

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：マイクロフロー技術を駆使する高収率・省スペースかつ低コストな革新的ペプチド合成法の開発

Development of High-Yielding, Space-Saving, and Low-cost Synthetic Approach for Peptides based on Micro-flow Technology

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：布施 新一郎  
Shinichiro Fuse

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
国立大学法人東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 特定教授  
Tokyo Institute of Technology, Institute of Innovative Research, Laboratory for Chemistry and Life Science, Visiting Professor

## II 研究開発の概要

### 研究開発の目的

ペプチドは従来の低分子医薬品、そして近年の躍進が目覚ましい抗体医薬品のもつ双方の利点（生産コストの低さと開発成功率の高さ）を兼ね備えうると考えられており、特に環状の *N*-メチル化ペプチドは細胞膜透過性や代謝安定性に優れ、経口投与も可能になることがあるため、次世代医薬品としての重要性が増している。一方で、従来の化学合成法は、廃棄物を多量に生じることや、精製操作が煩雑なこと、高コストであるといった様々な問題点を有している。本プロジェクトでは、この問題を解決すべく、高収率・省スペースかつ低コストでペプチド医薬品を合成できる革新的マイクロフロー合成法の開発（マイクロフロー合成法は、通常 1 mm 以下の内径の流路中で溶液を流しながら反応させる手法を指す）、インライン計測技術、反応条件の精密制御技術の確立、環状 *N*-メチル化ペプチド薬剤 **cilengitide** の合成による、開発する合成法の有用性実証を目指した。

東工大グループは既に本プロジェクト開始前にペプチド合成の常識を覆し、安価な試薬でアミノ酸を迅速に活性化し、副反応を起こす前にペプチドを合成するマイクロフロー法を開発していた。本合成法では、安価で反応性の高いトリホスゲンを用いるため、副生物は除去容易な二酸化炭素と塩酸のみである。本合成法では反応性の高い活性種を生じるため副反応が進行しやすいが、反応時間を秒単位未満で制御してこれを抑制している。バッチ反応では、溶液の混合に数秒以上を要するため、本反応は実現不可能であり、マイクロフロー法ならではの合成法である。また、通常アミノ酸の連結には数時間以上を要する。反応時間が僅か数秒の申請者の合成法はアミノ

酸を最速で連結できる手法である。過去にマイクロフローペプチド合成は数例報告されたが、いずれもバッチ反応で使用されている条件をそのままフロー化したのみであり、スケールアップ時の再現性の向上には有効だが、反応時間やコストの問題は未解決となっていた。

一方で、東工大グループが過去に開発した合成法は活性化するアミノ酸を連結相手のアミノ酸に対して過剰量要する。そこで本プロジェクトでは過剰量のアミノ酸を要せずに、高収率で連結できる新規合成法の開発を目指した。また、医薬品生産への応用にはインライン計測、反応条件制御技術の確立が必須であるため、本分野で最先端の技術を保持する横河電機株式会社の研究者を東工大に迎え、緊密な協働によりこの実現を目指した。また、環状 *N*-メチル化ペプチド薬剤 *cilengitide* (血管新生に関わるインテグリンの選択的阻害剤。フェーズ 3 まで進んだ) の合成による、開発手法の有用性実証をめざした。

## 主要な研究開発成果

### ・革新的マイクロフローアミド化法の開発

#### 1) 混合酸無水物を經由する *N*-メチルアミノ酸連結条件確立

安価でかつ廃棄物を多く生じない反応剤を用いるアミド化法を開発した。開発した手法では高活性な混合酸無水物を用いているため、通常、競合する副反応の抑制が困難となるが、精密な反応温度や反応時間の制御が可能なマイクロフロー法を駆使することで副反応の抑制に成功し、高収率で嵩高い *N*-メチルアミノ酸を連結する手法の確立に成功した。また、開発した手法が広い基質適用範囲を示すことを確認している。本プロジェクトで特許を 2 件出願した。

#### 2) ペプチド鎖伸長のスケールアップと光環化条件確立

フロー合成法の大きな特長の一つは流し続けるだけで、簡便に再現性良くスケールアップできる点である。実際にフロー合成装置の運転時間の延長により、ペプチド鎖伸長を当初の目標通りグラムスケールで実施した。また、細い流路を反応場とするマイクロフロー合成法では、光の減衰が抑制できるため、高効率的に光反応を実施できる。この利点を活かし、マイクロフローリアクターを用いた光反応によるペプチド環化を実施し、実際に、これまでの東工大グループの結果と比べて、遥かに高収率で目的物を得る手法を確立した。なお、本手法では、精製が煩雑なアミノ基とカルボキシル基を共に有する環化前駆体は生じず、しかも過剰量の高価な縮合剤を添加する必要もない。

#### 3) 活性種の確認

高反応性活性種の生成について、実際に化合物を単離して NMR 測定を実施することにより確認し、想定通りの機構で反応が進行していることを確かめた。

### ・マイクロフローペプチド合成システムの開発

#### 4) マイクロフローペプチド合成システムの開発

自動的にペプチド鎖を伸長する手法を確立するため、液相自動分液精製技術を駆使して、反応で過剰に用いた試薬、および保護基に由来する化合物の除去ができるかを実際に検討した。電気伝導度の違いにより有機層と水層を区別して分液できる装置を利用したところ、実際に夾雑物が分離できるプロトコルを確立した。さらにフローリアクター内で、有機層と水層を混合させて精製する技術も確立した。

#### 5) 混合酸無水物によるアミノ酸連結反応のシステム化のための要素技術開発

東工大グループが開発したアミド化反応をより精密な条件下で実施する反応装置のプロトタイプを開発した。これを用い、東工大グループの結果と同等以上の成績でペプチドを合成できることを確認した。なお、本装置の作成にあたり、当初計画通り、様々な溶媒の使用に対応可能な耐薬品性素材を用いた。一方、当初計画では合成装置プロトタイプのみを開発予定であったが、マイクロフロー反応場は高速混合により溶液内の均一性が高いため、高品質なデータがセンサー設置により取得できると考え、微細反応場の反応温度を計測するためのデバイスを追加で試作して本装置に実装した。実際に反応液温度を高精度で測定できることを実証した。

#### 6) 分光法によるペプチド生成率の非接触計測技術の開発

ペプチド合成反応の進行をモニタリングするには、原料のペプチドと目的物のペプチドの増減を検知する必要があるが、ペプチドの定量で通常用いるアミド結合に由来する光吸収は、原料と目的物の双方がもつため、これを区別する必要がある。これを実現するため、基準振動によらず隣接する原子集団の影響を受けて光吸収が変化する近赤外分光法を用いた。その結果、原料の減少と生成物の増加に相関する吸収を同定し、アミド化反応収率の高速非接触モニタリングへの道を拓いた。

### 研究開発成果の意義

3年間の本プロジェクトにより、革新的なペプチド合成手法開発に向けた技術基盤を確立できた。具体的には、既存のどの手法よりも短時間、高収率で *N*-メチルアミノ酸を連結できる手法を開発することができ、しかもペプチドの収率をインライン分析により算出できる技術基盤、ペプチド合成における収率予測を行う技術基盤を構築できた。ペプチドは前述の通り、次世代医薬品としてますます重要性を増しており、開発した技術は我が国がペプチドの低コスト生産において世界をリードする端緒となるものと期待される。また、ペプチドの利用は医薬品以外に、医療用材料、機能性食品、飲料、化粧品等様々な分野に拡大しており、その波及効果は広範なものとなる。

## **Background of the research project**

Peptide drugs have garnered much attention because they have both merits of antibody drugs and traditional low-molecular weight drugs. In particular, medium sized oligopeptides consisting of <11 amino acids account for roughly a half of marketed peptide drugs. The medium sized, *N*-methylated cyclic peptides that enable oral administration will grow increasingly important. There are growing needs of scalable, low-cost synthetic process for peptide drugs. However, the present synthetic process for peptides have problems including generation of a lot of waste, high cost, low yields in amidation of *N*-methyl amino acids.

The most conventional approach for coupling amino acids is based on the mild activation of an amino acid using expensive reagents. This approach usually takes rather long time to obtain desired peptides. On the other hand, we developed original micro-flow amidation by activating an amino acid strongly and rapidly (< 0.5 sec) using inexpensive reagents. Our developed micro-flow technology enabled precise control of such short reaction time and reaction temperature. In addition, our developed process emits only CO<sub>2</sub> and HCl those can be easily removed. Moreover, this process should be readily scaled-up by either continuous running or by the numbering-up of the reactors. However, our developed process had one drawback. Namely, excess amount of an amino acid for generating active species was necessary. Therefore, we developed a novel micro-flow amidation that enables high-yielding coupling of *N*-methyl amino acids using inexpensive and less wasteful reagents.

## **Major achievements in this project**

- Development of amidation for *N*-methyl amino acids via mixed carbonic anhydride formation

We developed amide bond formation using inexpensive and less wasteful reagents. The developed approach used highly active mixed carbonic anhydride that tended to cause undesired reactions. However, those side reactions were successfully suppressed by using micro-flow technologies including precise temperature and reaction time control. We achieved synthesis of various *N*-methylated peptides in high yield. Two patents application was completed.

- Scaled-up peptide chain elongation and photo-induced macrolactamization

We demonstrated scaled-up amidation (gram scale) by simply extending pumping time. Photo-induced macrolactamization was performed in a micro-flow reactor. The developed method avoided the problematic purification of cyclization precursor containing both amino- and carboxyl groups. In addition, the addition of excess amount of expensive coupling agents was not necessary.

- Automated purification

We successfully purified obtained peptides using liquid-phase automated purification technology. We also performed the purification process in a micro-flow reactor.

- Development of continuous-flow amidation system

We developed the micro-flow reactor system that enabled precise temperature control. The reactor is highly resistant to variety of chemicals. We developed special temperature sensor and achieved accurate measurement of the temperature of reaction mixtures in the micro-flow reactor.

- In-line measurement of the yield of the desired peptides

In order to achieve in-line real-time monitoring of the yield of the desired peptides, we tried to detect the desired peptide in the reaction mixture by using NIR analysis. We successfully identified the absorption wavelength that is attributable to the change of the amount of the desired peptide. The obtained results paved the way for real time in-line monitoring of the amidation.