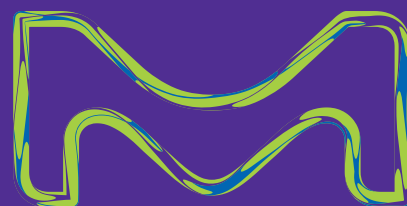


Novabiochem® NEWS



アスパルトイミド形成 対策特集

contents

1 アスパルトイミド形成の問題点

- ・アスパルトイミド形成反応について
- ・検知が難しい副生成物
- ・シーケンスに依存するアスパルトイミド形成の傾向

2 アスパルトイミド形成を防ぐためのアミノ酸製品

- ・Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH
- ・Fmoc-Asp(OEpe)-OH および Fmoc-Asp(OBno)-OH

3 アスパルトイミド形成に対する効果の検証

- ・OEpe 基による効果の検証
- ・マイクロ波合成における効果の検証
- ・OBno 基による効果の検証
- ・酸性調整剤による効果の検証

Fmoc アミノ酸によるペプチド固相合成 (SPPS) における問題の一つに、Asp 残基におけるアスパルイミド形成があります。この問題の本質は、副反応により生成した不純物ペプチドの同定が極めて難しい点にあります。本号では、このアスパルトイミド形成反応やその問題点を解説し、これらを解決する製品を紹介いたします。

アスパルトイミド形成反応について

Fmoc アミノ酸によるペプチド固相合成 (SPPS) において、ペプチド鎖の Asp 残基に悪影響を及ぼす副反応はアスパルトイミド形成です。これは、 α -カルボキシル結合上の窒素元素と β -カルボキシル側鎖に形成される閉環反応で、エステル保護基が脱離してしまいます (Figure 1) [1,2]。特に Fmoc SPPC においては、Fmoc 保護基を外すためのピペリジンや DBU 等の強塩基を使用する際に環化が起こってしまうため、大きな問題となります [3-6]。

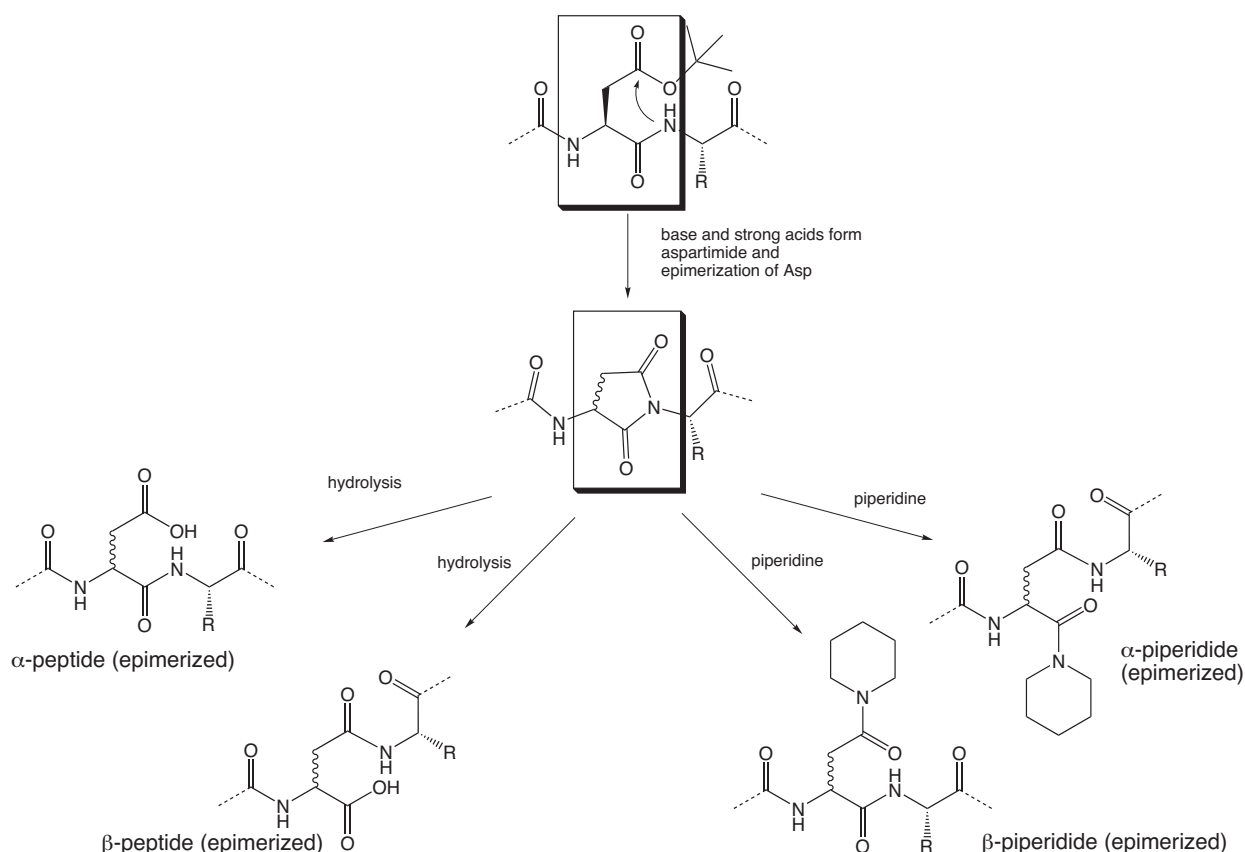


Figure 1: アスパルトイミド形成に伴う副生成物

形成されたアスパルトイミドは、水分存在下や塩基性環境下で容易に開環することでエピマー化し [7]、様々な副生成物を生成します。水分の存在下では、 β -アスパルチルペプチドと α -アスパルチルペプチドの比率は約 3:1 になります [8]。ピペリジンによる開環反応は α -、 β -ピペリジドの混合物となり、質量分析による測定では目的のペプチドよりも大きなピークとなっています。多くの場合、副反応により生成されるアスパルトイミドや α -および β -ピペリジドは、HPLC により容易に目的ペプチドから分離することができます。一方で、 β -アスパルチルペプチドとエピマー化した α -アスパルチルペプチドは、HPLC によるピークが目的ペプチドと重なってしまい、分離不可となるケースが多く見受けられます。加えて分子量が目的ペプチドと同じため、これらの副生成物の存在を検知することは極めて困難です。

検知が難しい副生成物

副生成物検知の難しさは Figure 2 にて説明されます。Figure 2 はレジンから切り出し直後のクールド状態における (Gly2)-GLP-2 (短腸症候群治療剤：Teduglutide) の HPLC 分析結果です。アスパルトイミドは切り出し直後には明らかに存在しますが、水性溶媒中では開環反応により L/D-β-アスパルチルおよび D-アスパルチルペプチドとなり、目的ペプチドのピークに隠れてしまいます。この場合、主成分として単離された単一ピークには、アスパルトイミド関連副生成物が約 15% も含まれています。

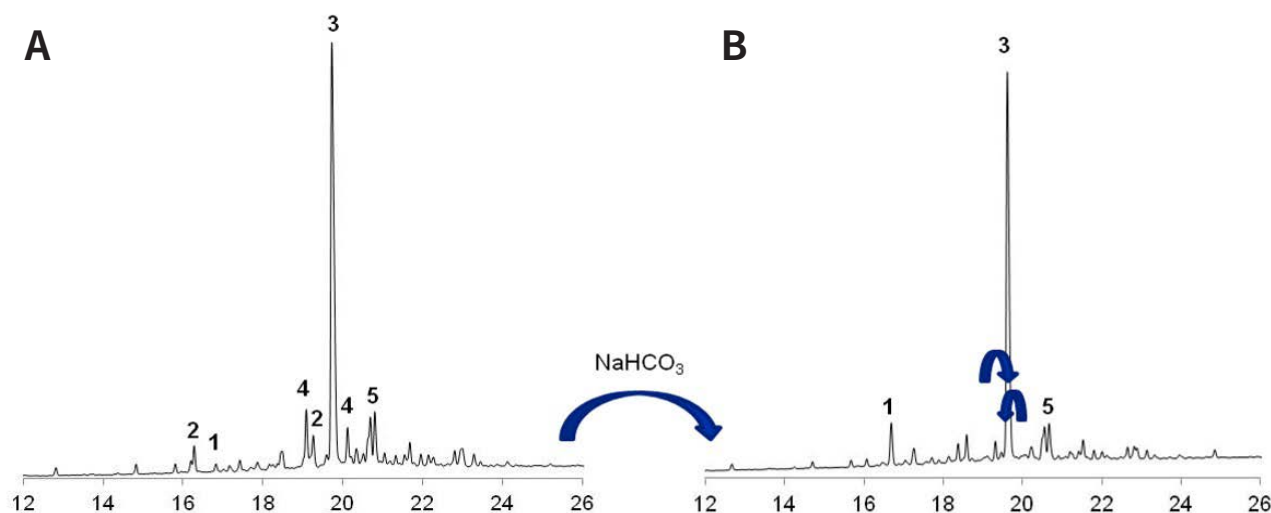


Figure 2: (Gly2)-GLP-2 (短腸症候群治療剤：Teduglutide) の HPLC 分析結果

A) 切り出し直後、B) pH7.5 の水系バッファー溶解直後

ピーク番号: 2) イソアシルペプチド, 3) 目的ペプチド, 4) D/L-アスパルトイミド類, 5) D/L-α/β-ピペリジド類

つまり、アスパルトイミドの形成や、β-アスパラチルペプチドおよびエピマー化した副生成物が HPLC 分析における生成物ピークの下に隠れてしまうため、副生成物の同定は難しいと言えます。従ってアスパルトイミド形成を最小限に抑えるペプチド合成法は、高収率で均一な Asp 含有の目的ペプチドを得るための前提条件といえるでしょう。

シーケンスに依存するアスパルトイミド形成の傾向

アスパルトイミド形成の傾向は、Asp 残基の手前のアミノ酸の種類に依存します (Table 1)。さらに、ペプチドのシーケンスや高次構造の影響を受けます。

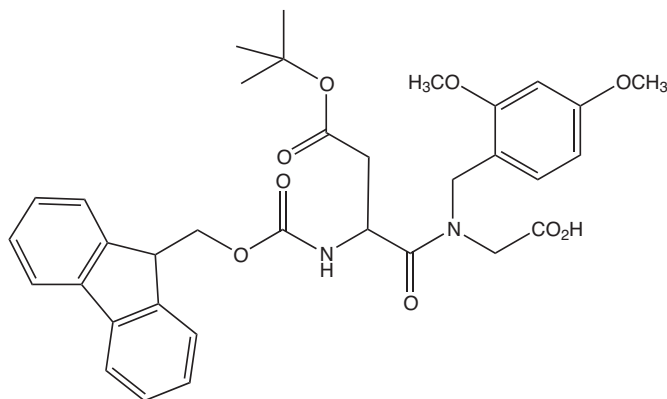
Table 1: 塩基処理下における Asp-Aaa 配列のアスパルトイミド形成の傾向 [2,4,6,9]

アミノ酸	アスパルトイミド形成の傾向
Ala	+
Arg(Pbf)	++
Asp(OtBu)	+++
Asn(Trt)	+++
Cys(Acm)	++
Cys(Trt)	+
Gly	++++

Asp-Gly 配列を含むペプチドは特にアスパルトイミド形成を起こしやすく、Fmoc 脱保護サイクルあたり約 0.5% 程度発生すると想定されています [10]。アスパルトイミド形成の度合いはピペリジンとの接触時間に依存するため、潜在的にアスパルトイミド形成を起こしうる部位が 2 箇所以上ある配列、および、長鎖ペプチドにおいて深刻な問題です。また、塩基として BDU を使用した場合、ピペリジン使用時よりもアスパルトイミド形成が進行することが知られています [11]。

アスパルトイミド形成を防ぐための アミノ酸製品

Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH



製品名	容量	カタログ番号
Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH	1g 5g	852115

ペプチド合成中にアスパルトイミド形成を防ぐ有効な方法は、 α -カルボキシルアスパルトイミド結合の一時的な保護でしょう [10,12]。最もアスパルトイミド形成が起こりやすい Asp-Gly 配列を含むペプチドに対して、予め問題となる部分を保護したビルディングブロックが、Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH [13] です。このジペプチド化合物は一般的なカップリング方法を用いて、一反応で二つの残基をペプチド鎖に導入することができます。また、このようなジペプチド化合物は、ペプチド鎖を伸ばす際に凝集を起こりにくくする作用もあります (Figure 3)。

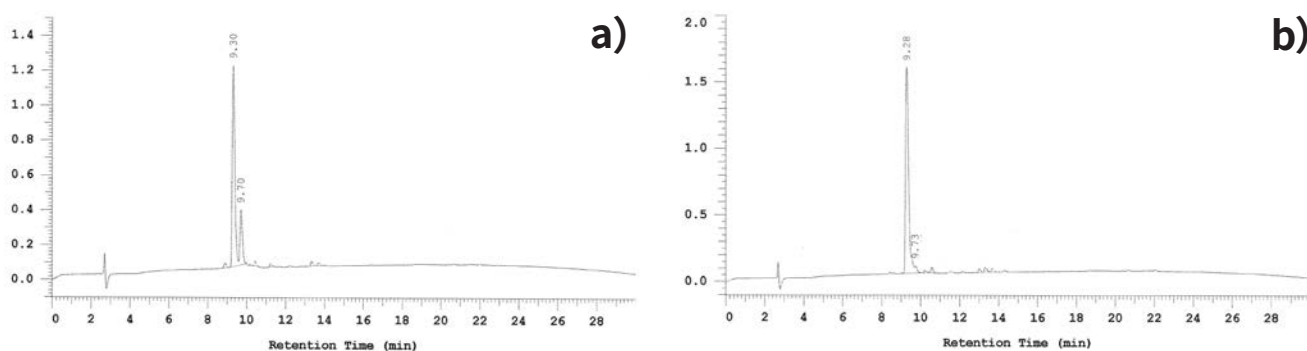
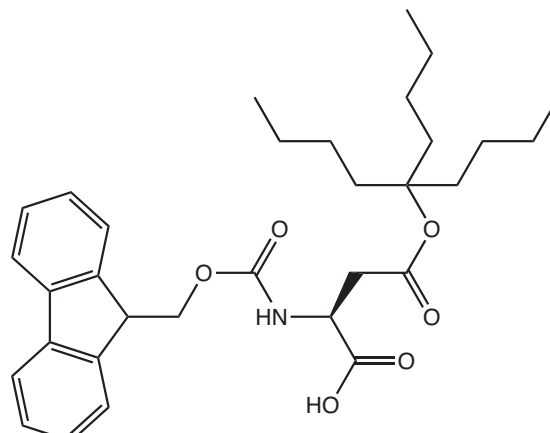
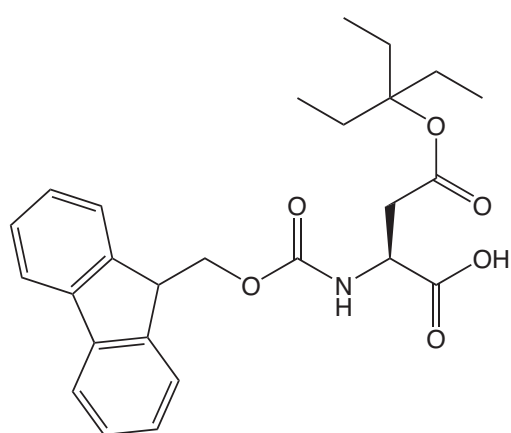


Figure 3 : H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Leu-OH の HPLC チャート a) 通常のアミノ酸を用いて合成 ; b) Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH を用いて合成

ジペプチド化合物を使用しない方法としては、後述する Fmoc-Asp(OBno)-OH も効果的です。他の Asp 含有ペプチドについては、Hmb- アミノ酸を用いることで α -カルボキシルアスパルチルアミド結合に保護基を導入する方法が考えられます。しかしながら、Hmb 誘導体にはアシル化の問題が避けられません。反応をトレースすることが難しく、特殊なアシル化反応条件の検討が必要になるからです。代替として、後述する Fmoc-Asp(OEpe)-OH を用いる方法が効果的です。

Fmoc-Asp(OEpe)-OH および Fmoc-Asp(OBno)-OH



製品名	容量	カタログ番号
Fmoc-Asp(OEpe)-OH NEW	1g 5g	852401
Fmoc-Asp(OBno)-OH NEW	1g 5g	852418

Fmoc-SPPS におけるアスパルトイミド形成を防ぐ簡便かつ有効な手段として、汎用的な Fmoc-Asp(OtBu)-OH におけるセーブチル基の部分を嵩高くし、立体障害を大きくする方法が考えられます。こうして Fmoc-Asp(OEpe)-OH および Fmoc-Asp(OBno)-OH が開発されました。これらの保護基により、アスパルチル β-カルボニル基の反応を抑えることで、アスパルトイミド形成による副生成物の生成を抑える効果があります。

NEW

新製品ファインダー

メルクとシグマアルドリッチの新製品をキーワードで検索できる Web サイトです。

Novabiochem® の新製品も要チェック！

ブランド別に探す

Cerilliant	19
Novabiochem	16
Sigma	6,515
Sigma-Aldrich	66
Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	17

Novabiochem製品はココをクリック！

<https://www.sigmaaldrich-jp.com/>

または 新製品ファインダー 検索

アスパルトイミド形成に対する効果の検証

OEpe 基による効果の検証

Fmoc-Asp(OEpe)-OH のアスパルトイミド形成抑制効果は、Asn および Arg を含む確立されたモデルペプチドである、サソリ毒素 (H-Val-Lys-Asp-Asn-Tyr-Ile-OH, H-Val-Lys-Asp-Arg-Tyr-Ile-OH) にて検証されています。この毒素はアスパルトイミド形成がしやすい Asp(OtBu)-Asn(Trt) および Asp(OtBu)-Arg(Pbf) の配列を有します。このペプチド合成における Asp 残基導入に、Fmoc-Asp(OtBu)-OH や Fmoc-Asp(OMpe)-OH[14]、または、Fmoc-Asp(OEpe)-OH が使用されています。TFA による切り出しの前に、レジンに 20% ピペリジン DMF 溶液にて 18 時間処理し、約 100 回に相当する脱保護サイクルの影響をシミュレートしています。

Figure 4 は H-Val-Lys-Asp-Asn-Tyr-Ile-OH 合成のクールド状態の HPLC 分析結果です。Fmoc-Asp(OtBu)-OH を用いて合成したペプチドでは、目的ペプチドの含量は低く、ピペリジドおよびアスパルトイミド類が主要成分になっています。この結果はアスパルトイミドの脱保護サイクルあたり約 1.5% に相当します。一方で、Fmoc-Asp(OEpe)-OH を用いて合成した場合、アスパルトイミド形成による副生成物を劇的に減少させ、脱保護サイクルあたりわずか 0.2% 程度まで抑制することができました (Table 2)。

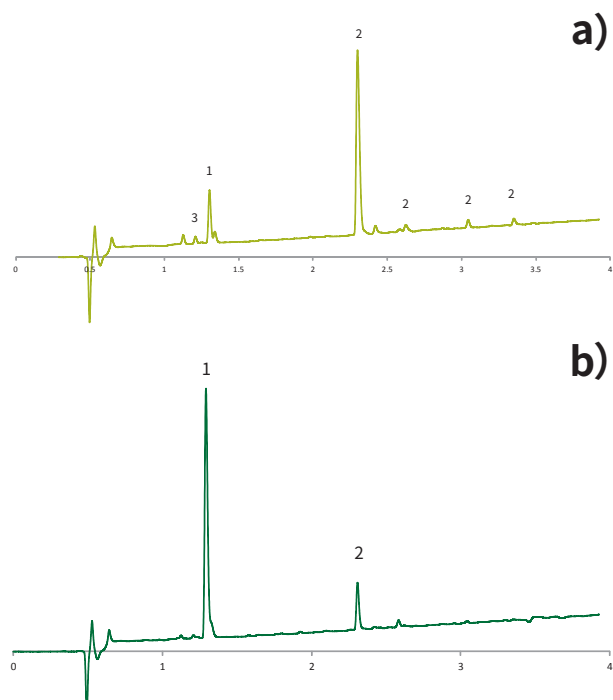


Figure 4 : a) Fmoc-Asp(OtBu)-OH を使用、b) Fmoc-Asp(OEpe)-OH を使用し合成した H-Val-Lys-Asp-Asn-Tyr-Ile-Wang resin における 20% ピペリジン DMF 溶液にて 18 時間処理後の HPLC チャート比較
ピーク番号: 1) 目的ペプチド, 2) ピペリジド類, 3) アスパルトイミド

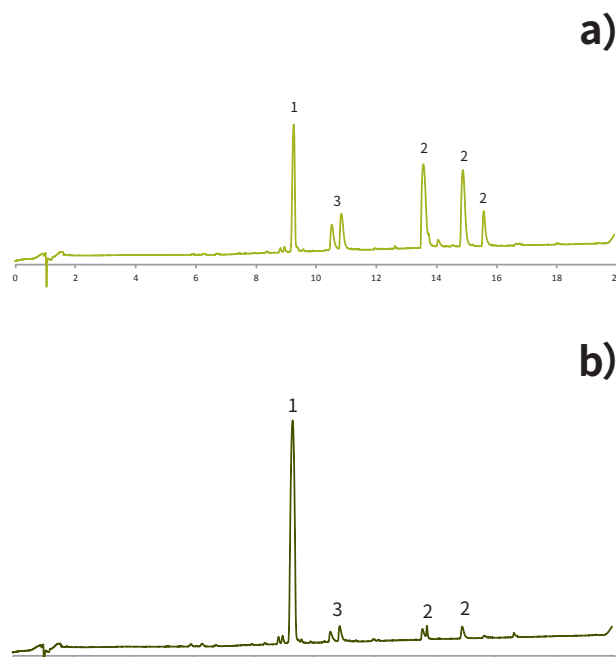


Figure 5 : a) Fmoc-Asp(OtBu)-OH を使用、b) Fmoc-Asp(OEpe)-OH を使用し合成した H-Val-Lys-Asp-Arg-Tyr-Ile-Wang resin における 20% ピペリジン DMF 溶液にて 18 時間処理後の HPLC チャート比較
ピーク番号: 1) 目的ペプチド, 2) ピペリジド類, 3) アスパルトイミド

モデルペプチドである H-Val-Lys-Asp-Arg-Tyr-Ile-OH においても同様の結果が得られています (Figure 5)。OtBu 保護体を用いた場合、アスパルトイミド形成は脱保護サイクルあたり約 1.4% 程度です。一方で、OEpe 保護体を用いた場合は、脱保護サイクルあたり僅か 0.18% まで抑制しています。

マイクロ波合成における効果の検証

SPPS におけるマイクロ波合成は、長鎖ペプチド合成においてカップリング反応や脱保護反応を加速し、反応時間を短縮し、高い収率につながるため、純度の高いペプチドの合成に適しています [15]。しかしながら、実際にはアスパルトイミド形成に由来する副生成物が多く発生してしまいます [16]。マイクロ波合成時における、Fmoc-Asp(OEpe)-OH の効果を検証するため、モデルペプチドであるサソリ毒素について、対応する保護基をもつペプチドが固定化されたレジンを、20% ピペリジン DMF 溶液にて 60℃で 200 分処理し、約 100 回に相当する脱保護サイクルの影響をシミュレートしました。すると、それぞれの Asp-Asn / Arg 配列について、Asp(OEpe) 誘導体で優位な改善が見られました。アスパルトイミド副生成物は、Asp-Asn および Asp-Arg について、それぞれ 0.27% および 0.18% まで劇的に低下しました (Figure 8)。

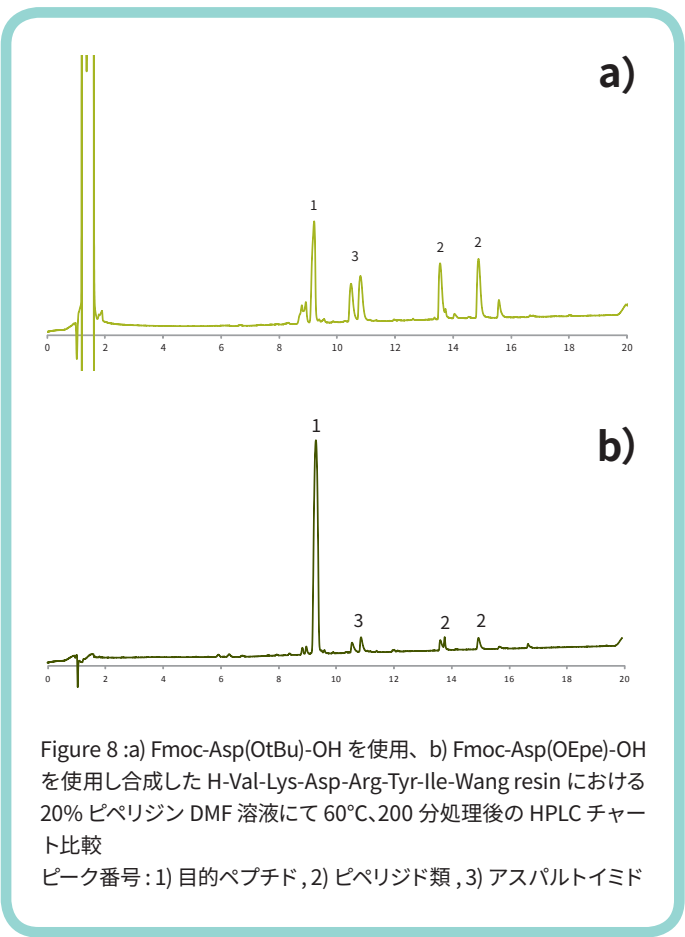


Table 2 : H-Val-Lys(Boc)-Asp(OR)-Aaa-Tyr(tBu)-Ile-Rink Amide resin を 20% ピペラジン DMF 溶液にて室温または 60℃にて処理した場合の、脱保護サイクルあたりのアスパルトイミド形成

アミノ酸	反応温度	側鎖保護基 (OR)	脱保護サイクルあたりのアスパルトイミド形成 (%)
Asn(Trt)	室温	Epe	0.2
		Mpe	0.4
		tBu	1.5
Arg(Pbf)	室温	Epe	0.18
		tBu	1.4
Arg(Pbf)	60℃	Epe	0.18
		tBu	1.3
Asn(Trt)	60℃	Epe	0.27
		tBu	1.6

OBno 基による効果の検証

Fmoc-Asp(OBno)-OH のアスパルトイミド形成抑制効果は、最もアスパルトイミド形成が起こりやすい Asp-Gly を含むシーケンスにおいて検証しました。Asp-Gly を含むモデルペプチドとして、サソリ毒 (H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH) のシーケンスを使用しています [17]。モデルペプチドにおける Asp 残基の導入に、それぞれ Fmoc-Asp(OtBu)-OH および Fmoc-Asp(OMpe)-OH、そして Fmoc-Asp(OBno)-OH を用いて合成しました。TFA による切り出しの前に、20% ピペリジン DMF 溶液で 18 時間処理し約 100 回の脱保護プロセスをシミュレートすることで、その効果を比較しました。

Figure 6 はクルード状態における H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH の HPLC 分析結果です。Fmoc-Asp(OtBu)-OH を用いて合成したペプチドは、目的ペプチドの含量は少なく、ピペリジド類やアスパルトイミド類のピークが多く見られます。脱保護サイクルあたりのアスパルトイミド形成は約 2.23% という結果です (Table 3)。Fmoc-Asp(OBno)-OH を用いて合成した場合、アスパルトイミド形成による副生成物は大幅に減少し、脱保護サイクルあたり 0.14% 程度まで下がりました (Table 3)。この結果から、Asp-Gly シーケンスを含むペプチド合成には本化合物が最適であることが示されました。

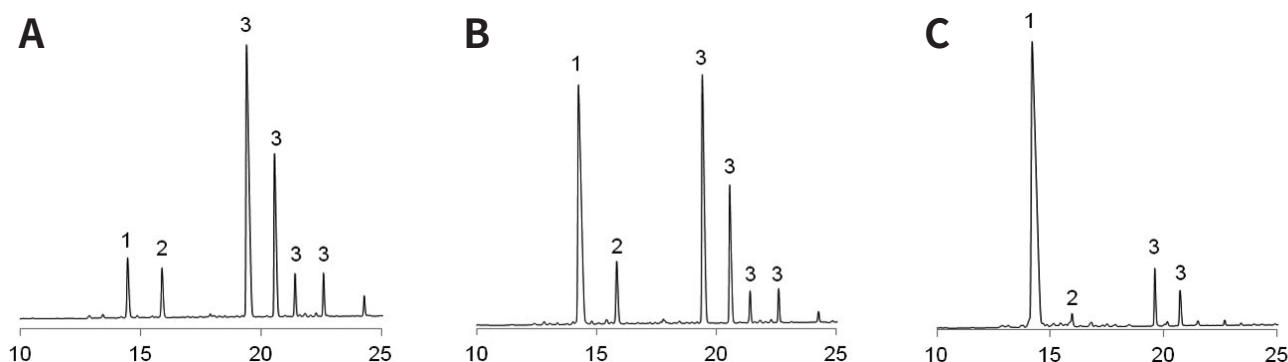


Figure 6: H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH の HPLC 分析結果; A)Fmoc-Asp(OtBu)-OH, B)Fmoc-Asp(OMpe)-OH, C)Fmoc-Asp(OBno)-OH を用いて合成後、20% ピペリジン DMF 溶液にて 18 時間処理
ピーク番号: 1) 目的ペプチド, 2) ピペリジド類, 3) アスパルトイミド

酸性調整剤による効果の検証

Fmoc 脱保護に使用するピペリジン溶液において、酸性調整剤を添加しアスパルトイミド形成を抑制する手法 [18] は、Asp-Aaa アミド結合のイオン化を抑えることが起因していると考えられます。最も頻繁に使用される調整剤は 0.1M HOBT [18], 0.1-1M Oxyma Pure [19], 0.1M ギ酸 [20] の 20% ピペリジン DMF 溶液です。酸性調整剤と OBno 基保護体の併用によるアスパルトイミド形成の抑制効果を検証しました。切り出し前のモデルペプチドを 0.1M および 1M の Oxyma Pure 20% ピペリジン溶液にて 18 時間処理した後、TFA にて切り出しクルード状態で HPLC 測定を実施しました。Asp(OtBu)-Gly シーケンスについて、0.1M および 1M Oxyma Pure 20% ピペリジン溶液は、アスパルトイミド形成を脱保護サイクルあたり、それぞれ 0.67% および 0.46% に減少させました (Table 3)。しかしながら、Oxyma Pure の使用は結果的に不純物を増やすことにつながっています。特に、0.1M Oxyma Pure 20% ピペリジン /DMF 溶液で顕著でした (Figure 7A)。Fmoc-Asp(OBno)-OH を用いて調整したペプチドでは、0.1M または 1M Oxyma Pure 20% ピペリジン /DMF 溶液で処理した後も、アスパルトイミド形成由来の副生成物は確認できませんでした。これは、約 100 回に相当する脱保護サイクルをシミュレートしたことを考えると、非常に驚くべき結果です。Oxyma Pure の反応に関連する副生成物も抑えられていることから、多くの不純物は酸性調整剤とアスパルトイミドとの反応により生じていることが示唆されました。

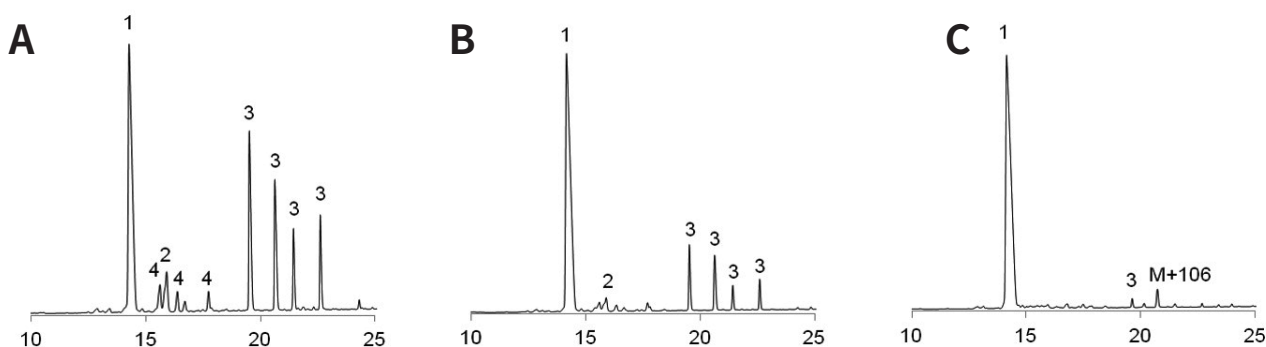


Figure 7 : H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH の HPLC 分析結果 ; A)Fmoc-Asp(OtBu)-OH, B)Fmoc-Asp(OMpe)-OH, C)Fmoc-Asp(OBno)-OH を用いて合成後、0.1M Oxyma Pure の 20% ピペリジン DMF 溶液にて 18 時間処理
ピーク番号 : 1) 目的ペプチド, 2)D/L アスパルトイミド, 3)D/L- α / β - ピペリジド, 4)Oxyma Pure での反応由来の不純物

Table 3 : H-Val-Lys(Boc-Asp(OR))-Aaa-Tyr(tBu)-Ile-Wang resin の 20% ピペリジン DMF 溶液または、Oxyma Pure 20% ピペリジン DMF 溶液処理後の、脱保護サイクルあたりのアスパルトイミド形成

反応条件	側鎖保護基 (OR)	脱保護サイクルあたりのアスパルトイミド形成 (%)
20% piperidine	Bno	0.14
	Mpe	0.77
	tBu	2.23
20% piperidine + 0.1M Oxyma Pure	Bno	0.04
	Mpe	0.24
	tBu	0.67
20% piperidine + 1M Oxyma Pure	Bno	0.02
	Mpe	0.16
	tBu	0.46

4 結論

ペプチド固相合成において問題となるアスパルトイミド形成は、Novabiochem® の提供するアミノ酸製品にて抑制することが可能です。最も問題となる Asp-Gly 含有ペプチドについては、ジペプチドの Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH や、Fmoc-Asp(OBno)-OH を使用することで、ペプチド合成反応中のアスパルトイミド形成に伴う副反応を防ぎます。また、OBno 保護体は、Oxyma Pure に代表される酸性調整剤との併用においても、アスパルトイミド形成を防ぐ効果が検証されています。他の Asp 含有ペプチドについては、Fmoc-Asp(OEpe)-OH の効果が検証されました。OEpe 保護体は、マイクロ波合成において効果的にアスパルトイミド形成を抑える結果が得られています。

Novabiochem の提供するこれらのアミノ酸製品を日常的に用いることで、汎用的な Fmoc アミノ酸を使用することで生成される同定が難しい不純物レベルを大きく下げることが可能となります。Fmoc SPPS の最大の問題であるアスパルトイミド形成による問題を防ぐ有効な方法といえるでしょう。

- [1] G. Barany & R. B. Merrifield in "The peptides, Vol. 2", E. Gross & J. Meienhofer (Eds), Academic Press, New York, 1979, pp. 1-234.
- [2] M. Bodansky & J. Martinez (1978) in "The peptides, Vol. 5", E. Gross & J. Meienhofer (Eds), Academic Press, New York, 1983, pp. 111-216.
- [3] E. Nicolás, *et al.* (1989) *Tetrahedron Lett.*, **30**, 497.
- [4] R. Dölling, *et al.* (1994) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 853.
- [5] Y. Yang, *et al.* (1994) *Tetrahedron Lett.*, **35**, 9689.
- [6] J. L. Lauer, *et al.* (1995) *Lett. Pept. Sci.*, **1**, 197.
- [7] I. Schön, *et al.* (1991) *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 3213.
- [8] J. Orpiszewski, *et al.* (2000) *FASEB J.*, **14**, 1255.
- [9] M. Mergler, *et al.* (2003) *J. Pept. Sci.*, **9**, 518.
- [10] M. Quibell, *et al.* (1994) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2343.
- [11] A. K. Tickler, *et al.* (2001) *J. Pept. Sci.*, **7**, 488.
- [12] L.C. Packman (1995) *Tetrahedron Lett.*, **36**, 7523.
- [13] V. Cardona, *et al.* (2008) *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **14**, 285.
- [14] A. Karlström & A. Undén (1996) *Tetrahedron Lett.*, **37**, 4243.
- [15] M. Erdeyli & A. Gogoll (2002) *Synthesis*, **11**, 1592.
- [16] S. L. Pedersen, *et al.* (2012) *Chem. Soc. Rev.*, **14**, 1826.
- [17] M. Mergler, *et al.* (2003) *J. Pept. Sci.*, **9**, 36.
- [18] J. Martinez & M. Bodanszky (1978). *Int.J.Pept.Protein Res.*, **12**: 277.
- [19] R. Subirós-Funosas, *et al.* (2012) *Biopolymers*, **98**, 89.
- [20] T. Michels, *et al.* (2012) *Org.Lett.*, **14**, 5218.

Novabiochem® のカタログ ダウンロード、
および最新情報はこちら

www.sigma-aldrich.com/novabiochem-jp



Novabiochem の試薬はバルク対応が可能です！

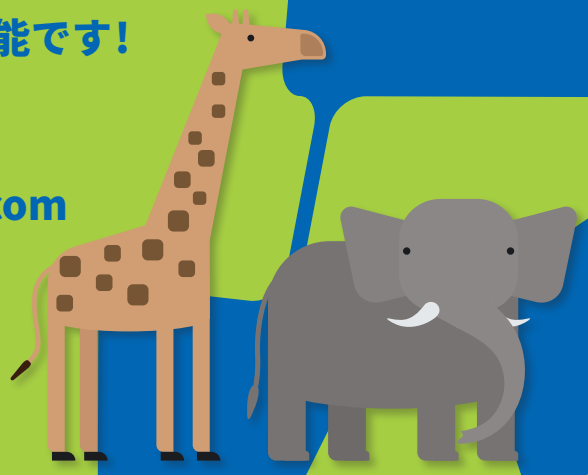
- 原料、試験研究用どちらも対応いたします。
- 商用原料としての供給実績多数ございます。

下記アドレスへお気軽にお問い合わせください。

バルク専用メールアドレス: mj_bulk@sial.com

お問い合わせの際は下記を記載いただけますとスムーズです。

- 用途（原料用、研究用）
- カタログ番号
- 数量
- ご希望の納期
- ご予算



**LINE公式アカウント
はじめました**



**サイエンス系
お役立ちメディア**

M-hub



m-hub.jp



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2018 年 6 月時点の情報です。©2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp/bio

E-mail: jpts@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859