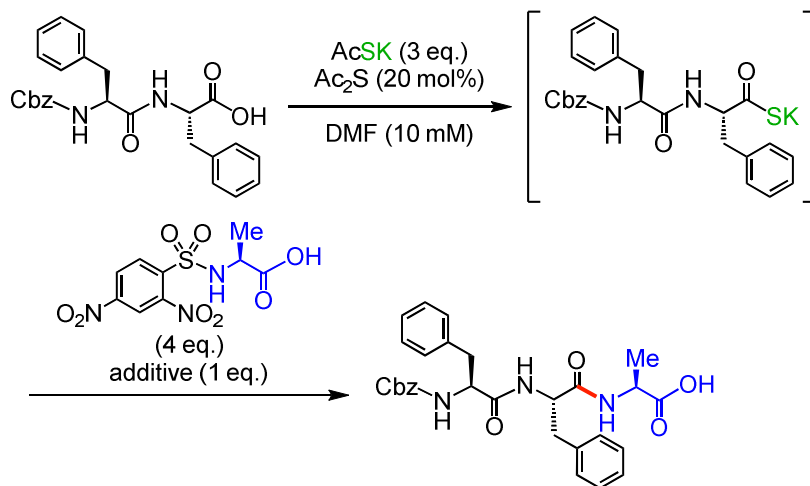
Entry	additive	T.M. ^a	epimerization rate ^a
1	-	20%	9.1%
2	HOAt	43%	> 10%
3	HOObt	55%	n.d.

^a Determined by HPLC analysis of ether-precipitated mixture.

3.4. Study for the Application to Peptide Chain Elongation Process from One by One Residue by Using 2,4-Dinitrobenzenesulfonylamino Acid

3.3.で示した、ワンポットでの DNS アミドとのフラグメントカップリングが、1 残基のアミノ酸単位へも適応可能かどうかの検討を行った(Table 8)。反応液中のジペプチドチオ酸に対し、HOObt 存在下、DNS アラニンを加えることで、> 95%収率、1.5%のエピ化で目的とするトリペプチドを得た(entry 2)。

Table 8. Reaction between peptidyl thioacid and DNS-amino acid



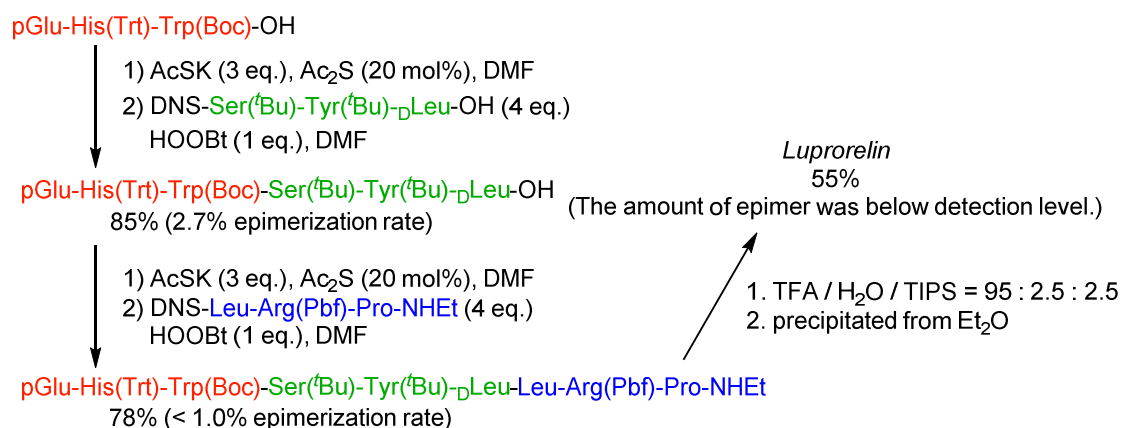
Entry	additive	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate
1	HOAt	> 95%	3.3%
2	HOObt	> 95%	1.5%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

3.5. Summary of Chapter 3

Chapter 2 で開発したペプチドチオ酸合成法と、チオカルボキシル基と 2,4-ジニトロベンゼンスルホンアミド基(DNS アミド基)との間の縮合反応を利用し、非天然型ペプチド医薬であるリュープロレリンの合成を行った。具体的には、リュープロレリンを 3 残基ずつ 3 つのフラグメントに分け、各フラグメント C 末端を開発した手法でチオ酸化し、対応する N 末端 DNS ペプチドとのフラグメントカップリングを順次行った。条件の再検討の結果、チオ酸への変換には市販のチオ酢酸カリウム塩を用い、このペプチドチオ酸合成の反応液に HOObt 及び N 末端 DNS ペプチドを加えることで、二度のフラグメントカップリング両段階において、高収率・低エピ化率で目的ペプチドを得た。縮合剤を用いた事前活性化が必要なフラグメントカップリングとの対照実験の結果、カルボキシル基存在下でもチオカルボキシル基での選択的な反応が進行する本カップリング反応において、大幅なエピ化の低減化が実現し得ることを確認することができた。また、非天然型アミノ酸においてもカップリングが問題なく進行することも確認した。



3.6. Experimental

A. General Method

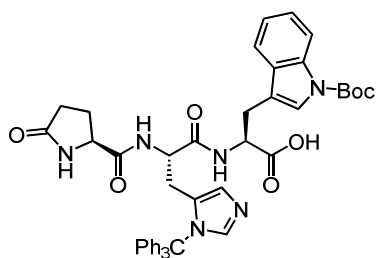
The similar methods as section 2.6. were used, unless otherwise stated.

B. Materials

General Procedure of SPPS

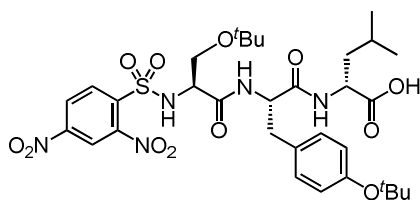
All peptides were prepared by SPPS, unless otherwise stated. Reactions were carried out in polypropylene tube under air. C-terminal amino acids were loaded onto 2-chlorotrityl chloride resin by using DIPEA in 1,2-dichloroethane. Each peptide-chain elongation was carried out at least for 1 h by using 2.5 equivalents of Fmoc-amino acid, DIPCI and HOBt. Peptides were cleaved off from resins with 1% TFA (v/v) in DCM as side-chain protected forms. After neutralization of TFA with excess amount of pyridine in methanol, the mixture was concentrated under reduced pressure at room temperature. The residue was added H₂O to precipitate protected peptides out. Finally, the precipitate was filtered, washed with H₂O and dried under reduced pressure to give desired peptides, which were used for the next step without further purification.

pGlu-His(Trt)-Trp(Boc)-OH



55 mg (68 μ mol) of titled compound was obtained in 34% yield: **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 47.8 min.; **ESI-MS** m/z 795.5 [M+H]⁺, 817.6 [M+Na]⁺, 793.6 [M]⁻.

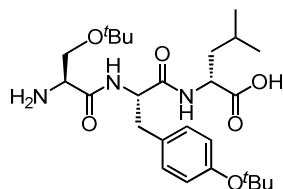
DNS-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu-OH



Capping at N-terminal amino acids with 2,4-dinitrobenzenesulfonyl chloride was carried out according to Sucheck's procedure³⁰. 10 mg (14 μ mol) of titled compound was obtained in 6.9% yield: **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 40 min.) tR 34.2 min.; **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.75 (s, 1H), 8.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H),

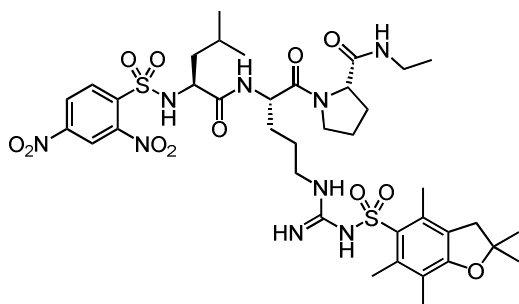
6.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J = 5.6, 9.6$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.59 – 3.52 (m, 2H), 2.97 (dd, $J = 6.8, 14$ Hz, 1H), 2.80 (dd, $J = 7.6, 14$ Hz, 1H), 1.54 – 1.38 (m, 3H), 1.31 (s, 9H), 1.10 (s, 9H), 0.87 (dd, $J = 6.8, 16$ Hz, 6H); **ESI-MS** m/z 724.6 $[M+H]^+$, 746.5 $[M+Na]^+$, 722.7 $[M]^-$.

H-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu-OH



70 mg (140 μ mol) of titled compound was obtained in 71% yield: **HPLC** (H_2O 2 min. then 0-100% MeCN / H_2O over 80 min.) tR 22.8 min.; **ESI-MS** m/z 494.6 $[M+H]^+$, 516.6 $[M+Na]^+$, 492.7 $[M]^-$.

DNS-Leu-Arg(Pbf)-Pro-NHEt



DNS-Leu-Arg(Pbf)-Pro-NHEt was synthesized from DNS-Leu-Cl and H-Arg(Pbf)-Pro-NHEt in solution phase. DNS-Leu-Cl and H-Arg(Pbf)-Pro-NHEt were prepared in situ from DNS-Leu-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-NHEt respectively. DNS-Leu-OH was synthesized according to Schwarzer's procedure³³. **¹H NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.72 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.53 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.01 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.27 – 4.21 (m, 1H), 1.89 – 1.79 (m, 1H), 1.71 – 1.58 (m, 2H), 0.95 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H); **ESI-MS** m/z 384.3 $[M+Na]^+$. Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-NHEt was synthesized from Fmoc-Arg(Pbf)-OH and H-Pro-NHEt, prepared from deprotection of Boc-Pro-NHEt, by using WSCI-HCl and Oxyma in solution phase. **¹H NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.78 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.63 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.36 (m, 3H), 4.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.67 (br, 1H), 3.53 (br, 1H), 3.20 – 3.13 (m, 4H), 2.97 (s, 1H), 2.80 (t, $J = 14$ Hz, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.15 (s, 6H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 1.87 (br, 2H), 1.77 (br, 1H), 1.57 (br, 2H), 1.42 (s, 6H), 1.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); **ESI-MS** m/z 773.8 $[M+H]^+$, 795.8 $[M+Na]^+$. For detailed synthetic procedure of DNS-Leu-Arg(Pbf)-Pro-NHEt from DNS-Leu-OH and Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-NHEt:

³³ Schwarzer, D. *et al. Chem. Commun.* **2012**, 48, 9525.

Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-NHEt (308 mg, 0.4 mmol) was added into ice cold 50% Et₂NH (v/v) in DMF (2 ml). After stirring at the same temperature for 10 min, AcOEt (ca. 40 ml) and brine (ca. 40 ml) was added. Organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The residue was triturated with hexane to give crude H-Arg(Pbf)-Pro-NHEt (90 mg) as white powder, which was used in the next step without further purification. To a stirred ice cold solution of H-Arg(Pbf)-Pro-NHEt (90 mg of crude) and DIPEA (524 μl, 3 mmol), DNS-Leu-Cl (1 mmol) in DCM (5 ml), prepared from DNS-Leu-OH (361mg, 1 mmol), SOCl₂ (145μl, 2 mmol) and pyridine (81μl, 1 mmol) according to Schwarzer's procedure³³, was dropwisely added over 10 min. After stirring at the same temperature for 3 h, AcOH (570μl, 10 mmol) was added, then solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (SiO₂, AcOEt / MeOH = 100 / 0 to 98 / 2 to 95 / 5) to give DNS-Leu-Arg(Pbf)-Pro-NHEt (67 mg, 19% yield) as pale yellow powder. **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 55.5 min.; **¹H NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.71 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.53 – 8.46 (m, 1H), 8.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.93 (br, 1H), 4.29 (br, 1H), 4.21 (dd, *J* = 5.0, 8.5 Hz, 1H), 4.14 – 4.07 (m, 2H), 3.55 (br, 1H), 3.45 (br, 1H), 3.16 (br, 4H), 2.96 (s, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.15 (s, 6H), 2.05 (s, 3H), 2.01 (s, 2H), 1.83 (br, 4H), 1.67 (br, 1H), 1.61 – 1.41 (m, 13H), 1.10 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); **ESI-MS** *m/z* 894.5 [M+H]⁺, 916.5 [M+Na]⁺.

pGlu-His(Trt)-Trp(Boc)-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu-OH

30 mg (24 μmol) of titled compound was obtained in 47% yield: **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 59.7 min.; **ESI-MS** *m/z* 1269.1 [M]⁻.

pGlu-His(Trt)-D-Trp(Boc)-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu-OH

26 mg (21 μmol) of titled compound was obtained in 40% yield: **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 62.8 min.; **ESI-MS** *m/z* 1265.9 [M]⁻.

**pGlu-His(Trt)-Trp(Boc)-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu--Leu-Arg(Pbf)-Pro-NHEt
(Protected Leuprorelin)**

pGlu-His(Trt)-Trp(Boc)-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-D-Leu--Leu-Arg(Pbf)-Pro-OH was prepared by SPPS in 66% yield (63 mg, 33 μmol): **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 65.4 min.; **ESI-MS** *m/z* 967.90 [(M+Na)/2]⁺, 1912 [M+Na]⁺. Amide bond formation at C-terminal was carried out according to Chiba's procedure¹⁵: **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min) tR 67.5 min.; **ESI-MS** *m/z* 959.0 [(M+H)/2]⁺, 981.5 [(M+Na)/2]⁺, 1917 [M+H]⁺.

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-D-Leu-Arg-Pro-NHEt (Leuprorelin)

This compound was purchased from TCI Co., Ltd. **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O

over 80 min.) tR 30.3 min.

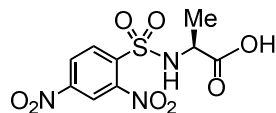
**pGlu-His(Trt)-Trp(Boc)-Ser(^tBu)-Tyr(^tBu)-Leu--Leu-Arg(Pbf)-Pro-NHEt
(Protected *epi*-Leuprorelin)**

Protected *epi*-Leuprorelin was synthesized in the similar manner as protected Leuprorelin. For SPPS: 20% yield (18 mg, 10 μ mol); **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 65.6 min; **ESI-MS** m/z 968.0 [(M+Na)/2]⁺, 1889 [M+H]⁺, 1912 [M+Na]⁺. For amide bond formation: **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 65.2 min.; **ESI-MS** m/z 959.2 [(M+H)/2]⁺, 981.7 [(M+Na)/2]⁺, 1917 [M+H]⁺.

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt (*epi*-Leuprorelin)

To a stirred solution of protected *epi*-Leuprorelin (1 μ mol in 100 μ l DMF) and H₂O (25 μ l) in TFA (950 μ l), Et₃SiH (25 μ l, 300 μ mol) was added at room temperature. The resulting solution was stirred at the same temperature for 1 h. After concentrated under reduced pressure at 50 °C, the mixture (ca. 300 μ l) was added diethyl ether (2.8 ml) to precipitate *epi*-Leuprorelin out. Finally, the precipitate was filtered, washed with diethyl ether and dried under reduced pressure to give crude *epi*-Leuprorelin as a white solid. **HPLC** (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 30.1 min.; **ESI-MS** m/z 1210 [M+H]⁺.

((2,4-dinitrophenyl)sulfonyl)-L-alanine



2,4-Dinitrobenzenesulfonylation of alanine was carried out according to Schwarzer's procedure³³. This compound was reported in the literature³⁰.

C. General Procedure of Fragment Coupling

Reactions were carried out in dry solvents in polypropylene tube (Eppendorf tube) under air. To a stirred solution of *N*-terminal fragment (10 μ l, 25 mM in DMF, 0.25 μ mol) and AcSK (15 μ l, 50 mM in DMF, 0.75 μ mol), Ac₂S (1 μ l, 50 mM in DMF, 0.05 μ mol) were added at room temperature. After stirred at the same temperature for 3 h, the mixture was added into a solution of *N*-terminal fragment (50 μ l, 20 mM in DMF, 1.0 μ mol) and HOObt (25 μ l, 40 mM in DMF, 1.0 μ mol) (and DIPEA (1.0 μ mol, stock solution in DMF)). In the case of Table 6, activator (1.0 μ mol) was added immediately after addition of thioacid. After stirred at room temperature for 3 h, the crude mixture was directly injected into HPLC systems for analysis. The yield was calculated based on a calibration curve.

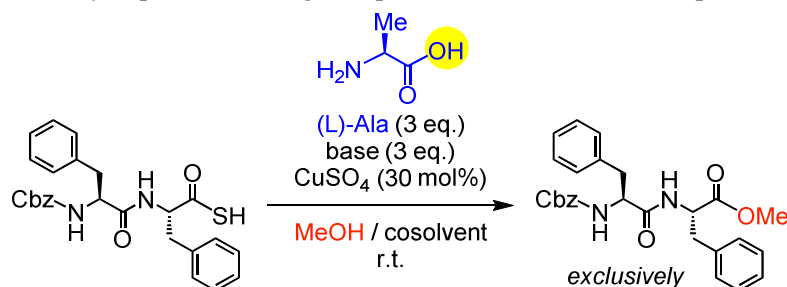
Chapter 4 Development of Peptide Bond Forming Reaction between Peptidyl Thioacid and Non-Protected Amino Acid

4.1. Background & Preliminary Experiment

ペプチド合成プロセスの原子効率を極限まで高めるためには、無保護アミノ酸の利用だけではなく、ペプチドチオ酸の触媒的活性化が必須であると考えられる。これまでにチオ酸の触媒的活性化法として、Gopi らにより報告された硫酸銅を用いた触媒的ペプチド結合形成反応⁶や、Bhattacharya らによって報告された銀 - トリフェニルホスフィン錯体を用いて酸素を末端酸化剤としたチオ安息香酸の触媒的二量化反応³⁴などが、数少ないながらも挙げられる。この内、より目的とする反応に近い Gopi らの報告を参考にまずは条件の最適化を行うこととした。

報告では、求核剤として C 末端がエステル化されたアミノ酸を用いているのみで、無保護アミノ酸は用いられていない。詳細な触媒機構は不明であり、更にペプチドチオ酸を求電子剤として用いた際のエピ化の有無についても言及がなされていなかったが、初期検討として報告条件を C 末端がフェニルアラニンであるジペプチドチオ酸と無保護アラニンの系へと適用した(Scheme 17)。しかしながらこの場合、ジペプチドのメチルエステルが得られるのみで、目的とするトリペプチドは一切得られなかった。

Scheme 17. Preliminary experiment using non-protected amino acid in Gopi's conditions



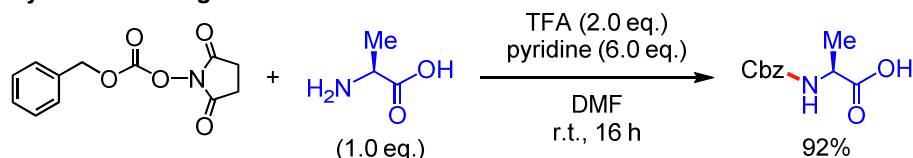
この原因として、アミノ酸の有機溶媒(Scheme 17 の場合メタノール)への低い溶解性が考えられた。通常、双性イオンを持つ無保護アミノ酸は水にしか溶解しない。一方で Scheme 17 の結果及び、Chapter 2, 3 でのペプチドチオ酸の精製段階で示したように、チオ酸はプロトン性溶媒中での安定性が低く、容易に加溶媒(加水)分解してしまう。目的とする反応の実現のためには、エピ化の抑制・チオ酸の触媒的活性化の他に、無保護アミノ酸の有機溶媒中での利用という課題も解決する必要がある。

³⁴ Singh, S.; Chaturvedi, J.; Bhattacharya, S.; Nöth, H. "Silver(I) catalyzed oxidation of thiocarboxylic acids into the corresponding disulfides and synthesis of some new Ag(I) complexes of thiophene-2-thiocarboxylate", *Polyhedron* **2011**, *30*, 3093.

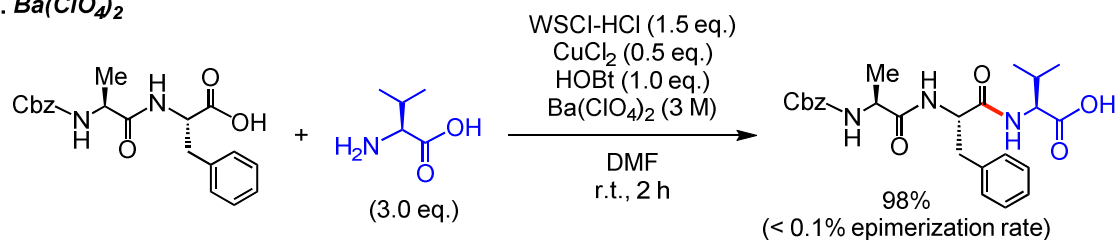
これまでに、有機溶媒中での無保護アミノ酸のアシル化反応が幾つか報告されている (Scheme 18)。Mitin は、トリフルオロ酢酸やトシル酸などの強酸に対し弱塩基であるピリジン を小過剰量加えた高塩濃度の DMF 中に無保護アミノ酸が溶解し、種々のアシル化が進行することを報告している (Scheme 18a)³⁵。Mitin らはその後、過塩素酸バリウムが同様の効果を示すことも報告している (Scheme 18b)³⁶。更に橋元らは、アミノ酸二分子からなるカルシウム塩を用いることで、同じく DMF 中でのアシル化反応が進行することを報告している (Scheme 18c)³⁷。また大野らは、アミノ酸をテトラブチルホスホニウム (TBP) 塩とすることで DNA にコードされた 20 種類のアミノ酸全てが、アセトニトリルに混合するイオン性液体となることを報告³⁸しており、柳らはこのアミノ酸 TBP 塩のイオン性液体にアミノ酸メチルエステルの塩酸塩を混合することで、高収率にジペプチドを得ている³⁹。

Scheme 18. Acylation of non-protected amino acid in organic solvent

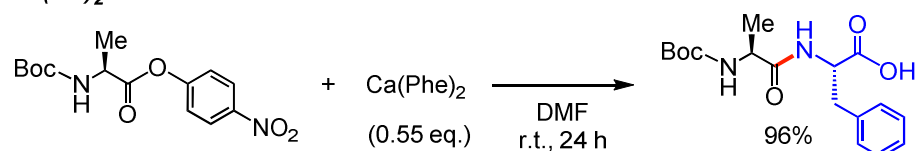
a. Pyridine + Strong Acid



b. Ba(ClO₄)₂



c. Ca(AA)₂



³⁵ Mitin, Y. V. "An effective organic solvent system for the dissolution of amino acids", *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *48*, 374.

³⁶ Ryadnov, M. G.; Klimenko, L. V.; Mitin, Y. V. "Suppression of epimerization by cupric (II) salts in peptide synthesis using free amino acids as amino components", *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 322.

³⁷ Hashimoto, C.; Takeguchi, K.; Kodomari, M. "An efficient synthetic method of N-protected dipeptide acids using amino acid calcium carboxylates in an organic solvent", *Synlett* **2011**, *10*, 1427.

³⁸ Kagimoto, J.; Fukumoto, K.; Ohno, H. "Effect of tetrabutylphosphonium cation on the physico-chemical properties of amino-acid ionic liquids", *Chem. Commun.* **2006**, 2254.

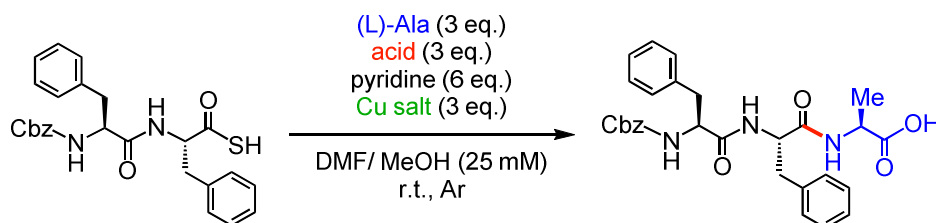
³⁹ Furukawa, S.; Fukuyama, T.; Matsui, A.; Kuratsu, M.; Nakaya, R.; Ineyama, T.; Ueda, H.; Ryu, I. "Coupling-reagent-free synthesis of dipeptides and tripeptides using amino acid ionic liquids", *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11980.

4.2. Metal Complex for Thioacid Activation

4.2.1. Optimizing Reaction Conditions

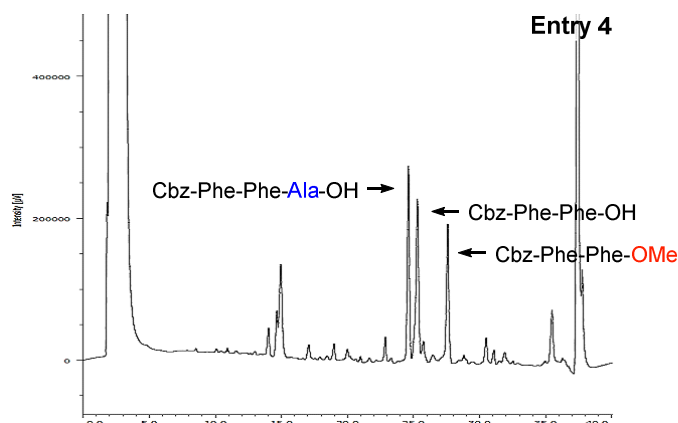
チオ酸の大量精製の困難さから、リュープロレリン合成同様、縮合段階までを連続的に
行うこととした。また Gopi らの報告において、溶媒としてメタノールを用いることが触媒
的ペプチド結合形成反応に重要であるという記述があったことから、縮合段階における溶
媒は DMF とメタノールの混合溶媒系をまずは用いた。Mitin の報告を参考にトシル酸もし
しくはトリフルオロメタンスルホン酸とピリジンを用いてアラニンの DMF 溶解液を調製し、
チオ酸合成後にアミノ酸・銅塩・メタノールを加え縮合反応を行った (Table 9)。その結果、
メタノールのみを溶媒とした初期検討時とは異なり、ジペプチドのメチルエステルも観測
されたものの、目的のトリペプチドが得られた。

Table 9. DMF - methanol cosolvent system



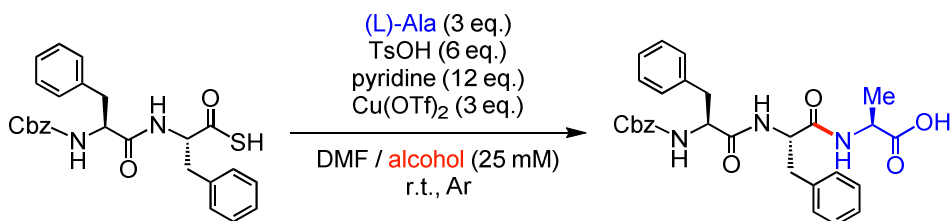
Entry	acid	Cu salt	tripeptide ^a (LLL form)	comment
1	TsOH	CuSO ₄	21%	Methyl ester was observed.
2	TsOH	Cu(OTf) ₂	24%	"
3	TfOH	CuSO ₄	18%	"
4	TfOH	Cu(OTf) ₂	23%	"

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.



そこで、エステル体の生成を抑制しトリペプチドの収率を向上させる目的で、アルコール系溶媒の検討を行った(Table 10)。しかしながら、トリペプチド収率の向上は見られなかった。

Table 10. DMF - alcohol cosolvent system

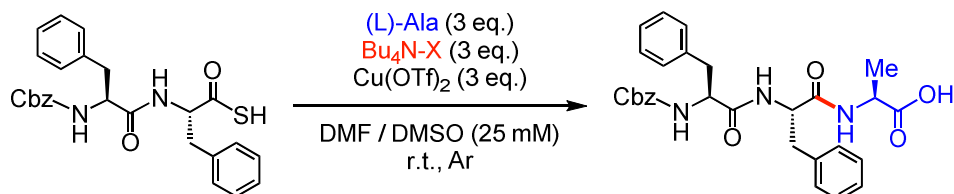


Entry	alcohol	tripeptide ^a (LLL form)
1	EtOH	28%
2	IPA	30%
3	HFIP	28%
4	TFE	28%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

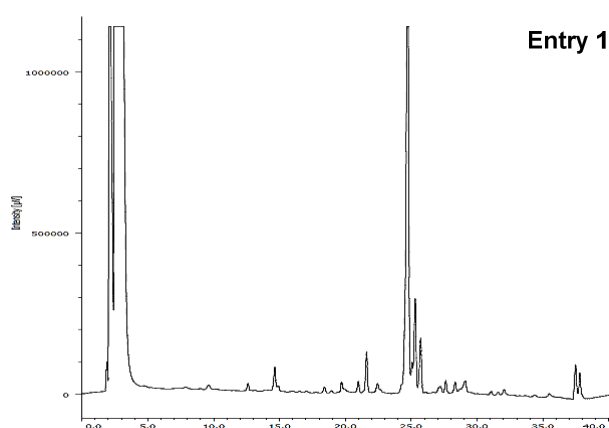
そこで次に、より高極性非プロトン性溶媒である DMSO と DMF との混合溶媒系に変え、アミノ酸の対イオンを第四級アンモニウムとして検討を行った。まず、テトラブチルアンモニウム塩の対イオンの検討を行った(Table 11)。その結果、水酸化物イオン(entry 1)もしくは酢酸イオン(entry 4)を用いた場合に、多くの副生成物とともに検量線比で 100%を超える目的トリペプチドのピークが観測された。

Table 11. Tetrabutylammonium salt in DMF - DMSO cosolvent system



Entry	Bu ₄ N-X	tripeptide ^a (LLL form)
1	TBA-OH (40 % in H ₂ O)	(140%)
2	TBA-F - xH ₂ O	26%
3	TBA-I	16%
4	TBA-OAc	(125%)
5	TBA-HSO ₄	28%
6	TBA-NO ₃	trace

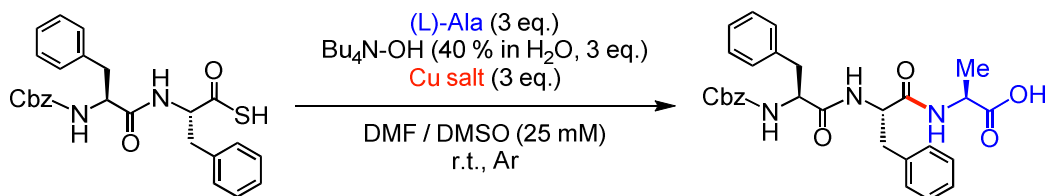
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.



何らかの副生物の目的ピークへの混在が考えられたが、他にもいくつかの副生物が存在していたため、詳細な解析を行う前に他のパラメータに関するいくつかの検討を行った。まず、銅塩の対イオンの検討を行った(Table 12)。その結果、塩化銅を用いた場合にトリフル

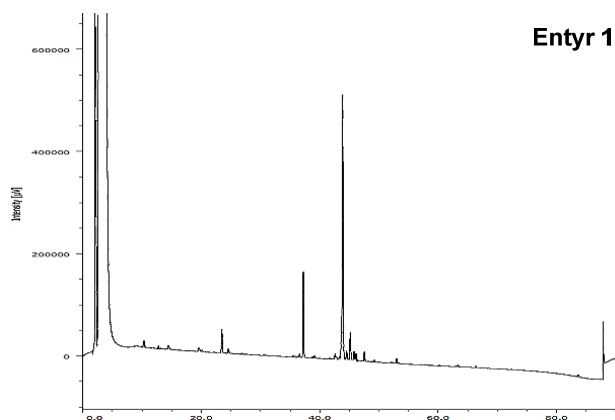
オロメタンスルホン酸銅の場合と同じく、HPLC 上で目的物周辺に極めて強いピークが観測された⁴⁰。

Table 12. Various copper salts



Entry	Cu salts	tripeptide ^a (LLL form)
1	CuCl ₂	(165%)
2	Cu(OAc) ₂	messy
3	Cu(BF ₄) ₂	6%
4	Cu(NO ₃) ₂	8%
5	CuF ₂	messy
6	CuBr ₂	43% (messy)
7	CuI	50%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

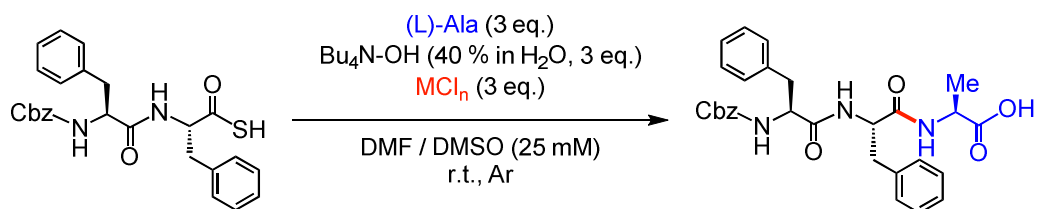


次に、種々の第一列遷移金属塩化物の検討を行った(Table 13)。銅塩の他は、マンガン塩(entry 2)と鉄塩(entry 3)が、目的物周辺にピークを示すことが判った。特にマンガン塩の場合、反

⁴⁰ 第四級アンモニウム水酸化物に関する検討も行った。活性化剤として塩化銅を、塩基としてテトラメチルアンモニウム・トリメチルベンジルアンモニウム・コリンそれぞれの水酸化物を用い検討を行ったが、テトラブチルアンモニウムを用いた場合と結果は変わらなかった。

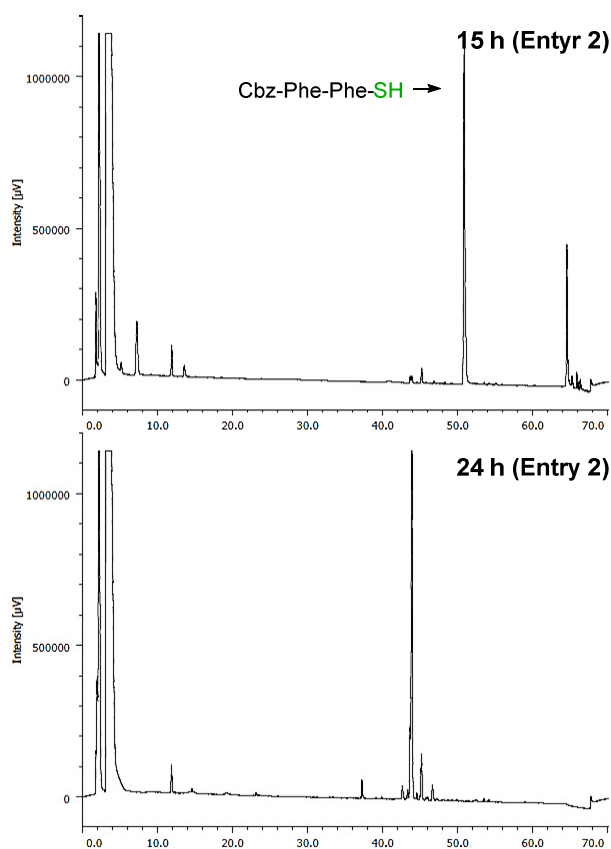
応速度は非常に遅いものの、目的物周辺のピーク以外の副生物の量が銅や鉄塩に比べ非常に少なかったため、以後の検討はマンガン塩を用いて進めることとした。

Table 13. Other 1st row transition metals



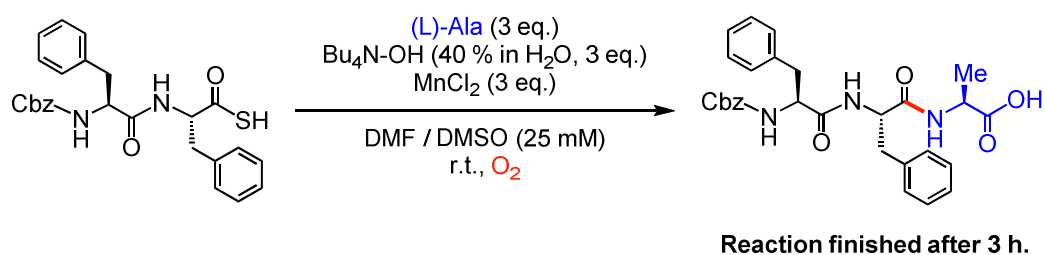
Entry	MCl_n	tripeptide ^a (LLL form)
1	$CrCl_3$	n.d.
2	$MnCl_2$	After 15 h, n.d. But after 24 h, tripeptide was formed.
3	$FeCl_3$	70%
4	$CoCl_2$	n.d.
5	$NiCl_2$	n.d.
6	$ZnCl_2$	n.d.

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.



塩化マンガンの結果において、反応開始 15 時間後にはほとんど反応が進行せず、24 時間後に反応が終結していた(Table 13, entry 2)。これは、15 時間後の段階で反応液を一部取り出すために容器を開放したことにより、アルゴン雰囲気下で行っていた反応系中に酸素が混入し反応が促進されたためであると考えた。この仮説を検証するため次に、同様の反応を酸素雰囲気下で行ったところ、反応が 3 時間以内に終結することが判った(Scheme 19)。この結果から、何らかの酸化過程が目的ピーク生成に介在していることが示唆された。

Scheme 19. Reaction promotion by oxygen



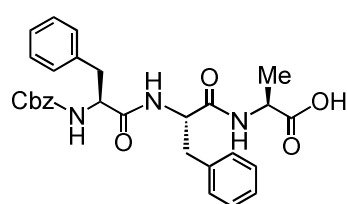
そしてその後の検討により、最終的には溶媒を DMF(及び塩基に含まれる水との混合溶媒)に変更することで、目的ピークを単一物として与える HPLC チャートを得ることに成功した^{41, 42}。

⁴¹ DMF 溶媒中でのマンガン塩の検討も行った。硫酸マンガン(II)・酢酸マンガン(II)・炭酸マンガン(II)・過塩素酸マンガン(II)・酸化マンガン(IV)を用いたが、酢酸マンガン(II)を除き目的ピークは観測されなかった。

⁴² DMF 溶媒中での第一列遷移金属以外の金属塩の検討も行った。亜鉛・銀・カドミウム・インジウム・鉛(II)・ビスマス(III)の塩化物を中心に用いたが、目的ピークは観測されなかった。

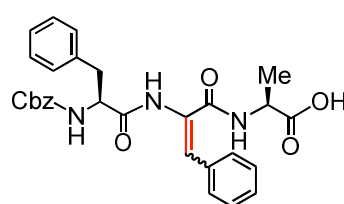
そこで次に、該当ピークの単離精製を行い化合物の構造決定を行った(Figure 6)。ESI-MS 分析では、目的トリペプチドのピークと共に目的トリペプチドより 2 だけ少ない分子量のピークを強く示した⁴³。反応の進行に酸素が関与している可能性も考慮すると、副生物としてペプチドのいずれかの部分が脱水素を起こした化合物が考えられた。更に HPLC 分析において、副生物の溶出時間が目的トリペプチドとほとんど変わらなかったことから、トリペプチドの極性官能基に変化はなく、フェニルアラニンいずれかのベンジル位と C α 位において脱水素が進行したものと考えた。

Figure 6. Supposed byproduct structure



targeted tripeptide

MW: 517.22



supposed byproduct structure

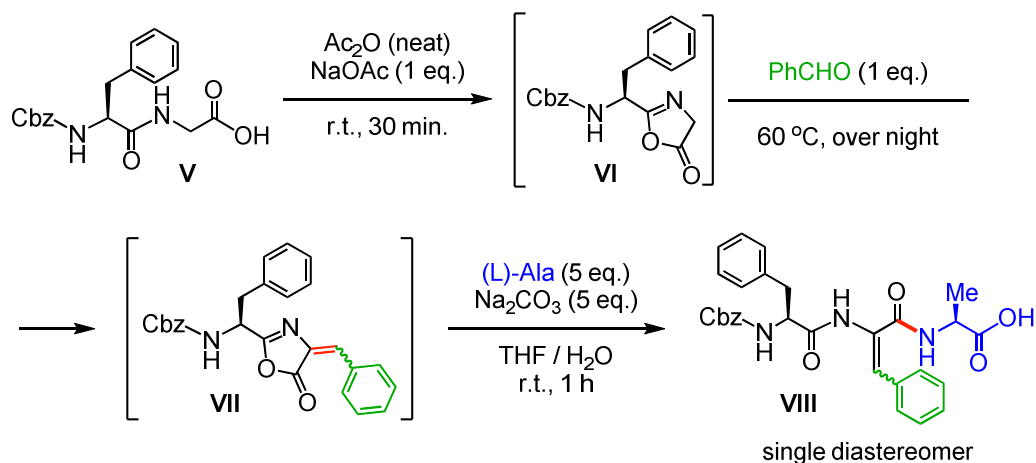
MS: around 515

HPLC: quite near tR as targeted tripeptide

⁴³銅塩を用いた場合にも、ESI-MS によるこの[目的トリペプチド分子量-2]のピークは観測された。

銅(II)塩やマンガン(II)塩と酸素を用いたのみで室温下フェニルアラニンの酸化反応が進行するとは考えづらく、分子内環化によるオキサゾロン中間体を経由した C 末端フェニルアラニン部位での反応であると想定した。この仮説を検証するため、標品合成を別途行い⁴⁴、そのスペクトルデータとの比較から副生物の構造を決定することを試みた(Scheme 20)⁴⁵。

Scheme 20. Synthesis of dehydrogenated tripeptide

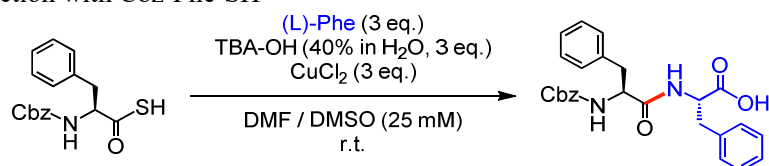


まず、C 末端グリシンジペプチド(V)に無水酢酸を作用させることで、ペプチド酸無水物経由でオキサゾロン中間体(VI)が生成する。この反応液にベンズアルデヒドを加えることにより、求核付加反応と続く脱水を経てオレフィン中間体(VII)を得る。そして、この中間体も単離はせず最後にアラニンと縮合させることにより、目的の脱水素型トリペプチド(VIII)を得た。合成した標品二重結合部位の立体異性に関しては不明であったものの、単一の異性体を得ることに成功した。そして、NMR・ESI-MS・HPLC の各スペクトルは単離した副生物のものと良い一致を示した。また、NMR 分析より目的のトリペプチドと脱水素型トリペプチドの生成比は 1 : 1 である事を確認した。なお、エピマー体のトリペプチドは HPLC 分析の限りでは観測されなかった。

⁴⁴ Jursic, B. S.; Sagiraju, S.; Ancalade, D. K.; Clark, T.; Stevens, E. D. "Practical preparation of Z - α - (N - acetylamino) - and Z - α - (N - benzoylamino) - α, β - unsaturated acids", *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 1709.

⁴⁵ また、オキサゾロン中間体をとらない N-ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニンのチオ酸を用いて同様の条件での反応も行った。その結果、脱水素体ジペプチドは観測されなかった。

Scheme B. Reaction with Cbz-Phe-SH

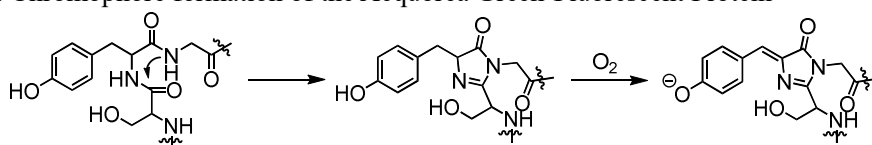


現在想定している酸化反応機構を示す(Scheme 21)。まず、金属塩により活性化された活性型ペプチドチオ酸(**X**)の分子内環化反応によりオキサゾロン中間体(**XI**)が生成する。オキサゾロン中間体(**XI**)は、脱プロトン化を経た芳香化により生ずるオキサゾロール中間体(**XII**)との平衡状態にある。なお立体情報は脱プロトン化の段階で消失する。通常の縮合反応においては、平衡状態にあるオキサゾロン中間体(**XV**)へのアミノ酸の求核攻撃によりエピ化したペプチド(**XVI**)が得られる。一方、今回の場合フェニルアラニンのベンジル位がベンゼン環とオキサゾロール環に挟まれたジベンジル位であるため極めて酸化を受けやすく、酸化剤(金属塩)による脱水素反応がオキサゾロン中間体への異性化に比べ優先的に進行したと考えている(**XII** → **XIII**)^{46, 47}。

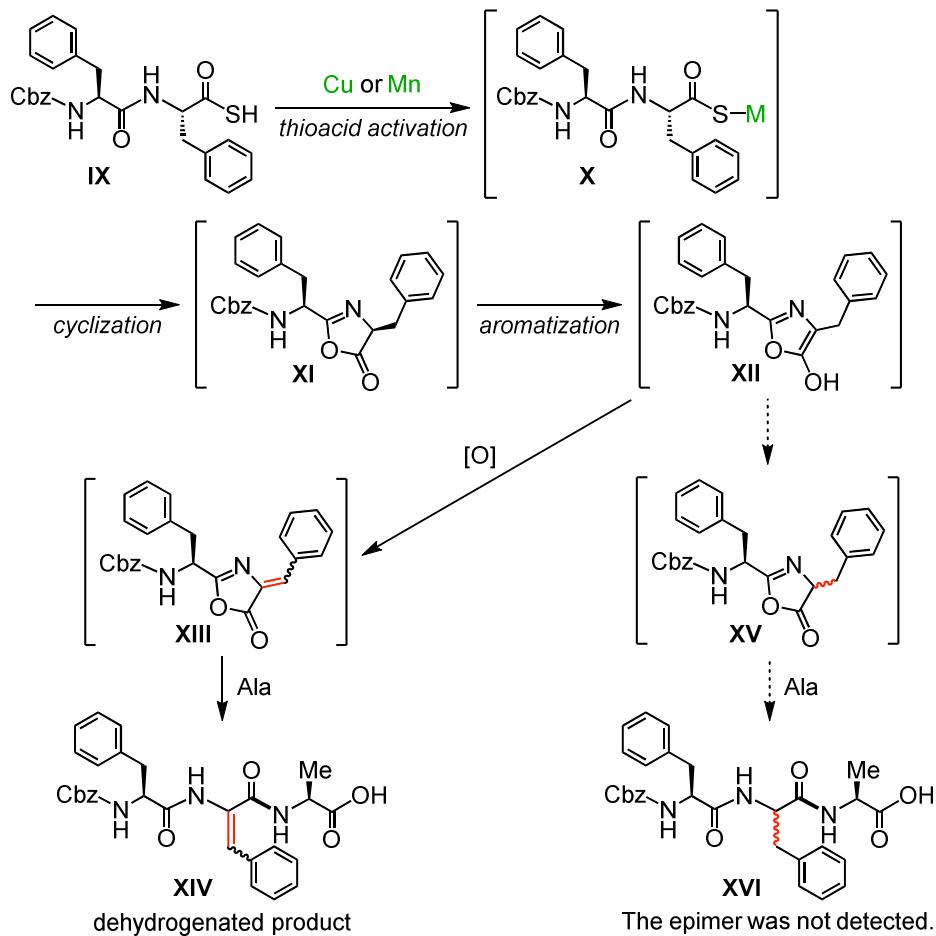
⁴⁶ 酸化がオキサゾロール中間体の電子豊富なエノラート α 位においてまず起こる可能性も考えられるものの、後述する C 末端アラニン型ジペプチドチオ酸を用いた場合に脱水素型副生物が観測されなかったことから、フェニルアラニンベンジル位が脱水素反応に重要な役割を果たしていると考えている。

⁴⁷ また、同様の反応として緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein, GFP)蛍光団の生成過程を参考にした((a) Cody, C. W.; Prasher, D. C.; Westler, W. M.; Prendergast, F. G.; Ward, W. W. “Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein”, *Biochemistry* **1993**, 32, 1212. (b) Heim, R.; Prasher, D. C.; Tsien, R. Y. “Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12501.)). GFP の場合には、中間体はイミダゾリノンであるが、酸素酸化によりチロシン残基ベンジル位と C α 位の間に二重結合形成する。

Scheme C. Chromophore formation of the Aequorea Green-Fluorescent Protein

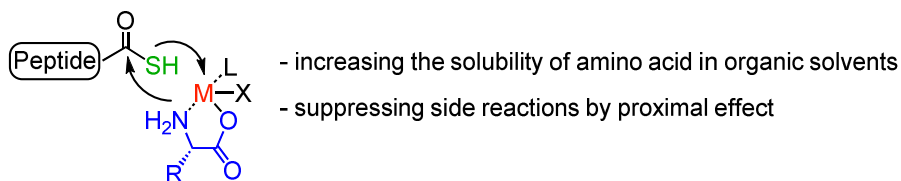


Scheme 21. Plausible mechanism of dehydrogenation



そこで、(1) アミノ酸の有機溶媒への溶解性を高める目的、(2) チオ酸活性化のための金属イオンと求核剤であるアミノ酸を近接させることによる脱水素やエピ化を防ぐ目的で、アミノ酸を金属原子との錯体化することにした(Figure 7)。なお、脱水素型副生物生成の可能性を減じるため、C末端がアラニンとなったジペプチドチオ酸を用いることとした⁴⁸。更に以降の検討では、意図しない副反応の抑制を最小限に抑えるため、単離精製を行ったジペプチドチオ酸を用いて検討を行った。

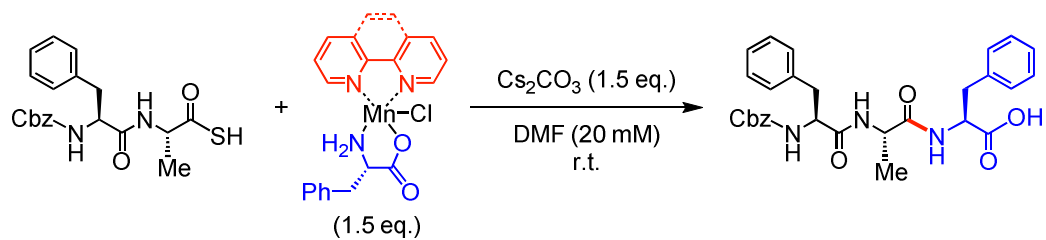
Figure 7. Complexation of amino acid with metal



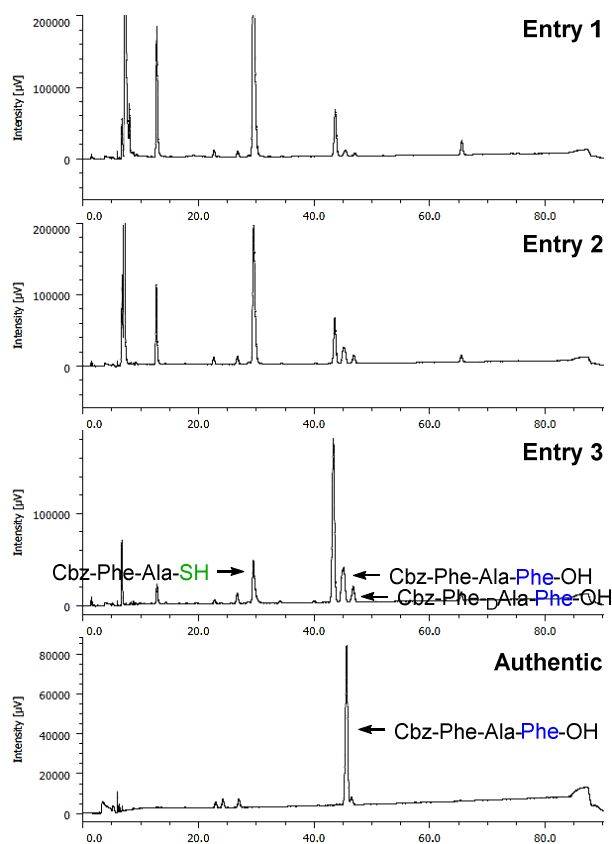
⁴⁸ C末端フェニルアラニン型基質を用いた初期検討では、アラニンのマンガン錯体を用いた場合いくつか配位子の検討をしたものの、いずれも脱水素型副生物が主生成物であった。

まず、先程までの結果により脱水素は進行したものの他の副生物の生成が相対的に抑えられていたマンガンを用いてフェニルアラニン錯体を調製し検討を行った(Table 14)。しかしながらこの場合、目的物とは異なる何らかの副生物⁴⁹が高い割合で生じ、同時にエピ化も観測された。

Table 14. Screening with Mn complexes



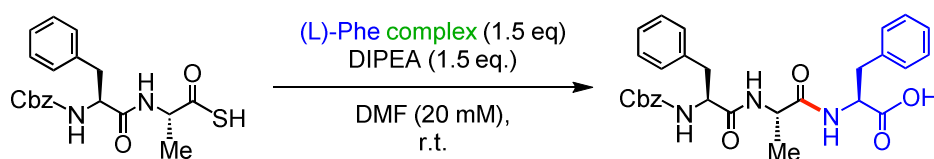
Entry	ligand	comment
1	phen	byproduct formation, severe epimerization
2	bipy	"
3	-	"



⁴⁹ 脱水素型副生物でないことは、LC-MS を用いた解析により確認している。

そこで次に、酸化力が極めて低く、かつ硫化物の溶解度が小さい典型金属のフェニルアラニン錯体を調製し検討を行った(Table 15)。その結果、塩化ビスマスを用いた場合にのみトリペプチドが観測された(entry 3~4)。また興味深い事実として、ビスマスとフェニルアラニン比 1:1 の錯体を用いた場合収率が 18%に留まった(entry 3)が、これがビスマスとフェニルアラニン比 1:2 の錯体の場合には、46%まで向上することが判った(entry 4)。

Table 15. Screening with main-group-metal complexes



Entry	(L)-Phe complex	tripeptide ^a (LLL form)
1	ZnCl-Phe	no reaction
2	PbCl-Phe	no reaction
3	BiCl ₂ -Phe	18%
4	BiCl-Phe ₂	46%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

この結果から、中心金属に配位するアミノ酸の内の一つが酸塩基反応によりチオ酸と交換した、中間体(XVII)が重要ではないかと考え(Scheme 22)、次にこの複数アミノ酸配位型の錯体を用いた検討を行った(Table 16)。

Scheme 22. Effect of the number of amino acids on the metal

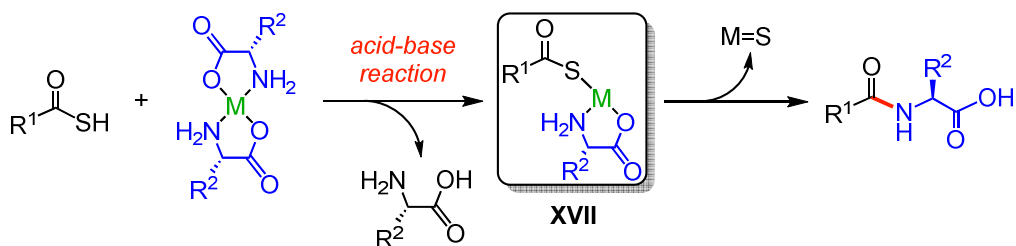
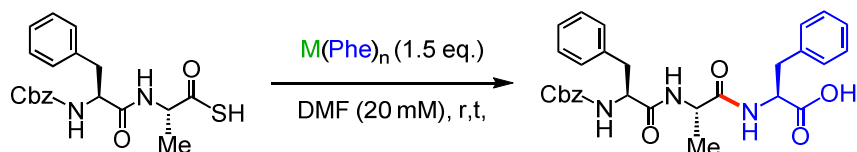


Table 16. Screening with metal complexes coordinated with plural number of amino acid



Entry	M(Phe) _n	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate
1	CuCl(Phe)	19%	8.0%
2	Cu(Phe) ₂	62%	1.6%
3	MnCl(Phe)	75%	25%
4	Mn(Phe) ₂	90%	< 1.0%
5	Bil(Phe) ₂	46%	< 1.0%

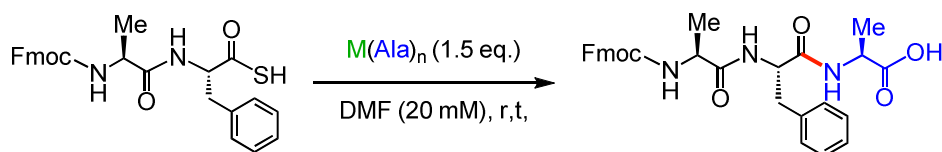
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

その結果、二つのアミノ酸が配位した銅錯体を用いた場合(entry 2)、及び同様のマンガン錯体を用いた場合(entry 4)において、配位するアミノ酸の数が一つの場合(entry 1・3)に比べて、それぞれ収率とエピ化の大幅な改善が見られた。特に、マンガン錯体を用いた場合で、90% 収率・1%以下のエピ化と十分な結果が得られた(entry 4)。

そこで、先程脱水素型副生成物が問題となった C 末端フェニルアラニン型基質についても複数アミノ酸配位型の錯体を用いた検討を行った(Table 17)。しかしながらこの場合、収率・エピ化に於いて中程度の結果に留まり、先程良好な結果が得られていたマンガン錯体の場合においても、脱水素体副生物が観測された(entry 2)。

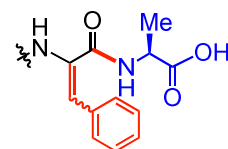
Table 17. Reaction using C-terminal phenylalanyl thioacid



Entry	M(Ala) _n	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	dehydrogenation ^a
1	Cu(Ala) ₂	57%	4.9%	n.d.
2	Mn(Ala) ₂	59%	n.d.	17%
3	Bil(Ala) ₂	55%	3.1%	n.d.

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).



dehydrogenation

そこで次に、縮合剤を用いた通常のペプチド縮合反応において、二価の銅塩と HOBt の添加により収率とエピ化の改善がみられるという報告⁵⁰を参考に、HOBt 誘導体の添加を試した(Table 18)。その結果、entry1~3 に見られるように C 末端フェニルアラニン型基質においても大幅な状況の改善が見られ、特に HOAt を添加した際に 94%収率、3.6%のエピ化という結果を得ることに成功した(entry 3)。

Table 18. Simultaneously use of copper complex and HOBt derivatives

Entry	R-NOH	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)
0	-	57%	4.9%	20%
1	HOBt	92%	5.6%	2.2%
2	HOObt	88%	8.9%	2.7%
3	HOAt	94%	3.6%	2.1%
4	Oxyrna	75%	18%	5.8%

HOBt

HOObt

HOAt

Oxyrna

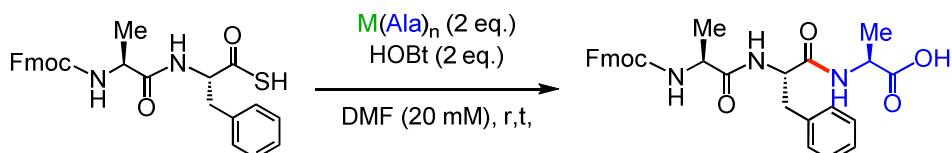
^aDetermined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

⁵⁰ (a) Miyazawa, T.; Otomatsu, T.; Fukui, Y.; Yamada, T.; Kuwata, S. "Racemization-free and efficient peptide synthesis by the carbodiimide method using 1-hydroxybenzotriazole and copper(II) chloride simultaneously as additives", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 419. (b) Joseph, R.; Dyer, F. B.; Garner, P. "Rapid formation of *N*-glycopeptides via Cu(II)-promoted glycosylative ligation", *Org. Lett.* **2013**, *15*, 732.

なお、HOBt 誘導体の添加効果が他の金属原子錯体についても適用し得るかどうかについての検討も行った (Table 19)。添加効果は幅広い金属種で観測され、特にマンガン・アンチモン・ビスマスを用いた場合に高収率でトリペプチドが得られたものの、収率・エピ化の二つの観点からは銅原子が最適であった⁵¹。

Table 19. Simultaneously use of other metal complexes and HOBt



Entry	M(Ala) _n	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)
0	Cu(Ala) ₂	92%	5.6%	2.2%	-
1	Mn(Ala) ₂	77%	3.7%	18%	-
2	Sb(Ala) ₃	89%	6.2%	4.5%	-
3	Bi(Ala) ₃	86%	6.4%	7.0%	-
4	BiI(Ala) ₂	79%	11%	8.9%	-
5	Fe(Ala) ₃	66%	3.5%	30%	-
6	Co(Ala) ₂	43%	-	16%	40%
7	Ni(Ala) ₂	7.6%	-	-	92%
8	Zn(Ala) ₂	5.4%	-	2.3%	93%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

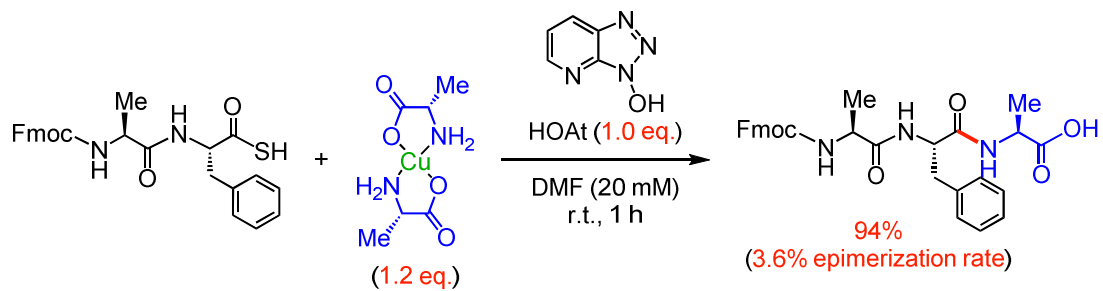
^b LDL form / (LLL form + LDL form).

⁵¹ なお残留金属毒性の観点では、銅に比べマンガン・アンチモン・ビスマスの方が生体への影響は少ないとされている(「医薬品の金属不純物ガイドライン」

<https://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiulLbAh87JAhWFJZQKHT7IDZQQFggbMAA&url=http%3A%2F%2Fsearch.e-gov.go.jp%2Fervlet%2FPcmFileDownload%3FseqNo%3D0000104443&usg=AFQjCNFdIU8JG1yIF-UxqLIEd8hH9qcsJw&bvm=bv.109332125,d.dGo> 2015 年 12 月 9 日参照)。

その後、銅錯体と HOAt を用いた条件を基に更なるエピ化の改善 (< 1.0%) に向けた検討⁵²を行った。その結果、銅錯体の量は 1.2 当量まで、HOAt の量は 1.0 当量までそれぞれ低減可能なことが判ったもののエピ化の改善を実現することはできていない (Scheme 23)。

Scheme 23. Optimized conditions

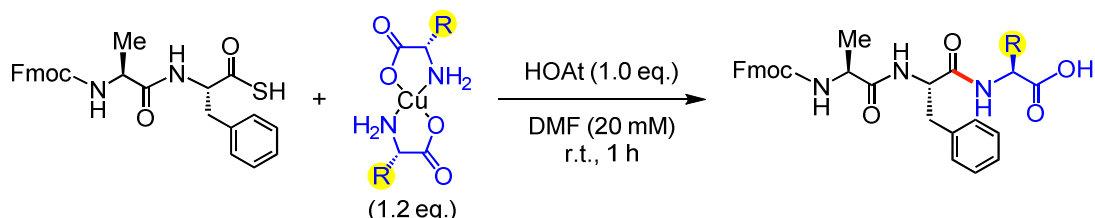


⁵² 銅錯体や添加剤の量・比、反応剤の濃度、反応温度の検討を行った。

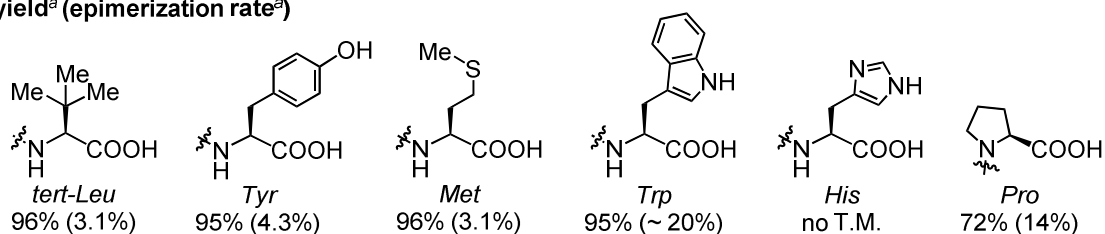
4.2.2. Scope & Limitation

反応の基質適応範囲をみる検討を行った。まず、C末端フェニルアラニン型チオ酸基質に対するアミノ酸側の適応範囲をみた(Table 20)。

Table 20. Substrate scope of amino acid



yield^a (epimerization rate^a)



^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

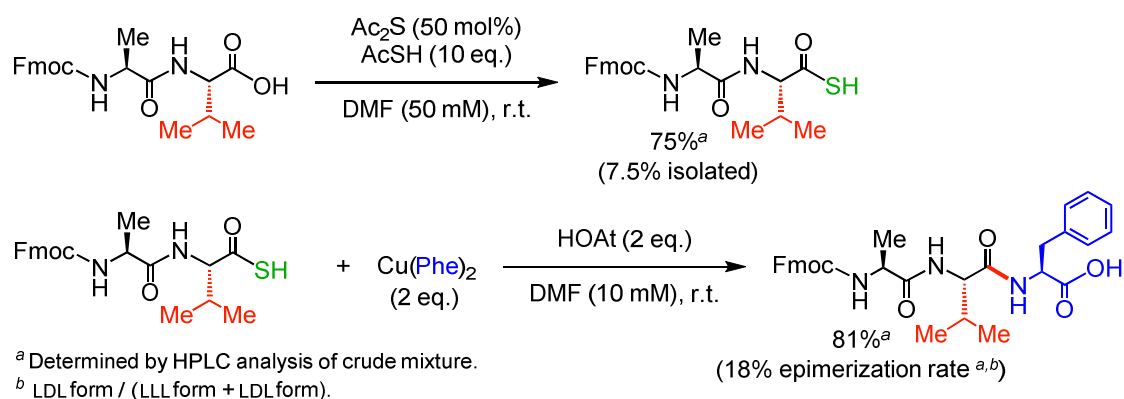
tert-ロイシンのような高いβ多置換アミノ酸⁵³や、無保護のチロシン、硫黄原子を含むメオニンでも反応は円滑に進行した。一方で、無保護のトリプトファンを用いた場合反応は高い変換率で進行したものの、同時に高い割合でエピ化が観測された。また、同じく窒素芳香環を有する無保護のヒスチジンをを用いた場合には、反応は全く進行しなかった⁵⁴。更に、イミノ酸であるプロリンを用いた場合、トリプトファンの場合同様に反応は高い変換率で進行したものの高い割合でエピ化が観測された。反応点である窒素原子周辺の立体障害が問題であると考えている。

⁵³ α,α-ジメチルグリシンでも反応が高収率に進行することが確認できたが、標品を用いた順相・逆相 HPLC 解析いずれにおいてもジアステレオマーの分離が困難であったことから、エピ化の割合を算出することができなかった。

⁵⁴ なお、イミダゾール環窒素原子をトリチル基で保護したヒスチジンをを用いた場合、LC-MS による簡単な解析ではあるが、目的トリペプチドの生成を確認することができた。トリプトファンの場合もインドール窒素原子の保護を行うことで、状況が改善されると予測している。

次にチオ酸側の基質適応範囲をみる検討を行った。ペプチド縮合反応では一般に C 末端アミノ酸残基 β 位の置換数が反応の収率やエピ化に大きな影響を与えることが知られている。そこでジペプチドチオ酸 C 末端をバリンに変更し検討を行った(Scheme 24)。

Scheme 24. Substrate scope of peptidyl thioacid

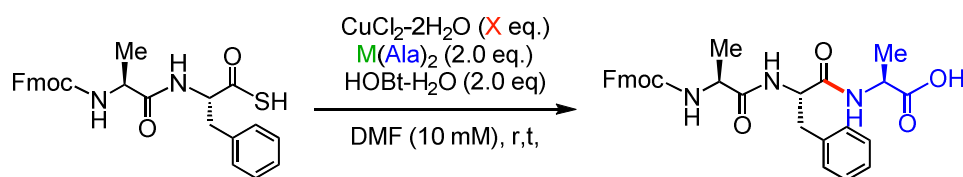


その結果、求核剤としてフェニルアラニンを用いた場合に高い変換率でトリペプチドは得られたものの、20%以上のエピ化が観測された。反応の実用化を考えた場合、 β 位の置換数が多いバリン・イソロイシン・トレオニンといったアミノ酸にも適用し得る、より堅牢な方法論の開発が必要であることが判った。

4.2.3. Unsuccessful Attempts for Catalytic Activation

同様にプロセスの実用化を見据え、Gopi らの報告⁶では実現していた銅原子の触媒化の検討も行った。橋元らの報告³⁷を基に、アミノ酸源としてアミノ酸のカルシウム塩やバリウム塩を用い、初期検討時に良好な変換効率を示していた塩化銅を活性化剤とし添加量の検討を行った(Table 21)。

Table 21. Reducing the amount of copper salt



Entry	X	M(Ala) _n	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)
0 ^c	-	-	92%	5.6%	2.2%	-
1	0.5	Ca(Ala) ₂	11%	-	10%	78%
2	2.0	Ca(Ala) ₂	89%	8.1%	2.6%	-
3	0.5	Ba(Ala) ₂	29%	1.5%	17%	47%
4	2.0	Ba(Ala) ₂	92%	5.5%	2.2%	-

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

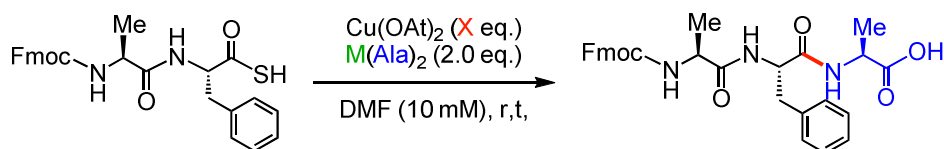
^b LDL form / (LLL form + LDL form).

^c 2 eq. of Cu(Ala)₂

塩化銅を 2 当量添加した場合においては、事前に調製した銅-アミノ酸錯体を加えた場合の結果と変わらない収率・エピ化でトリペプチドを得た(entry 2, 4)。しかしながら、塩化銅の量を 0.5 当量にまで低減させたところ、反応は進行したものの完結せず得られたトリペプチドの量も添加した銅原子量以下であった(entry 1, 3)。

また、銅原子量と同時に HOAt の添加量を低減する目的で、銅と HOAt からなる錯体を用いた検討も行った (Table 22)。銅原子によるチオ酸活性化時に、チオ酸・銅原子・アミノ酸・HOAt の全てが互いに近傍に存在することを想定し、同時にエピ化の改善も期待した。

Table 22. Reducing the amount of copper and HOAt



Entry	X	M(Ala) _n	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)
0 ^c	-	-	94%	3.6%	2.1%	-
1	0.5	Ca(Ala) ₂	57%	20%	11%	-
2	2.0	Ca(Ala) ₂	23%	3.1%	11%	-
3	0.5	Ba(Ala) ₂	19%	-	4.6%	76%
4	2.0	Ba(Ala) ₂	19%	-	7.6%	73%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

^c 2 eq. of Cu(Ala)₂ and 2 eq. of HOAt

しかしながらこの場合も、状況の改善は見られなかった。先程の塩化銅と HOAt を別に加えた系の結果との違いは、HOAt の銅原子に対する高い配位力によりアミノ酸が活性中間体近傍に適切に存在しなかったためだと考えている。

以上示した結果は、ジペプチドチオ酸と無保護アミノ酸から高収率に C 末端無保護トリペプチドを得た初めての例ではあるが、合成プロセスの実用化を目指した場合に多くの改善すべき点が残されている。具体的にはこれまでも本論中で述べてきた、(1) エピ化の更なる低減 (< 1.0%)、(2) 当量の重金属の使用の回避、(3) 当量の HOAt の使用の回避、などである。

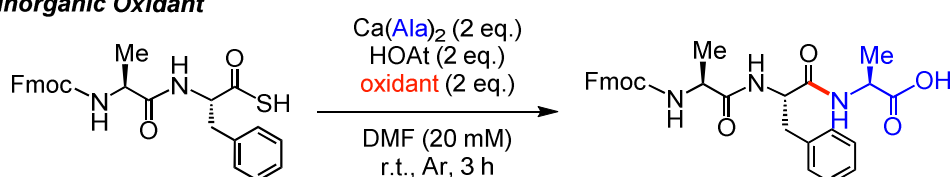
そこで次にこれらの問題を解決する目的で、重金属以外のペプチドチオ酸活性化剤の探索を行うこととした。

4.3. Oxidant for Thioacid Activation

4.2 の検討で酸素の存在が反応開始に影響していた例があったこと、また硫黄原子の性質から、各種無機・有機酸化剤の検討を行った(Table 23)。有機酸化剤(Table 23a)を用いた場合には反応系が複雑化した。一方で、無機酸化剤(Table 23b)を用いた場合には、恐らく試薬の DMF への低溶解性により、ほとんどの場合で反応の進行は一部に留まった⁵⁵。しかしながら、ヨウ素分子や *N*-ヨードスクシンイミドなどのヨウ素系酸化剤を用いた場合に比較的良好な結果が得られることが判った(entry 7, 15)。

Table 23. Thioacid activation by various organic or inorganic oxidants

a. Inorganic Oxidant



Entry	oxidant	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)	deprotection ^a of Fmoc
0 ^c	-	3.4%	-	5.7%	73%	-
1	NaNO ₂	10%	-	4.7%	69%	8.3%
2	NaNO ₃	6.5%	-	4.1%	66%	16%
3	KNO ₂	12%	-	9.9%	61%	7.0%
4	<i>t</i> BuNO ₂	24%	trace	49%	16%	-
5	K ₂ S ₂ O ₈	19%	trace	4.9%	54%	6.2%
6	Oxone (KHSO ₅)	32%	2.0%	57%	9.8%	31%
7	I ₂	80%	5.4%	4.9%	-	-

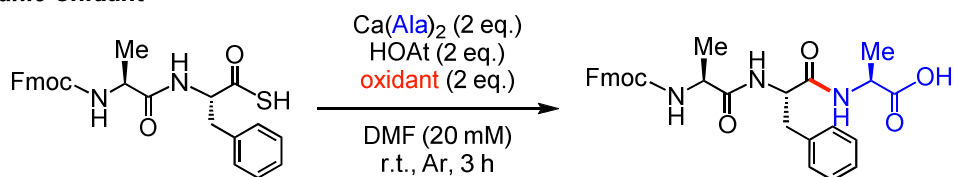
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

⁵⁵ また、興味深い事実として HOAt の添加のみで反応が進行することも確認した。反応開始後 3 時間以内に反応が完結し得る金属原子や酸化剤を加えた場合に比べて反応速度は極めて遅い(反応開始後 3 時間でトリペプチドの収率は 5% 以下)ものの、18 時間後には収率 70% 程度、5% 前後のエピ化でトリペプチドが得られることを確認している。なお、DMSO 中 HOBt を用いたペプチドチオ酸の活性化については、Danishefsky らが参考文献 28 において報告している。

Table 23. (Continued)

b. Organic Oxidant



Entry	oxidant	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)	deprotection ^a of Fmoc
0 ^c	-	3.4%	-	5.7%	73%	-
8	Benzoquinone	trace	-	-	5.2%	46%
9	Chloranil	30%	1.8%	11%	-	-
10	Cumene Hydroperoxide	35%	1.9%	31%	-	7.4%
11	<i>tert</i> -Butyl peroxide	7.9%	-	4.9%	14%	17%
12	Pentanedione peroxide	39%	2.1%	18%	-	6.5%
13	<i>tert</i> -Butyl peroxybenzoate	6.0%	-	3.9%	35%	46%
14	NCS	56%	3.3%	6.1%	-	-
15	NIS	71%	4.7%	6.0%	-	-

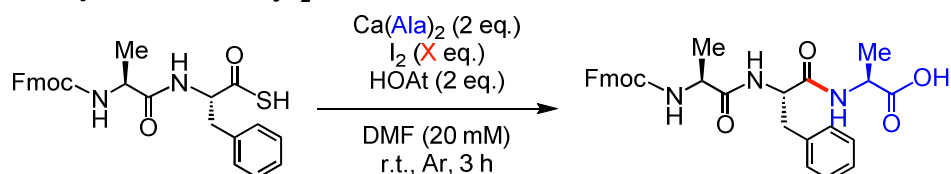
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

そこで次に、ヨウ素分子の系(Table 23, entry 7)を基に更なる条件の最適化を図った(Table 24)。その結果、ヨウ素の添加量を 50 mol%に低減させた際に 70%収率でトリペプチドが得られヨウ素の触媒作用を観測することができた(Table 24a)⁵⁶。しかしながら、反応のパラメータを様々に変えて検討を行ったものの、検討の範囲内では収率(> 90%)・エピ化(< 5.0%)の改善を実現することができなかつたため、ヨウ素を用いた検討を断念した。

Table 24. Examined parameters and selected screening results using iodine

a. Catalytic Activation by I₂



Entry	X	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)
0	2	80%	5.4%	4.9%	-
1	0.5	71%	5.9%	8.0%	5.3%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

b. Screened Parameters

Ratio of Ca(Ala)₂ and I₂

Solvent: DMF → DMA, NMP

Metal: Ca → Mg, Sr, Ba

Oxidant: I₂ → Br₂, I-Cl, NIS, DIH, Py₂IBF₄,

Temperature: r.t. → 0 °C, - 20 °C, - 40 °C

Atmosphere: Ar → Air

Concentration: 20 mM → 10 mM, 40 mM

⁵⁶ なお、Danishefsky らは同じ参考文献 28 において過剰量の HOBt と触媒量のヨウ素を添加することによるペプチドフラグメントカップリング反応を行っている。なお、Table 24 の検討では、HOAt の添加の有無で収率・エピ化に変化はなかった。

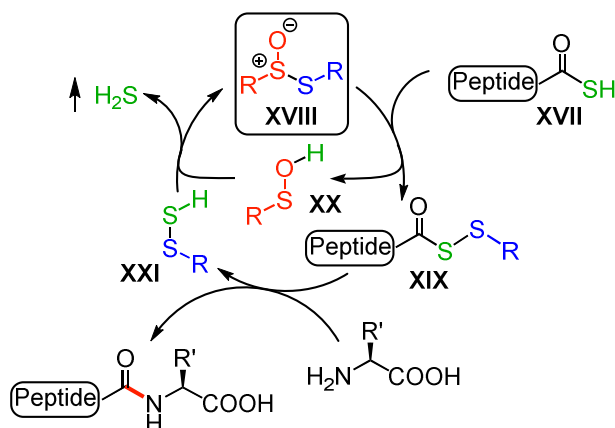
4.4. Thiosulfinate, Thiosulfonate, and Disulfide for Thioacid Activation

4.4.1. Catalyst Design

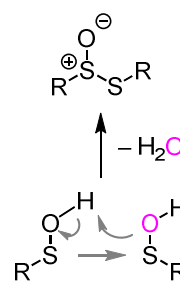
当量重金属の使用回避とエピ化抑制を目指し、独自の触媒機構設計に基づいた有機分子触媒の検討を行った。具体的には、チオスルフィネート(チオスルフィン酸エステル)を用いたチオ酸縮合反応の開発に着手した(Scheme 25a)。まず、チオカルボン酸(XVII)とチオスルフィネート(XVIII)の間でアシルジスルフィド(XIX)が生成する⁵⁷。この活性種は、チオ酸やチオエステルと比べて強く活性化されており、ペプチド結合形成に十分な反応性を示す⁵⁸。触媒再生の段階では、スルフェン酸が容易に二量化する特徴(Scheme 25b)より着想を得て、スルフェン酸(XX)とチオスルフェン酸(XXI)の二つの脱離基が、硫化水素を放出する設計をした。

Scheme 25. Thiosulfinate-based organocatalyst

a. Designed Catalytic Cycle



b. Dimerization of Sulfenic Acid



またエピ化の抑制には、チオスルフィネート部位にアミノ酸を活性種へ近接させる認識部位を導入することで解決することとした(後述)。これは、エピ化につながる分子内環化反応が、分子間反応である望みの縮合反応よりも速いという仮定に基づく。そこで、アミノ酸認識部位を導入することにより、縮合反応も分子内反応となり、アミドとアミンの反応性の違いから、より高い反応性を有するアミンでの優先的な反応が進行すると考えた。なお同様の考え方は、C末端がエステルもしくはチオエステル構造をもったペプチドへのアミド結合形成反応にも数多く用いられている⁵⁹。

⁵⁷ Freeman, F.; Huang, B. G.; Lin, R. I. S. "A facile synthesis of acetyl alkyl disulfides", *Synthesis* **1994**, 699.

⁵⁸ Zhang, L.; Tam, J. P. "Orthogonal coupling of unprotected peptide segments through histidyl amino terminus", *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3.

⁵⁹ (a) Coltart, D. M. "Peptide Segment Coupling by Prior Ligation and Proximity-Induced Intramolecular Acyl Transfer", *Tetrahedron* **2000**, 56, 3449. (b) Hemantha, H. P.; Narendra, N.; Sureshbabu, V. V. "Total chemical synthesis of polypeptides and proteins: chemistry of ligation techniques and beyond", *Tetrahedron* **2012**, 68, 9491. (c) Ishiwata, A.; Ichiyangi, T.; Takatani, M.;

4.4.2. Search for Catalyst Moiety

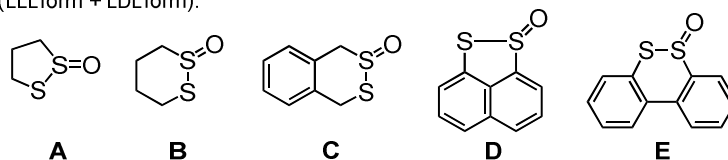
チオスルフィネートの触媒能を確かめるための検討を行った。Scheme 25 で言及したこれまでの報告内容を踏まえ、触媒再生の段階が知見に乏しく触媒回転の障壁になり得ると考えた。そこでこの段階を促進するために、スルフェン酸とチオスルフェン酸の二つの脱離基が同一分子内に留まる環状チオスルフィネートでの検討をまず行った(Table 25)。

Table 25. Thioacid activation by cyclic thiosulfonates

Entry	thiosulfonate	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate	hydrolysis ^a (dipeptide)	S.M. ^a (thioacid)	deprotection ^a of Fmoc
0	-	3.4%	-	5.7%	73%	-
1	A	3.6%	-	2.0%	48%	40%
2	B	4.6%	-	2.4%	51%	36%
3	C	9.4%	-	3.6%	27%	52%
4	D	47%	3.8%	8.7%	15%	-
5	E	30%	2.1%	5.4%	9.8%	31%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

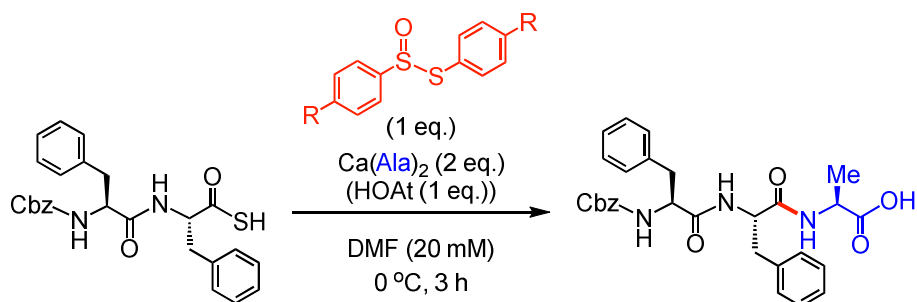


当量での初期検討の結果、脂肪族環状チオスルフィネートを用いた場合、目的トリペプチドの収率は10%以下に留まり、出発物のチオ酸が30~50%の割合で残っていた(entry 1~3)。脂肪族アシルジスルフィドの反応性の低さ、もしくは脂肪族スルフェン酸の高求核能によるチオスルフィネート再生の逆反応が問題であると考え、次に芳香族環状チオスルフィネートを検討した(entry 4, 5)。しかしながら、チオ酸のトリペプチドへの変換効率に多少の改善が見られたものの、チオ酸は完全には消失せずトリペプチドの収率も中程度に留まった。

Ito, Y. "Chemoselective peptide bond formation using formyl-substituted nitrophenylthio ester", *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3187. 他には NCL について述べた参考文献 17 を参照。

そこで先程の仮定とは反対に、チオスルフィネート周囲の立体障害がペプチド結合形成の障害になっていると考え、次に非環状チオスルフィネートを用いた検討を行った。単純なフェニルチオスルフィネート及び *p*-メトキシ基を有するチオスルフィネートでの検討を用い、HOAt 添加有無でも条件を変え検討を行った(Table 26)。

Table 26. Thioacid activation by acyclic thiosulfonates



Entry	R	HOAt	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate
1	H	X	49%	8.6%
2	H	O	63%	9.9%
3	OMe	X	65%	5.0%
4	OMe	O	71%	14%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

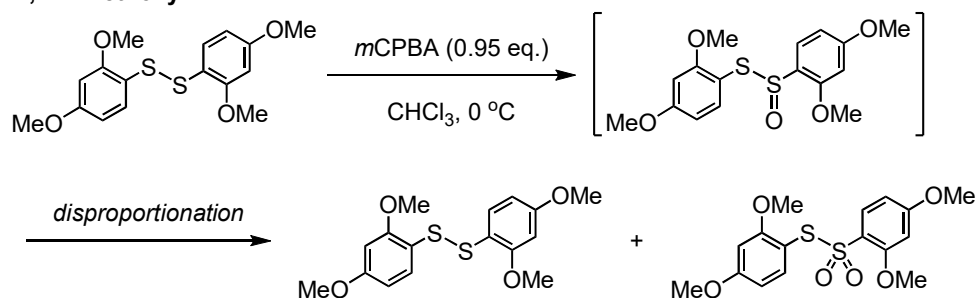
^b LDL form / (LLL form + LDL form).

当量での初期検討の結果、いずれもチオ酸の消失が観測された。HOAt の添加により多少の収率の改善は見られたものの、エピ化抑制効果は観測されなかった(entry 1 vs 2, entry 3 vs 4)。また、チオスルフィネートベンゼン環上の電子密度の比較(entry 1 vs 3, entry 2 vs 4)では、より電子豊富なものの方が収率・エピ化で若干の改善が見られた(entry 3)ことから、ベンゼン環上の電子密度を変えたチオスルフィネートの合成を行い、ペプチド結合形成反応への検討をすることにした。

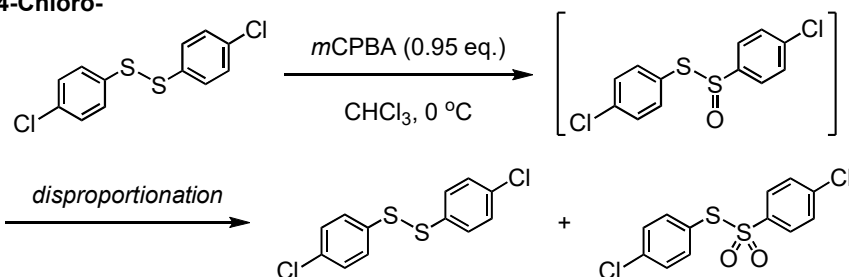
具体的には、*p*-メトキシ体に比べより電子豊富なものとして2,4-ジメトキシ体及び*p*-ジメチルアミノ体の合成を、フェニル体に比べより電子不足なものとして *p*-クロロ体の合成を試みた(Scheme 26)。

Scheme 26. Synthetic effort of several acyclic thiosulfonates

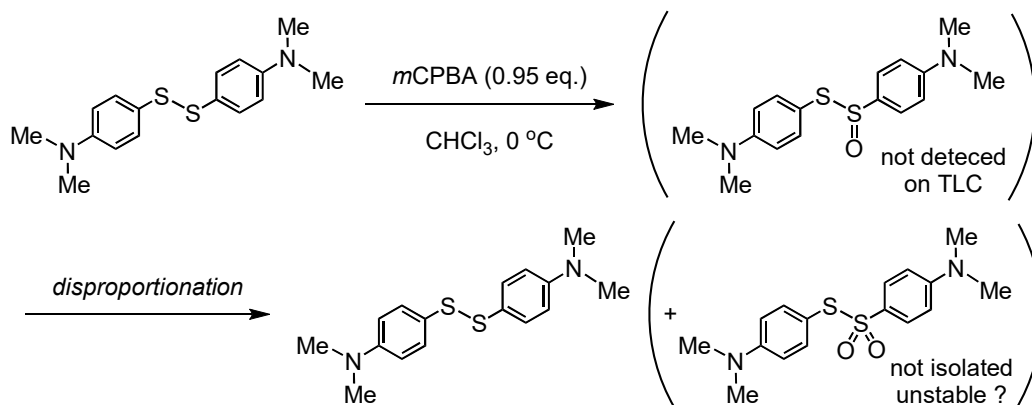
a. 2,4-Dimethoxy-



b. 4-Chloro-



c. 4-Dimethylamino-

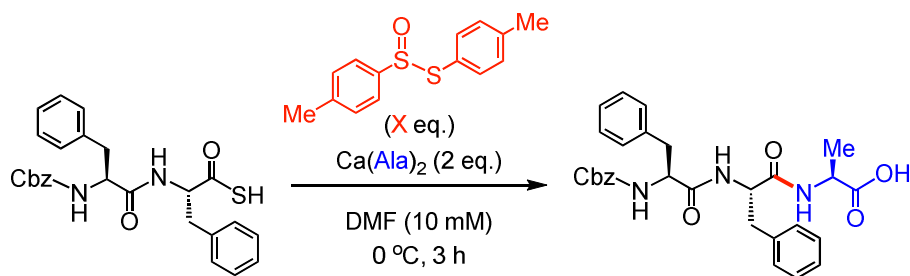


しかしながら、2, 4-ジメトキシ体及び *p*-クロロ体の場合、TLC 上で目的のチオスルフィネートと思われるスポットは観測されたものの、カラムクロマトグラフィー精製中に起こったと思われるチオスルフィネートの不均化により、単離された化合物はジスルフィドとチオスルフォネート(チオスルホン酸エステル)の混合物であった(Scheme 26a, b)。また *p*-ジメチルアミノ体の場合では、不均化後のチオスルフォネートの安定性に問題があったためか、

1 当量の酸化剤添加後でも TLC 上ではジスルフィドのスポットが観測されるのみであった (Scheme 26c)。

この結果より、チオスルフィネートの安定性が将来的な反応系の最適化を行っていくにあたり障害になると考えたため、安定に単離することができた非環状芳香族チオスルフィネートを用いてチオ酸の触媒的活性化の有無の確認を行った (Table 27)。

Table 27. Catalytic activity toward thioacid by acyclic thiosulfinates



Entry	X	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate
1	1	45%	14%
2	0.5	36%	13%
3	0.2	27%	12%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

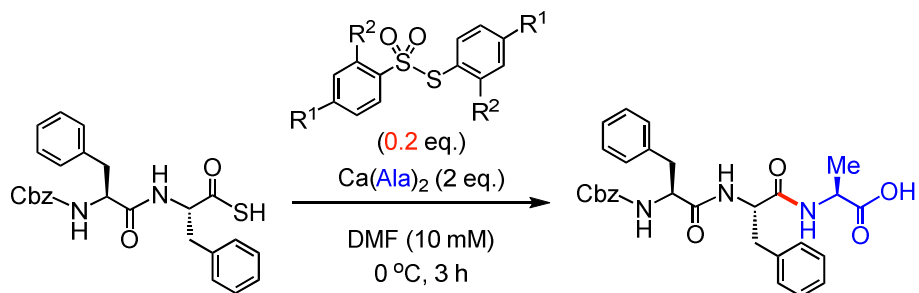
^b LDL form / (LLL form + LDL form).

その結果、添加したチオスルフィネートの量以上のペプチドを得ることはできなかつたため、チオスルフィネートを用いた検討を断念した⁶⁰。

⁶⁰ 非環状脂肪族チオスルフィネートを用いることによりチオ酸の触媒的活性化が行える可能性も残されているが、エピ化の抑制が困難であると判断し検討を行わなかつた。

副生物として得られたチオスルフォネートによるペプチド結合形成反応の検討も行った (Table 28)。

Table 28. Catalytic activity toward thioacid by acyclic thiosulfonates



Entry	R ¹	R ²	tripeptide ^a (LLL form)	epimerization ^{a,b} rate
1	Cl	H	47%	15%
2	MeO	H	16%	17%
3	MeO	MeO	15%	14%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

予想外の結果として、*p*-クロロ体を用いた場合において、添加したチオスルフォネートの量以上のトリペプチドの生成が観測された (entry 1)。詳細な触媒機構は現在のところ不明であるが、今後はより安定性の高いチオスルフィネートでの検討を行っていく予定である。

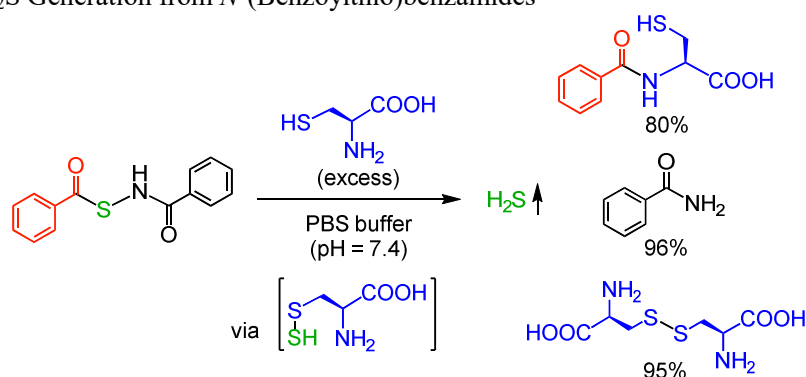
4.4.3. Search for Epimerization-Suppressing Moiety

反応剤合成の容易さから、チオ酸との間の当量反応で同じ活性中間体であるアシルジスルフィドを生成するジスルフィドを活性化剤として、認識部位の候補探索のための予備検討を行った⁶¹。

まずは、カルボニル基によるヘミアミナール形成をアミノ酸認識中間体(Table 29a)として用いることを想定し、オルト位にカルボニル等価体を有するジスルフィドの検討を行った(Table 29b)。その結果、まずオルト位にホルミル基を持つジスルフィド A では 9.4% という高い割合でエピ化が観測された。ヘミアミナール形成後に脱水を経て生じるイミンの安定性が、アミノ酸へのアシル転位の障害になっていると考え⁶²、そこで次にその強い求電子性からヘミアミナール構造を安定にとり易い⁶³トリフルオロアセチル基を持つジスルフィド B を試した。しかしながら逆にエピ化の悪化が観測されてしまった⁶⁴。いずれの場合においても反応系が複雑化したことから、チオ酸のジスルフィドカルボニル部位での副反応が問題であると考えた。

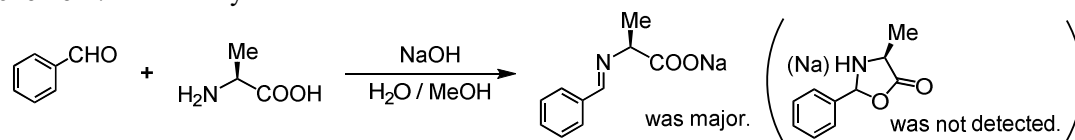
⁶¹ ジスルフィドも触媒となり得る例として、チオールとチオスルフェン酸から硫化水素を放出し、ジスルフィドが再生するという報告も存在する：Zhao, Y.; Wang, H.; Xian, M. “Cysteine-activated hydrogen sulfide (H₂S) donors”, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15.

Scheme D. H₂S Generation from *N*-(Benzoylthio)benzamides



⁶² いくつかの報告(*J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3586. etc.)を参考に、ジスルフィド A とアラニンから想定活性中間体であるオキサゾリジノンの観測を試みた。しかしながら、イミン体が観測されたのみであった。

Scheme E. NMR study of disulfide A and alanine

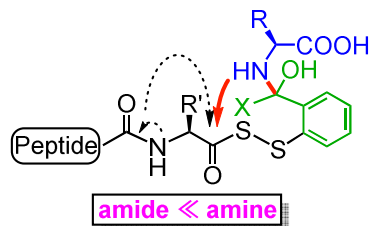


⁶³ Kelly, C. B.; Mercadante, M. A.; Leadbeater, M. E. “Trifluoromethyl ketones: properties, preparation, and application”, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11133.

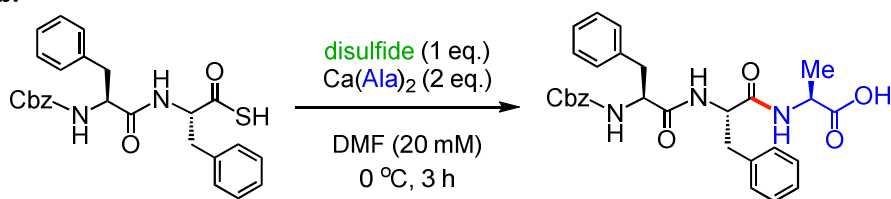
⁶⁴ トリフルオロアセチル基がメタ位もしくはパラ位に存在するジスルフィドでの検討も行ったが、収率・エピ化においてジスルフィド B とほぼ変わらない結果が得られた。トリフルオロアセチル基は単に電子求引基として働いていたのみだと考えている。

Table 29. Suppressing epimerization via hemiaminal intermediate

a.



b.



disulfide		
	A	B
tripeptide ^a (LLLform)	54%	53%
epimerization ^{a,b} rate	9.4%	14%

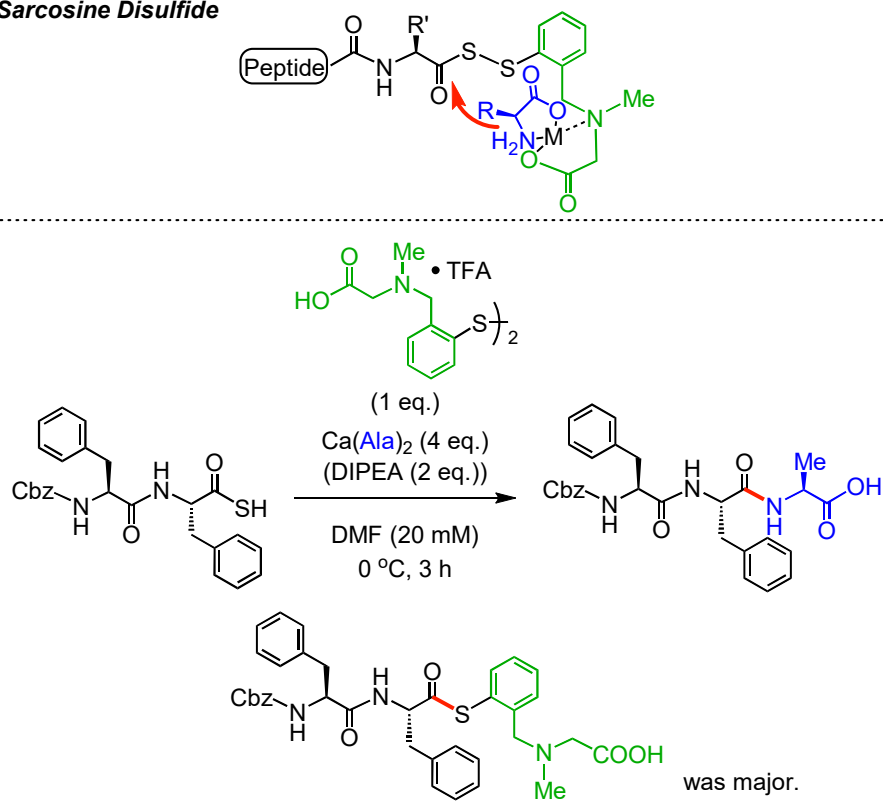
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

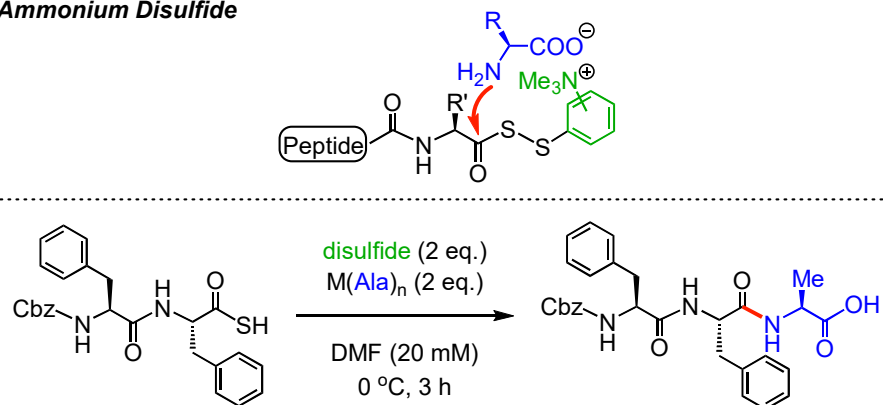
そこで、チオカルボキシル基共存下でも機能するアミノ酸認識部位として、サルコシン(*N*-メチルグリシン)構造をアミノ酸カルシウム塩への認識部位として用いることを想定したジスルフィド、もしくは第四級アンモニウム構造をアミノ酸の対イオンとして利用するジスルフィドの検討を行った(**Table 30**)。ベンジル位にサルコシン部位を導入したジスルフィドを用いた場合(**Table 30a**)、チオ酸との反応前にカルシウム塩に配位するアラニンの一部をジスルフィドサルコシン部位と交換する目的で、事前にジスルフィド・アラニン-カルシウム塩・塩基を加え反応を行った。その結果、チオ酸は完全に消失したものの、目的トリペプチドの量は 20%程度に留まり、チオエステルが副生物として高い割合で観測された。また、第四級アンモニウム基を持つジスルフィドを用いた場合においても(**Table 30b**)、事前にイオン交換を行ってチオ酸との反応を行ったが、いずれの場合も 20%程度のエピ化が進行し効果は見られなかった。第四級アンモニウム基は単なる電子求引基として機能したのみと考えている。

Table 30. Suppressing epimerization through non-covalent interaction

a. Sarcosine Disulfide



b. Ammonium Disulfide



	I ⁻ Me ₃ N ⁺ (S) ₂		Me ₃ N ⁺ (S) ₂ I ⁻		Me ₃ N ⁺ (S) ₂ I ⁻
disulfide					
M(Ala) _n	Ca(Ala) ₂	NaAla	Ca(Ala) ₂	NaAla	NaAla
tripeptide ^a (LLL form)	38%	44%	46%	34%	34%
epimerization ^{a,b} rate	18%	23%	18%	21%	24%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LDL form / (LLL form + LDL form).

上記のジスルフィドを用いた今回の検討では、ペプチド結合形成時のエピ化が抑制可能な最適のアシルジスルフィド構造を見出すことはできなかった⁶⁵。今後は、ジスルフィドと比べチオ酸への反応性が高く、チオスルフィネートと比べ安定性に優れ、触媒的效果も観測されたチオスルフォネートを用いて同様の検討を行っていく予定である。

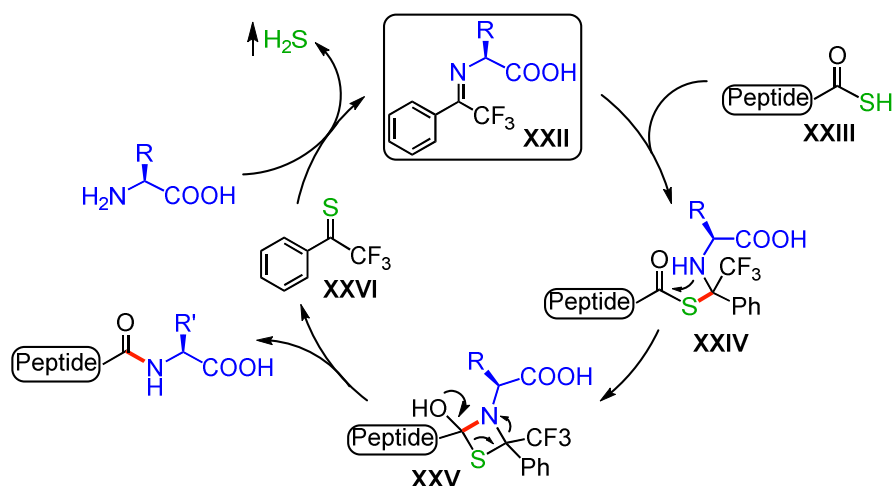
⁶⁵ この他に検討したものとして、アシルジスルフィド中間体の脱離基部位の電子的性質などが、エピ化に及ぼす影響を調べるため、ジスルフィド化合物の網羅的な検討も行った。

1. パラ位にメトキシ基からニトロ基・トリメチルアンモニウム基を持つ電子的性質の異なるジスルフィドを試した。電子不足な置換基を持つジスルフィドであるほどトリペプチドの収率は向上した(max. ~50%)ものの、エピ化(~30%)に違いは見られなかった。また、オルト位にカルボキシル基やヒドロキシル基を持つ、活性点付近に官能基が存在するジスルフィドを用いた場合も同様のエピ化率であった。
2. 窒素・酸素・硫黄を含むヘテロ環芳香族ジスルフィドも試した。5員環・6員環の違い、ベンゼン環との縮環構造の有無、窒素芳香環では窒素原子の数などが異なるジスルフィドを試したが、この場合もトリペプチドの収率(max. ~50%)、及びエピ化(20~30%)に改善は見られなかった。
3. 脂肪族直鎖ジスルフィドを用いた場合、多くの場合でチオ酸との反応が進行しなかった。検討した中では、ジチオジグリコール酸を用いた場合のみチオ酸は完全に消失し、ジペプチドのチオグリコール酸チオエステルが主生成物として高い割合で得られた。
4. ジスルフィドの代わりにジセレニドを用いた検討も行った。フェニルジスルフィド及びフェニルジセレニドの比較では、いずれも収率40%程度、エピ化25%程度の結果に留まり、両者の差異は認められなかった。

4.5. Trifluoroacetophenone Imine for Thioacid Activation

Table 29 での検討において、チオ酸のジスルフィドカルボニル部位での副反応が原因と考えられる反応系の複雑化が観測されたことに着想を得て、電子求引性置換基を持つトリフルオロアセトフェノンとアミノ酸より生じるイミンを触媒として用いる触媒系の設計を行った(Scheme 27)。

Scheme 27. Trifluoroacetophenone imine-based organocatalyst



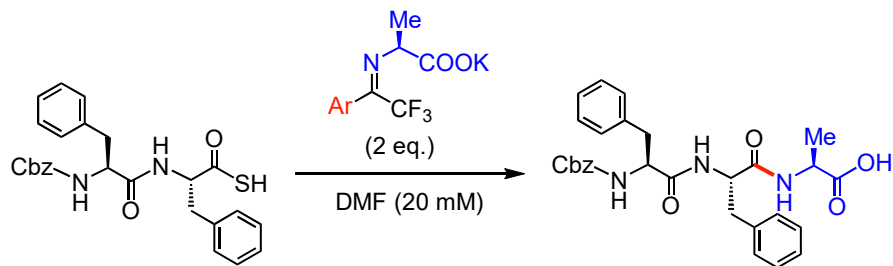
アミノ酸のトリフルオロアセトフェノンイミン(XXII)に対し、チオカルボン酸(XXIII)が求核付加を行うことにより、四面体中間体(XXIV)が生成する。次に、分子内のアシル転位による四員環中間体(XXV)を経て、ペプチド結合形成⁶⁶とチオケトン(XXVI)の脱離が起こる。チオカルボニル基の高い反応性により、アミノ酸によるヘテロ原子交換が速やかに起こり、触媒が再生すると考えた。

まず、Hughes・Devineらの報告⁶⁷を参考に、種々のアミノ酸のトリフルオロアセトフェノンイミンを合成し、想定した四面体中間体を経由して目的トリペプチドが高収率・低エピソードで得られるかをみるために当量反応での検討を行った(Table 31)⁶⁸。

⁶⁶ 四員環遷移状態を経由するペプチド結合形成反応の例として、(a) Suppo, J. S.; Subra, G.; Berges, M.; Figueiredo, R. M.; Campagne, J. M. “Inverse peptide synthesis via activated α -aminoesters”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5389. (b) Pourvali, A.; Cochrane, J. R.; Hutton, C. A. “A new method for peptide synthesis in the *N-C* direction: amide assembly through silver-promoted reaction of thioamides”, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15963. 他にも参考文献7など。
⁶⁷ Hughes, G.; Devine, P. N.; Naber, J. R.; O’Shea, P. D.; Foster, B. S.; McKay, D. J.; Volante, R. P. “Diastereoselective reductive amination of aryl trifluoromethyl ketones and α -amino esters”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1839.

⁶⁸ 事前の予備実験として、トリフルオロアセトフェノンとアラニンから合成したイミンに対しチオ酢酸を作用させる実験を行った。¹⁹F NMR 解析の結果、 sp^2 性炭素原子に結合するトリフルオロメチル基は消失し、新たに sp^3 性炭素原子に結合するトリフルオロメチル基が現れることを確認した。また、ESI-MS 解析においても、チオ酢酸がイミンと結合した化合

Table 31. Reaction between peptidyl thioacid and various trifluoroacetophenone imines



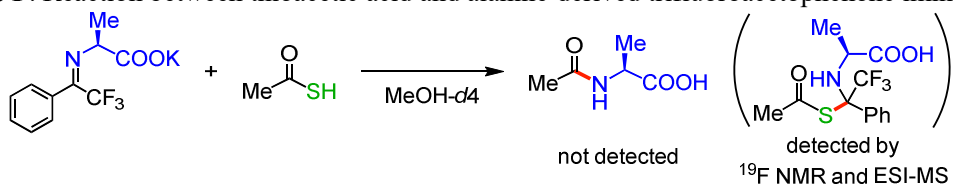
Entry	Ar	comment
1		no reaction at r.t.
2		no reaction at r.t. messy at 50 °C
3		no reaction at r.t. messy at 50 °C
4		messy at r.t.

単純なフェニル基を持つイミンを用いた場合、室温下では反応の進行がほとんど見られなかった(entry 1)ため、電子不足なイミンでの検討を行った(entry 2, 3)。しかしながら、この場合でも室温下では反応の進行がほとんど見られず、50℃に昇温したところ今度はいずれのイミンにおいても目的物のピークが HPLC 上で認識できないほど反応が複雑化した。そこで更に芳香環上の電子密度を減少させ反応温度を低減させる目的で、より電子不足なジニトロベンゼン誘導体を用いた検討を行った(entry 4)。期待通り室温下でチオ酸との反応が起こったものの、やはり反応系は複雑化した。

今回の検討だけでは、収率とエピ化の改善は実現できなかった。しかしながら、イミン構造や反応条件の更なる検討による改善の余地が残されていると考える。また、他の高活

物が観測された。

Scheme F. Reaction between thioacetic acid and alanine-derived trifluoroacetophenone imine

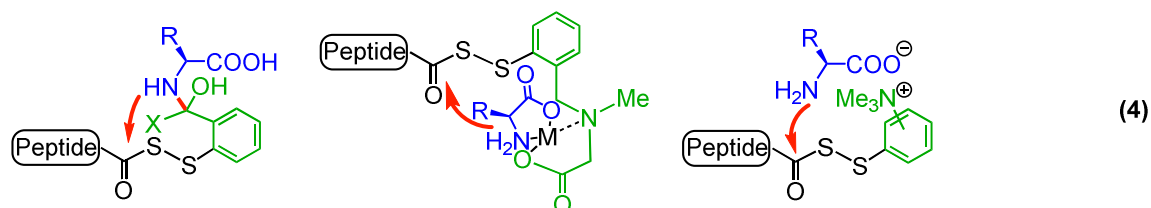
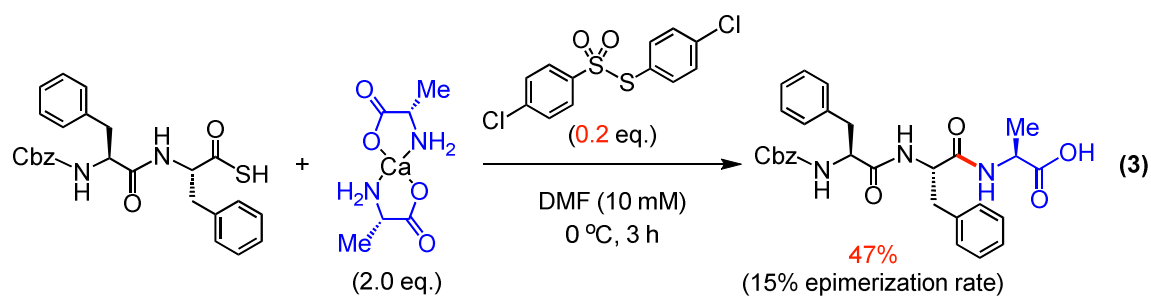
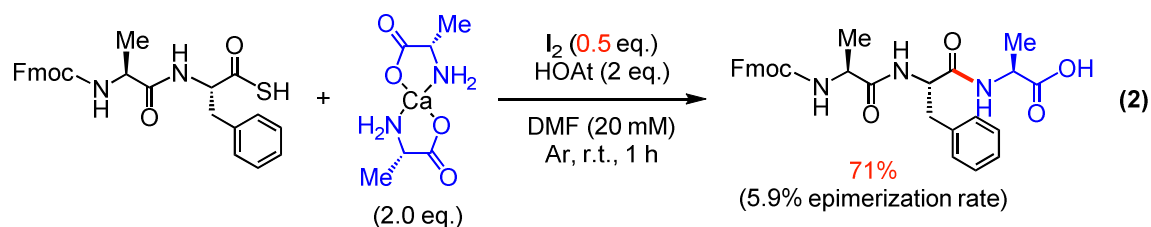
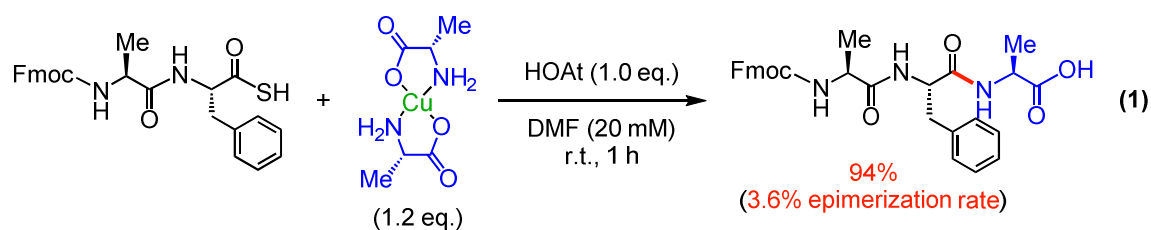


性カルボニル化合物⁶⁹イミンを用いることでも、同様の想定触媒機構による触媒的ペプチド結合形成反応の開発余地が十分に残されていると考えている。

⁶⁹ 一例として、シクロプロペノンを挙げる: Yoshida, H.; Nakajima, M.; Ogata, T. “Synthesis of Cyclopropenethiones or 3,3-Bis[acylthio]cyclopropenes from Cyclopropenones and Thiocarboxylic Acids”, *Synthesis* **1981**, 36.

4.6. Summary of Chapter 4

ジペプチドチオ酸に HOAt 存在下、銅-アミノ酸 1 対 2 錯体を用いることで高収率、中程度のエピ化でトリペプチドを得ることに成功した(eq. 1)。またこの系での、反応後の当量の重金属の排出という課題を克服するため様々な酸化剤を検討した結果、ヨウ素のペプチドチオ酸に対する触媒的ペプチド結合形成能を見出した(eq. 2)。更に、エピ化の改善と添加剤の量を最小限に抑えるため有機分子触媒機構を設計した。当初設計したチオスルフィネート(チオスルフィン酸エステル)での触媒作用を確認することはできなかったものの、チオスルフォネート(チオスルフォン酸エステル)を用いた場合において触媒的ペプチド結合形成能を確認することができた(eq. 3)。また、ジスルフィドを用いたエピ化抑制部位の探索では、いくつかのモチーフを試みたものの検討した範囲では最適なアシルジスルフィド構造を見出すことはできなかった(eq. 4)。



4.7. Experimental

A. General Method

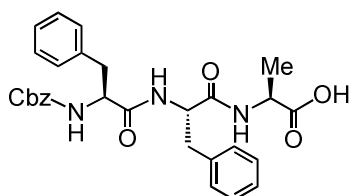
The similar methods as section 2.6. were used, unless otherwise stated.

B. Materials

B.1. Peptide

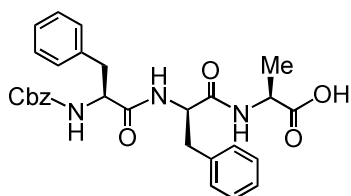
All peptides were prepared by SPPS in the similar manner as section 3.6. unless otherwise stated.

((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-L-alanine (Cbz-Phe-Phe-Ala-OH)



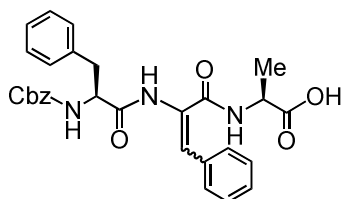
HPLC (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 43.5 min.; **¹H NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.25 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.31 – 7.15 (m, 15H), 4.99 (dd, *J* = 13, 20 Hz, 2H), 4.68 – 4.62 (m, 1H), 4.38 – 4.30 (m, 2H), 3.17 (dd, *J* = 5.0, 15 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 5.0, 15 Hz, 1H), 2.92 (dd, *J* = 4.5, 14 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 4.5, 14 Hz, 1H), 1.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H); **ESI-MS** m/z 540.0 [M+Na]⁺, 516.3 [M]⁻.

((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanyl-D-phenylalanyl-L-alanine (Cbz-Phe-D-Phe-Ala-OH)



HPLC (H₂O 2 min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 44.5 min.; **ESI-MS** m/z 540.4 [M+Na]⁺.

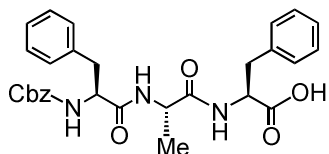
Cbz-Phe-Phe(-H₂)-Ala-OH



This compound was prepared according to Jursic's procedure⁴⁴. Crude product was used for analysis.

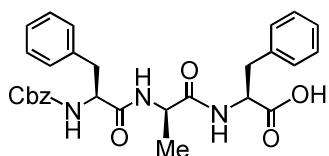
HPLC (H₂O 2min. then 0-100% MeCN / H₂O over 80 min.) tR 43.8 min.; selected characteristic peaks in ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz), which were also detected in the isolated mixture by using Cu salts, δ 7.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.55 – 4.48 (m, 1H), 4.40 (dd, *J* = 5.0, 9.5, 1H), 1.44 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H); ESI-MS: m/z 538.5 [M+Na]⁺, 514.7 [M]⁻.

((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-phenylalanine (Cbz-Phe-Ala-Phe-OH)



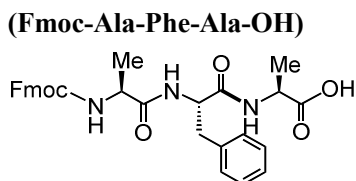
HPLC (H₂O 1.9 min. then 0-45% MeOH / H₂O over 0.1 min. then 45-70% MeOH / H₂O over 50 min., 301 nm) tR 40.3 min.; **ESI-MS** m/z 539.8 [M+Na]⁺.

((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanyl-D-alanyl-L-phenylalanine (Cbz-Phe-D-Ala-Phe-OH)



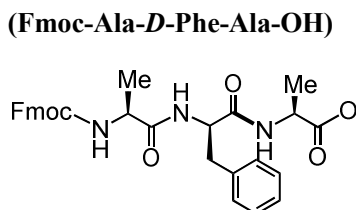
HPLC (H₂O 1.9 min. then 0-45% MeOH / H₂O over 0.1 min. then 45-70% MeOH / H₂O over 50 min., 301 nm) tR 41.1 min.; **ESI-MS** m/z 540.4 [M+Na]⁺.

((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-alanine (Fmoc-Ala-Phe-Ala-OH)



HPLC (H₂O 1.9 min. then 0-35% MeCN / H₂O over 0.1 min. then 35-60% MeCN / H₂O over 50 min.) tR 28.2 min.; **ESI-MS** m/z 552.6 [M+Na]⁺.

((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-L-alanyl-D-phenylalanyl-L-alanine (Fmoc-Ala-D-Phe-Ala-OH)



HPLC (H₂O 1.9 min. then 0-35% MeCN / H₂O over 0.1 min. then 35-60% MeCN / H₂O over 50

min.) tR 29.2 min.; ESI-MS m/z 551.9 [M+Na]⁺.

B.2. Metal Complex

For complexes with nitrogen based ligand⁷⁰: stoichiometric amounts of sodium hydroxide (1 eq.) and *L*-alanine (1 eq.) were dissolved in methanol with sonication. The sodium salt of *L*-alanine was then added dropwise to Mn(II)Cl₂ (1 eq.) dissolved in methanol. After stirring for 30 min, sodium chloride was removed by filtration. The appropriate nitrogen based ligand (1 eq.) dissolved in methanol was then added dropwise to the resulting solution. The final product was precipitated by the addition of diethyl ether, filtered, washed with diethyl ether / pentane, and dried under vacuum to give an amino acid complex.

For complexes without nitrogen based ligand: stoichiometric amounts of sodium hydroxide (2 eq.) and *L*-alanine (2 eq.) were dissolved in methanol with sonication. The sodium salt of *L*-alanine was then added dropwise to Cu(II)Cl₂ (1 eq., the amount of metal salt was changed depending on the complex) dissolved in methanol. After stirring for 30 min, precipitate was separated, washed with methanol and diethyl ether, and dried under vacuum to give Cu(Ala)₂ as blue powder.

Ca(Ala)₂ or Ba(Ala)₂

Both salts were prepared according to Hashimoto's procedure³⁷.

B.3. Thiosulfinate • Thiosulfonate

All thiosulfonates were prepared according to the general procedure, unless otherwise stated: to a stirred ice cold solution of disulfide (1.0 mmol) in DCM (10 ml), *m*CPBA (0.95 mmol) in DCM (10 ml) was dropwisely added over 10 min. After finishing addition, the solution was transfer to separating funnel and added saturated NaHCO₃ aqueous solution. Separated organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated to give crude thiosulfinate, which was purified with silica gel column chromatography (SiO₂). Thiosulfonates in this work were obtained as byproducts in thiosulfonates synthesis.

1,2-dithiolane 1-oxide



This compound was reported in the literature⁷¹.

⁷⁰ Pintauer, T. *et al. Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3297.

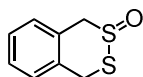
⁷¹ Arterburn, J. B. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9309.

1,2-dithiane 1-oxide



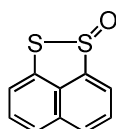
This compound was reported in the literature⁷¹.

1,4-dihydrobenzo[*d*][1,2]dithiine 2-oxide



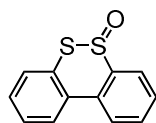
This compound was reported in the literature⁷².

naphtho[1,8-*cd*][1,2]dithiole 1-oxide



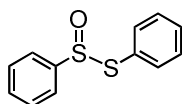
This compound was reported in the literature⁷³.

dibenzo[*c,e*][1,2]dithiine 5-oxide



Oxidation of disulfide⁷⁴ was carried out according to the general procedure in 0.5 mmol scale. The crude product was purified with silica gel column chromatography (SiO₂, Hexane / AcOEt = 7 / 3) to give the titled compound (48 mg, 41% yield) as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76 – 7.66 (m, 2H), 7.57 – 7.52 (m, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H); ESI-MS *m/z* 254.8 [M+Na]⁺.

S-phenyl benzenesulfinothioate



This compound was reported in the literature⁷⁵.

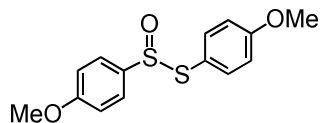
⁷² Welker, M. E. *et al. J. Organometallic Chem.* **1990**, 384, 105.

⁷³ Grainger, R. S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4832.

⁷⁴ Cossu, S. *et al. Synth. Commun.* **1989**, 19, 3431.

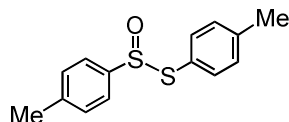
⁷⁵ White, M. C. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6970.

S-(4-methoxyphenyl) 4-methoxybenzenesulfinothioate



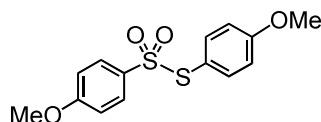
This compound was reported in the literature⁷⁶.

S-(*p*-tolyl) 4-methylbenzenesulfinothioate



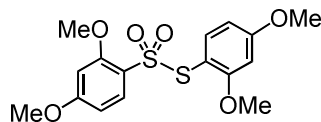
This compound was reported in the literature⁷⁷.

S-(4-methoxyphenyl) 4-methoxybenzenesulfonothioate



Titled compound was reported in the literature⁷⁸.

S-(2,4-dimethoxyphenyl) 2,4-dimethoxybenzenesulfonothioate



A disulfide precursor was obtained as a mixture of thiol according to Bergbreiter's procedure⁷⁹. The resulting crude mixture of disulfide and thiol was treated with $\text{CuNO}_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (ca. 20 mol%) in acetone to oxidize the remaining thiol into disulfide according to Firouzabadi's procedure⁸⁰. The crude product was purified with silica gel column chromatography (SiO_2 , Hexane / AcOEt = 9 / 1) to give the disulfide as a pale yellow oil: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.40 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.43 – 6.41 (m, 4H), 3.79 (s, 6H), 3.79 (s, 6H). Oxidation of disulfide was carried out according to the general procedure in 0.35 mmol scale. The crude product was purified with preparative thin-layer chromatography (SiO_2 , Hexane / AcOEt = 1 / 1) to give the titled compound (42 mg, 34% yield) as a yellow solid: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.41 – 7.38 (m, 2H), 6.52 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 2.0, 8.5 Hz, 1H), 6.34 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.84 (s,

⁷⁶ Stensaas, K. L. *et al. J. Sulfur Chem.* **2008**, 29, 433.

⁷⁷ Hanquet, G. *et al. J. Org. Chem.* **2006**, 71, 4854.

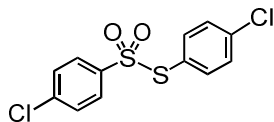
⁷⁸ Cal Y. Meyers *et al. J. Org. Chem.* **2003**, 68, 500.

⁷⁹ Bergbreiter, D. E. *et al. Inorg. Chim. Acta* **2006**, 359, 1912.

⁸⁰ Firouzabadi, H. *et al. Synth. Commun.* **1998**, 28, 1179.

3H), 3.81 (s, 3H), 3.48 (s, 3H); **ESI-MS** m/z 392.9 $[M+Na]^+$.

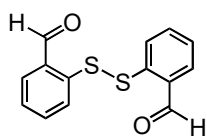
S-(4-chlorophenyl) 4-chlorobenzenesulfonothioate



This compound was reported in the literature⁸¹.

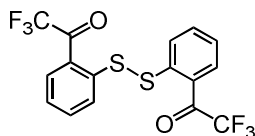
B.4. Disulfide (Section 4.4.3.)

2,2'-disulfanediyldibenzaldehyde



This compound was reported in the literature⁸².

1,1'-(disulfanediyldis(2,1-phenylene))bis(2,2,2-trifluoroethan-1-one)



2-(*tert*-Butylthio)-trifluoroacetophenone was prepared from 2-(*tert*-butylthio)-bromobenzene⁸³ and *N,N*-diethyl-2,2,2-trifluoroacetamide by using ^{*n*}BuLi. The crude product was purified with silica gel column chromatography (SiO₂, only Hexane) to give 2-(*tert*-butylthio)-trifluoroacetophenone (178 mg, 68% yield) as a yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.57 – 7.51 (m, 1H), 7.48 – 7.47 (m, 2H), 1.26 (s, 9H); **ESI-MS** m/z 284.9 $[M+Na]^+$, 316.9 $[M+MeOH+Na]^+$. Deprotection and oxidation of thiol group was carried out in the similar manner as 2,2'-disulfanediyldibenzaldehyde: to a stirred ice cold solution of disulfide (59 μ l, 0.20 mmol) in AcOH (10 ml), HBr (48% in H₂O, 136 μ l, 1.2 mmol) and DMSO (29 μ l, 0.40 mmol) were added. The resulting solution was stirred at 50 °C for 3 h. After cooling to room temperature, diethyl ether and brine were added. The aqueous layer was extracted with diethyl ether, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Mg₂SO₄, and concentrated. The residue was purified with preparative thin-layer chromatography (SiO₂, Hexane / DCM = 15 / 85, twice) to give the titled compound (41 mg, 88% yield) as a yellow powder: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.10 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.38 (t, J = 7.6 Hz, 1H); **ESI-MS** m/z

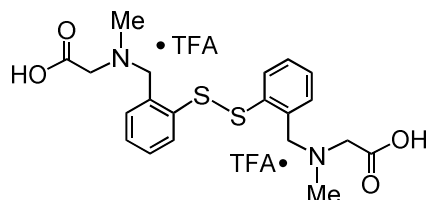
⁸¹ Sara Sobhani *et al.* *Synlett* **2011**, 319.

⁸² Chemburkar, S. R. *et al.* *Synth. Commun.* **2010**, 40, 1887.

⁸³ Liao, J. *et al.* *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 575.

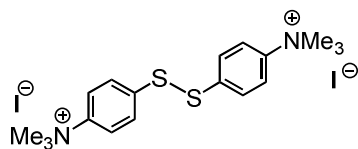
432.7 [M+Na]⁺, 464.5 [M+MeOH+Na]⁺, 496.5 [M+2MeOH+Na]⁺.

2,2'-(((disulfanediy)bis(2,1-phenylene))bis(methylene))bis(methylazanediy))diacetic acid trifluoroacetic acid salt



To a stirred solution of sarcosine ethyl ester hydrochloride (307 mg, 2 mmol) and Et₃N (562 μl, 4 mmol) in DCM (10 ml), 1,2-bis(2-(bromomethyl)phenyl)disulfane (0.75 mmol) in DCM (10 ml), prepared from (disulfanediy)bis(2,1-phenylene))dimethanol⁸⁴ quantitatively by using PBr₃, was added. After stirring at room temperature overnight, H₂O was added. The aqueous layer was extracted with DCM, and the combined organic layers were washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄, and concentrated. The residue (360 mg) was purified with silica gel column chromatography (SiO₂, Hexane / AcOEt / Et₃N = 90 / 10 / 0.1) to give diethyl ester of the titled compound (110 mg, 30% yield) as a white powder: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.19 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.13 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.16 (q, *J* = 7.0, 14 Hz, 4H), 3.85 (s, 4H), 3.32 (s, 4H), 2.41 (s, 6H), 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H); **ESI-MS** *m/z* 238.0 [(M+H)/2]⁺, 477.0 [M+H]⁺, 499.0 [M+Na]⁺. To a stirred solution of the diethyl ester (48 mg, 0.1 mmol) in ethanol (5 ml), NaOH (20 mg, 0.5 mmol) in H₂O (2.5 ml) was added. After stirred at room temperature for 3 h, the solution was added TFA (77 μl, 1 mmol). The titled compound was obtained after lyophilization as a white powder (43 mg, 72% yield): ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.65 (d, 7.0 Hz, 2H), 7.62 (d, 7.5 Hz, 2H), 7.55 (t, 7.0 Hz, 2H), 7.49 (t, 7.5 Hz, 2H), 4.16 (br, 4H), 4.06 (br, 4H), 2.80 (br, 6H).

4,4'-disulfanediy)bis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) iodide

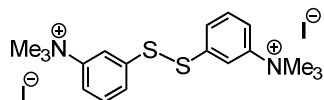


This compound was reported in the literature⁸⁵.

⁸⁴ Chen, M. H. *et al. Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis* **2002**, 34, 665.

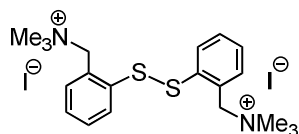
⁸⁵ Briand, G. G. *et al. Polyhedron* **2012**, 33, 171.

3,3'-disulfanediybis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) iodide



This compound was synthesized in the similar manner as 4,4'-disulfanediybis(*N,N,N*-trimethylbenzenaminium) iodide⁸⁵. 3,3'-Disulfanediyldianiline⁸⁶ was used instead: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 8.27 (br, 2H), 7.97 (br, 2H), 7.81 (br, 2H), 7.74 (br, 2H), 3.67 (s, 18H).

1,1'-(disulfanediybis(2,1-phenylene))bis(*N,N,N*-trimethylmethanaminium) iodide



To a stirred solution of dimethylamine hydrochloride (652 mg, 8 mmol) and DIPEA (2.1 ml, 8 mmol) in acetonitrile (10 ml), 1,2-bis(2-(bromomethyl)phenyl)disulfane (2 mmol) in acetonitrile (10 ml) and TBAI (74 mg, 0.2 mmol) were added. After stirred at room temperature for 2 h, the solvent was removed under reduced pressure then AcOEt and H₂O was added. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution and brine, dried over MgSO₄, and concentrated to give enough pure bis(*N,N*-Dimethylbenzylamine) product (670 mg, quantitative) as a brown liquid, which was used for the next step without further purification.: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.25 – 7.11 (m, 6H), 3.52 (s, 4H), 2.24 (s, 12H); ESI-MS m/z 167.5 [(M+H)/2]⁺, 332.8 [M+H]⁺, 355.4 [M+Na]⁺. To a stirred solution of the product (332 mg, 1 mmol) in DMF (4 ml), MeI (1.25 ml, 20 mmol) was added. After stirred at room temperature overnight, the solution was poured into diethyl ether (100 ml). A resulting precipitate was separated, washed with acetone and dry under reduced pressure to give the titled compound as a very hygroscopic solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.77 (d, J = 7.6, 2H), 7.69 – 7.59 (m, 6H), 4.69 (s, 4H), 3.12 (s, 18H); ESI-MS m/z 182.5 [(M+H)/2]⁺.

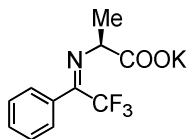
B.5. Trifluoroacetophenone Imine

All trifluoroacetophenone imines were prepared according to Hughes • Devine's procedure⁶⁷. Nitro-substituted trifluoroacetophenones were prepared according to Kanai • Oisaki's procedure⁸⁷.

⁸⁶ Zhang, M. *et al. Synthesis* **2003**, 112.

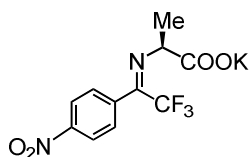
⁸⁷ Kanai, M. *et al. Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 2193.

potassium (*S,Z*)-2-((2,2,2-trifluoro-1-phenylethylidene)amino)propanoate



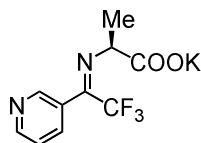
This compound was reported in the literature⁶⁷.

potassium (*S,Z*)-2-((2,2,2-trifluoro-1-(4-nitrophenyl)ethylidene)amino)propanoate



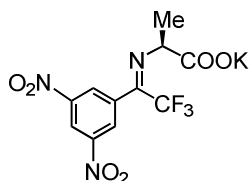
¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 8.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.82 (q, *J* = 6.5, 8.5 Hz, 1H), 1.39 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); **ESI-MS** *m/z* 350.8 [M+Na]⁺.

potassium (*S,Z*)-2-((2,2,2-trifluoro-1-(pyridin-3-yl)ethylidene)amino)propanoate



For 3-trifluoroacetylpyridine preparation: To a stirred solution of 3-bromopyridine (585 μl, 6 mmol) in THF (12 ml) at - 78 °C, ⁿBuLi (2.6 M in hexane, 2.4 ml, 6.2 mmol) then 1-(trifluoroacetyl)piperidine (876 μl, 6 mmol) were dropwisely added successively. After stirring at the same temperature for 1 h, saturated NH₄Cl aqueous solution was added. The aqueous layer was extracted with AcOEt, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (SiO₂, AcOEt) to give 3-trifluoroacetylpyridine (391 mg, 37% yield) as an yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.27 (s, 1H), 8.91 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 5.2, 8.0 Hz, 1H). The imines was prepared according to Hughes • Devine' s procedure⁶⁷: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 8.66 (dd, *J* = 2.0, 5.0 Hz, 1H), 8.54 (br, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (dd, *J* = 5.0, 8.0 Hz, 1H), 3.85 (q, *J* = 6.5, 13 Hz, 1H), 1.40 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); **ESI-MS** *m/z* 307.1 [M+Na]⁺.

potassium (*S,Z*)-2-((1-(3,5-dinitrophenyl)-2,2,2-trifluoroethylidene)amino)propanoate



The obtained product was a mixture of imine and hemiaminal (1:2). ¹H NMR of imine (CD₃OD,

500 MHz) δ 9.11 (s, 1H), 8.97 (s, 2H), 3.85 (q, $J = 6.5, 13$ Hz, 1H), 1.45 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ^1H NMR of hemiaminal (CD_3OD , 500 MHz) δ 8.83 (s, 2H), 8.68 (s, 1H), 3.71 (br, 1H), 1.30 (dd, $J = 1.5, 7.5$ Hz, 3H); ESI-MS m/z 395.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

C. General Procedure of Reaction between Peptidyl Thioacid and Non-Protected Amino Acid

C.1. Activation with Metal Salt or Metal Complex

To a stirred solution of peptidyl thioacid (1 μmol) in DMF (50 μl), HOAt (25 μl , 80 mM in DMF, 2 μmol) and $\text{Cu}(\text{AA})_2$ (25 μl , 80 mM in DMF, 2 μmol) were added at room temperature. After stirred at the same temperature for 1 h, the mixture was added 1% TFA (v/v) in H_2O (100 μl). Resulting suspension was subjected to centrifuge, and supernatant was directly injected into HPLC systems for analysis. The yield was calculated based on a calibration curve.

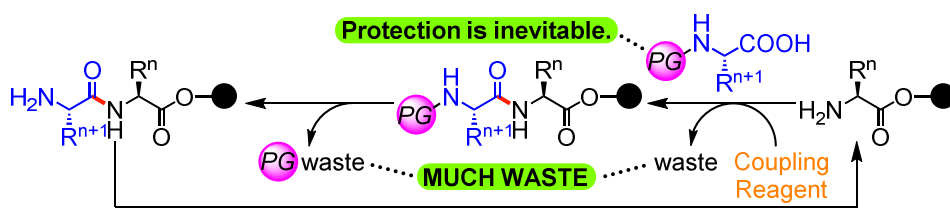
C.2. Activation with Oxidant, Thiosulfinate, Thiosulfonate, Disulfide or Trifluoroacetophenone Imine

To a stirred solution of peptidyl thioacid (1 μmol) and $\text{Ca}(\text{AA})_2$ (2 μmol) in DMF (75 μl), activator (25 μl , 80 mM in DMF, 2 μmol) (and HOAt (stock solution in DMF, 2 μmol) was added at room temperature. After stirred at the same temperature for 3 h, the crude mixture was directly injected into HPLC systems for analysis. The yield was calculated based on a calibration curve.

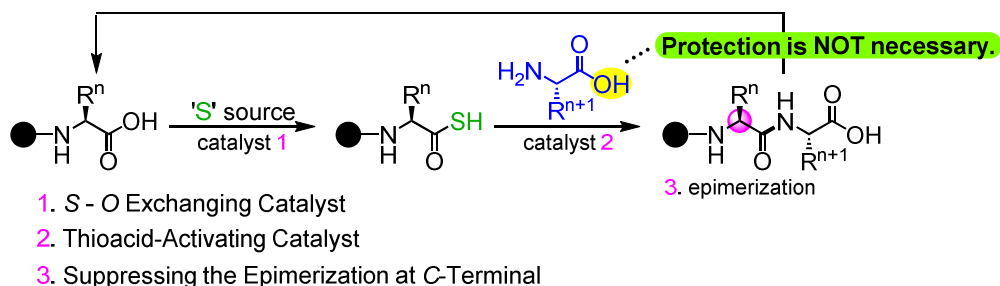
Conclusion

- 私は本学博士課程にて、縮合剤及び主鎖保護基の使用を回避するために、チオカルボン酸(以下、チオ酸)を経る従来法とは逆方向の *N* 末端から *C* 末端へとペプチド鎖を伸長する、ペプチド合成プロセスの開発に取り組んだ。プロセス実現のために、(1) 原子効率に優れたペプチドチオ酸の合成法の開発、(2) ペプチドチオ酸の触媒的活性化法の開発、(3) ペプチド *C* 末端活性化に付随した分子内環化(オキサゾロン中間体形成)によるエピ化過程の抑制、という三つの課題を設定し研究に着手した。

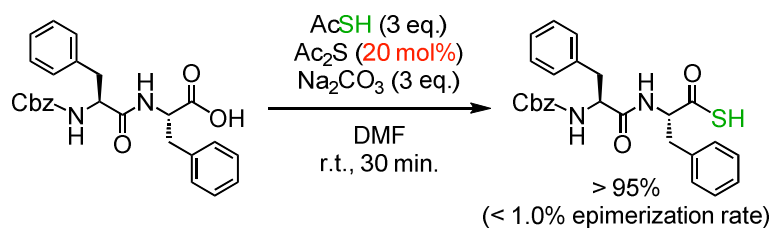
C-Terminal to N-Terminal & Coupling Reagents (Conventional Peptide Synthesis)



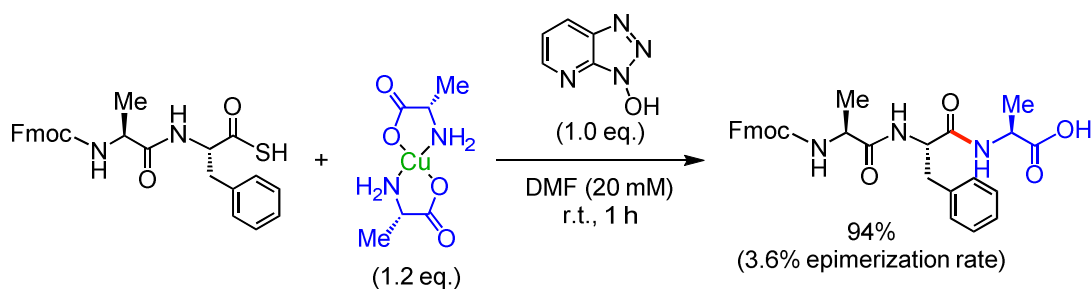
N-Terminal to C-Terminal & Thioacid (This Work)



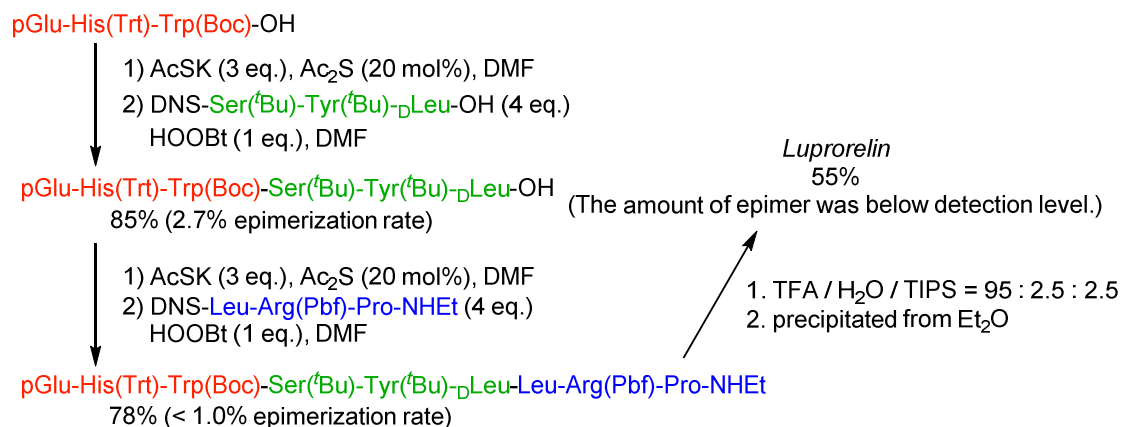
- ペプチドチオ酸合成の段階では、チオ酢酸を硫黄源として、ジアセチルスルフィドを酸素 - 硫黄原子交換触媒として用いたペプチド *C* 末端カルボキシル基のチオカルボキシル基への直截的変換反応を開発した。反応は、アルカリ金属炭酸塩存在中室温下で円滑に進行し、1 時間以内に完結する。また、エピ化も 1.0%以下に抑えられていることを確認した。



- ▶ ペプチド結合形成反応の段階では、ジペプチドチオ酸に HOAt 存在下、銅-アミノ酸 1 対 2 錯体を付すことで高収率、中程度のエピ化率でトリペプチドを得た。ジペプチドチオ酸と無保護アミノ酸から高収率に C 末端無保護トリペプチドを得た初めての例である。今後、合成プロセスの実用化を目指し、(1) エピ化の更なる低減(<1.0%)、(2) 当量の重金属の使用の回避、(3) 当量の HOAt の使用の回避、という点で反応の改良を行っていく。



- ▶ また、チオカルボキシル基と 2,4-ジニトロベンゼンスルホンアミド基(以下、DNS アミド基)との間の縮合反応を利用し、非天然型ペプチド医薬であるリュプロレリンの合成を行った。リュプロレリンを 3 残基ずつ 3 つのフラグメントに分け、各フラグメント C 末端を開発した手法でチオカルボキシル基へと変換し、対応する N 末端 DNS ペプチドとのフラグメントカップリングを順次行った。チオカルボキシル基への変換にはチオ酢酸カリウム塩を用い、このペプチドチオ酸合成の反応液に HOObt 及び N 末端 DNS ペプチドを加えることで、二度のフラグメントカップリング両段階において、高収率・低エピ化率で目的ペプチドを得た。縮合剤を用いた事前活性化が必要なフラグメントカップリングとの対照実験の結果、カルボキシル基存在下でもチオカルボキシル基での選択的な反応が進行する本カップリング反応において、大幅なエピ化の低減化が実現し得ることを確認することができた。



Acknowledgment

研究室の立ち上げという多忙を極める時期に新入生として私を研究室に受け入れて下さり、後期博士課程 3 年までの 6 年間に渡り、終始熱心なご指導ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科教授 金井求先生に心より深謝申し上げます。

本研究を直接ご指導いただき、研究や化学のみならず多岐に渡り様々に有益なご助言下さり議論をしていただきました、東京大学大学院薬学系研究科助教 生長幸之助先生に心より感謝申し上げます。

時には冗談を交えながら、また時にはお酒も交えながら、常に温かい姿勢でご助言下さりご指導下さいました、北海道大学大学院薬学研究院教授 松永茂樹先生 (前 東京大学大学院薬学系研究科准教授)、東京大学大学院薬学系研究科助教 清水洋平先生、ERATO 金井触媒分子プロジェクト医薬機能グループリーダー 相馬洋平先生、同 触媒医療(化学系)グループリーダー 山次健三先生、同 触媒グループリーダー 國信 洋一郎先生、同 触媒医療(生物系)グループリーダー 川島茂裕先生に深く感謝申し上げます。

本研究を円滑に進めるに当たり多大なご助力をいただきました、東京大学薬学系研究科有機合成化学教室秘書 師尾佐由利氏、ERATO 金井触媒分子生命プロジェクト研究推進主任 佐々木大輔氏、石神美和氏 (前 研究推進主任)に深く感謝申し上げます。

本研究の共同研究者である、東京大学薬学部有機合成化学教室 平野遼氏をはじめ、同じ研究室の仲間として日々苦楽を共にし、様々な場面においてご助力、ご助言いただいた、東京大学大学院薬学系研究科有機合成化学教室の皆様、ERATO 金井触媒分子生命プロジェクトの皆様にご深く感謝申し上げます。

専門分野は千差万別であるものの、同期として公私に渡り叱咤激励をいただきました、東京大学ライフイノベーション・リーディング大学院 2 期生の皆様に深く感謝申し上げます。

研究生活での経済援助のみならず、学生のためにプログラムをより魅力的なものにするべく常にご尽力して下さいました東京大学ライフイノベーション・リーディング大学院担当教員の皆様、同 事務員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、時に温かく、また時に厳しく、私の研究生生活を常に励まし支えて下さった、父・幸造、母・洋子、弟・典之、祖父・三上参次、祖母・三上久子、幼少期に日々真面目にひたむきに努力をすることの大切さを教えて下さいました、祖父・故 松本清、祖母・故 松本よしに心より深く感謝申し上げます。