

N-ハロペプチドの合成法の確立とその機能解析

京都大学大学院薬学研究科

南條 毅

緒言

数個から十数個のアミノ酸から構成される次世代型中分子ペプチドは、低分子と抗体医薬両方の利点を併せ持つ新たな創薬モダリティとして近年大きな注目を集めている。その中でペプチド鎖への異常アミノ酸や大環状骨格等の非天然型特異構造の導入は薬理活性や代謝安定性を向上させる上で極めて重要であり、多彩な非天然型構造を多く含む、いわゆる「特殊ペプチド」を効率的に供給できる合成手法の実現は有機合成化学に課せられた喫緊の課題である。現状特定の天然型配列を合成するのみであれば、Fmoc固相合成法が信頼性の高い手法として既に確立されており、対応するアミノ酸さえ入手できれば、N末端方向へ任意のアミノ酸を一つずつ連結する直接的な合成経路により比較的簡便に得ることが可能である。一方で、導入したい非天然型構造によっては単量体アミノ酸ユニットの合成に多工程を要するものや、一残基ずつの伸長に向かないものもあり、既存法では合成しづらい構造は非天然型ペプチドにこそ多く存在する。また、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できれば、既に手元にある親化合物を活用した迅速な誘導体供給が可能となるが、既存手法では反応の足掛かりとして側鎖の反応性官能基が必須である⁴。近年では、10残基程度の疎水性側鎖からなる大環状ペプチドが経口投与も可能な「ドラックライク」なペプチド化合物として注目を集め始めているが^{5,6}、特にそのような低反応性のペプチド化合物を標的とできる化学変換法は皆無であった。

このような背景の下、筆者らはアミノ酸側鎖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、ペプチドのN-クロロ化を経由する「N-クロロペプチド法」を考案した(図1)。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であるが、その低い反応性のために、ペプチド化合物では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、単純な構造を有するアミドでN-クロロ化が比較的温和な条件で進行すると

いう報告^{7,8}に着目し、反応条件を最適化することでペプチド主鎖のアミドも温和な条件下変換できるのではないかと考えた。また、得られたペプチドのN-クロロ化体はそれ自体の安定性・物性が興味を持たれるとともに、反応活性なN-Cl結合が近傍での化学修飾の足掛かりとなると期待した。

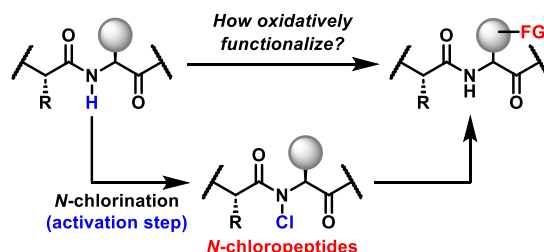


図1. N-クロロペプチド法の提案

ペプチド主鎖アミドでも円滑に進行するN-クロロ化条件の探索

筆者らはまず、N末端がフタロイル保護されたジペプチド1をモデル基質として、期待通りN-クロロ化が進行するか検討した(図2)。上述のように単純な基質で報告例のあった次亜塩素酸t-ブチルやトリクロロイソシアヌル酸(TCCA)を試したところ、TCCAを用いた場合のみ反応が進行するものの、反応性が十分でないためか低変換率に留まった。その後、市販されている様々な求電子的クロロ化剤を検討したが、いずれもTCCAを上回る結果は得られなかった一方で、触媒量のキヌクリジン(ABCN)を添加することで劇的に反応が加速されることが明らかとなった。本反応は0.1mol%の触媒量でも完結し、水系溶媒中でも問題無く進行した。なお、得られたN-クロロペプチドはシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製・単離でき、長期保存に耐える程に安定であることも判明した。

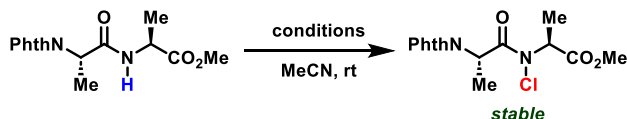
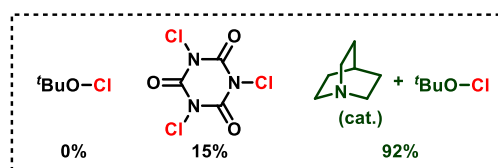


図2. ペプチド主鎖アミドに対するN-クロロ化条件の探索



デヒドロアミノ酸への変換法の実現と大環状ペプチドへの応用

上記の検討によって、*N*-クロロペプチドを簡便に調製できる反応条件を確立したので、*N*-クロロペプチドを経由する変換法についても検討した。*N*-クロロペプチドのX線結晶構造のCl-N-C-Hからなる二面角を見ると、178°と塩素原子と水素原子がほぼアンチペリプラナーの関係にあり、適切な塩基を作用させることでβ脱離と二重結合の異性化により円滑にデヒドロアミノ酸(ΔAA)構造へ変換できると期待した(図3a)。検討の結果、DABCOやABCOといった嵩の低い塩基を用いることで所望の反応が円滑に進行し、*N*-クロロ化段階とのワンポット合成にも成功した(図3b)。本プロトコルを様々なアミノ酸側鎖を有するジペプチドに適用したが、いずれも良好な収率で対応するΔAA含有ペプチドへ変換可能であった。特に*N*-クロロ化段階が酸化条件であるにもかかわらず、チロシンやトリプトファン残基に含まれる電子豊富な芳香環があっても問題無く反応が進行することは特筆に値する。

また、本法は疎水性大環状ペプチドの変換にも利用可能である。シクロスポリンAは11残基からなる大環状ペプチドであるが、水酸基を含む異常アミノ酸側鎖を除いて反応性官能基を含む側鎖は皆無である。それに対して、本法を用いることで立体的に比較的空いているAla残基周辺の主鎖アミドが選択的にクロロ化され、続く塩基の添加によりΔAA構造の導入に成功した(図3c)。本結果は反応の足掛かりとなる官能基が存在しない大環状ペプチドに対してΔAA構造を導入した初めての例であり、クロロペプチド法がドラッグライクな疎水性大環状ペプチドの変換に極めて有効な手法であることが実証された。

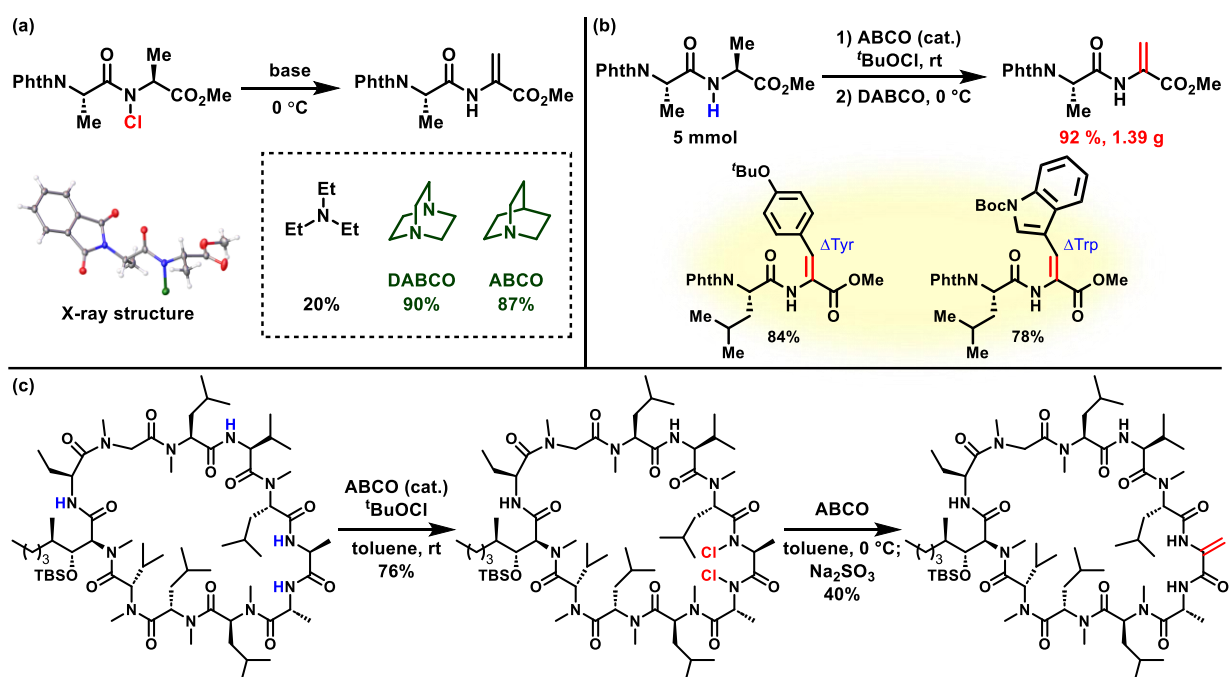


図3. *N*-クロロペプチドを経由するデヒドロアミノ酸構造導入法と大環状ペプチドへの応用

分子内1,5-HATを利用したペプチド側鎖C-H結合官能基化

つづいて、*N*-クロロペプチドを経由するペプチド側鎖のC(sp³)-H官能基化についても検討した(図4)。C(sp³)-H官能基化は多彩なペプチド側鎖に官能基を導入する上で最も魅力的なアプローチであり、最近では求電子的反応剤による水素原子移動(HAT)反応によるラジカル的C-H官能基化も盛んに研究されている。しかし、ペプチド側鎖中のC-H結合は立体的・電子的に分子間HAT反応に対する活性が低く、幅広い基質、ペプチド側鎖に利用できる手法はこれまで皆無であった。このような背景の下、筆者らは*N*-クロロペプチドからの分子内1,5-HAT反応を利用することで従来のラジカル法で低反応性であった第一級、第二級C-H結合を含む幅広いペプチド側鎖のC-H官能基化を位置特異的に行えると期待した。そのような着想に基づき、筆者らはまず、簡便に調製可能な*N*-クロロジペプチドをモデル基質として、1,5-HATを経由するC(sp³)-Hクロロ化条件を探索した(図4a)。はじめに、単純な加熱条件やBlue LED照射条件を検討したが、目的とするクロロ化体はほとんど得られなかった。一方で、単純な*N*-ハロアミドの反応で報告されていた銅触媒条件は概ね良好な結果を与え、特に触媒量のヨウ化銅と4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリンを用いた時に86%収率でクロロ化体が得られた。この際、原料の*N*-クロロジペプチドは30分以内に速やかに消失し、γ位の第一級C-H結合が位置特異的にクロロ化された。本法は幅広いオリゴペプチドに適用可能であり、既存法では合成困難な側鎖クロロ化ペプチドを簡便に得ることが可能である。

最後に合成した側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化についても検討した(図4b)。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を得ることに成功した。特筆すべき点として、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結合は一切反応せず、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いる有用な部分構造であり、今後さらなる応用利用が期待される。

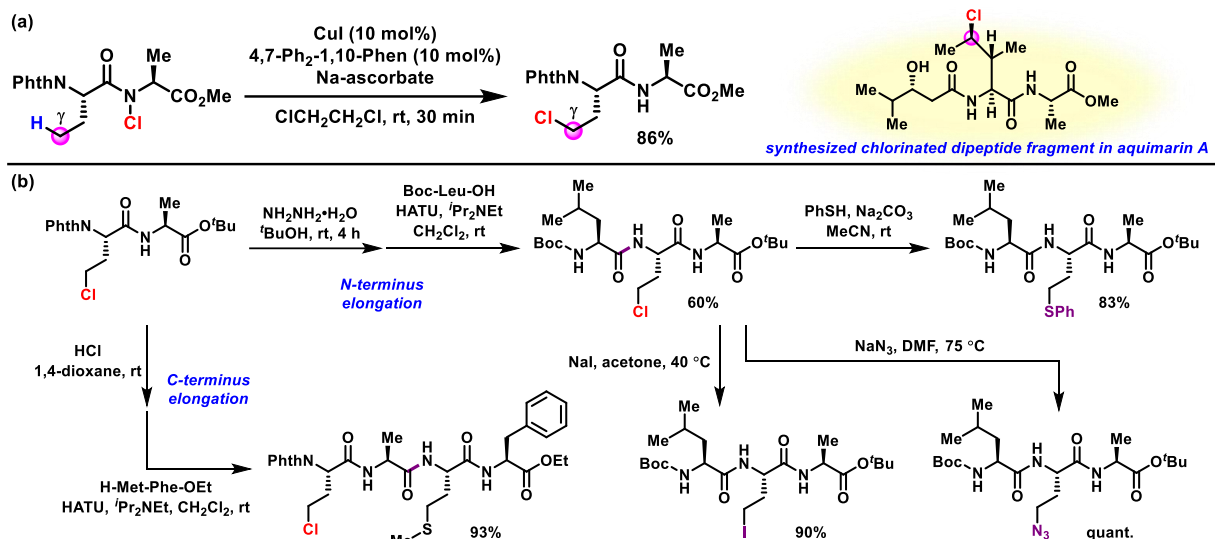


図4. 銅/フェナントリン触媒系を用いた γ / δ 位選択的C-Hクロロ化および側鎖クロロ化ペプチドの変換

まとめ・今後の展望

今回、筆者らは構築済みのペプチド鎖の化学修飾に利用できる*N*-クロロペプチド法を新たに提案し、その基盤技術となるペプチドの触媒的*N*-クロロ化反応条件を確立した。また、簡便に調製できるようになった*N*-クロロペプチドを足掛かりとした特異構造の導入も種々検討し、既存法では合成困難な非天然型ペプチド構造を実際に合成することで本法の有用性を実証した¹⁻³。本成果はあくまで*N*-クロロペプチドの利用法の一例を示したに過ぎないが、ペプチドの*N*-ハロゲン化が合成化学上有効な手段であることは十分に示されたと筆者らは考えている。また、*N*-クロロペプチドの更なる合成化学的利用法の探索や*N*-クロロ化の位置選択性制御、さらには*N*-クロロ化がペプチドの代謝安定性、膜透過性に及ぼす影響についても現在検討を進めており、今後*N*-ハロペプチドのさらなる応用可能性を模索していく予定である。

発表論文

1. 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**, *28*, e202201120.
2. Nanjo, T.; Sada, H.; Nagaya, T.; Maruo, Y.; Takemoto Y. Rhodium-Catalyzed C-H Alkylation for the Stereoselective Synthesis of β,β -Disubstituted Dehydroamino-Acid Motifs. *Asian. J. Org. Chem.* **2023**, e202300227.
3. Nanjo, T.; Matsumoto, A.; Oshita, T.; Takemoto Y. Synthesis of Chlorinated Oligopeptides via γ - and δ -Selective Hydrogen Atom Transfer Enabled by the *N*-Chloropeptide Strategy. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 19067-19075.

参考文献

4. deGruyter, J. N.; Malins, L. R.; Baran, P. S. Residue-Specific Peptide Modification: A Chemist's Guide. *Biochemistry* **2017**, *56*, 3863-3873.
5. Tanada, M.; Iikura, H.; Shiraiishi, T. *et al.* Development of Orally Bioavailable Peptides Targeting an Intracellular Protein: From a Hit to a Clinical KRAS Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 16610-16620.
6. Ohta, A.; Iikura, H. *et al.* Validation of a New Methodology to Create Oral Drugs beyond the Rule of 5 for Intracellular Tough Targets. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 24035-24051.
7. Jones, R. C. F.; Choudhury, A. K.; Dawson, C. E.; Lumley, C.; McKee, V. Dehydrogenation-Halogenation of a 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[4,3-*c*]pyridin-4-one to Provide a Scaffold for Acylpyridones. *ARKIVOC*, **2012**, *7*, 12-24.
8. De Luca, L.; Giacomelli, G.; Nieddu, G. A Simple Protocol for Efficient *N*-Chlorination of Amides and Carbamates. *Synlett* **2005**, 223-226.