(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4358307号
(P4358307)

(45)発行日　平成21年11月4日(2009.11.4)　(24)登録日　平成21年8月14日(2009.8.14)

(51)Int.Cl.		F I	
C07K 1/02	(2006.01)	C07K	1/02
C07K 1/04	(2006.01)	C07K	1/04
C07K 2/00	(2006.01)	C07K	2/00
C07K 1/10	(2006.01)	C07K	1/10
C07K 1/107	(2006.01)	C07K	1/107

請求項の数 8　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願平10-528717
(86)(22)出願日　平成8年12月24日(1996.12.24)
(65)公表番号　特表2001-507027(P2001-507027A)
(43)公表日　平成13年5月29日(2001.5.29)
(86)国際出願番号　PCT/US1996/020610
(87)国際公開番号　WO1998/028434
(87)国際公開日　平成10年7月2日(1998.7.2)
審査請求日　平成15年12月19日(2003.12.19)

(73)特許権者
ザ　スクリップス　リサーチ　インスティテュート
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９２０３７　ラ　ジョラ　ノース　トーリー　パインス　ロード　１０５５０
(74)代理人
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人
弁理士　有原　幸一
(74)代理人
弁理士　松島　鉄男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】一般的化学結合

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
第一のオリゴペプチドと第二のオリゴペプチドとを末端と末端で結合し、オリゴペプチド生成物を製造する方法であって、
工程Ａ：第一及び第二のオリゴペプチドを、触媒性チオールを含む反応溶液中で混合する工程であって、第一のオリゴペプチドはＣ末端チオエステルを有するＣ末端残基を含み、第二のオリゴペプチドは非酸化スルフヒドリル部分を有するＮ末端補助官能基を有するＮ末端残基を含み、前記Ｎ末端残基がグリシンでもシステインでもなく、前記Ｃ末端残基はグリシンである工程、
工程Ｂ：Ｎ末端補助官能基の非酸化スルフヒドリル部分とＣ末端チオエステルとを縮合し、第一及び第二のオリゴペプチドがアミノチオエステル結合で結合している中間体オリゴペプチドを製造する工程、及び、
工程Ｃ：工程Ｂの中間体オリゴペプチドのアミノチオエステル結合を転位し、第一及び第二のオリゴペプチドがＮ結合補助官能基を有するアミド結合で結合しているオリゴペプチド生成物を製造する工程、
を含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
触媒性チオールが、ベンジルメルカプタン及びチオフェノールからなる群より選ばれる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

Ｎ末端補助官能基がＮ－α－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＳＨ（式中、１≦ｎ≦３である）である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
追加の工程である、
工程Ｄ：Ｎ末端補助官能基を、工程Ｃのオリゴペプチド生成物から、還元剤を用いて除去し、天然ペプチド結合を生成する工程、
を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
Ｎ末端補助官能基がＮ－α－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＳＨ（式中、１≦ｎ≦２である）である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
還元剤が亜鉛である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
Ｃ末端チオエステルを含む第一のオリゴペプチドセグメント、
非酸化スルフヒドリル部分を有するＮ末端補助官能基を含む第二のオリゴペプチドセグメント、及び、
Ｃ末端チオエステルと補助官能基の非酸化スルフヒドリル基とを結合するアミノチオエステル結合、
を含むオリゴペプチド中間体であって、アミノチオエステル結合単位が自発的に分子内転位して、該第一及び第二のオリゴペプチドセグメントを末端と末端で結合するアミド結合を形成し、第二のオリゴペプチドセグメントのＮ末端残基がグリシンでもシステインでもなく、第一のオリゴペプチドセグメントのＣ末端残基がグリシンである中間体。
【請求項８】
以下の式：
（ａａ$_1$－ＣＯ）－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｘ－（Ｎ－ａａ$_2$）
（式中、ａａ$_1$－ＣＯはカルボニル基を有する第一のアミノ酸を表し、Ｎ－ａａ$_2$はアミノ基を有する第二のアミノ酸を表し、Ｘは酸素及びメチレンからなる群より選ばれ、１≦ｎ≦２であり、Ｎ－ａａ$_2$がグリシンでもシステインでもなく、ａａ$_1$－ＣＯはグリシンである。）
で示される結合単位を有する中間体オリゴペプチドであって、
第一及び第二のオリゴペプチドを、触媒性チオールを含む反応溶液中で混合する工程であって、第一のオリゴペプチドはＣ末端チオエステルを有するＣ末端残基である、ａａ$_1$－ＣＯＳＲ（式中、Ｒは３－カルボキシ、４－ニトロフェニル及びベンジルからなる群より選ばれる）を含み、第二のオリゴペプチドは非酸化スルフヒドリル部分を有するＮ末端補助官能基を有するＮ末端残基である、ａａ$_2$－Ｎ－α－Ｘ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＳＨ（式中、Ｘは酸素及びメチレンからなる群より選ばれ、１≦ｎ≦２である）を含み、前記Ｎ末端残基がグリシンでもシステインでもなく、前記Ｃ末端残基はグリシンである工程、及び、
Ｎ末端補助官能基の非酸化スルフヒドリル部分とＣ末端チオエステルとを縮合し、第一及び第二のオリゴペプチドがアミノチオエステル結合で結合している上記式で示される結合単位を有する中間体オリゴペプチドを製造する工程、
を含む方法により製造される、中間体オリゴペプチド。
【発明の詳細な説明】
発明の属する技術分野
本発明は、オリゴペプチドを化学的に結合する方法に関する。より詳細には本発明は、ペプチド結合を使用してオリゴペプチドの末端と末端を化学的に結合する方法に関する。
政府の権利
本発明は、アメリカ国立衛生研究所より与えられた助成番号Ｒ０１　ＧＭ　４８８９７及びＰ０１　ＧＭ　４８８７０の下、政府の支援を受けてなされた。アメリカ合衆国政府は本発明について一定の権利を有する。
背景技術

従来の段階的固相方法論によるペプチド合成は、長いペプチドを合成するとき、低収率により制限される（Merrifield et al. J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149-2154; Kent et al. Ann. Rev. Biochem. 1988, 57, 957-989）。この制限を克服するために、化学結合により小さい合成ペプチドを別のペプチドへ結合して、長いペプチドを製造するだろう。ペプチドの化学的結合法は
Schnölzer
らにより開示されている

(Schnölzer et al., Science 1992, 256, 221-225; Rose et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 30-34; Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 6584-6588)。

Schonolzerにより開示された方法論は、非保護ペプチドセグメントの化学選択的反応により、結合部位に非天然バックボーン構造を有する生成物を与えることに関するものである。この方法論は、標準的ペプチド合成法により得られるものよりもサイズの大きいペプチドの合成を可能にする（Canne et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 2998-3007; Baca et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 1881-1887; Williams et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 10797-10798）。更にこの方法論は、異常な構造及びトポロジーを有するペプチドの合成を可能にする（Dawson et al. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 7263-7266; Rose et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 30-34; Muir et al. Biochemistry 1994, 33, 7701-7708; Canne et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 2998-3007）。従来の段階的固相ペプチド合成と化学結合とを組み合わせた使用は、化学者が６０アミノ酸残基までの非保護ペプチドを良好な収率及び純度で日常的に製造することを可能にする
(Schnölzer et al. Int. J. Pept. Protein Res. 1992, 40, 180-193)。

これら２つの方法論の組み合わせを使用して、タンパク質の全化学合成が達成されるかもしれない。

天然のバックボーン構造を有するタンパク質製造のための別の化学結合技術が報告されている（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。この様式の化学結合は「天然結合（native ligation）」と名づけられている。この技術においては、Ｃ末端α－チオエステルを有する非保護合成ペプチドを、化学選択的態様で、Ｎ末端Ｃｙｓ残基を含む非保護ペプチドと反応させる。チオール交換反応は初期のチオエステル結合中間体を与え、これは自発的に転位（rearrange）し、２つのペプチドセグメントが結合している結合部位において天然のアミド結合を与え、この過程においてＣｙｓ側鎖チオールを再生する。この天然結合の変形は、アミノ酸の反応についてWielandにより最初に記載された化学反応を使用する（Wieland et al. Liebigs Ann. Chem. 1953, 583, 129-149）。最初に記載されているように、ネイティブ結合は、Ｘ－Ｃｙｓ結合におけるペプチドセグメントの結合に制限される（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。

必要とされるのは、Ｃ末端α－チオエステルペプチドセグメントをＮ末端アミノ酸ペプチドセグメントに結合する一般的方法であって、Ｎ末端アミノ酸ペプチドセグメントがＮ末端システインを有することを必要としない方法である。

発明の要約

本発明は、非保護オリゴペプチドを化学的に結合し、全てのペプチド結合を有する生成物を形成する方法に向けられる。第一工程において、２つのオリゴペプチドを結合し、アミノチオエステル結合を有する結合生成物を形成する。第二工程において、アミノチオエステル結合を転位し、Ｎ置換アミド結合を有する生成物を形成する。任意の第三工程において、アミド結合上の置換基を、酸性媒体中Ｚｎを用いた容易な処理により取り除き、結合部位に天然のペプチド結合を与える。

本発明の方法は、２つの出発オリゴペプチド、すなわち第一の出発オリゴペプチド及び第二の出発オリゴペプチドを使用する。第一のオリゴペプチドはチオエステル部分を有する

Ｃ末端補助基（auxiliary group）を有している。すなわち、[ペプチド$_1$]$^{\alpha}$ＣＯＳＲ（式中、Ｒは３－カルボキシ、４－ニトロフェニル及びベンジルからなる群より選ばれる。）である。第二のオリゴペプチドは非酸化スルフヒドリル部分を有する補助官能基（auxiliary functional group）を有する。すなわち、ＨＳＣＨ$_2$ＣＨ$_2$（Ｏ）－Ｎ$^{\alpha}$[ペプチド$_2$]である。第一及び第二の出発オリゴペプチドを、チオエステル交換を促進する条件下で混合したとき、両ペプチドは互いに縮合し中間体オリゴペプチド生成物を形成する。ここで、第一及び第二のオリゴペプチドはアミノチオエステル結合を介して結合している。アミノチオエステル結合は分子内で自発的に転位し、Ｎ置換アミド結合により結合している結合生成物を形成する。分子内転位の間、Ｎ末端補助官能基のアミノ基はチオエステルを攻撃し、置換スルフヒドリル部分を含む結合したＮ結合補助官能基を有するアミド基を形成する。置換スルフヒドリル部分を含むＮ結合補助官能基を、化学的手段により適宜取り除き、全ての天然ペプチド結合を有する生成物を形成してもよい。

本発明の１つの態様は、オリゴペプチド生成物を製造するために第一のオリゴペプチドと第二のオリゴペプチドとを末端と末端で結合する方法に向けられる。より詳細には、本発明の方法は２つの工程及び任意の第三工程を含んでいる。

第一工程は、第一及び第二のオリゴペプチドがδ又はγアミノチオエステル結合で結合している中間体オリゴペプチドを製造するために、第一のペプチドのＣ末端チオエステルと第二のオリゴペプチドの非酸化スルフヒドリル部分とを縮合させることを含んでいる。第一のオリゴペプチドはＣ末端残基上にＣ末端チオエステルを含み、第二のオリゴペプチドは非酸化スルフヒドリル部分を有するＮ末端残基上にＮ末端補助官能基を含んでいる。第一のオリゴペプチドのＣ末端残基が非グリシンである場合、第二のオリゴペプチドのＮ末端残基はグリシンである。第二のオリゴペプチド上のＮ末端残基が非グリシンである場合、第一のオリゴペプチド上のＣ末端残基はグリシンである。但し、非グリシン残基は、非β分岐アミノ酸である。

第二工程により、中間体オリゴペプチドのδ又はγ－アミノチオエステル結合が、δ又はγ－アミノ基のチオエステル部分への分子内攻撃により、転位し、チオエステル部分由来の副生物としてスルフヒドリル部分を置換する。これにより、第一及び第二のオリゴペプチドがアミド結合で結合しているオリゴペプチド生成物を製造する。アミド結合の窒素は、置換スルフヒドリル部分を有する補助官能基を含んでいる。

任意の第三工程は、天然ペプチド結合を生成するための、還元剤を用いた、アミド窒素上の補助官能基のオリゴペプチド生成物からの除去を含んでいる。アミド窒素補助官能基は、Ｎ－α－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＳＨ（式中、１≦ｎ≦２である。）である。還元剤は亜鉛（下線の窒素は結合アミド窒素を表す。）である。

本発明の別の態様には、Ｃ末端チオエステルを含む第一のオリゴペプチドセグメント、非酸化スルフヒドリル部分を有するＮ末端補助官能基を含む第二のオリゴペプチドセグメント、並びに、Ｃ末端チオエステル及び補助官能基のスルフヒドリル基を結合するアミノチオエステル結合単位を含むオリゴペプチド中間体が含まれる。

【図面の簡単な説明】

図１は、非保護ペプチドセグメント（式中、Ｒはβ分岐アミノ酸残基である。ただし、第一のオリゴペプチド上のＣ末端残基が非グリシンである場合、第二のオリゴペプチド上のＮ末端残基はグリシンであり、第二のオリゴペプチド上のＮ末端残基が非グリシンである場合、第一のオリゴペプチド上のＣ末端残基はグリシンである。）の一般化天然化学結合を示している。Ｒ’は、３－カルボキシ、４－ニトロフェニル及びベンジルからなる群より選ばれる。

図２は、Ｎ$^{\alpha}$（置換）ペプチドセグメント２ａ及び２ｂの化学合成を示す。

図３は、化合物８ｂの化学合成を示す。

図４は、実施例＃１～５についてのモデル結合の要約に関する表を示す。上付き文字は以下に示す通りである。（ａ）チオエステルペプチド（式中、－ＳＮＢ＝３－カルボキシ－４－ニトロフェニルチオエステル、－Ｓｂｚｌ＝ベンジルチオエステルである）。（ｂ）Ｎ$^{\alpha}$（置換）ペプチド（式中、ｅｔｓｈ＝Ｎ$^{\alpha}$（エタンチオール）、ｏｅｔｓｈ＝Ｎ$^{\alpha}$（

オキシエタンチオール）である）。（ｃ）ペプチド２を基礎とする。分析用逆相ＨＰＬＣ（ピーク領域）及びＥＳＭＳより推定。（ｄ）ｐＨ７．５で示された時間経過後、ｐＨ４．５に調節。

図５Ａ～５Ｃは、モデル結合を示している。実施例＃２（後述）。アミド－Ｇｌｙ（Ｎ$^{\alpha}$－OCH_2CH_2SH）Ｇｌｙ－化合物４ｂを、６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ Na_2HPO_4、ｐＨ７．５で形成。（Ａ）～（Ｃ）は以下の通り、ＨＰＬＣプロットを示す。（Ａ）ｔ＝０における分析用ＨＰＬＣ（１０～５０％Ｂで３０分間）、ピークａ、チオエステルペプチド、１、ＬＹＲＡＧ－$^{\alpha}COSC_6H_3$（３－CO_2H－４－NO_2）。ピークｂ、Ｎ$^{\alpha}$（オキシエタンチオール）ペプチド、２ｂ、[$HSCH_2CH_2O$]－ＧＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CONH_2$。（Ｂ）ｔ＝１時間における分析用ＨＰＬＣ（１０～５０％Ｂで３０分間）、ピークｃ、非ペプチド不純物、ピークｄ、ＬＹＲＡＧ－$^{\alpha}COSC_6H_5$、チオフェノールを用いて１のトランスチオエステル化による。ピークｅ、中間体結合生成物、４ｂ、ＬＹＲＡＧＧ（Ｎ$^{\alpha}$－OCH_2CH_2SH）ＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CONH_2$及び少量の未反応[$HSCH_2CH_2O$]－ＧＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CONH_2$（２ｂ）、エレクトロスプレーイオン化ＭＳにより測定。（Ｃ）ＨＰＬＣ－精製及び酸性ＨＰＬＣ溶媒中でのＺｎを用いた一晩の処理後のピークｅの分析用ＨＰＬＣ（１５～４０％Ｂで３０分間）、ピークｆ、最終結合生成物、５ｂ、ＬＹＲＡＧＧＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CHNH_2$、ピークｇ、非ペプチド不純物。

図６Ａ～６Ｃは、モデル結合を示している。実施例＃３（後述）。－Ｐｈｅ（Ｎ$^{\alpha}$－OCH_2CH_2SH）Ｇｌｙ－結合生成物４ｂ。結合及び転位は３７℃で行った。（Ａ）～（Ｃ）は以下の通り、ＨＰＬＣプロットを示す。（Ａ）６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ Na_2HPO_4、ｐＨ７．５中で１１．５時間後における分析用ＨＰＬＣ（２０～４０％Ｂで３０分間）、ピークａ、Ｎ$^{\alpha}$（オキシエタンチオール）ペプチド、２ｂ、[$HSCH_2CH_2O$]－ＧＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CONH_2$、ピークｂ、非転位中間体結合生成物、４ｂ、ＬＹＲＡＦＧ（Ｎ$^{\alpha}$－OCH_2CH_2SH）ＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CONH_2$、ピークｄ、チオエステルペプチド、１、ＬＹＲＡＦ－$^{\alpha}COSCH_2C^6H_5$。（Ｂ）６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ $NaCH_3CO_2$、ｐＨ４．５中で１１．５時間後における分析用ＨＰＬＣ（０～６７％Ｂで３０分間）。（Ｃ）酸性ＨＰＬＣ溶媒中でのＺｎを用いた一晩の処理後のＨＰＬＣ精製ピークｃの分析用ＨＰＬＣ（２０～４０％Ｂで３０分間）、ピークｆ、最終結合生成物、５ｂ、ＬＹＲＡＦＧＲＮＴＡＴＩＭＭＱＲＧＮＦＲ－$^{\alpha}CONH_2$。

発明の詳細な説明

本発明は、２つの別のペプチド断片を化学的に結合するための２工程からなる方法に向けられる。より詳細には、本発明は、非保護ペプチドセグメントを天然（アミド形成）化学結合し、天然ペプチド結合を精製するための一般的方法論に関する

第一工程は、第一のペプチドのＣ末端チオエステルと、第二のオリゴペプチドの非酸化スルフヒドリル部分とを縮合し、第一のオリゴペプチドと第二のオリゴペプチドがδ－又はγ－アミノチオエステル結合で結合している中間体オリゴペプチドを生成することを含んでいる。第一のオリゴペプチド上のＣ末端残基が非グリシンである場合、第二のオリゴペプチド上のＮ末端残基はグリシンである。第二のオリゴペプチド上のＮ末端残基が非グリシンである場合、第一のオリゴペプチド上のＣ末端残基はグリシンである。ただし、非グリシン残基は非β分岐アミノ酸である。

第二工程は、δ又はγ－アミノ基のチオエステル部分への分子内攻撃による中間体オリゴペプチドのδ又はγ－アミノチオエステル結合の転位、これによる、チオエステル部分に由来する副生物としてのスルフヒドリル部分の置換、及び、第一のオリゴペプチド及び第ニのオリゴペプチドが天然アミド結合で結合しているオリゴペプチド生成物の生成を含んでいる。しかしながら、アミド結合上の窒素は置換スルフヒドリル部分を有する補助官能基を含んでいる。

任意の第三工程は、還元剤を用いてアミド窒素上の補助官能基を、オリゴペプチド生成物から除去し、天然ペプチド結合を生成することを含んでいる。アミド窒素補助官能基は、

Ｎ－α－Ｏ－（CH_2）Ｎ－ＳＨ（式中、１≦ｎ≦２である）であり、還元剤は亜鉛である（下線を引いた窒素は結合したアミド窒素を表す）。）である。
本発明の方法は、天然又は修飾されたバックボーン構造のいずれかを有するペプチド及びタンパク質の合成を許容する。図１は手順を要約している。ペプチドα－カルボキシチオエステル（１）を、チオール交換を経て、N^{α}（エタンチオール）ペプチド（２ａ）又はN_{α}（オキシエタンチオール）ペプチド（２ｂ）のいずれかと反応させ、結合生成物３を生成する。このチオエステル結合中間体は、５又は６員環を含む有利な幾何転位を経て転位し、４ａにおいては二級アミドを含むアミド結合生成物４又は４ｂにおいては類似体Ｎ－オキシアルキル化合物を含むアミド結合生成物４を与える。得られたＮ－$^{\alpha}$（置換）アミドも有利な溶解特性を潜在的に有している（Quibell et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 11656-11668）。得られたＮ－$^{\alpha}$（Ｏ－アルキル）アミド結合生成物は、更に、ＨＦ切断条件に対し安定であるという利点を有し、穏やかな条件下で簡単に除去される。４ｂの場合、亜鉛粉末を酸性溶離剤中の逆相ＨＰＬＣ精製ペプチドへ直接添加し、Ｏ－アルコキシヒドロキサメートのＮ－Ｏ結合を還元し、結合生成物５ｂの天然バックボーン構造を得ることができる。
すべてのペプチドセグメントは、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）化学についての原位置中和／２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）活性化プロトコルを使用した確立された固相法により、段階的に合成し、分離用逆相ＨＰＬＣにより精製し、エレクトロスプレーマススペクトロメトリー（ＥＳＭＳ）により特徴付けた
(Schnölzer et al. Int. J. Pept. Protein Res. 1992, 40, 180-193)。

ペプチド－α－チオエステル（１）は、対応のペプチド－α－チオ酸より生成し、次に、Canne et al. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 1217-1220に記載されているようにしてチオエステル樹脂上で合成した。ペプチド－α－チオ酸を、６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ　酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０～６．５中、１．５当量の５，５’－ジチオ－ビス（２－ニトロ安息香酸）との反応により対応の３－カルボキシ－４－ニトロフェニルチオエステルに転換するか、又は、６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ　酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０中、１０当量の臭化ベンジルを使用して対応のベンジルエステルに転換した（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。両方のチオエステルは、３－カルボキシ－４－ニトロフェニルチオエステルを有する結合反応用の十分な脱離基を提供する。これは、対応のベンジルチオエステルよりもやや速い反応速度を示す（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。
N^{α}（エタンチオール）（２ａ）及びN^{α}（オキシエタンチオール）（２ｂ）の合成を図２に示す。適切なα－ブロモカルボン酸（対称性無水物として活性化（ジクロロメタン中の０．５当量の１，３－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ））（Robey et al. Anal. Biochem. 1989, 177, 373-377）を、ペプチド－樹脂６の脱保護Ｎ－末端アミノ酸と結合し、ブロモアシル－ペプチド－樹脂７を得た。臭化物を、ＤＭＳＯ中の８ａ又は８ｂのアミン基により、立体化学転換的に置換し、ペプチド－樹脂９を得た。無水ＨＦ中における脱保護及び樹脂からの切断により、２ｂを直接得るか、又は、２ａをジスルフィド形態で得、これを遊離のチオールへ還元する。
アミノエタンチオール誘導体８ａは、水中の８０％アセトニトリル中、２－アミノエタンチオール及び５，５’－ジチオ－ビス（２－ニトロ安息香酸）の反応より、１工程で合成した。アミノオキシエタンチオール誘導体８ｂの合成も含まれ、これを図３に示す。臭化物１１を、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド（１０）と大過剰量の１，２－ジブロモエタンとの反応より生成した（Bauer J. Org. Chem. 1963, 28, 1604-1608）。臭化物１１を、塩基１，８－ジアザビシクロ[５．４．０]ウンデカ－７－エン（ＤＢＵ）の存在下で４－メチルベンジルメルカプタンを用いて保護アミノオキシエタンチオール誘導体１２に転換した。１２のフタルイミド基を２工程方法で除去した（Osby et al. Tetrahedron Lett. 1984, 25, 2093-2096）。この方法には$NaBH_4$を用いた還元、続く酢酸を用いた処理によ

る所望のアミノオキシエタンチオール誘導体８ｂを得る工程が含まれる。
Ｘ－Ｃｙｓ部位におけるオリジナルの天然化学結合と比較して（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）、本発明の結合化学のもっとも注目すべき特徴は、最初のチオエステル結合生成物の遅い転位である。この例における６員環中間体を経たα－ＮＨ（Ｏ－アルキル）基による分子内攻撃は、Ｘ－Ｃｙｓ結合における非置換α－NH_2の容易な５員環媒介攻撃（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）よりもかなり好まれにくい（Mandolini et al. J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 550-554）。Ｇｌｙ－Ｇｌｙ結合を除いて、ゆっくりと転位させたのみである本発明のチオエステル－結合初期結合生成物を単離することができる（図４）。注目すべきことに、両方の結合部位上のＣ$^{\alpha}$置換アミノ酸について、アミド結合への転位は見ることができない。すなわち、チオエステル結合中間体は、反応条件下では無制限に安定であった。これらの遅い転位は、既報の（Ｎ置換）アミド形成結合化学において見られたものと類似している（Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 6584-6588）。
本発明における、アミド形成性結合における一時的補助官能基の使用は、Kempにより提案された「チオールキャプチャー」戦略（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）の回想である。天然化学結合及びチオールキャプチャー法は、定められたゴールとして、長鎖ポリペプチド鎖の合成を達成するための、セグメント縮合戦略における非保護ペプチドの使用を有している。天然化学結合アプローチの鍵は、初期チオエステル結合中間体生成物のチオール部分交換を促進する条件下での、両セグメントにその他のＣｙｓ残基の存在していてもＮ末端Ｃｙｓにおける位置選択的結合を与える反応である（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。対照的に、「チオールキャプチャー」戦略及び関連する方法（Liu et al. Tetrahedron Lett. 1996, 37, 933-936）においては、結合反応前のＣｙｓ側鎖官能基の位置特異的保護が必要である（Kemp et al. Peptides: Proceedings of the 11th American Peptide Symposium Rivier, J.E.; Marshall, G.R., Eds, ESCOM: Lieden, 1990; pp 920-922）。したがって、これの元の意図を妨げる。
同様に、本発明における、カルボニル活性化α－チオカルボキシル基（すなわちα－ＣＯＳＲ）の使用は、ペプチドセグメント縮合に使用する従来の化学（Blake et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78, 4055-4058; Yamashiro et al. Int. J. Pept. Protein Res. 1988, 31, 322-334; Hojo et al. Peptide Chemistry Okada, Y., Ed, Protein Research Foundation: Osaka, 1994; pp 9-12）の回想である。しかしながら、これらの合成法は、Ａｇ$^{+}$活性化ペプチド－$^{\alpha}$ＣＯＳＲ上の第二のセグメントのαアミン求核原子による慣習的非化学選択的攻撃に基づいている。したがって、両セグメントにおけるすべての他のα－及びε－アミン官能基の位置特異的（再）保護を必要とする。
対照的に、チオエステル媒介アミド形成結合化学は、チオールを含む天然に見出されるすべての側鎖官能基を有するまったく保護されていないペプチドセグメントの使用と適合する（Baca et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 1881-1887; Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。この理由により、天然化学結合は、簡単、実用的であり、タンパク質が適当な結合部位を含んでいるならばそのタンパク質の全化学合成に対する一般的アプローチになる。
本発明は、結合部位として使用可能なジペプチド配列の数を拡張することにより、Dawsonら（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）により報告されている天然化学結合法の有用性を増大させる。その方法論のＸ－Ｃｙｓ結合部位に加えて、本明細書には、Ｘ－Ｇｌｙ及びＧｌｙ－Ｘ結合部位（すなわち、Ｎ末端残基が非グリシンである場合のＣ末端残基のグリシン、Ｃ末端残基が非グリシンである場合のＮ末端残基のグリシン）をどのように使用するか開示している。好ましい態様において、Ｘはすべての非β分岐アミノ酸である。しかしながら、本発明者らの過去の研究は、Ｘは、β分岐アミノ酸例えばＶａｌを含むすべてのアミノ酸であることができることを示した（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。
本発明は、潜在的に、３つだけの天然化学結合に適切な部位の数を、タンパク質に見出さ

れる４００のジペプチド配列のなかの５０より多くへ拡張する。グリシン残基を含む標的配列における結合部位の選択においてかなりの許容度があるので、この拡張された適用性は、ほとんどのポリペプチドを天然化学結合により利用しやすくする。
オリジナルの形態（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）又は本明細書に記載される形態の天然化学結合は、典型的な大きさのタンパク質ドメインのポリペプチド側鎖への直接合成アクセスを提供する。その他の結合化学

(Schnölzer et al. Science 1992, 256, 221-225; Rose et al. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 30-34; Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 6584-6588)

を使用して、モジュール様式で合成ドメインを結合し、大きな（すなわち＞２０キロダルトン）、完全機能性合成タンパク質を製造することができる（Canne et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 2998-3007; Baca et al. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 1881-1887）。すべての適切な化学反応を組み込むほぼ一般的な形態（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）において、化学結合アプローチは、ポリペプチドの化学合成法の進化において次世代に相当し、再生可能、かつ実用的なタンパク質の全化学合成を提供する。

結合例１～４

結合例の結果を図４に要約する。全ての結合は、８M尿素、０．１MNa_2HPO_4、pH７．０又は６Mグアニジン・HCl、０．１MNa_2HPO_4、pH７．５中、各ペプチド４mg／ml～８mg／mlの濃度範囲で行った。ペプチドセグメントの（solvation）直後、２～５％ベンジルメルカプタン（結合例＃１）又はチオフェノール（結合例＃２～５），容量の結合用緩衝液を添加し、チオール基を還元形態に維持した。これは、もとのペプチドーαチオエステル（１）の有意量をペプチドーαチオベンジルエステル又はペプチドーαチオフェニルエステル（共に、所望の態様でペプチド２と反応する能力を有している）へ交換する追加の重要性を有していた。結合反応に続いて、分析用逆相HPLCを行い、生成物をESMSにより同定した。以下に示す実施例において、結合に関連するアミノ酸残基に下線を引いた。

実施例１

ペプチド-αチオ（３－カルボキシ－４－ニトロ）フェニルエステル１は、配列LYRAG-αCOSC_6H_3（3-CO_2H-4-NO_2）（配列番号１）（実測質量７６０Da、計算値７６０Da）を有していた。５－チオ-２－（ニトロ安息香酸）ジスルフィドとして保護されているNα（エタンチオール）ペプチド２aは、配列[（3-CO_2H-4-NO_2）-C_6H_3-S-SCH_2CH_2]-GAGPAGD-α$CONH_2$（配列番号２）（実測質量８００Da、計算値８００Da）（この配列は結合混合物中で[$HSCH_2CH_2$]-GAGPAGD-α$CONH_2$（配列番号２）（実測質量６０３Da、計算値６０３Da）に還元される）を有していた。１時間後、結合生成物４a[LYRAGG（Nα-CH_2CH_2SH）AGPAGD-α$CONH_2$（配列番号３）（実測質量１１６３±１Da、計算値１１６３Da）]が有意な程度生成した。逆相HPLCによる結合生成物の精製後、５，５’－ジチオービス（２－ニトロ安息香酸）と６M尿素、０．１Mリン酸塩、pH６．０中で１時間処理し予想される－S－ニトロ安息香酸ジスルフィド生成物、LYRAGG[Nα-CH_2CH_2S-SC_6H_3（3-CO_2H-4-NO_2）]AGPAGD-α$CONH_2$（配列番号３）（実測質量１３６０±１Da、計算値１３６０Da）を得た。これにより３aの転位により４aが形成することを確認した。なぜなら、３aは５，５’－ジチオービス（２－ニトロ安息香酸）に対して不活性であるからである。結果を図４に要約する。

実施例２

図５Ａ～５Ｃは結合例＃２の過程を示している。ペプチドーαチオエステルセグメント１（ピークａ）は、配列LYRAG-α$COSC_6H_3$（3-CO_2H,4-NO_2）（配列番号１）（実測質量７６０Da、計算値７６０Da）を有していた。Nα（オキシエタンチオール）ペプチド２b（ピークb）は、配列[$HSCH_2CH_2O$]-GRNTATIMMQRGNFR-α$CONH_2$（配列番号４）（実測質量１８２７±１Da、計算値1828Da）から構成されていた。添加したチオフェノールの存在

下、室温で１時間の反応後、結合生成物LYRAGG（N-OCH_2CH_2SH）RNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（配列番号５）（４ｂ、実測質量２３８８±１Ｄａ、計算値２３８９Ｄａ）が有意な程度生成し、これは未反応のＮ$^{\alpha}$（オキシエタンチオール）ペプチド２ｂ（ピークｅ）と共に共溶出した。更に一晩、室温下で反応させた後、結合生成物をＨＰＬＣにより精製し、亜鉛粉末をＨＰＬＣ溶離剤中に集めたペプチドへ直接添加し、室温下で一晩攪拌した。これらの条件下、亜鉛はＮ－Ｏ結合を効率的に還元した。このタイプの還元は、種種の試薬により可能である（Kecketal.TetrahedronLett.1995,36,7419-7922）。得られたペプチド（ピークｆ）はＮ－Ｏ結合の還元により生成したLYRAGGRNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（配列番号５）（５ｂ、実測質量２３１３±１Ｄａ、計算値２３１３Ｄａ）と一致した質量を与えた。これにより、図１に示すように３ｂから４ｂへの転位を確認した。なぜなら、未転位３ｂにおけるＮ－Ｏ結合の切断は有意に低い質量の２つの異なるペプチドの形成を引き起こすからである。

実施例３

図６Ａ～６Ｃは結合例＃３の過程を示している。ペプチド－$^{\alpha}$チオエステルセグメント１（ピークｄ）は、Ｃ末端フェニルアラニンチオエステル[LYRAF-$^{\alpha}COSCH_2C_6H_5$（配列番号６）（実測質量７７５Ｄａ、計算値７７５Ｄａ）]を有するペプチドから構成されていた。したがって、前記の場合（結合例＃１及び＃２）（Ｃ末端グリシンチオエステルを含む）よりも立体障害を提供する。Ｎ$^{\alpha}$（オキシエタンチオール）ペプチド２ｂ（ピークａ）は、[$HSCH_2CH_2O$]-GRNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（配列番号７）（実測質量１８２７±１Ｄａ、計算値１８２８Ｄａ）から構成されていた。より立体障害を受けたチオエステルの存在は、障害を受けていないモデルと比較して反応を低下させた。しかしながら、３７℃での加熱は初期結合速度を促進することを見出した。図６Ａは、３７℃で１１．５時間後の結合反応を示している。３ｂから４ｂへの転位速度は、未転位生成物３ｂ、LYRAF-[$^{\alpha}COSCH_2CH_2O$]-GRNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（配列番号８）（ピークｂ、実測質量２４７８±１Ｄａ、計算値２４７８Ｄａ）を観察するのに十分なほど遅く、転位生成物４ｂ、LYRAFG（Ｎ$^{\alpha}$-OCH_2CH_2SH）RNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（配列番号９）（ピークｃ、実測質量２４７８±１Ｄａ、計算値２４７８Ｄａ）のわずか前に溶離した。同一の質量を有する、未転位及び転位生成物３ｂ及び４ｂを、亜鉛還元生成物により同定した。中間体３ｂ、ピークｂは、亜鉛還元時に、それぞれペプチド配列LYRAF-$^{\alpha}COOH$（チオエステル加水分解）及びGRNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$に対応する６６９Ｄａ及び１７５３Ｄａの質量を有する２つのペプチドを与えた。次いで粗反応混合物を６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ4.0で（容量の５倍まで）希釈して初期結合後のｐＨを４．５に低下させることにより、転位速度が加速したことを測定した。図６Ｂは、初期結合生成物３ｂから４ｂ（ピークｃ）への転位が、ｐＨ４．５、３７℃で１０時間後に完了したことを示している。このピークのＨＰＬＣ精製及び続く亜鉛還元により、予想される質量を有するペプチド（ピークｆ）LYRAFGRNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（配列番号９）（５ｂ、実測質量２４０３±１Ｄａ、計算値２４０４Ｄａ）を得た。

実施例４

LYRAG-$^{\alpha}COSCH_2C_6H_5$１（配列番号１）（実測質量６８５Ｄａ、計算値６８５Ｄａ）を、[$HSCH_2CH_2O$]-AARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$２ｂ（配列番号１０）（実測質量１５９５±１Ｄａ、計算値１５９６Ｄａ）へ、ｐＨ７．５で結合した。本実施例は、結合例＃３の結合部位とは反対側のAla残基形態の立体障害を提供した。反応速度は実施例３と同様であり、未障害例（結合例＃１及び＃２）よりも有意に遅い速度であるが、３７℃での加熱により加速した。未転位（３ｂ、LYRAG-$^{\alpha}$[$COSCH_2CH_2O$]-AARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$）（配列番号１１）及び転位（４ｂ、LYRAGA（Ｎ$^{\alpha}$-OCH_2CH_2SH）ARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$）（配列番号１２）結合生成物が形成し、実測質量（未転位及び転位ともに）２１５６±１Ｄａ、計算値２１５７Ｄａであった。しかしながら、結合例＃３と異なり、アミドへの成功した還元に示されるようにｐＨにかかわらず３７℃で２日後に転位はほぼ完了したが、転位速度は、初期結合後にｐＨを４．５に低下させても加速しなかった。

最終結合生成物５ｂ（LYRAGAARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$（配列番号１２）、実測質量２０８０

±１Ｄａ、計算値２０８０Ｄａ）における有意数のヒスチジンの存在により、ペプチドの亜鉛への結合が起こったことに注目すべきである。Ｎ－Ｏ結合の還元後、ＥＤＴＡをＨＰＬＣ緩衝液／Ｚｎ混合物に添加して、ペプチドを亜鉛から遊離させる必要がある。この結果を図４に要約する。

実施例５

実施例５は、結合部位の両側に立体的バルク（steric bulk）を有する例を提供する。LYRAF-$^{\alpha}$COSCH$_2$C$_6$H$_5$１（配列番号６）（実測質量７７５Ｄａ、計算値７７５Ｄａ）を、[HSCH$_2$CH$_2$O]-AARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}$COOH２ｂ（配列番号１３）（実測質量１５９５±１Ｄａ、計算値１５９６Ｄａ）にｐＨ７．５で結合した。初期（すなわち未転位）結合生成物３ｂが観察されたが、LYRAF-$^{\alpha}$[COSCH$_2$CH$_2$O]-AARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}$COOH（配列番号１４）（実測質量２２４６±１Ｄａ、計算値２２４７Ｄａ）、低ｐＨ下であっても、時間内に転位の証拠は存在しなかった。結合部位の両側の側鎖の存在は、明らかに立体障害を与えたため、使用した条件下では６員環中間体を経た転位は起こらなかった。結果を図４に要約する。

前記の例は、本発明者らのオリジナルの天然結合化学（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）の驚くべき能力を強調する。これは、最近モデル結合研究（Tametal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 12485-12489）において本質的に同一の形態で独立して繰り返された。本発明者らは、このオリジナルの天然ペプチド結合-形成結合反応を、完全な生物学的活性を有するいくつかのタンパク質の化学合成に使用した。これらには、ケモカインＩＬ－８（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）、酵素ＨＩＶ－１プロテアーゼ及びバーナーゼ（barnase）、セリンプロテアーゼ阻害剤シチメンチョウオボムコイド第三ドメイン及びエグリン（eglin）Ｃ及びａｂ／ＨＬＨ転写因子が含まれる。この結合反応は、MaxBrenner（Brenner M. peptides, Proceedings of the Eighth European peptide Symposium Beyerman, H.C., Ed., NorthHolland: Amsterdam,1976; pp1-7）により公表された原理に基づくものであり、Wieland（Wieland et al. Liebigs Ann. Chem. 1953, 583, 129-149）により最初に記載された化学を使用している。

実験プロトコル

概略

機械補助固相ペプチド合成を、カスタム修正（custom-modified）したアプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）４３０Ａペプチド合成機中で行った（Schnolzer et al. Int. J. Pept. Protein Res. 1992, 40, 180-193）。逆相ＨＰＬＣを、バイダック（Vydac）Ｃ－１８計算用カラム（５μｍ、０．４６×１５ｃｍ）及び準分離用（10μｍ、１．０×２５ｃｍ）カラムを使用したライニン（Rainin）ＨＰＬＣシステムで２１４ｎｍのＵＶ検出を用いて行った。クロマトグラフィー分離は、緩衝液Ａ中の緩衝液Ｂ（Ａ＝水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝９０％CH_3CN／０．０９％ＴＦＡ含有１０％水）の直線勾配を３０～６０分間、1ｍｌ／分（計算値）又は３ｍｌ／分（準分離用）で使用して達成した。全てのペプチドセグメントのマススペクトルは、SciexAPI-IIIエレクトロスプレー四極マススペクトロメーターを用いて得た。実測質量は、プログラムマックスペック（MacSpec）（サイエックス（Sciex））を使用しての、分子種についての全ての観察されたプロトン化状態についての実験ｍ／ｚ値に由来した。計算質量は、平均アイソトープ組成物に基づき、かつプログラムマックプロマス（MacProMass）（テリー・リー・アンド・サニル・ベムリ）（Terry Lee and Sunil Vemuri）、ベックマン・リサーチ・インスティテュート（Beckman Research Institute）、デュアルテ、カリフォルニア）の使用に由来した。その他すべてのマススペクトロメトリーは、ザ・スクリップス・リサーチ・インスティテュートのマススペクトロメトリー施設で行った。^{1}ＨＮＭＲスペクトルは、ブルッカー（Bruker）２５０ＭＨｚスペクトロフォトメーターに記録し、化学シフトは、Me_4Si由来の低磁場百万分率で報告した。微量分析は、ザ・スクリップス・リサーチ・インスティテュートのＸ腺結晶学施設で行い、これは計算値±０．４％で一致した。Ｂｏｃ－Ｌ－アミノ酸及びＨＢＴＵは、ノババイオケム（Novabiochem）（ラジョラ、カリフォルニア）より購入した。４－ヒドロメチルフェニルアセトアミドメチル（ＰＡＭ）樹脂及びジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）は、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems

）（フォスターシティ、カリフォルニア）より入手し、メチルベンズヒドリルアミン（ＭＢＨＡ）はペニーシュラ・ラボラトリーズ（Peninsula Laboratories, Inc）（サンカルロス、カリフォルニア）より入手した。合成用ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）はベーカー（Baker）より入手し、AR用CH_2Cl_2及びＨＰＬＣ用CH_3CNはフィッシャー（Fisher）より入手した。トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）はハロカーボン（Halocarbon）（ニュージャージー）より入手した。ＨＦはマセソンガス（Matheson Gas）より購入した。４－メチルベンジルメルカプタンはランカスター（Lancaster）より入手した。その他全ての試薬はＡｒ用又はそれより良く、アルドリッチ・ケミカル（Aldrich Chemical）又はフィッシャーより入手した。

ペプチドセグメント合成鎖の組立て

ペプチドを、Ｂｏｃ化学についての原位置中和／ＨＢＴＵ活性化プロトコルを使用した確立された固相法により段階的に合成した（Schnolzer et al. Int. J. Pept. Protein Res. 1992, 40, 180-193）。側鎖の保護は以下に示すとおりであった。Boc-Arg（p-トルエンスルホニル）-OH、Boc-Asn（キサンチル）-OH、Boc-Asp（O-シクロヘキシル）-OH、Boc-His（ジニトロフェニル）-OH、Boc-Thr（ベンジル）-OH及びBoc-Tyr（2-ブロモベンジルオキシカルボニル）-OH。Boc-Gln-OH及びBoc-Met-OHは側鎖の保護なしに使用した。カップリング反応を、定量的ニンヒドリンアッセイによりモニターし（Sarinetal, Anal. Biochem., 1981, 117, 147-157）、典型的には＞９９％であった。鎖の組立が完了した後、ペプチドを脱保護し、同時に、ＨＦ含有５％ｐ－クレゾールを用いた０℃で５時間の処理により樹脂から切断し、ペプチド-$^{\alpha}COSH$、-$^{\alpha}CONH_2$又は-$^{\alpha}CO_2H$を得た。減圧下でＨＦを除去した後、粗ペプチドを無水Et_2O（ジエチルエーテル）中に沈殿させ、ＨＰＬＣ緩衝液（４０～５０％Ｂ）中に溶解し、凍結乾燥した。

図１に示すペプチド-$^{\alpha}$チオエステル（1）の合成

チオ酸ペプチドは、[4-[α-（N-t-Boc-アミノアシル-S）ベンジル]フェノキシ]酢酸、DCHA塩（Canne et al. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 1217-1220），（２．０当量）及びアミノメチル－樹脂（１当量、ＤＭＦ中１０％ＤＩＥＡ（アルドリッチ）で洗浄）を、活性化剤として添加したＨＢＴＵ（１．６当量、アルドリッチ）及びＤＩＥＡ（１当量、アルドリッチ）を用いて、ＤＭＦ（ジメチルホルムアミド）中でカップリングすることにより、適切なＢｏｃ－アミノアシル－Ｓ－樹脂上で合成した。ペプチド-$^{\alpha}COSC_6H_3$（3-CO_2H-4-NO_2）チオエステルは、粗ペプチド-$^{\alpha}COSH$（１５～２０ｍｇ）を６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０～６．５に溶解することにより生成し、これに１．５当量の５，５’－ジチオ-ビス（２－ニトロ安息香酸）を添加した（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。混合物を簡単にボルテックスし、１０分後生成した。ペプチド-$^{\alpha}COSC_6H_3$（3-CO_2H-4-NO_2）エステルの同一性は、正確なエレクトロスプレー質量測定により明確に確認し、これはLiuら（Tetrahedron Lett. 1996, 37, 933-936）と一致した。ペプチド-$^{\alpha}COSCH_2C_6H_5$チオエステルは、粗ペプチド-$^{\alpha}COSH$（１５～２０ｍｇ）を６Ｍグアニジン・ＨＣｌ、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０中に溶解し、これに１０当量の臭化ベンジルを添加することにより生成した（Dawson et al. Science 1994, 266, 776-779）。混合物を簡単にボルテックスし、１時間後精製した。LYRAG-$^{\alpha}COSC_6H_3$（3-CO_2H-4-NO_2）（実測質量７６０Ｄａ、計算値７６０Ｄａ）を、準分離用ＨＰＬＣ（２０～６０％Ｂで４０分間）により精製し、２０～３０％の収率を得た。LYRAG-$^{\alpha}COSCH_2C_6H_5$（実測質量６８５Ｄａ、計算値６８５Ｄａ）を準分離用ＨＰＬＣ（１５～４５％Ｂで６０分間）精製し、２５～３０％の収率を得た。LYRAF-$^{\alpha}COSCH_2C_6H_5$（実測質量７７５Ｄａ、計算値７７５Ｄａ）を準分離用ＨＰＬＣ（３０～６０％Ｂで６０分間）により精製し、２５～３０％の収率を得た。収率の損失のほとんどは、単にＨＰＬＣ回収によるものであった。

図２に示すＮ$^{\alpha}$（エタンチオール）及びＮ$^{\alpha}$（オキシエタンチオール）ペプチド（２）の合成

これらのペプチドを、ＭＢＨＡ（シグマ（Sigma））又は適切なBoc-アミノアシル-OCH_2-PAM-樹脂（シグマ）のいずれかにおいて合成した。鎖の組立を完了し、Ｎ$^{\alpha}$Ｂｏｃ基を純

粋ＴＦＡで除去し（１分間の処理２回）、ＤＭＦ中の１０％ＤＩＥＡ中和（１分間の処理２回）後、ペプチドをRobeyの方法（Robey et al. Anal. Biochem. 1989, 177, 373-377）によりブロモアセチル化した。ブロモ酢酸（２．０ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2（２ｍｌ）に溶解し、これにＤＩＣ（１ｍｍｏｌ、２－ジメチルアミノイソプロピルクロリド又はヒドロクロリド、アルドリッチ又はシグマ）を添加した。１０～１５分間活性化し、対称性無水物を形成した後、混合物をＤＭＦ（２ｍｌ）で希釈し、ペプチド－樹脂に添加し、３０分間カップリングした。次いで樹脂をＤＭＳＯで洗浄し、８ａ（ＤＭＳＯ中２Ｍ）又は８ｂ（ＤＭＳＯ中の１Ｍ）を添加し、ブロモアセチル化ペプチド－樹脂と８～２３時間反応させた。ペプチドを、樹脂からの除去後、修飾なしに精製した。[（3-CO_2H-4-NO_2）-C_6H_3-S-SCH_2CH_2]-AGPAGD-$^{\alpha}CONH_2$（２ａ）（実測質量８００Ｄａ、計算値８００Ｄａ）を、準分離用ＨＰＬＣ（０～６７％Ｂで６０分間）により精製し、～２４％を得た。[$HSCH_2CH_2O$]-GRNTATIMMQRGNFR-$^{\alpha}CONH_2$（２ｂ）（実測質量１８２７±１Ｄａ、計算値１８２８Ｄａ）を準分離用ＨＰＬＣ（１５～４０％Ｂで６０分間）により精製し、～２５％の収率を得た。[$HSCH_2CH_2O$]-AARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$（２ｂ）を、ブロモ酢酸の代わりに２－ブロモプロピオン酸のラセミ化合物を使用し前記の方法により合成した。得られた粗凍結乾燥生成物は、所望のペプチド及びブロモプロピオン酸塩化ペプチド（CH_2=CHCO-ARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$、実測質量１５０２±１Ｄａ、計算値１５０２Ｄａ）からのＨＢｒの除去により生じたペプチドの混合物であった。混合物を準分離用ＨＰＬＣ（１０～４０％Ｂで６０分間）により精製し、[$HSCH_2CH_2O$]-AARHTVHQRHLHG-$^{\alpha}COOH$（実測質量１５９５±１Ｄａ、計算値１５９６Ｄａ）を～１０％の収率で得た。

図２に示すＳ－[（３－カルボキシ－４－ニトロ）フェニルチオ]－２－アミノエタンチオール（８ａ）の合成

２－アミノエタンチオール（１．０ｇ、１３．０ｍｍｏｌ）及び５，５’－ジチオ－ビス（２－ニトロ安息香酸）（１．７５ｇ、４．４ｍｍｏｌ）を、アセトニトリル（１００ｍｌ）及び水（２５ｍｌ）と組み合わせ、室温で１４時間攪拌した。反応混合物を水（４５０ｍｌ）で希釈し、ウォーターズ・デルタ・プレップ（Waters Delta Prep）４０００（バイダック５．０×２．５ｃｍ分離用Ｃ－１８カラムを有する）中の分離用逆相ＨＰＬＣで精製し、８ａ（１．０ｇ、４０％）を得た。^{1}HNMR（D_2O）：δ7.95（d,1H,J=8.7Hz），7.61（dd,1H,J=8.7,2.2Hz），7.58（d,1H,J=2.2Hz），3.18（t,2H,J=6.5Hz），2.92（t,2H,J=6.7Hz）。

図３に示すＮ－（２－ブロモエトキシ）フタルイミド（１１）の合成

Ｎ－（２－ブロモエトキシ）フタルイミド（１１）を、Bauer及びSureshl（Bauer et al. J. Org. Chem. 1963, 28, 1604-1608）の手順の修飾により合成した。Ｎ－ヒドロキシフタルイミド（１６．０ｇ、９８ｍｍｏｌ、アルドリッチ）、トリエチルアミン（３０ｍｌ、２１５ｍｍｏｌ）及び１，２－ジブロモエタン（３５ｍｌ、４０６ｍｍｏｌ、アルドリッチ）をＤＭＦ（１１５ｍｌ）で組み合わせ、室温下で一晩攪拌した。固体をろ過し、ＤＭＦで洗浄した。ろ液を水（８００ｍｌ）で希釈し、得られた沈殿物をろ過し、ＥｔＯＡｃ（２００ｍｌ）中に希釈し、１ＮＨＣｌ（２×５０ｍｌ）、水（１×５０ｍｌ）、飽和ＮａＣｌ（１×５０ｍｌ）で洗浄し、$MgSO_4$で乾燥した。揮発物質を減圧下で除去し、得られた固体を９５％ＥｔＯＨより再結晶化し、１１を白色固体として得た（１６．６ｇ、６３％）。^{1}HNMR（CDCl3）：δ7.82（m,4H），4.49（t,2H,J=6.9Hz），3.65（t,2H,J=6.9Hz）;FABMS（ナトリウムイオン）:[$C_{10}H_8BrNO_3$,H^+]についての計算値291.9585、実測値291.9579。

図３に示すＮ－[２－[Ｓ－（４－メチルベンジル）]メルカプト]エトキシ]フタルイミド（１２）の合成

臭化物１１（１６．６、６２ｍｍｏｌ）、４－メチルベンジルメルカプタン（８．５ｍｌ、６３ｍｍｏｌ）及びＤＢＵ（９．５ｍｌ、６４ｍｍｏｌ、１，８－ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ－７－エン、アルドリッチ）をベンゼン（１５０ｍｌ）中で組み合わせ、室温下で８時間攪拌した。固体をろ過し、ベンゼンで洗浄し、ろ液を１Ｎ　ＨＣｌ（２×３５ｍｌ）、水（１×３５ｍｌ）、飽和ＮａＣｌ（１×３５ｍｌ）で洗浄し、$MgSO_4$で

乾燥した。揮発物質を減圧下で除去し、得られた固体をＥｔＯＡｃ／ヘキサンから再結晶化し、１２を白色固体として得た（１４．８ｇ、７４％）。^{1}HNMR（CDCl3）：δ7.80（m,4H）,7.18（d,2H,J=8.0Hz）,7.04（d,2H,J=8.0Hz）,4.22（t,2H,J=7.4Hz）,3.75（s,2H）,2.79（t,2H,J=7.4Hz）,2.27（s,3H）;FABMS:[$C_{18}H_{17}NO_3S,H^+$]についての計算値328.1007,実測値328.1016.計算値.$C_{18}H_{17}NO_3S$についての計算値C,66.03;H,5.23;N,4.28;S,9.79.実測値C,66.04;H,4.95;N,4.30;S,9.58。

図３に示すＳ－（４－メチルベンジル）－２－アミノオキシエタンチオール（８ｂ）の合成

Ｓ－（４－メチルベンジル）－２－アミノオキシエタンチオールを、Osby（Osby et al. Tetrahedron Lett. 1984, 25, 2093-2096）の方法により合成した。Ｎ－置換フタルイミド１２（７．４ｇ、２３ｍｍｏｌ）をイソプロパノール（２０３ｍｌ）及び水（３５ｍｌ）中に懸濁し、これに$NaBH_4$（３．５ｇ、９２ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を室温下で一晩攪拌した。酢酸（２５ｍｌ）を泡立ちが停止するまでゆっくりと添加し、フラスコに栓をし、５０℃で２～３時間加熱した。揮発物質を減圧下で除去し、得られた溶液を１Ｎ　ＮａＯＨで希釈し、ＥｔＯＡｃ（４×５０ｍｌ）で抽出した。組み合わせたＥｔＯＡｃ抽出物を飽和ＮａＣｌ（１×５０ｍｌ）で洗浄し、$MgSO_4$で乾燥した。揮発物質を減圧下で除去し、得られた油をフラッシュクロマトグラフィー（１：１ヘキサン：ＥｔＯＡｃ）により精製し、８ｂを透明かつ無色（３．２ｇ、７２％）の油として得た。^{1}HNMR（$CDCl_3$）：δ7.21（d,2H,J=8.0Hz）,7.12（d,2H,J=8.0Hz）,5.40（brs,2H,D_2O ex.）,3.77（t,2H,J=6.5Hz）,3.71（s,2H）,2.64（t,2H,J=6.5Hz）,2.33（s,3H）;FABMS:[$C_{10}H_{15}NOS,H^+$]についての計算値198.0953,実測値198.0958.計算値.$C_{10}H_{15}NOS$についての計算値C,60.88;H,7.66;N,7.10;S,16.25.実測値C,60.79;H,7.88;N,7.03;S,16.11。

【図１】

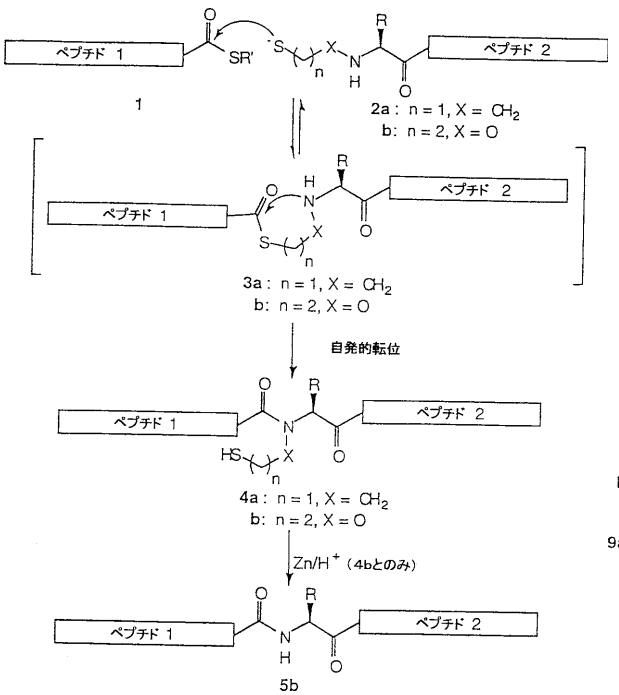

FIG. 1

【図２】

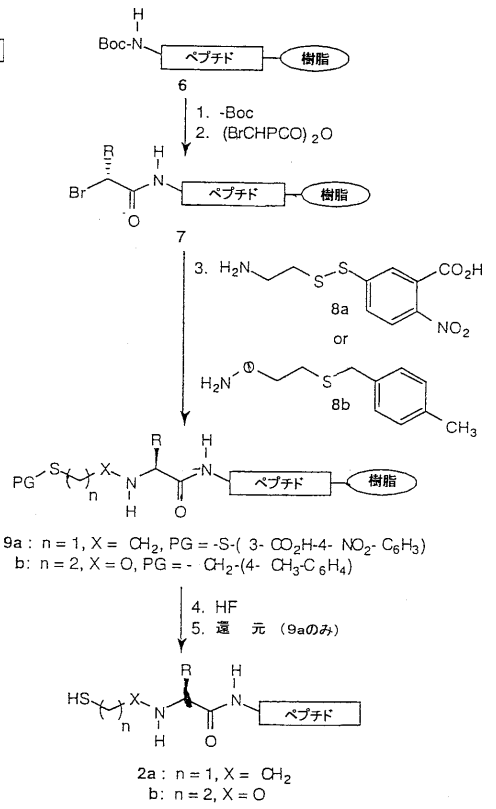

FIG. 2

【図３】

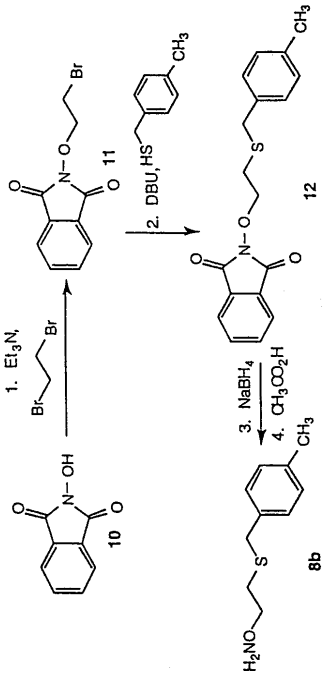

FIG. 3

【図４】

統合例	ペプチド 1[a]	ペプチド 2[b]	pH	温度 (°C)	反応時間 (時間)	標識の収率[c] 転位しなかった生成物(3)	転位した生成物(4)
1	LYRAG-SNB	Nα(oetsh)-GAGPAGD	7.0	25	4	検出されず	90%
2	LYRAG-SNB	Nα(oetsh)-GRNTATIMMQRGNFR	7.5	25	16	検出されず	75%
3	LYRAF-Sbzl	Nα(oetsh)-GRNTATIMMQRGNFR	[7.5	37	11.5	30%	(35%)]
			4.5[d]	37	10	0%	64%
4	LYRAG-Sbzl	Nα(oetsh)-AARHTVHQRHLHG	[7.5	37	17.5	39%	(52%)]
			4.5[d]	37	6.5	20%	69%
5	LYRAF-Sbzl	Nα(oetsh)-AARHTVHQRHLHG	7.5	37	19	58%	検出されず
			4.5[d]	37	22	52%	検出されず

FIG. 4

【図５Ａ】

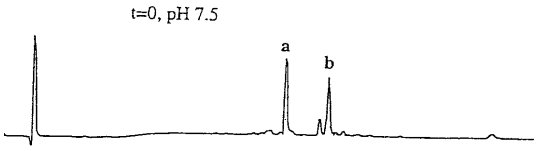

FIG. 5A

【図５Ｂ】

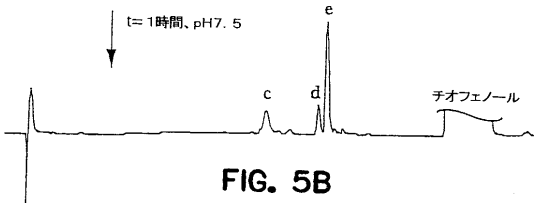

FIG. 5B

【図５Ｃ】

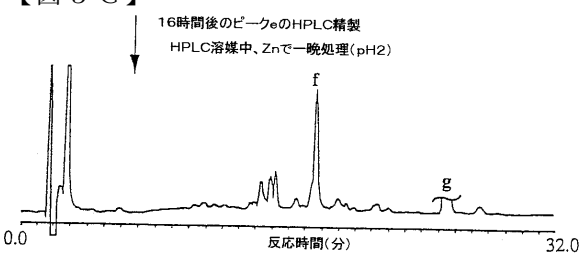

FIG. 5C

【図６Ａ】

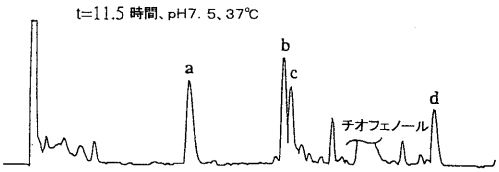

FIG. 6A

【図６Ｂ】

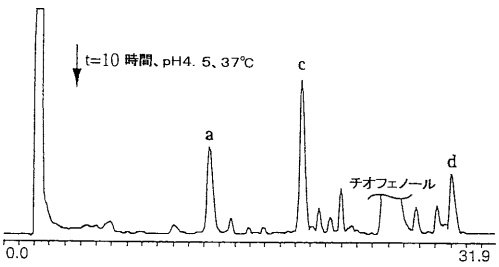

FIG. 6B

【図６Ｃ】

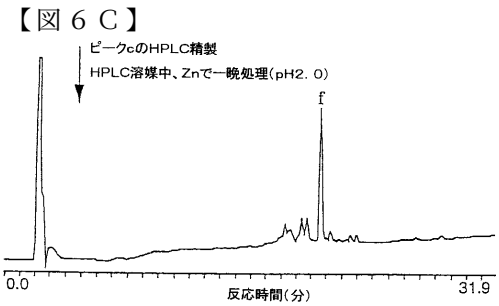

FIG. 6C

フロントページの続き

(72)発明者 ケント スティーヴン ビー エイチ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２０３７ ラ ジョラ ラ ジョラ ハーモサ アベニュー ６０４６
(72)発明者 ミュアー トム ダブリュー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 １００２１ ニューヨーク イースト シックスティサード ストリート ５００ アパートメント １５ビー
(72)発明者 ドーソン フィリップ イー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１０３０ サウス パサディナ リンドン ストリート １３０２－＃１１
(72)発明者 バーク スティーヴン ジェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２０３７ サン ディエゴ カミニト ディア ７９４４－＃１
(72)発明者 カンヌ リン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０４４ パシフィカ クレスピ ドライヴ １１０３

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 Science, １９９４年, Vol.266, p.776-779
Journal of the American Chemical Society, １９９７年, Vol.119, No.19, p.4325-4329

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 1/00 - 19/00
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
Pubmed