

178. 生合成を範とする新規ペプチド合成法の開発

丸岡 啓二

京都大学 大学院薬学研究科 有機触媒化学研究室

Key words : ペプチド, アミノ酸, フッ化アシル, 活性化基, セレクトフルオール

緒言

近年、アミノ酸由来の中分子医薬品としてのペプチド医薬品が注目を集めている。これまで広範に開発されてきた低分子医薬品の低迷が続き、その一方で、バイオテクノロジーの発展により登場した、タンパク質からなる抗体医薬品は低分子医薬品には見られない薬理機能を発揮できる利点があるにも拘らず、細胞膜を通過できず、抗原性、製造コスト高といった欠点が顕著になってきたからである。実際、ペプチド医薬品の台頭は目覚ましく、前立腺癌治療薬「リュプロレリン」や AIDS 治療薬「アタザナビル」などに見られるように、医療現場におけるその価値は年々高まっている。そのため、ペプチド医薬品を効率的に合成、供給する方法を確立することには大きな意義と需要がある。特に、ペプチドの化学合成にはメリットが多く、人工アミノ酸の導入による生物活性の調節、活性メカニズムの解明などにつなげることも可能である。代表的なペプチドの化学合成法である固相合成法（図 1）は強力な手法ではあるが、縮合の反応性の問題から、多くても 50 残基ほどのアミノ酸からなるペプチドしか合成できないこと、縮合後の脱保護を繰り返すことで望まない副生成物が生じ、最終的な精製が困難になることが欠点として挙げられる。加えて、人工アミノ酸の中でも α, α -ジアルキルアミノ酸が注目を集めているが、そのかさ高さから固相合成法による導入が困難な場合も多いものの、国内外で抜本的な対策が講じられていないのが現状である。このように、従来手法で合成可能なペプチドは限られており、ペプチド医薬品のさらなる発展のためには、簡便かつ効率的な新規ペプチド合成法の開発が必要不可欠である [1~3]。

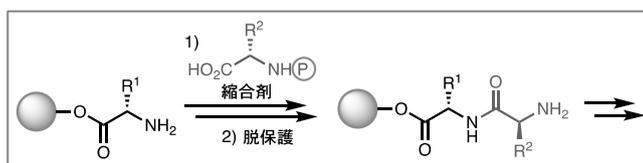


図 1. ペプチドの固相合成法 (N 末端からの伸長)

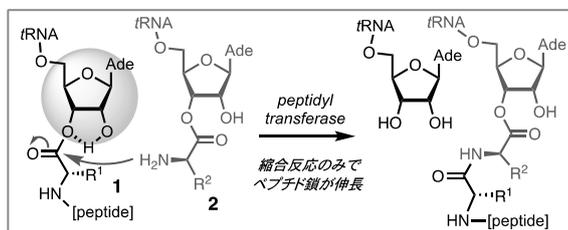


図 2. ペプチドの生合成 (C 末端からの伸長)

生体内でのペプチド合成は、固相合成法とは異なり、C 末端側からアミノ酸残基が伸長される（図 2）。すなわち、ペプチジルトランスフェラーゼを介して、糖鎖エステルを持つアミノ酸 **2** がペプチド **1** の糖鎖エステルに求核攻撃することで、新たなペプチド結合が形成されている。我々は、図 2 において糖鎖部が酵素によって活性

化されていると考え、この直截的な手法を人工的に模倣することができれば、嵩高いアミノ酸残基との縮合も可能となるような、効率的かつ革新的なペプチド合成法が可能になると考え、図3のような戦略を立案した。すなわち、エステル残基に潜在的な活性化基（PAG：potential activating group）を導入した基質 **3** を、適切な触媒により活性化したのち、同じく **PAG** をエステル残基にもつアミノ酸 **4** と反応させることで、新たなペプチド **5** が得られる。この **5** も同様の手法によりさらなる伸長も可能であり、これを繰り返すことで目的とするペプチドを効率良く合成できると考えた。

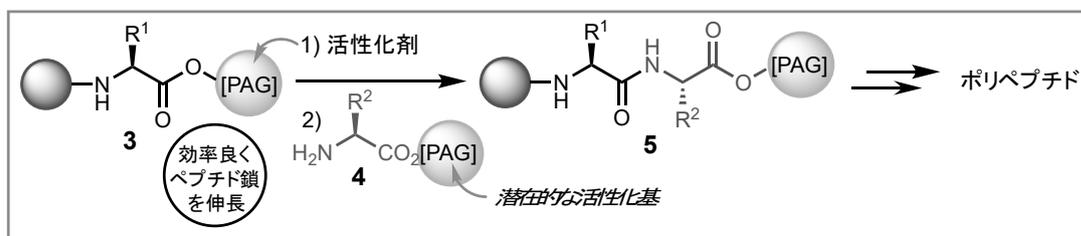


図3. 直截的な新規ペプチド合成法の概念図（C末端からの伸長）

方法、結果及び考察

1. メチルチオメチルチオエステルを用いるペプチド合成法の開発

まずは、先述したエステルの活性化-ペプチド形成プロセスの実現化を目指した。活性化後の中間体として、「フッ化アシル」に着目した。フッ化アシルは他のハロゲン化アシルと比較して安定であり、カラムクロマトグラフィーによる精製も可能でありながら、かさ高いアミンとも容易に反応して相当するアミドを収率良く与えることが知られている。そこで、以下の戦略によりフッ化アシルを効率的に得る手法を開発したのち、アミンとワンポットで反応させることでペプチドの新規合成手法とした（図4）。すなわち、図2に示した生合成において、**1**の糖に含まれる隣接水酸基がエステルの酸素原子を活性化していることが示唆される。これを模倣し、エステル部にあらかじめメチルチオメチルチオ基を導入したアミノ酸のチオエステル **6** に対し、フッ素化剤（Selectfluor、*N*-フルオロピス（フェニルスルホニル）アミン（NFSI）、Py-F·BF₄など）を反応させることで、カルボニルの活性化、続くフッ化物イオンの付加とメチルチオメチルチオ基の脱離を経て、相当するフッ化アシル中間体 **7** へと導く。この際、各種のフッ素化剤を検討して、最適条件を選ぶ。このフッ化アシル中間体 **7** に、同じくメチルチオメチルチオ基をもつアミノ酸のチオエステル **8** を作用させることで、新たなジペプチド **9** が生成すると思われる。続いて、ジペプチド **9** からも同様の手法により直接ペプチド鎖の伸長が可能であり、従来法のような脱保護の操作を必要としない直截的なアプローチとなる。

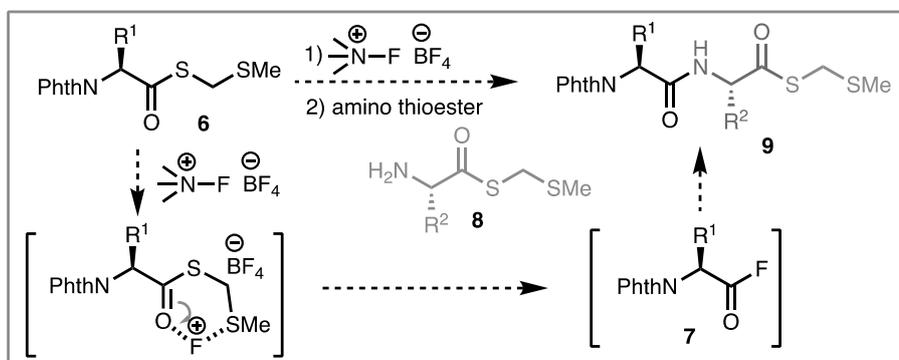


図4. カチオン性フッ素化剤によるフッ化アシルの生成と新規ペプチド合成法

最初に、通常のカルボン酸として、3-フェニルプロパン酸 **10** を用い、メチルチオメチルチオシランとフッ化テトラブチルアンモニウム、及び脱水縮合剤存在下で相当するメチルチオメチルチオエステル **11** に変換した。続いて、メチルチオメチルチオ基を活性化させるため、幾つかのフッ素化剤 (Selectfluor、NFSI、Py-F·BF₄ など) を試みたところ、Selectfluor がほぼ定量的に相当するフッ化アシル中間体 **12** を与えることを見出した。一方、NFSI や Py-F·BF₄ を用いた場合は、**12** の収率は、それぞれ 59、42% であった。また、Selectfluor を用いた場合でも、溶媒をアセトニトリルから THF、ジクロロメタン、DMF などに変えると、反応は全く進行しなかった。続いて、生成したフッ化アシル中間体 **12** を各種の第一級、第二級アミンを用いてアミド化反応を試みたところ、かさ高いアミンを用いても、相当するアミド **13** が非常に高い収率で得られた (図 5) [4]。

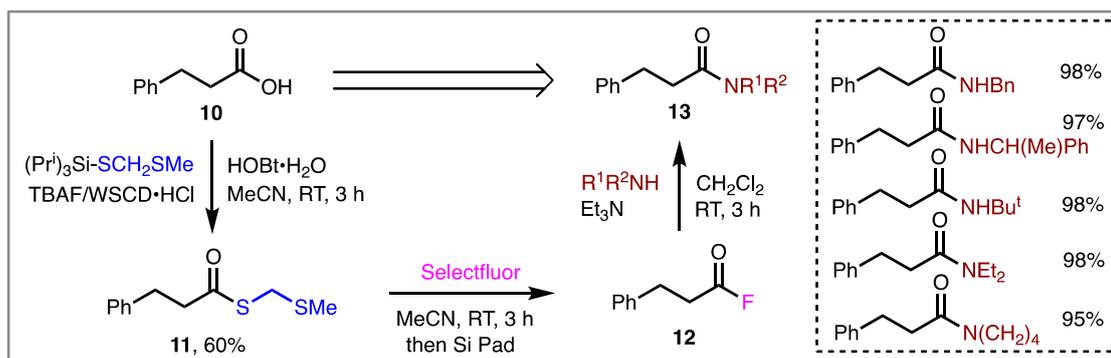


図 5. メチルチオメチルチオエステルからフッ化アシルの生成と新規アミド合成法

この合成手法を活用して、ペプチド合成に応用した。すなわち、保護されたグルタミン酸のメチルチオメチルチオエステル **14** から出発して、Selectfluor と反応させることにより、相当するフッ化アシル中間体 **15** を与えることを見出した。続いて、アラニンのメチルエステルを用いてアミド化反応を試みたところ、相当するジペプチド **16** が良い収率で得られた (図 6)。

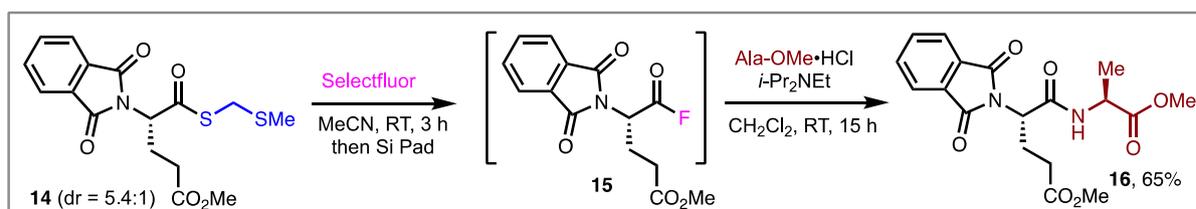


図 6. フッ化アシル中間体を經由する新規ペプチド合成法

2. カルボン酸から出発した新規ペプチド合成法の開発

カルボン酸から直接、フッ化アシル中間体に変換できれば、出発原料を保護することなく、変換反応が可能になる。そこで、私どもは市販の反応剤を用いて、カルボン酸から直接、フッ化アシル中間体に変換する手法を開発することとした。モデル反応として 3-フェニルプロパン酸 **10** を用い、市販の各種の反応剤を試してみたところ、トリフルオロメタンチオール銀 (I) とヨウ化カリウムを組み合わせると、カルボン酸を効率よく相当するフッ化アシル **12** に変換できた。このフッ化アシル中間体 **12** は、相当するアミド **17** やエステル **18** のみならず、Friedel-Crafts 反応やパラジウム触媒によるフェニルボロン酸とのカップリング反応によって、相当する 2-チオフェニルケトン **19** やフェニルケトン **20** へと変換することができた (図 7) [5]。

フッ化アシル合成の最適化条件を見出した後、続いて反応の基質適応範囲を調べた (図 8)。求核剤に関しては、第一級アミン及び第二級アミンの両方ともフッ化アシル中間体 **22** と円滑に反応して、所望のアミド **23a~23e** を合成することができた。また、かさ高いアミンを使用した場合でも、問題なく生成物 **23f**、**23g** が高

収率で得られた。さらに、トランス-桂皮酸、各種の4-置換型安息香酸、シクロヘキサンカルボン酸、(3r,5r,7r)-アダマンタン-1-カルボン酸など、様々なカルボン酸からフッ化アシル中間体 **22** を経由して、相当するアミド体 **23h**~**23o** に円滑に変換できた。4-エトキシ-4-オキソブタン酸、2-メチル-2-フェニルプロパン酸、2,2,2-トリフェニル酢酸、ロキソプロフェン、デヒドロアビエチン酸なども、相当するアミド **23p**~**23v** に高収率で変換することができた。本反応の特徴として、(1) 一方の水酸基をシリル基で保護されたデオキシコール酸は、もう一方の水酸基を保護することなく、相当するベンジルアミド **23u** に変換できた；(2) 3-オキソ-4-アザ-5 α -アンドロスト-1-エン-17 β -カルボン酸からのフィナステリド **23v** への直截的合成も達成できた。

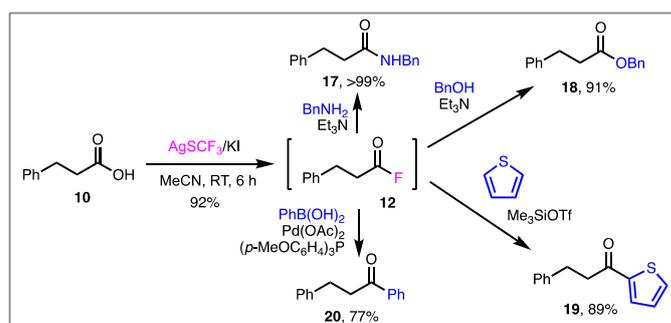


図 7. カルボン酸からフッ化アシル中間体を経由する各種の合成変換

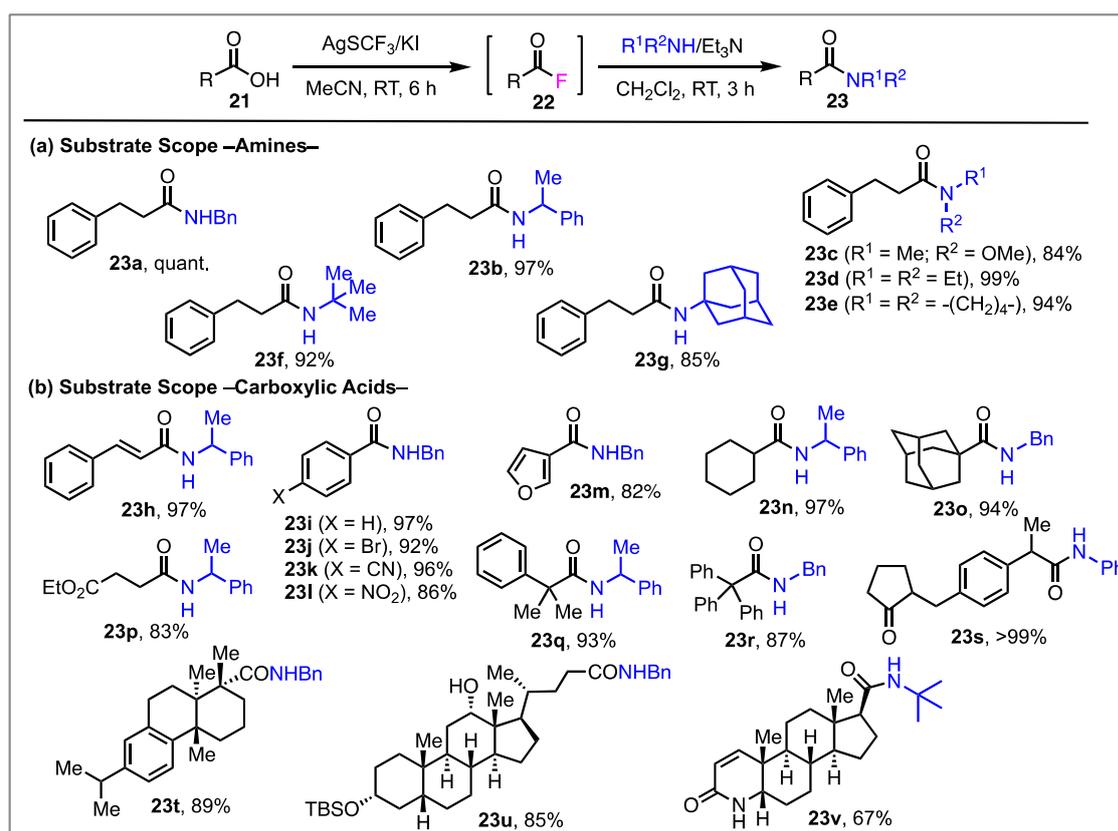


図 8. カルボン酸からフッ化アシル中間体を経由する各種のアミド合成

この合成手法は、ジペプチドの効果的な合成にも適用できた (図 9)。すなわち、保護されたアミノ酸 **24** として、アラニン (*N*-Cbz-Ala 及び *N*-Phth-Ala) やバリン (*N*-Cbz-Val)、及びかさ高い α,α -ジメチルグリシン (*N*-Cbz-Aib) を用いて、トリフルオロメタンチオール銀 (I) とヨウ化カリウムと反応させることにより、相当するフッ化アシル体 **25** に変換でき、これを DIPEA の存在下、L-アラニンのメチルエステルで処理すると、

それぞれ、*N*-Cbz-Ala-Ala-OMe (**26a**)、*N*-Phth-Ala-Ala-OMe (**26b**)、*N*-Cbz-Val-Ala-OMe (**26c**) および *N*-Cbz-Aib-Ala-OMe (**26d**) が良好な、或いは高い収率で得られた。さらに、かさ高いジアルキルアミノ酸誘導体同士を反応させても、*N*-Cbz-Aib-Aib-OMe (**26e**) を中程度の収率で得られることを見出した。

トリフルオロメタンチオール銀 (I) とヨウ化カリウム (AgSCF₃/KI) を用いる合成手法の有用性は、アミノ酸そのものを使うジペプチドの直截的合成からも明らかである (図 10)。すなわち、Cbz または Fmoc で保護されたアラニン (*N*-Cbz-Ala (**27a**) または *N*-Fmoc-Ala (**27b**)) を AgSCF₃/KI で処理し、得られたフッ化アシル中間体 **28a**、**28b** と L-アラニンと反応させることにより、ジペプチドである *N*-Cbz-Ala-Ala (**29a**) および *N*-Fmoc-Ala-Ala (**29b**) を良好な収率で得ることができた。これらの生成物は、さらに同様の反応変換を繰り返すことにより、ペプチド鎖の伸長を行うことが可能になる。

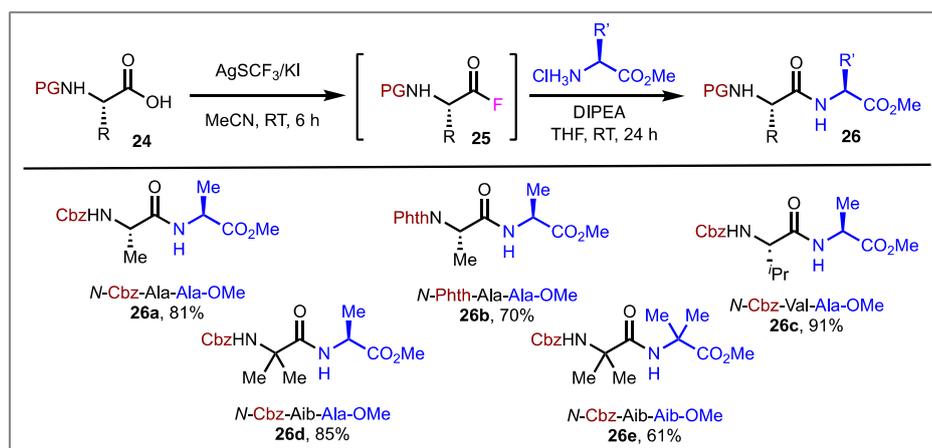


図 9. カルボン酸からフッ化アシル中間体を経由する各種のジペプチド合成

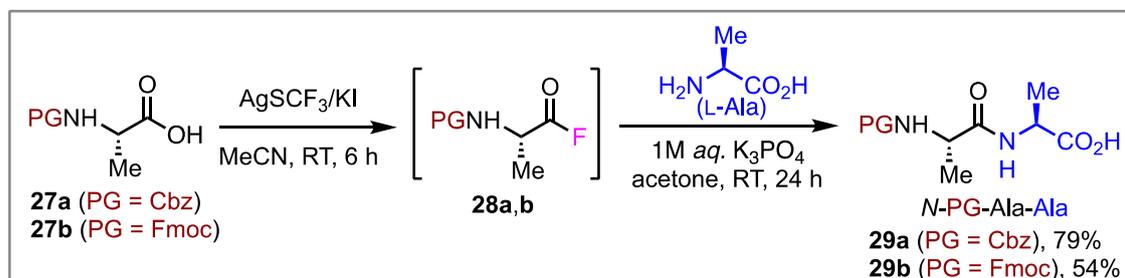


図 10. カルボン酸からフッ化アシル中間体を経由する各種のジペプチド合成

文 献

- Lee, H.-J., Huang, X., Sakaki, S., Maruoka, K. Metal-Free Approach for Hindered Amide-Bond Formation with Hypervalent Iodine(III) Reagents: Application to Hindered Peptide Synthesis. *Green Chem.* 2021 Dec 25; 23(2):848-855. DOI: org/10.1039/D0GC3912H
- Lee, H.-J., Choi, E.-S., Maruoka, K. Development of a Catalytic Ester Activation Protocol for the Efficient Formation of Amide Bonds using an Ar-I/HF•Pyridine/mCPBA System. *Asian J. Org. Chem.* 2022 Sep 15; 11(10):e202200483. DOI: org/10.1002/ajoc.202200483
- Choi, E.-S., Jeong, H.-C., Han, Y.-L., Lee, H.-J., Maruoka, K. Efficient Amide Formation from Non-Activated Cyclopropyl Ester via Acyl Fluoride Generation Using Hypervalent Iodine(III) Reagent and Selectfluor. *Asian J. Org. Chem.* 2023 July 26; 12(9): e202300333. DOI: org/10.1002/ajoc.202300333.

- 4) Nagano, S, Maruoka, K. Facile Synthesis of Acyl Halides from Carboxylic Acid Thioesters for Efficient Synthesis of Ketones, Esters, Amides and Peptides. In preparation.
- 5) Nagano, S., Maruoka, K. Synthesis of Acyl Fluorides from Carboxylic Acids with KI/AgSCF₃ for Efficient Amide and Peptide Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* 2023 Jan 9; 365(3): 295-300. DOI: [org/10.1002/adsc.202201103](https://doi.org/10.1002/adsc.202201103).