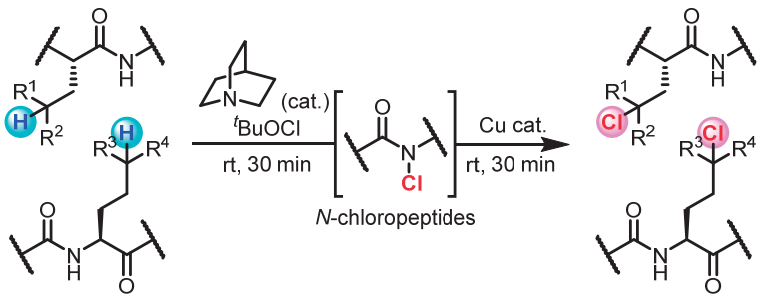
| 111　*N*-ハロペプチドの合成とその機能解析 | 南條　毅 |
|---|---|

**【目的】**ペプチドは中分子創薬における一大モダリティとして近年大きな注目を集めており、ペプチド化合物の多彩な誘導体を供給できる化学合成法の実現は重要な研究課題である。その中でも、構築済みのペプチド鎖に対する直接的な化学変換が実現されれば、既に手元にある親化合物を基に迅速な誘導体供給が可能となるため、比較的制御しやすい高反応性官能基を有するアミノ酸側鎖の変換を中心に最近精力的に取り組まれてきた。一方で、脂肪鎖で構成される疎水性ペプチド側鎖は反応のための足掛かりに乏しく、そのような側鎖を標的とする化学修飾法は未だ限られているのが現状である。このような背景の下、筆者らはアミノ酸残基の種類に依らないペプチド化合物の化学修飾法の実現を目指して研究に着手し、ペプチドの *N*-クロロ化を経由する手法を考案した。第二級アミドはペプチド化合物において主鎖を構成する主要な官能基と言えるが、その低い反応性のために、これまで有力な反応点としてはあまりみなされていなかった。一方で筆者らは、ペプチド主鎖を構成するアミドでも温和な条件下円滑に反応する触媒的 *N*-クロロ化条件を新たに見出しており、生じた *N*-クロロペプチドの高い反応性を利用した側鎖 C–H 官能基化法の実現を目指し、研究に着手した。

**【方法】***N*-クロロ化されたペプチドを用いて、銅触媒を用いた反応条件を中心に種々検討し、ペプチド側鎖 C–H 結合が円滑にクロロ化される条件を探索した。また、様々なアミノ酸残基を有するジペプチドに対する反応を検討し、本 C–H クロロ化の適用範囲を調査した。加えて、本法で合成された側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化を行い、ペプチド化合物合成におけるビルディングブロックとしての有用性を検証した。

**【結果】**簡便に調製可能な *N*-クロロペプチドを触媒量のヨウ化銅と 4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン、1 当量のアスコルビン酸ナトリウム存在下、1,2-ジクロロエタン中室温で攪拌することで、γ位もしくはδ位が位置特異的にクロロ化されたペプチド 2 が高収率で得られることを見出した。本法は第一級、第二級、第三級を問わず、様々なペプチド側鎖の C（$sp^3$）–H 結合のクロロ化に利用可能で、極性官能基や電子豊富な芳香環を含むペプチドでも円滑に反応が進行した。また、得られた側鎖クロロ化ペプチドは N 末端、C 末端ともに脱保護可能で、C–Cl 結合を損なうことなくペプチド伸長が可能であった。一方で、適切な反応条件に付すことで C–Cl 結合の求核置換反応は良好に進行し、様々な有用置換基に変換可能であることも示された。

*N*-クロロペプチドを経由するペプチド側鎖のγ、δ位選択的 C–H クロロ化



# 111. *N*-ハロペプチドの合成とその機能解析

南條　毅

京都大学 大学院薬学研究科 薬科学専攻 薬品分子化学教室

Key words：*N*-クロロ化，アミド，ペプチド，C–H 官能基化，ラジカル

## 緒　言

ペプチドは中分子創薬における一大モダリティとして近年大きな注目を集めており、ペプチド化合物の多彩な誘導体を供給できる化学合成法の実現は重要な研究課題である。その中でも、構築済みのペプチド鎖に対する直接的な化学変換が実現されれば、既に手元にある親化合物を基に迅速な誘導体供給が可能となるため、比較的制御しやすい高反応性官能基を有するアミノ酸側鎖の変換を中心に最近精力的に取り組まれてきた［1］。一方で、脂肪鎖で構成される疎水性ペプチド側鎖は反応のための足掛かりに乏しく、そのような側鎖を標的とする化学修飾法は未だ限られているのが現状である。

このような背景の下、筆者らはアミノ酸残基の種類に依らないペプチド化合物の化学修飾法の実現を目指して研究に着手し、ペプチドの *N*-クロロ化を経由する手法を考案した［2］。第二級アミドはペプチド化合物において主鎖を構成する主要な官能基と言えるが、その低い反応性のために、これまで有力な反応点としてはあまりみなされていなかった。一方で筆者らは、ペプチド主鎖を構成するアミドでも温和な条件下円滑に反応する触媒的 *N*-クロロ化条件を新たに見出しており、生じた *N*-クロロペプチドの高い反応性を利用した側鎖 C–H 官能基化法の実現を目指し、研究に着手した。

## 方　法

### 1. 側鎖 C–H クロロ化の反応条件最適化

*N*-クロロ化されたペプチドを用いて、銅触媒を用いた反応条件を中心に種々検討し、ペプチド側鎖 C–H 結合が円滑にクロロ化される条件を探索した。

### 2. 基質適用範囲の検討

様々なアミノ酸残基を有するジペプチドに対する反応を検討し、本 C–H クロロ化の適用範囲を調査した。

### 3. 側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化に関する検討

本法で合成された側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化を行い、ペプチド化合物合成におけるビルディングブロックとしての有用性を検証した。

## 結果および考察

### 1. 側鎖 C–H クロロ化の反応条件最適化

筆者らはまず、簡便に調製可能な *N*-クロロジペプチド 1 をモデル基質として、1,5-HAT を経由する C（$sp^3$）–H クロロ化条件を探索した（図 1）。その結果、触媒量のヨウ化銅と 4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン、1 当量のアスコルビン酸ナトリウム存在下、1,2-ジクロロエタン中室温で攪拌することで、*N*-クロロジペプチド 1 は 30 分以内で速

やかに反応し、γ位の第一級 C–H 結合が位置特異的にクロロ化されたペプチド 2 を 86%と良好な収率で与えた。なお、種々のコントロール実験の結果、本反応では一価の銅塩とフェナントロリン配位子の両方が本反応の進行に必須であることが明らかとなっている。

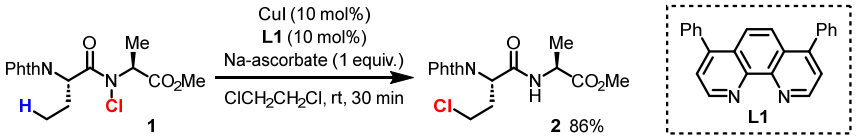
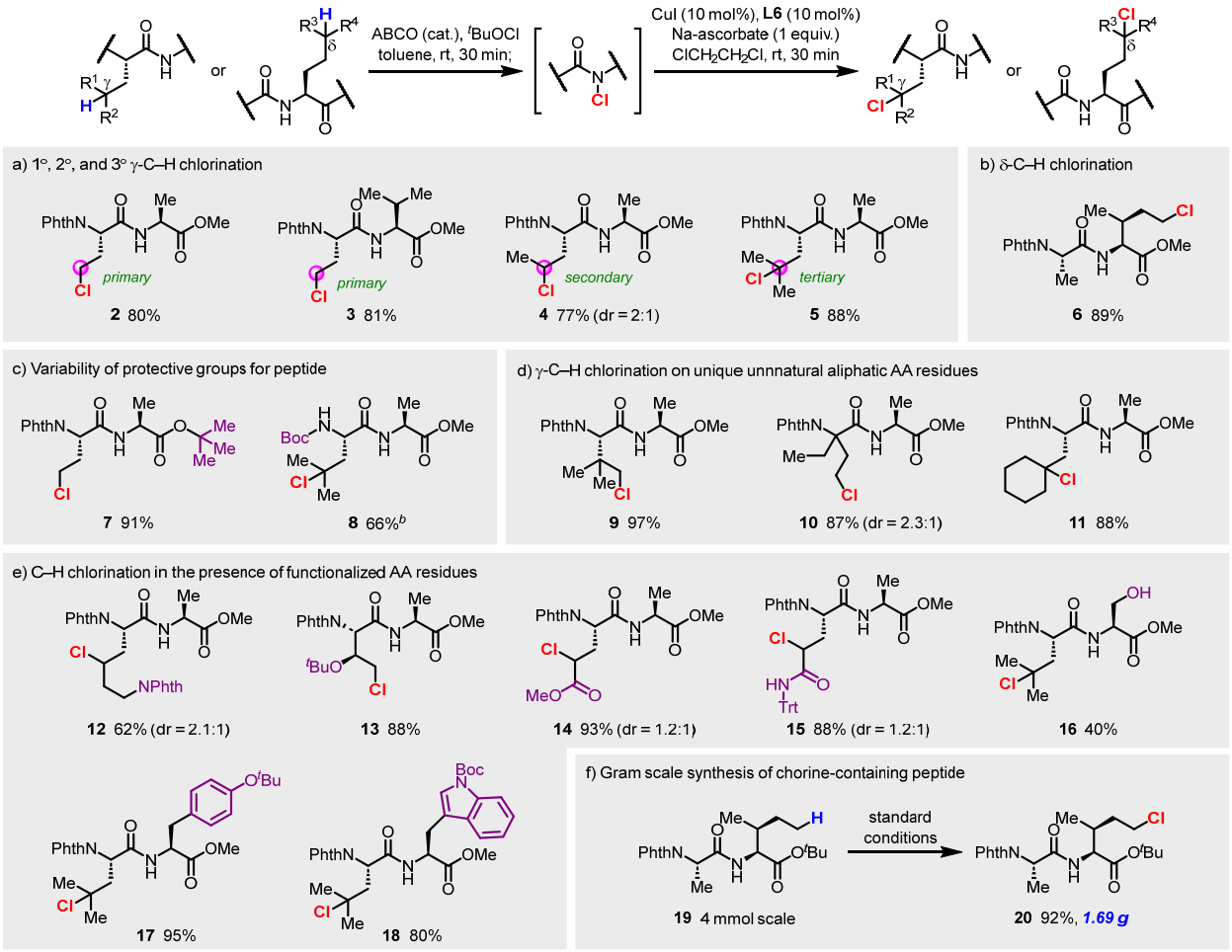



図 1. 反応条件の最適化
Abu、Ala 残基からなるジペプチドを基質とした C–H クロロ化反応において、種々の触媒や配位子を検討し、最適な反応条件を探索した。

**2. 基質適用範囲の検討**

見出した銅触媒条件を用いて本反応の一般性について検討した（図 2）。まず、本反応において *N*-クロロ化体の単離作業が必要かどうかの検討を行ったところ、*N*-クロロ化後に粗精製を行うのみでも後続の 1,5-HAT 反応は円滑に進行し、対応するペプチドから 2 工程 80%の収率で側鎖クロロ化ペプチド 2 が得られることがわかった。次にこの最適化した 2 段階プロトコールを、異なるアミノ酸残基からなる種々のジペプチドに適用した。C 末端側の嵩高い置換基はγ位 C（$sp^3$）–H 塩素化反応の効率に影響せず（3）、ノルバリン（Nov）およびロイシン（Leu）のγ位第二級、第三級 C–H 結合も第一級 C–H 結合と同様、円滑に反応した（4、5）（図 2a）。また、*N*-クロロアミドから C 末端側の C–H 結合も反応でき、イソロイシン（Ile）側鎖のδ位クロロ化にも成功した（6）（図 2b）。なお、図 3 では C 末端カルボキシ基の保護基として、出発原料が安価に入手容易なメチルエステルを主に用いているが、酸性条件下でより容易に脱保護できる *t*-ブチルエステルも問題なく使用できることを確認している（7）（図 2c）。さらに *N*-クロロ化条件を変更する必要があるものの、本 1,5-HAT 反応は Boc 保護ペプチドの C–H クロロ化にも有効である（8）。さらに、*t*-ロイシン（Tle）、ジエチルグリシン（Deg）、シクロヘキシルアラニン（Cha）といった嵩高い非天然アミノ酸残基も適用可能で、対応するγ位クロロ化をいずれも高収率で得た（9～11）（図 2d）。また、ラジカル極性効果を考慮した際に分子間 HAT 反応では反応しにくいと考えられるリジン（Lys）、トレオニン（Thr）、グルタミン酸（Glu）、グルタミン（Gln）等の極性アミノ酸側鎖も効率的に塩素化された（12～15）（図 2e）。加えて、セリン（Ser）残基内の無保護のヒドロキシ基やチロシン（Tyr）とトリプトファン（Trp）といった電子豊富な芳香環も、求電子的 *N*-クロロ化、銅触媒による 1,5-HAT 反応の両方で耐性を示し、それぞれ対応するγ位クロロ化ペプチド 16～18 を良好な収率で与えた。最後に、Ala と Ile からなるジペプチド 19 を用いてグラムスケールの反応についても検討し、4 mmol の基質からでも対応するγ位クロロ化ペプチド 20 が極めて高い収率で得られることを確認した（図 2f）。




[a]Isolated yields. [b]TCCA was used instead of ABCO and [t]BuOCl and the *N*-chloropeptide intermediate was purified to remove the byproducts derived from TCCA.

図 2.　基質適用範囲の検討
様々なアミノ酸残基を有するジペプチドに対する反応を検討し、本 C–H クロロ化の適用範囲を調査した。

### 3. 側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化に関する検討

最後にここまでで合成した側鎖クロロ化ペプチドのさらなる誘導体化について検討した（図 3）。初めに主鎖の保護基の除去について検討したところ、ジペプチド 7 の N 末端フタロイル基はヒドラジンで容易に脱保護され、その後の Boc 保護アミノ酸との縮合反応により、伸長したトリペプチド 21 が高収率で得られた。また、C 末端の *t*-ブチルエステルも容易に除去でき、ジペプチドのフラグメント縮合によりエピメリ化することなくテトラペプチド 22 を得ることに成功した。特筆すべきこととして、これら一連の脱保護・縮合反応において、側鎖に導入された C–Cl は一切反応せず、側鎖クロロ化アミノ酸残基は通常のペプチド伸長操作において安定に存在できる構造であることが示された。一方で、特定の条件に付すことで C–Cl 結合は他の官能基の導入の足掛かりとして利用可能である。実際、側鎖クロロ化トリペプチド 21 に対して、チオフェノール、ヨウ化物イオン、アジ化物イオン等の求核剤を作用させることで対応する置換体 23～25 がそれぞれ良好な収率で得られた。このように側鎖クロロ化ペプチドは適度な安定性と反応性を兼ね備えており、今後さらなる応用が期待される。

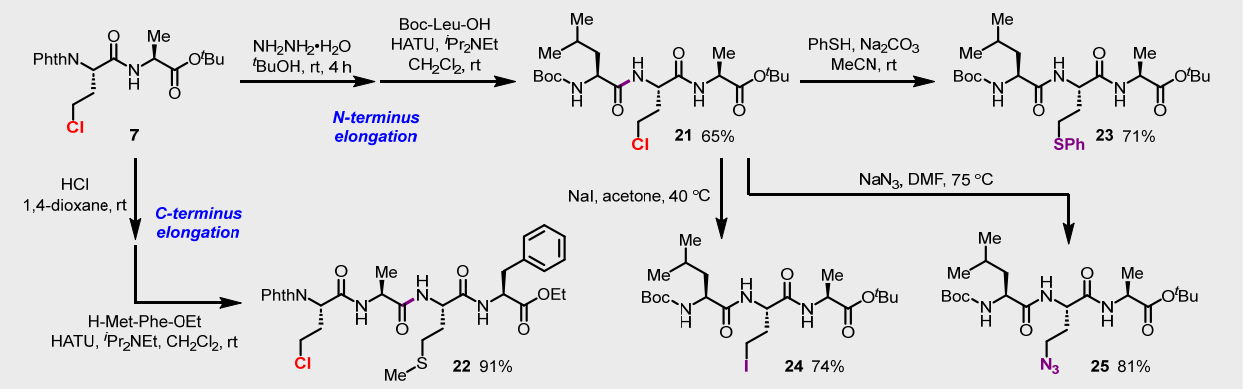



図 3. 側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化に関する検討

本法で合成された側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化を行い、ペプチド化合物合成におけるビルディングブロックとしての有用性を検証した。

以上、本研究で筆者らは *N*-クロロペプチドを経由するペプチド側鎖 C（$sp^3$）–H 結合の位置特異的官能基化法を開発した。本法では分子内反応である 1,5-HAT 反応を利用することで従来法［3, 4］では困難であった幅広いペプチド側鎖のγ位、δ位 C–H 結合を変換可能であった。このようにペプチドの *N*-ハロゲン化は合成化学上有効な手段であることが示されたが、今後さらなる応用研究を進め、多彩な非天然型ペプチドを供給できる実用的手法としての確立を目指したい。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学大学院薬学研究科薬品分子化学研究室の竹本佳司教授の研究室で行われたものです。共同研究者の竹本佳司教授、松元彩香修士および大下拓真修士にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 文　献

1) DeGruyter JN, Malins LR, Baran PS. Residue-Specific Peptide Modification: A Chemist's Guide. Biochemistry. 2017 Aug 1;56(30):3863-3873. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28653834 DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00536

2) Nanjo T, Oshita T, Matsumoto A, Takemoto Y. Late-Stage Installation of Dehydroamino Acid Motifs into Peptides Enabled by an *N*-Chloropeptide Strategy. Chem. Eur. J. 2022 Jun 27;28(36):e202201120. Epub 2022 May 26. PMID: 35527399 DOI: 10.1002/chem.202201120.

3) Shabani S, Wu Y, Ryan HG, Hutton CA. Progress and Perspectives on Directing Group-Assisted Palladium-Catalysed C–H Functionalisation of Amino Acids and Peptides. Chem. Soc. Rev. 2021 Aug 21;50(16):9278-9343. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34254063 DOI: 10.1039/d0cs01441a50.

4) White MC, Zhao, J. Aliphatic C-H Oxidations for Late-Stage Functionalization. J. Am. Chem. Soc. 2018 Oct 31;140(43):13988-14009. Epub 2018 Oct 19. DOI: 10.1021/jacs.8b05195.