

論文の内容の要旨

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

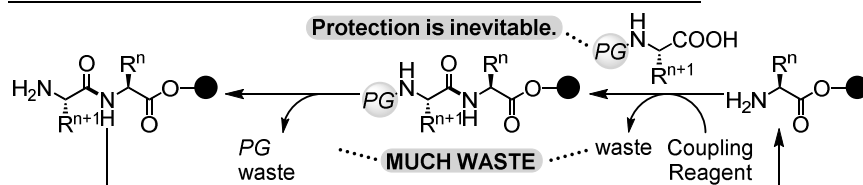
【背景・目的】

創薬分野においてペプチドは、小分子薬と生物製剤の利点を併せ持つ化合物群として注目を集めている。ペプチドの医薬品応用を考えた場合、細胞膜透過性や代謝安定性といった物性の改善が必要になり、非天然アミノ酸素子を自在に組み込むことのできる化学合成法が、その解決策として挙げられる。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発生するため、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

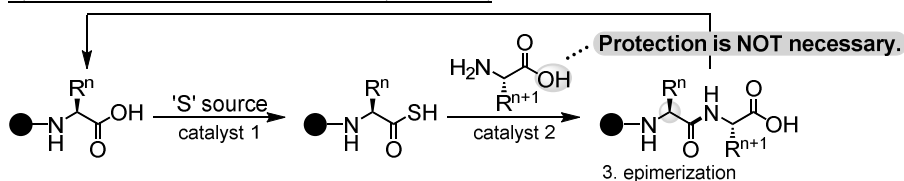
(Scheme 1a)。

そこで私は、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

a) *C*-terminal to *N*-terminal & Coupling Reagents (Conventional Method)



b) *N*-terminal to *C*-terminal & Thioacid (This Work)



Scheme 1. Conventional Peptide Synthesis vs This Work

の開発に取り組んだ(Scheme 1b)。 *C* 末端を一度硫黄原子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が利用可能になると考えた。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) チオ酸の触媒的活性化法の開発、(3) ペプチド *C* 末端活性化に付随する分子内環化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。

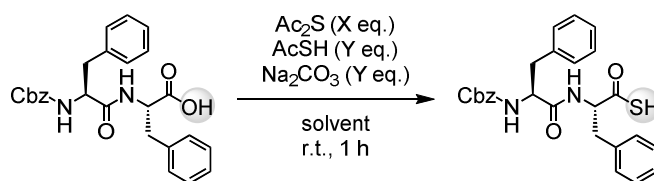
【結果・考察】

① チオ酢酸を用いた直截的ペプチドチオ酸の新規合成法の開発研究

これまでに報告されてきたペプチドチオ酸合成は、縮合剤によるチオエステル形成と引き続く脱保護、という複数工程を経由し、原子効率に乏しいものがほとんどである。そこで、より原子効率に優れた方法として、チオ酢酸を硫黄源として用いる平衡反応に基づいた、触媒的條件の最適化を行った。既報の直截的チオ酸合成法¹⁾では酸触媒の添加が有効とされていたが、ペプチドを基質とした場合、同条件下では対応するチオ酸は得られなかった。そこで、酸素-硫黄原子交換を

促進するため、脱水剤の添加を試みた。その結果、ジアセチルスルフィドを添加した際に、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。また塩基としてアルカリ金属炭酸塩を添加することにより、反応速度や収率の改善が見られた(**Table 1**)。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(**entry2~5**)、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(**entry6~7**)。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

Table 1. Optimization of reaction conditions



Entry	Solvent	X	Y	Yield ^a
1	NMP	0	10	34%
2	"	2	5	80%
3	"	1	5	78%
4	"	1	3	70%
5	"	1	1	63%
6	"	0.5	3	80%
7	"	0.2	3	82%
8 ^b	DMF	0.2	3	95%

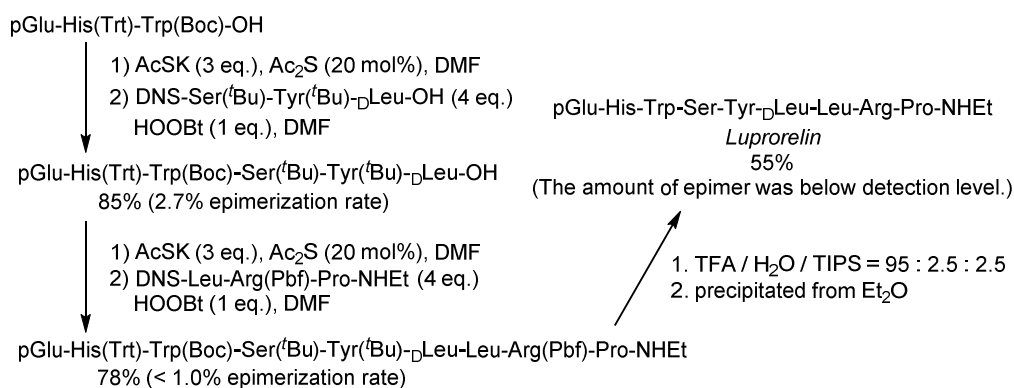
^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

^b LD form / (LLform + LDform) was less than 1.0%.

ることに成功した(**entry8**)。なお、単離したジペプチドチオ酸のエピ化率は 1.0%以下である事を確認している。現在、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。

② チオカルボキシル基と 2,4-ジニトロベンゼンスルホニルアミド基の間のカップリング反応を利用した非天然抗ガンペプチド・リュプロレリンの合成

開発したチオ酸合成法と、チオカルボキシル基と 2,4-ジニトロベンゼンスルホニルアミド基(以下、DNS アミド基)との間の縮合反応²⁾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(**Scheme 3**)。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。

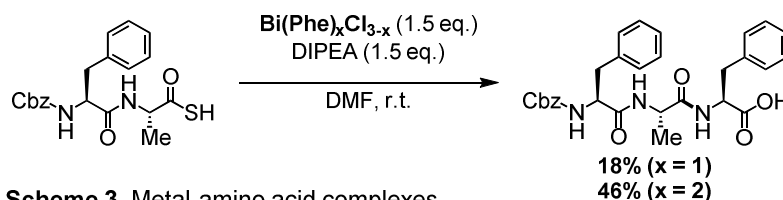


Scheme 2. Total synthesis of leuprorelin

③ ペプチドチオ酸と無保護アミノ酸間の縮合反応の開発研究

＜アミノ酸複数配位型銅錯体を用いた検討＞ Gopi らにより報告されていた、硫酸銅を触媒とするチオ酸を基質とするペプチド結合形成反応を参考に検討を行った³⁾。本報告では C 末端保護アミノ酸のみが報告されていたため、無保護アミノ酸へも適用可能であるかをまず確認した。しかしながら、①で得たジペプチドチオ酸と無保護アミノ酸の組み合わせからは、目的のトリペプチドは得られなかった。そこで、

(1) アミノ酸の有機溶媒への溶解性を向上させる、(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

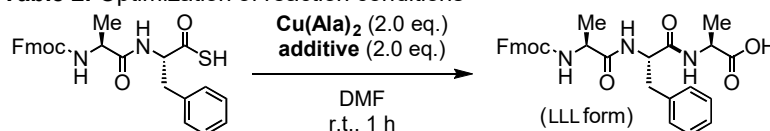


させることにより、エピ化や副反応につながるオキサゾロン中間体形成よりも速くペプチド結合を形成させる、という 2 つの目的から、アミノ酸の金属原子との錯体化を検討した。その結果、中心金属に配位するアミノ酸の数が目的トリペプチドの収率に大きく影響するという知見を得た (Scheme 3)。例えば三価ビスマス錯体において、ビスマスとフェニルアラニンの一対一の錯体の場合トリペプチドの収率は 18%

に留まったが、これが一対二の錯体の場合には 46%に向上した。この結果を基に、縮合剤を用いた従来型ペプチド縮合反応における、二価銅塩と HOBt の添加がもたらす改善効果⁴⁾を参考に、銅-アミノ酸錯体と *N*-ヒドロキシ化合物の添加を検討した

(Table 2)。その結果、HOAt を添加した際に 94%収率、3.6%のエ

Table 2. Optimization of reaction conditions

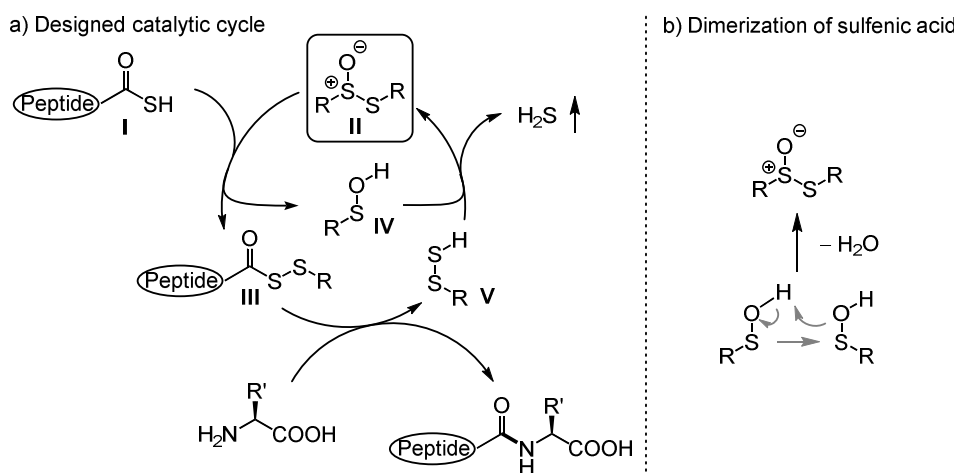


Entry	Additive	Tripeptide ^a (LLL form)	Epimerization ^{a,b} rate	Hydrolysis ^a (Dipeptide)
1	-	57%	4.9%	20%
2	HOBt	92%	5.6%	2.2%
3	HOObt	88%	8.9%	2.7%
4	HOAt	94%	3.6%	2.1%
5	Oxyma	75%	18%	5.8%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

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

ピ化率で目的のトリペプチドを得ることに成功した(entry 4)。その後、より実用性に優れた系の確立に向け、エピ化率の更なる低減(<1%)と銅の触媒化を目指したが、実現することはできなかった。



Scheme 4. Thiosulfinate-based organocatalyst

<チオスルフィネート・ジスルフィドを用いた検討> そこで次に私は、当量重金属の使用回避とエピ化抑制を目指し、チオスルフィネートを用いた新規有機触媒機構に基づくチオ酸縮合反応の開発に着手した。既報の知見を参考に設計した触媒機構を **Scheme 4a** に示す。まず、チオカルボン酸(**I**)とチオスルフィネート(**II**)の間でアシルジスルフィド(**III**)が生成する⁵⁾。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⁶⁾。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 4b**)から着想を得て、スルフェン酸(**IV**)とチオスルフェン酸(**V**)の二つの脱離基が、硫化水素を放出する設計をした。当量での初期検討の結果、チオスルフィネートが実際にペプチド結合形成能を有することを確認している(**Table 3**)。すなわち、*p*-メトキシフェニル基を有するチオスルフィネートを用いた際、65%の収率、5.0%のエピ化率で目的トリペプチドを得ている(**entry2**)。

またエピ化の問題は、無保護アミノ酸を活性種へ近接させる

認識部位をチオスルフィネート骨格へ導入することによる解決することとした。まずは、合成容易ながらチオ酸との間に同様のアシルジスルフィド中間体(**III**)を形成しうるジスルフィドを活性化剤として認識部位の候補探索を行った(**Figure 1**)。活性中間体として、カルボニル基によるヘミアミナル形成を利用する共有結合型のもの(**Figure 1a**)、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利用する非共有結合型のもの(**Figure 1b**)、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非共有結合型のもの(**Figure 1c**)、を想定し検討を行ったものの、これら3種類の認識形式を想定した場合ではエピ化の抑制に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。

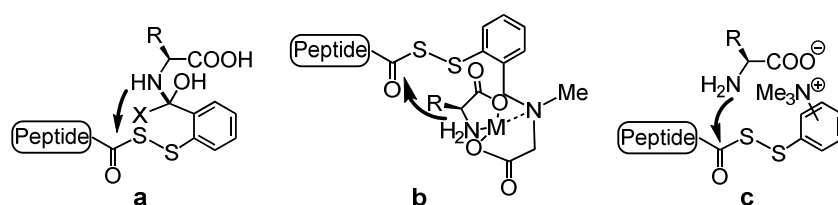


Figure 1. Search for epimerization-suppressing moiety

【参考文献】

- 1) 株式会社三協化成 JP2011051959 (A). 2) a) Tomkinson, N. C. O. *et al. Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1669. b) Crich, D. *et al. Org. Lett.* **2007**, 9, 4423. 3) Gopi, H. N. *et al. Chem. Commun.*, **2012**, 48, 7085. 4) a) Miyazawa, T. *et al. Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, 39, 308. b) Garner, P. *et al. Org. Lett.* **2013**, 15, 732. 5) Freeman, F. *et al. Synthesis* **1994**, 699. 6) Tam, J. P. *et al. Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3.

Table 3. Preliminary result

Entry	R	Tripeptide ^a (LLL form)	Epimerization ^{a,b} rate
1	H	49%	8.6%
2	OMe	65%	5.0%

^a Determined by HPLC analysis of crude mixture.

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