

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03053

研究課題名（和文）保護基を用いない高原子効率のマイクロフローペプチド鎖伸長法の開発

研究課題名（英文）Development of high atom economy peptide chain elongation in a micro-flow reactor using unprotected amino acids

研究代表者

布施 新一郎（Shinichiro, Fuse）

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：00505844

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：最も汎用されているペプチドの合成法は、1）保護アミノ酸の連結、2）保護基の除去の繰り返し操作からなる。すなわち、ペプチド合成の全工程の半分は脱保護工程が占め、しかも保護基に由来する廃棄物量も多い。本研究では、短工程で廃棄物の少ないペプチド合成の実現を目指し、無保護アミノ酸の連結手法の開発を目指した。検討の結果、安価で高活性な反応剤を用いて良好な収率でアミノ酸を連結することに成功した。通常高活性な反応剤を用いる手法では副反応の抑制が困難であるが、微小な流路を反応場とするマイクロフロー法合成法の特長である、精密な反応時間、反応温度制御により副反応の抑制に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチド医薬品はこれまで創薬の主役であった低分子医薬品、近年脚光を浴びている抗体医薬品の双方の長所を併せもつと期待されていることから重要性がましており、その低コストでクリーンな生産法の開発は重要な課題となっている。本研究で開発した手法は、スケールアップ合成に適するマイクロフロー合成法を駆使したものであり、ペプチドの低コストで廃棄物の少ない生産法開発につながる社会的意義の大きい成果である。また、研究の過程で、機械学習による反応成績予測を試みた際に、ペプチド合成において大きな課題の一つである副反応（ラセミ化・エピメリ化）について新たな機構の存在が示唆された。これは学術的にも重要な成果といえる。

研究成果の概要（英文）：Conventional peptide synthesis requires a deprotection step after each amidation step, which decreases synthetic efficiency. Therefore, peptide synthesis using unprotected amino acids is considered an ideal approach. We developed peptide chain elongation using unprotected amino acids via mixed carbonic anhydride. Micro-flow technology enabled rapid mixing of an organic layer containing a protected amino acid or dipeptide and an aqueous layer containing an unprotected amino acid or dipeptide to accelerate the desired amidation, and this approach successfully suppressed undesired racemization/epimerization. Various peptides were obtained in good to high yields.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ペプチド 無保護アミノ酸 マイクロフロー 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに 60 のペプチド医薬品が FDA により承認され、現在 140 以上の候補化合物が臨床試験中である。その数は増加し続けており、ペプチドの実践的合成は重要性を増している。しかし、現在ペプチド供給の主流である液相法は、保護基と縮合剤・添加剤の利用により原子効率が低い。例えばアミノ酸の平均分子量は約 110 だが、汎用保護基の分子量は Fmoc 基 (222)、Boc 基 (100)、Cbz 基 (134) であり、工業的に最も多用される反応剤と添加剤の分子量は EDCI (192)、HOBT (135) で、これらを過剰量要する。米国化学会グリーンケミストリー部会は投票により、原子効率の低いアミド化法の改善を有機合成上最大の課題とした。過去に報告された無保護アミノ酸の連結法はわずかで、しかも実用的手法はない。すなわち、イミダート、パラニトロフェニルエステル、ベンゾトリアゾールエステル、環状ボロンを活性種とした方法が報告されたが、過剰量の基質を要する、エピメリ化を起こす、高温条件を要する、活性化剤に由来する夾雑物を多量に生じて精製困難、といった問題をもつ。一方、ペプチドを混合酸無水物へと誘導し、無保護アミノ酸を連結して望むペプチドを得る手法が報告された。本法の副生物は除去容易な二酸化炭素とアルコールのみであり、低温で反応できる。しかも未反応の無保護アミノ酸は除去容易である。しかし、二層系反応であるため、望む分子間反応の速度が低下し、競合する副反応 (エピメリ化) が惹起されるため、実用性に乏しいとされていた。

2. 研究の目的

本問題を解決すべく、申請者は「保護基を用いない高原子効率のマイクロフローペプチド鎖伸長法の開発」を目指した。すなわち、マイクロフロー合成法の利点である、高速混合、厳密な温度・反応時間制御を活用し、上述の反応で問題となっていた副反応を抑止し、無保護のアミノ酸を用いてペプチド鎖を伸長する理想的かつ挑戦的な手法論開発を目指した。

3. 研究の方法

微小な流路を反応場とするマイクロフロー合成法を駆使して、安価で高活性なクロロギ酸アルキルを用いて混合炭酸無水物を經由するペプチド鎖伸長を検討することとした。マイクロフローペプチド合成法では、1 秒未満の反応時間を厳密に制御することが可能であり、なおかつ、反応温度も厳密に制御できることから、高活性な反応剤を用いることにより進行しやすい副反応を抑止できるものと期待した。まずは、合成難度の低いジペプチドの合成を検討し、最適条件の確立を目指した。続いて、合成難度の高い、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドの合成を検討し、開発する手法の有用性を実証することとした。

4. 研究成果

2017 年度は、マイクロフロー法を用いる混合酸無水物調製条件の確立と、遊離アミノ酸の連結によるジペプチド合成法確立の二点を目的とした。まず窒素原子が Boc 基で保護されたセリンを基質として用い、クロロギ酸アルキルと反応させ、得られた反応液は過剰のイソプロピルアミンを含む溶液へ注ぎ入れて安定なアミドへ変換し、NMR 解析を実施することにより収率を求めた。検討の結果、高収率で混合酸無水物を調製できる条件の確立に成功した。続いて、最適化した条件により混合酸無水物を調製し、これに対して遊離のアミノ酸を反応させることによるジペプチドの合成を目指した。本反応においてはラセミ化の抑制が最も重要であったため、生成物の HPLC 解析を実施してラセミ化の進行について定量的に解析した。特にラセミ化に大きく影響すると考えられる塩基や溶媒の種類、温度について検討した結果、ラセミ化を抑制しつつ遊離アミノ酸を連結できる手法の確立に成功した。

2018 年度は合成難度の高いトリペプチドの合成を検討した。これまでのジペプチドの合成では N 末端がカルバマートで保護されたアミノ酸をカルボン酸として用いていたため、望まないラセミ化をこの保護基の効果により抑制可能であったが、トリペプチドの合成では、カルボン酸としてジペプチドを用いて反応することとなるため、これまでの検討と比較して難度が格段に上昇する。実際に検討を進めた結果、驚くべきことにトリペプチドの合成についてもラセミ化を 0.5% 未満に抑制しつつ目的物を得ることに成功した。

2019 年度はさらに難度の高いトリペプチドの合成に焦点を当てて研究を推進した結果、開発した反応条件は当初の予想以上に副反応の抑制に効果があり、アミノ酸の中で最もラセミ化しやすいとされているフェニルグリシン (アラニンの 60 倍ラセミ化しやすいことが知られている) やシステイン (側鎖硫黄原子の存在によりタンパク質構成アミノ酸の中では最もラセミ化を起こしやすいアミノ酸の一つとされる) を含むペプチドの合成においてさえ、副反応を 1% 未満に抑えつつ合成できることを明らかにした。さらに、ジペプチドに対して、C 末端側、N 末端側双方が遊離の状態のジペプチドを反応させてテトラペプチドを得ることに成功した。これらの結果は、いずれも本研究でコア技術としている微小流路を反応場とするマイクロフロー合成法の賜であり、二相系の反応液を高速混合することにより実現した結果である。実際に開発した反応条件を通常のフラスコを用いて実施すると反応成績が低下することを確かめている。

前年度までの研究により、基質の種類によって反応成績がかなり変わることが判明した。ペプチドやアミノ酸の組み合わせは膨大であり、これらの基質を変える毎に合成条件の最適化を行う場合、多大な労力と時間を要することになる。この手法をさらに実用的なものとするには、今後基質の組み合わせによってどのような反応条件を設定すれば、最も高い成績が得られるかを事前予測できるようにすることが重要であるとの考えに至った。そこで、2020年度にはこれを実現するための第一歩として、基質の組み合わせをまずは固定して、様々な条件下における最低100以上の反応成績を収集し、得られたデータを機械学習により解析することで今後の事前予測を実現するアプローチの構築を目指した。実際にマイクロフロー合成実験を180条件分実施し、HPLC解析により各々の条件における目的物の収率とエピマーの収率を同定した。180条件の内、70%にあたる126条件分をトレーニングデータセット、30%にあたる54条件分をテストデータセットとして、Ridge回帰モデル、Lasso回帰モデル、サポートベクター回帰モデル、ランダムフォレスト回帰モデル、ニューラルネットワークを学習器として用いて、機械学習を実施し、予測精度を検討した。その結果、検討した学習器の中ではランダムフォレストおよびニューラルネットワークが高い予測精度を示し、特にランダムフォレストはより少ないトレーニングデータセット数でも予測精度が維持されることがわかった。また、ニューラルネットワークでは高い予測精度を得るために、適切なハイパーパラメーターの設定が肝要であることが示唆された。また、この検討の過程で、当初予測していなかったパラメーターが副反応に重大な影響を及ぼすことが示唆され、未知の反応機構により副反応が進行している可能性が浮上した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 布施新一郎	4. 巻 11
2. 論文標題 マイクロフロー合成技術による次世代医薬品（ペプチド）合成法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月間 PHARMSTAGE	6. 最初と最後の頁 13-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 布施新一郎	4. 巻 30
2. 論文標題 マイクロフロー合成法を駆動力とするペプチド合成の革新	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MEDCHEM NEWS	6. 最初と最後の頁 193-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinichiro Fuse, Koshiro Masuda, Yuma Otake, and Hiroyuki Nakamura	4. 巻 25
2. 論文標題 Peptide-Chain Elongation Using Unprotected Amino Acids in a Micro-Flow Reactor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry a European Journal	6. 最初と最後の頁 15091-15097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.201903531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 15件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shinichiro Fuse
2. 発表標題 マイクロフローアミド結合形成法が駆動する創薬の革新
3. 学会等名 Kanazawa University Sakigake Project 2020 Seminar 3rd Ohmiya Lab and Takeda Virtual Symposium（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフロー合成法を駆使する古くて新しい有機合成法の開発
3. 学会等名 有機合成化学協会東海支部主催 令和2年度有機合成セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフロー合成、自動合成による医薬品生産の革新
3. 学会等名 化学工学会関東支部第52回Continuing Educationシリーズ講習会「医薬品原薬のフロー合成」- 1日でわかるフロー合成の要素技術からシステム・情報まで -（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 創薬研究の自動化の動向と「いったい今後はどうなるのか？」問題
3. 学会等名 武田薬品プロセスケミストリーデベロップメントシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 有機合成の自動化・遠隔化の波とフロー合成の今後
3. 学会等名 近畿化学協会フロー・マイクロ合成研究会第88回研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinichiro Fuse
2. 発表標題 Development of amide bond formation via mixed carbonic anhydride in a micro-flow reactor
3. 学会等名 6th International Symposium on Middle Molecular Strategy (ISMMS-6) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 耕志郎、小竹 佑磨、中村 浩之、布施 新一郎
2. 発表標題 無保護アミノ酸連結を基盤とするマイクロフローペプチド鎖伸長法
3. 学会等名 第77回有機合成化学協会 関東支部シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田耕志郎、小竹佑磨、中村浩之、布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフロー法を駆使する無保護アミノ酸直接連結によるペプチド鎖伸長法の開発
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 奥深いアミド化の世界へのご招待 - マイクロフロー合成法を道具として -
3. 学会等名 日本薬学会東北支部主催 第18回化学系若手研究者セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田耕志郎、小竹佑磨、中村浩之、布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフロー法を駆使する無保護アミノ酸連結によるペプチド鎖伸長法の開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフローアミド結合形成法を駆動力とするペプチド合成の革新
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Fuse
2. 発表標題 An efficient amide bond formation through rapid and strong activation of carboxylic acids in a micro-flow reactor
3. 学会等名 Tokyo Tech-KAIST Joint Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Fuse
2. 発表標題 Highly Efficient Amide Bond Formation Using Micro flow Technology
3. 学会等名 The First International Conference on Automated Flow and Microreactor Synthesis (ICAMS-1) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフロー法を駆使するペプチドの高効率合成
3. 学会等名 人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミックアライアンス 2017年度生命機能 物質・デバイス・システムプロジェクトグループ (G3) 分科会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Fuse
2. 発表標題 Highly Efficient Amide Bond Formation Using Micro flow Technology
3. 学会等名 The 12th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia / The 3rd Advanced Research Network on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施新一郎、御船悠人、小竹佑磨、高橋孝志、田中浩士、中村浩之
2. 発表標題 迅速かつ強力なカルボン酸の活性化を基盤とするマイクロフローペプチド合成法の開発
3. 学会等名 35回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフローアミド化法を駆使するペプチドの高効率合成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 迅速かつ強力なカルボン酸の活性化を基盤とするマイクロフローペプチド合成法の開発
3. 学会等名 第34回有機合成化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 ペプチドの低コスト生産を志向したマイクロフローアミド結合形成法の開発
3. 学会等名 第5回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 微小流路中での高速アミド化反応（秒単位）を駆使するペプチド合成
3. 学会等名 第49回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施新一郎
2. 発表標題 マイクロフロー法を駆使するペプチドの高効率合成
3. 学会等名 平成28年度附置研アライアンス成果報告会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Fuse
2. 発表標題 Highly Efficient Amide Bond Formation Using Micro flow Technology
3. 学会等名 International Symposium on Pure & Applied Chemistry (ISPAC) 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 布施新一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 16
3. 書名 フロー合成、連続生産のプロセス設計、条件設定と応用事例	

1. 著者名 布施新一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術	

1. 著者名 布施新一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 10
3. 書名 DOJIN ACADEMIC SERIES現代光化学	

1. 著者名 布施新一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 6
3. 書名 ペプチド医薬品開発のためのスクリーニング・安定化・製剤化技術	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アミドの製造方法	発明者 布施新一郎、増田耕志郎、小竹佑磨、中村裕之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02020/175023 A1	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アミドの製造方法	発明者 布施新一郎、増田耕志郎、小竹佑磨、中村裕之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-036628	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋大学創薬科学研究科プロセス化学分野ホームページ http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/lab_pages/chemprocess

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------