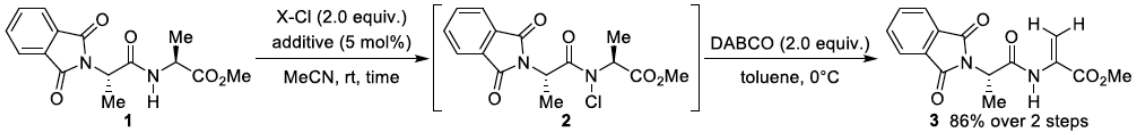
12　次世代中分子医薬創製に関わる合成基盤技術の開発研究	竹本　佳司

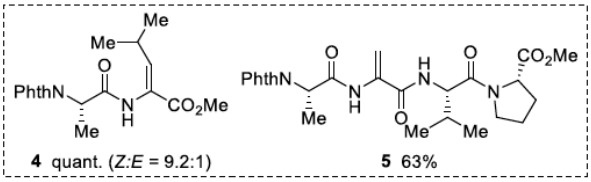
【目的】α,β–デヒドロアミノ酸（ΔAA）は天然にも広く見られる非タンパク質構成アミノ酸の一種である。その剛直な構造がペプチド鎖に安定性や活性の変化をもたらすだけでなく、ΔAA を足掛かりにしたペプチドの化学修飾法も数多く報告されているため、そのペプチド鎖へのΔAA の効率的な導入法の開発は重要な研究課題である。ΔAA が連結部位となるペプチド縮合はその低反応性と基質の分解が問題となるため、ペプチド鎖の構築後にΔAA 部位を構築するのが一般的であるが、ΔAA に簡便に変換可能なアミノ酸残基をあらかじめ導入しておく必要がある。また、近年ではΔAA の構築を伴うペプチドカップリングによる多置換ΔAA の立体選択的合成等も報告されているが、いずれも特殊なアミノ酸・ペプチドユニットを調製する必要があり、ペプチド中の単純なアミノ酸残基を利用できるΔAA の構築法はこれまで皆無であった。

【方法】そこで、筆者らはペプチド鎖中の単純なアミノ酸残基を変換できる手法の開発に着手し、その中でペプチド鎖に普遍的に存在する第二級アミド構造に着目した。すなわち、ペプチド主鎖のアミドに対して *N*-クロロ化を行い、その後適切な塩基を作用させることで、単純なアミノ酸残基を利用できる一般性の高いペプチド鎖へのΔAA 導入法となるのではないかと考えた。

【結果】単純な基質のアミド *N*-クロロ化で良好な結果を与えることが報告されている TCCA や ^{t}BuOCl は、ペプチドに適用するには反応活性が不十分で、低変換率に留まった（下図 entries 1 and 2）。そこで種々検討した結果、求電子的クロロ化剤に触媒量のキヌクリジンを添加することで、極めて短時間かつ高収率でペプチド主鎖アミドも *N*-クロロ化できることを新たに見出した（entry 4）。なお、得られた *N*-クロロペプチドはカラム精製や長期保存に耐える程度に安定であった。さらに *N*-クロロ化体に対して適切な塩基を作用させることで、対応するΔAA 含有ペプチドを高収率で得ることにも成功した。本反応は温和かつ短時間で進行し、種々の官能基を含む幅広いペプチドに適用可能であり、ペプチド内の任意の側鎖をΔAA に変換できた（**4**、**5**）。さらに本法により大環状構造を有する生物活性ペプチドや医薬品ペプチドへのΔAA 導入にも成功した。

N-クロロ化を経由したデヒドロアミノ酸（ΔAA）モチーフの合成





entry	X-Cl	additive	time (h)	yield of **2** (%)[a]	rsm (%)[a]
1	TCCA	-	3	15	81
2	^{t}BuOCl	-	3	0	97
3	^{t}BuOCl	pyridine	1	20	81
4	^{t}BuOCl	quinuclidine	1	92	0

[a]NMR yield.

12. 次世代中分子医薬創製に関わる合成基盤技術の開発研究

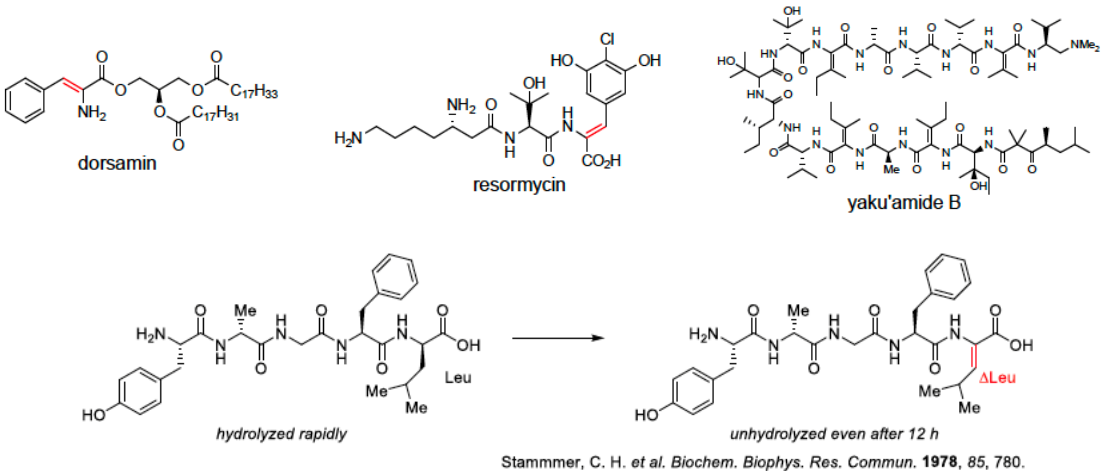
竹本　佳司

京都大学 薬学研究科 薬品分子化学分野

Key words：デヒドロアミノ酸，ペプチド医薬，*N*-クロロアミド，脱離反応，Michael 受容体

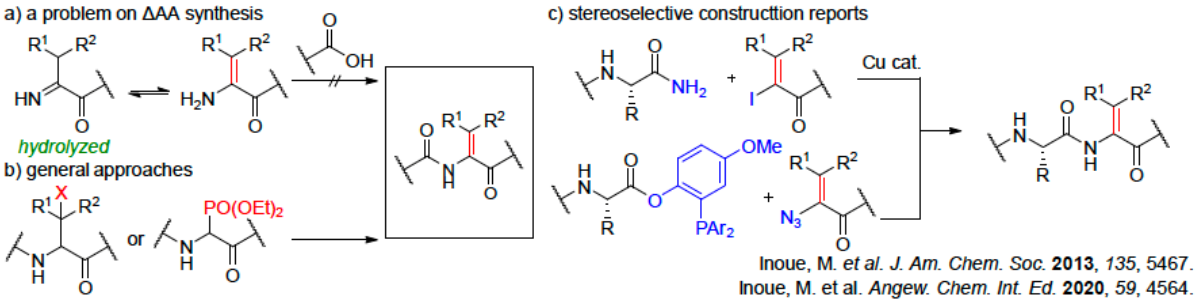
緒　言

α,β-デヒドロアミノ酸（ΔAA）は非タンパク質構成アミノ酸の 1 つであり、ΔAA を含有する生物活性天然物・ペプチドは多く存在する。また、炭素-炭素二重結合に起因する剛直性により、ΔAA がペプチド鎖へ導入されれば、その三次元構造は大きく変化する。1978 年に Stammer らは、ペプチド鎖へΔAA を導入することにより、エンケファリンアナログの酵素による加水分解耐性が向上することを初めて報告した（Scheme 1）[1]。その後、ΔAA 含有ペプチドの構造活性相関研究は広く研究され、ペプチド化合物の代謝安定性や生物活性向上といった報告は数多くなされてきた[2]。さらにΔAA の二重結合はエナミドおよび Michael 受容体としての性質を併せ持つ有用な官能基であり、それを巧みに利用したペプチド鎖の化学修飾法も数多く開発されてきた。



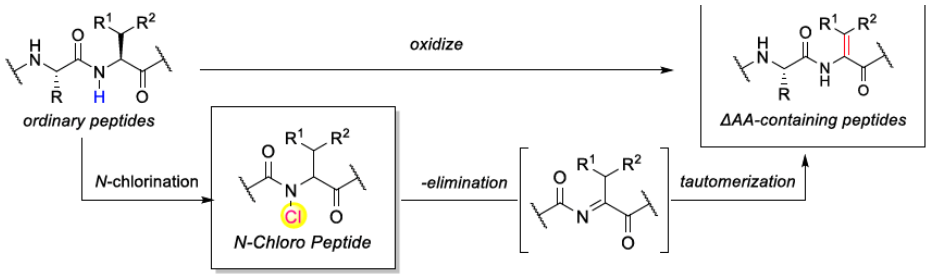
Scheme 1. DAA-containing natural products and SAR study

上述のようにΔAA は有用な部分構造であるため、ペプチド鎖への効率的な導入法の実現は非常に重要な研究課題である（Scheme 2）。N 末端にΔAA を有するペプチドの縮合はイミンへの異性化を経由する加水分解が競合するため[3]、ΔAA は最終段階で構築され、一般にはセリンやスレオニン、システインのアミノ酸残基の脱離反応が常套法である（Scheme 2a）。また、セリンの過ヨウ素酸分解等により調製可能なペプチドホスホン酸エステルとアルデヒドを用いた Horner-Wadsworth-Emmons 反応もよく用いられている。しかしこれらの手法はいずれも特殊なアミノ酸残基をペプチド連結段階で予め導入しておく必要がある（Scheme 2b）。最近では、井上らにより ΔAA の構築を伴うペプチド鎖の連結も報告されており、デヒドロイソロイシン残基の立体選択的構築を行う上で画期的な手法である（Scheme 2c）[4]。しかし、既存法ではいずれにおいても原料として特殊なユニットを導入しておく必要があることは共通しており、単純なペプチド鎖に直接ΔAA を導入できる手法は未だ存在しない。



Scheme 2. Previous common synthetics approaches

そのような背景の下、筆者は何の変哲もないペプチド鎖に直接デヒドロアミノ酸構造を導入できれば、構築後のペプチド鎖に対する Late-Stage 官能基化にも利用できる画期的な手法となると考えた。一方で、その実現のためにはペプチド鎖にどのように酸化度を導入するかが鍵となるが、筆者はペプチド鎖に普遍的に含まれる第二級アミド構造に着目した。すなわち、ペプチド主鎖の第二級アミド構造を求電子的クロロ化剤により *N*-クロロ化し、続く塩基による脱離反応に付すことで、ΔAA を簡便に導入できると期待した（Scheme 3）。本戦略ではペプチド鎖への予備的な特殊アミノ酸残基導入を必要としないため、ΔAA 含有ペプチドの合成工程数削減に加え、これまで達成例の無かった中・大分子ペプチドへの Late-Stage での ΔAA 導入の実現も可能ではないかと考え着手した。

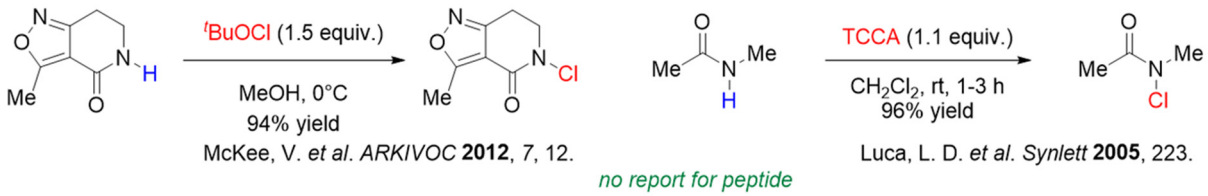


Scheme 3. Late-stage installation of DAAs by N-chloropeptide strategy (this work)

方法および結果

1. *N*-クロロペプチドの効率的合成

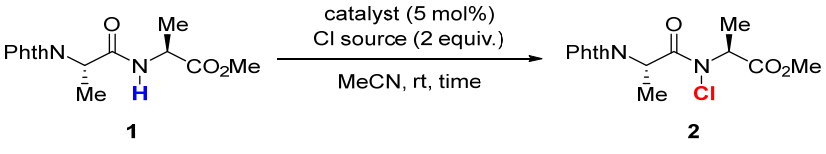
アミド構造の *N*-官能基化は一般に強塩基性条件が必要となるが、*N*-クロロ化は単純なアミドに対してであれば、温和な条件下、簡便な操作で円滑に進行することが知られていた（Scheme 4）[5]。

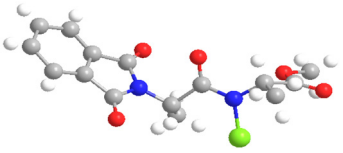


Scheme 4. General *N*-chlorinating reagents

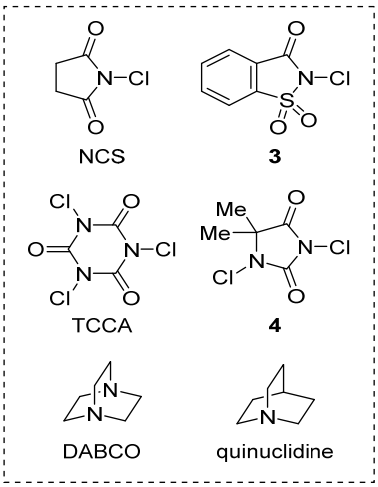
一方、ペプチド主鎖のアミドを *N*-クロロした例はこれまで皆無であり、周辺の嵩高い置換基と電子求引基により求核性が下がっていると予想されるペプチド内のアミド構造を簡便に *N*-クロロ化できるかは不透明であった。そこでまず単純なジペプチドをモデル基質として、ペプチド内アミド構造の *N*-クロロ化反応の条件検討から取り組むこととした（Table 1）。上述したように単純なアミドで報告例があった次亜塩素酸 *t* -ブチルや TCCA を作用させると、TCCA を用いた際に低変換率ではあるものの対応する *N*-クロロペプチドを 15%収率で得ることに成功した（entries 1、2）。得られた *N*-クロロペプチドはカラム精製可能な安定化合物であり、冷蔵保存することで 1 年以上の保存が可能であった。反応時間を 24 時間に延長することで収率は向上したものの、依然として原料が回収されており、分離困難な試薬由来の副生成物の生成も常に問題となった（entry 3）。また、市販のクロロ化剤を幾つか検討したが、いずれもほとんど反応は進行せず、既存の求電子的クロロ化剤では限界があることが示唆された（entries 4～6）。そこで、筆者はカチオン性の求電子的クロロ化剤であれば、中性の市販試薬と比べて高反応性を示し、市販のクロロ化剤と求核触媒を混合するだけで簡便に調製できるのではないかと期待した。そこで副生物の少ない次亜塩素酸 *t* -ブチルをクロロ化剤として、幾つかの求核触媒を検討したところ、いずれにおいても反応が加速された。特にキヌクリジンを用いた際には 1 時間で反応が完結しており、*N*-クロロペプチドを 92%収率で得ることに成功した（entries 7～9）。なお、本反応条件はキヌクリジンの触媒量を 0.1 mol%まで減じても十分な反応性を示し（entry 10）、水との混合溶媒中であってもクロロ化は問題なく進行した（entry 11）。

Table 1. Reaction optimization for *N*-chlorination





entry	catalyst	Cl source	time (h)	conv.[a] (%)	yield[a] (%)
1	none	^{t}BuOCl	3	<5	0
2	none	TCCA	3	19	15
3	none	TCCA	24	75	68
4	none	NCS	3	<5	0
5	none	**3**	3	<5	0
6	none	**4**	3	<5	0
7	pyridine	^{t}BuOCl	1	19	20
8	DABCO	^{t}BuOCl	1	47	50
9	quinuclidine	^{t}BuOCl	1	>95	92 (86)
10[b]	quinuclidine	^{t}BuOCl	12	>95	98
11[c]	quinuclidine	^{t}BuOCl	0.5	>95	97



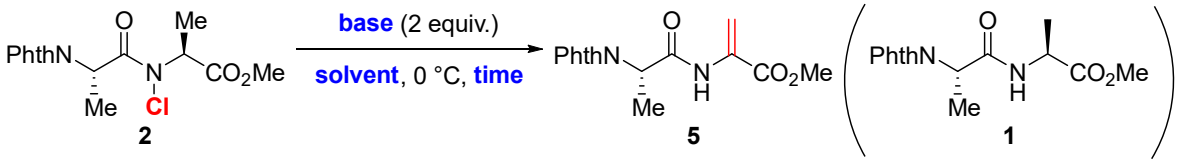
[a]Conversions and yields are determined by 1H NMR spectra using dimethyl terephthalate as an internal standard. Isolated yields in parenthesis. [b]The reaction was perfomed with 0.1 mol% of quinuclidine in toluene (0.5 M). [c]MeCN/H_2O (1:1) was used as solvent.

2. *N*-クロロペプチドからα,β-デヒドロアミノ酸（ΔAA）への誘導化検討

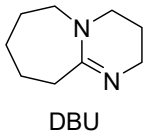
続いて、得られた *N*-クロロペプチド **2** の ΔAA への変換について検討した（Table 2）。まず炭酸カリウムを塩基として作用させたが、目的物 **5** は得られず還元されたペプチド **1** を与えるのみであった（entry 1）。続いて、トリエチルアミンを作用させたところ、目的とする ΔAA 含有ペプチド **5** を 20%収率で得ることに成功した（entry 2）。一方で、原料回収と還元体 **1** の副生が問題となっていたため、異なるアミンをいくつか検討したところ、環状構造を有する立体障害の小さなアミンで選択性が向上する傾向が見られ、中でも DABCO を用いた際に最も高い選択性がみられた（entries 3～6）。さらに溶媒をジクロロメタンからトルエンに変更することで目的物 **5** の収率は 90%まで向上した

（entry 7）。なお、DABCO に構造類似のキヌクリジンを用いた場合にΔAA の比率は変わらず反応が加速されたことから、塩基性は反応速度に影響しつつも選択性には影響しないことが示唆された（entry 8）。

Table 2. Reaction Optimization for β-Elimination



entry	base	solvent	time	conv.[a] (%)	yield[a] (%) 5	1
1	K_2CO_3	CH_3CN	48 h	44	0	28
2	Et_3N	CH_2Cl_2	1 h	71	20	29
3	pyridine	CH_2Cl_2	1 h	xx	xx	xx
4	DBU	CH_2Cl_2	1 h	>95	28	23
5	N-Me-pyrrolidine	CH_2Cl_2	1 h	>95	76	6
6	DABCO	CH_2Cl_2	1 h	>95	84	5
7	DABCO	toluene	1 h	>95	90	<5
8	quinuclidine	toluene	10 min	>95	87	<5

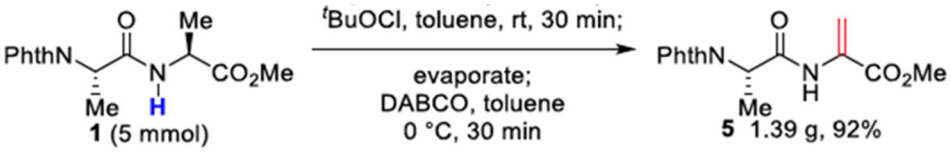

DBU


DABCO


quinuclidine

[a]Conversions and yields are determined by ^{1}H NMR spectra using dimethyl terephthalate as an internal standard. Isolated yields in parenthesis.

最後に出発化合物からΔAA 含有ペプチドへのワンポット変換を試みた。*N*-クロロ化段階において原料消失を確認後、減圧留去により溶媒および残留クロロ化試薬を除去し、得られた残渣にトルエンと塩基を添加するという簡便な実験操作で、所望のΔAA 含有ペプチド**5** のワンポット合成に成功した。また本変換反応はグラムスケールであっても問題なく目的物が得られることを確認している（Scheme 5）。

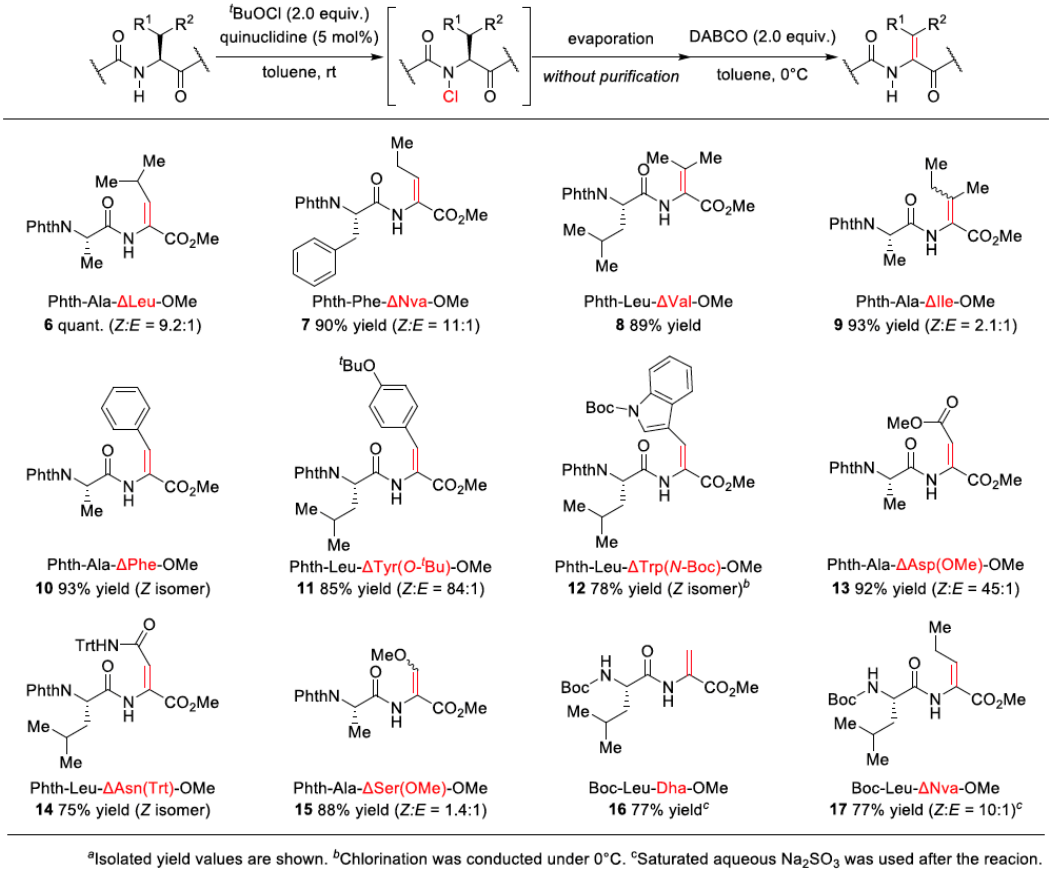


Scheme 5. One-pot gram scale synthesis of DAA

3. 基質適用範囲の検討

見出した最適ワンポット条件を用いて本反応の基質適用範囲の評価を行った（Scheme 6）。ロイシン、ノルバリン残基からは三置換体が非常に高い収率で得られた。この際、*Z* 体が高選択的に得られることが分かっている（**6**、**7**）。バリン、イソロイシン残基からは、より立体的に込んだ四置換体が良好な収率で得られた（**8**、**9**）。また本法は芳香族アミノ酸に対しても適用可能であり、フェニルアラニンのみでなく、電子豊富なフェノール環を有する保護チロシンやインドール環を有する保護トリプトファン残基もΔAA へと変換可能であった（**10**～**12**）。さらにアスパラギン酸エステル、トリチル保護されたアスパラギン（**13**、**14**）、セリン（**15**）といった極性側鎖を有する基質からも対応するΔAA を高収率で与えた。続いて、ペプチド合成で汎用される *N*-Boc 保護ペプチドへの適用も検討した。見出した *N*-クロロ化

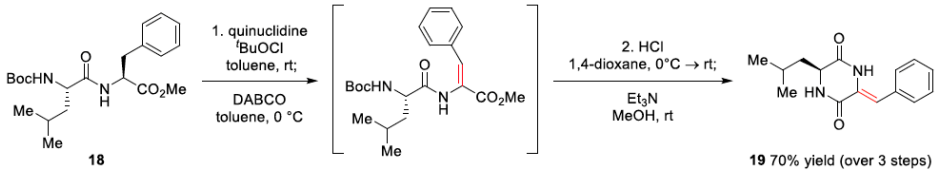
条件ではカルバモイル基上での *N*-クロロ化が競合するが、過剰量の次亜塩素酸 *t*-ブチルを用いることでジクロロ化が円滑に進行し、その後の脱離反応もアミド上で優先的に反応するため、反応後に適切な還元処理を行うことで所望のΔAA 含有ペプチドを高収率で得ることに成功した（**16**、**17**）。



[a]Isolated yield values are shown. [b]Chlorination was conducted under 0°C. [c]Saturated aqueous Na_2SO_3 was used after the reacion.

Scheme 6. Substrate scope

次に、本手法を生物活性化合物の合成に適用した（Scheme 7）。市販の保護アミノ酸の縮合で定量的に得られた *N*-Boc 保護ジペプチドからΔAA の導入の後、Boc 基の脱保護と環化を経ることで、2 工程総収率 70%で、生物活性を有するジケトピペラジンの合成を達成した［6］。

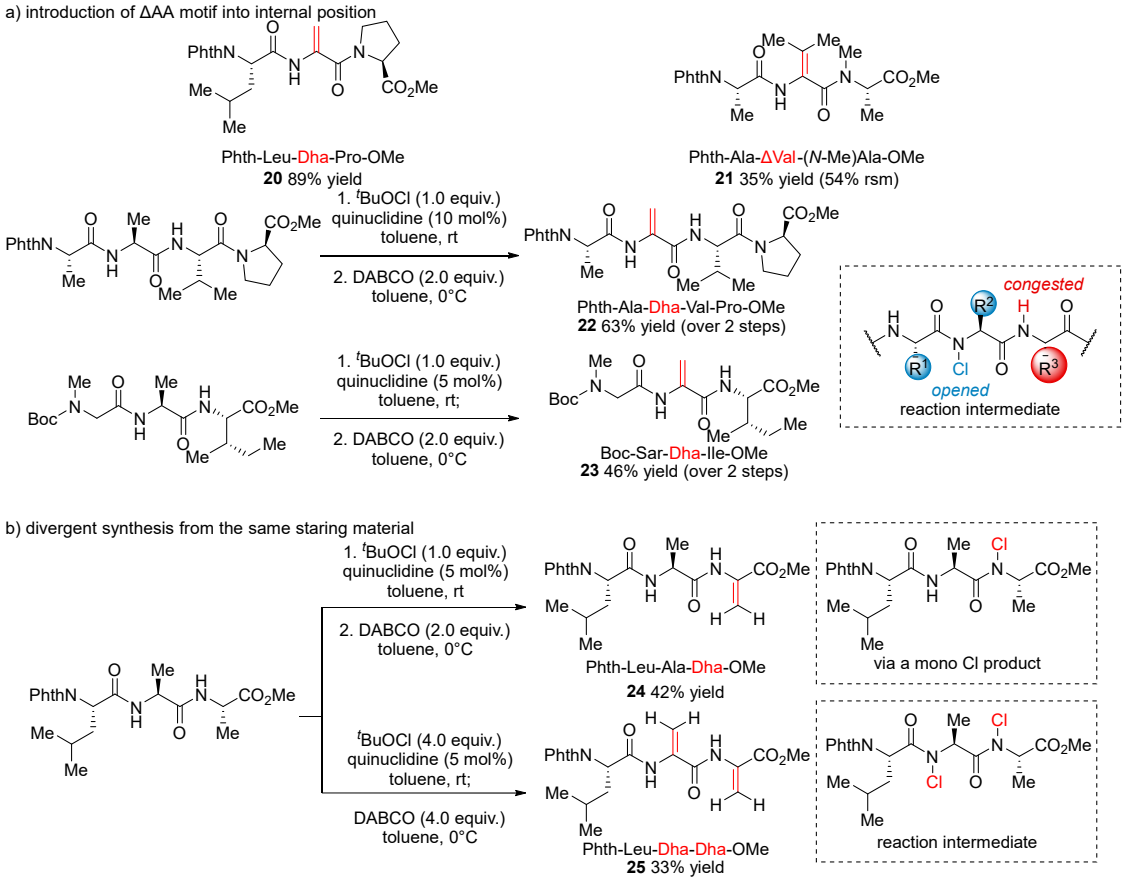


Scheme 7. Derivatization of a bioactive compound

続いて、より長鎖のオリゴペプチドへの適用を試みた（Scheme 8）。本変換はトリペプチドやテトラペプチドを基質としても良好に進行し、対応するΔAA 含有オリゴペプチドを良好な収率で与えた（**20**～**23**）。この際、*N*-クロロ化段階において第二級アミドが複数存在する場合でも、アミド基近傍の立体障害の差により位置選択的にΔAA を導入する

ことが可能であった。さらに、*N*-クロロ化条件における次亜塩素酸 *t*-ブチルの当量を調整することで、同一の基質から複数の誘導体を作り分けることも可能であった（Scheme 8b）。すなわち、1 当量の次亜塩素酸 *t*-ブチルを用いる場合には立体的に空いている C 末端側がモノクロロ化されるため、続く β 脱離によりモノデヒドロ化体 **24** を与えた一方で、過剰量の次亜塩素酸 *t*-ブチルを用いる条件ではジクロロ化体を経由したジデヒドロ化体 **25** に変換可能であった。いずれも収率が中程度なのは、還元反応によって原料が回収されるためである。

最後に、導入した ΔAA に対してヒドロシリル化、オゾン分解、チアマイケル付加反応を行い、対応する目的物を中程度以上の収率で得た。本結果から ΔAA が各変換反応の足掛かりとして有用なことが改めて確認され、本戦略による ΔAA 導入反応と合わせて多様なペプチド化合物の供給が可能となることが示唆された。これまでに ΔAA に変換するための部分構造をもたない環状ペプチドに対して直接 ΔAA 残基を導入した例は無く、本結果は従来法では合成困難な大環状ペプチドの誘導化手法の新戦略としての可能性を示すものである。



Scheme 8. Application to oligopeptides

考　察

筆者はキヌクリジンを用いた強力なペプチド *N*-クロロ化条件を確立し、それを基盤としたアミノ酸側鎖に依らない新規 ΔAA 含有ペプチド合成法を開発した。本反応は大環状を含む様々な生物活性ペプチドに対して ΔAA 導入が可能であり、ペプチド化合物の構造活性相関研究を含めた創薬科学において大きな貢献が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科薬品分子化学分野の南條毅助教である。

文　献

1) English, M. L. Stammer, C. H. D-Ala2, ΔzPhe4-methionine enkephalin amide, a dehydropeptide hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978 Nov 29;85(2):780–782. PMID: 216357 DOI:10.1016/0006-291X(78)91229-9

2) Yamada, K. Shinoda, S. Synthesis of low-hemolytic antimicrobial dehydropeptides based on gramicidin s. J. Med. Chem. 2006 Dec 8;49(26):7592–7595. J. Med. Chem. 2006 Dec 8;49(26):7592–7595 PMID: 17181140 DOI:10.1021/jm061051v

3) Kuranaga, T. Sesoko, Y. Inoue, M. Cu-mediated enamide formation in the total synthesis of complex peptide natural products. Nat. Prod. Rep. 2014 Feb 25;31(4):514–532. PMID: 24567066 DOI: 10.1039/C3NP70103D

4) Itoh, H. Miura, K. Kamiya, K. Yamashita, T. Inoue, M. Solid-phase total synthesis of yaku'amide B enabled by traceless Staudinger ligation. Angew. Chem. Int. Ed. 2020 Jan 13;59(11):4564–4571. PMID: 31943639 DOI:10.1002/anie.201916517

5) De, L. L. Giacomelli, G. Nieddu, G. A simple protocol for efficient N-chlorination of amides and carbamates. Synlett 2005 Jan 20;2005(2):223–226. DOI: 10.1055/s-2004-836061

6) Bartoccini, F. Bartolucci, S. Lucarini, S. Piersanti, G. Synthesis of boron- and silicon-containing amino acids through copper-catalysed conjugate additions to dehydroalanine derivatives. Eur. J. Org. Chem. 2015 Apr 17;2015(15):3352–3360. DOI: 10.1002/ejoc.201500362