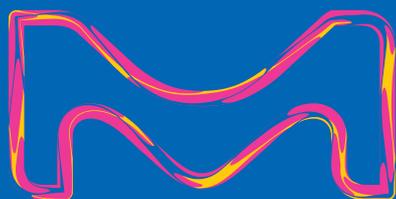


# Novabiochem® NEWS



## システイン型 シュードプロリンジペプチド特集

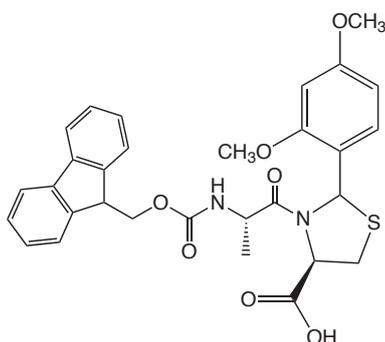
### contents

- 1 Fmoc-Xaa-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}\text{pro}$ )-OH の紹介
- 2 縮合反応中のエピマー化対策
- 3 ペプチド凝集対策
- 4 切出し反応中におけるアルキル化対策
- 5 結論
- 6 製品情報
- 7 参考文献

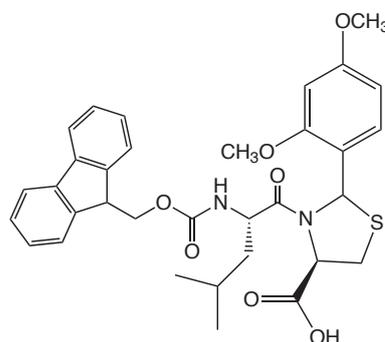
Fmoc アミノ酸によるペプチド固相合成 (SPPS) においては、シーケンス特有の問題があります。Novabiochem では、それらを解決する各種アミノ酸誘導体を開発しています。本号では、システイン含有シーケンスの問題を解決する、システイン型シュードプロリンジペプチドをご紹介します。

# Fmoc-Xaa-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}$ pro)-OHの紹介

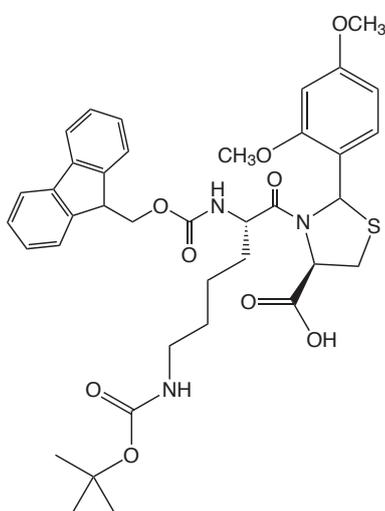
Fmoc-Ala-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}$ pro)-OH



Fmoc-Leu-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}$ pro)-OH



Fmoc-Lys(Boc)-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}$ pro)-OH



Fmoc-Val-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}$ pro)-OH

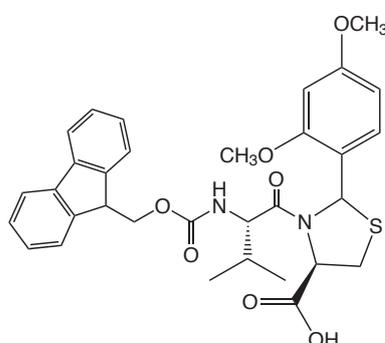


Figure 1 Fmoc-Xaa-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}$ pro)-OH のバリエーション一例

Mutter のシュードプロリンジペプチド [1] は、Fmoc SPPS の合成効率を高める強力なツールです。通常の Fmoc アミノ酸を使用する場合に比べて、シュードプロリンジペプチドを効果的に用いることで、予測不可能なアシル化および脱保護反応を防ぐことができます。結果的に高い収率で溶解性が高い粗生成物が得られることから、HPLC 精製が容易になり収率は改善され、合成の失敗を防ぐことが可能になります。特に合成困難なペプチド [2-5] や、長鎖ペプチド/低分子量タンパク質 [6-13]、および環状ペプチド [14,15] の合成において特に有効であることが証明されています。中には、シュードプロリンを使用しなければ合成不可能だったペプチドの報告例もあります。シュードプロリン誘導体は、Ser, Thr または Cys に続くシーケンスが存在し得ますが、今まで商業的に入手可能なものは Ser 型および Thr 型シュードプロリンジペプチドが中心でした。この度、Novabiochem では Cys 型シュードプロリンジペプチドの販売を開始しました。新たなビルディングブロック選択肢の追加により、Fmoc SPPS での合成の幅を広げましょう。

Cys 型シュードプロリンジペプチドは、Ser 型または Thr 型と同様の反応機構で使用可能です。これらは、PyBOP/DIPEA または DIPCDI/Oxyma Pure などの標準的な縮合剤を用いて反応させることが可能で、Cys 残基に続く残基と共にペプチド配列に導入することが出来ます。チアゾリン環は TFA に対して不安定であるため、切出し反応や脱保護反応時に開環され通常のシーケンスに戻ります。

Cys 型シュードプロリンジペプチドは、標準的なシュードプロリンおよび Dmb ジペプチドと組み合わせて使用することも可能です。ペプチド配列上で 6 残基程度の間隔をあけて使用すると最も効果的であることが、長鎖ペプチドおよびアミロイド生成性ペプチドの合成において極めて有効であることが報告されています。

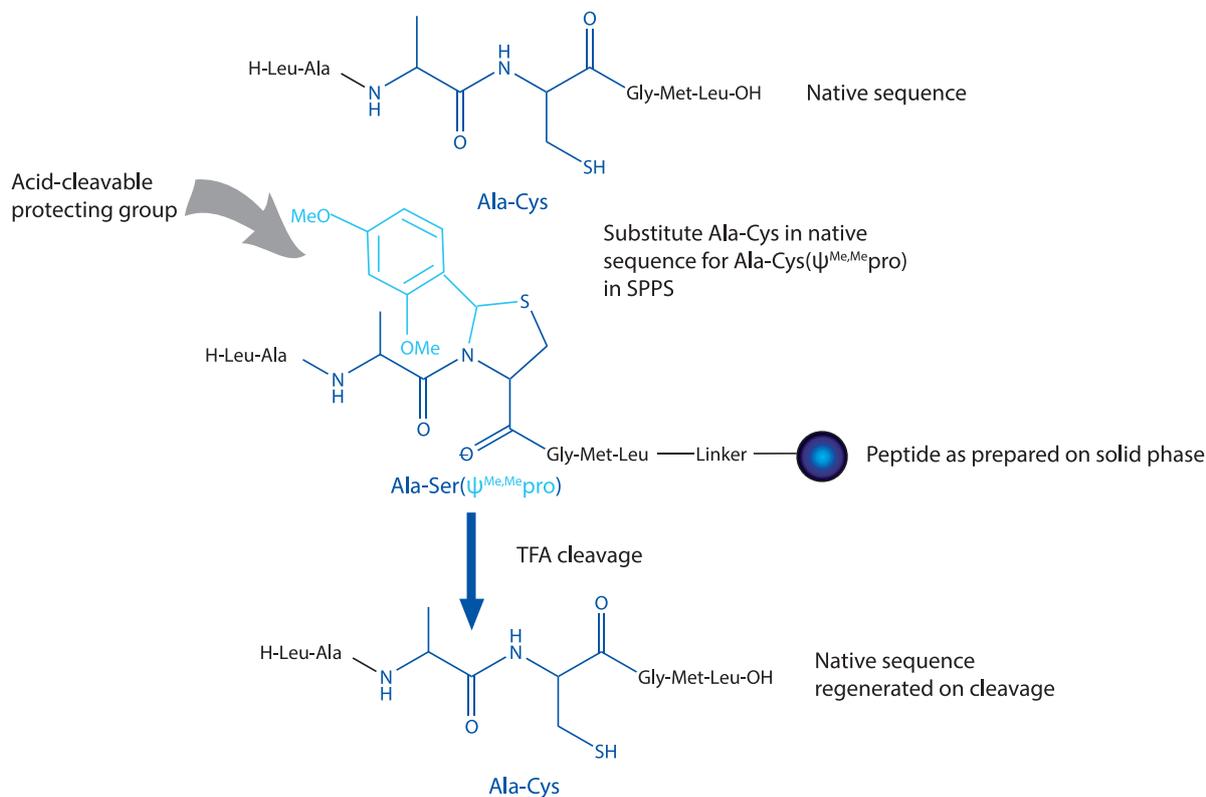
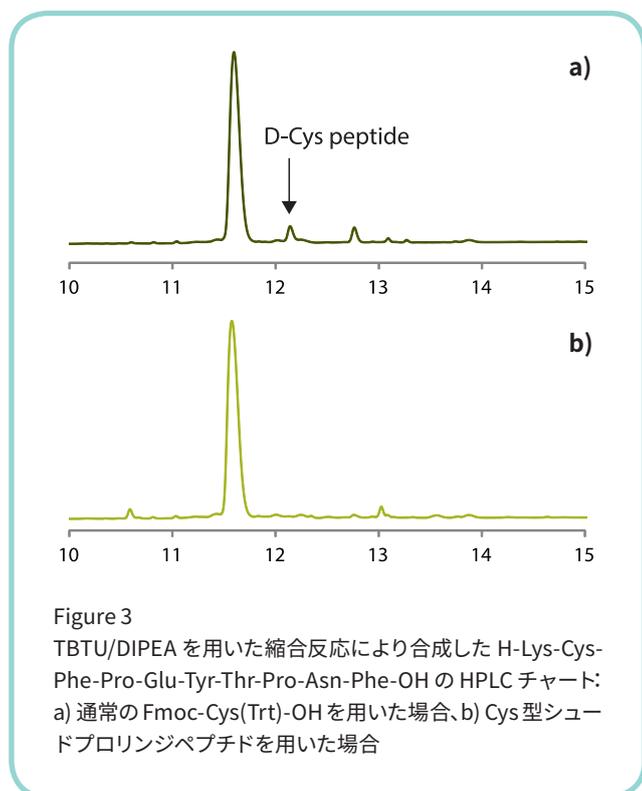


Figure 2 Cys 型シュードプロリンジペプチドの反応機構

## 2 縮合反応中のエピマー化対策

トリチル保護システインは縮合反応時にラセミ化が進行することが知られています。特に、塩基による活性化反応時に顕著です。Cys 型シュードプロリンは通常の Fmoc アミノ酸とは対照的で、Figure 3 に示されるように高いキラル安定性を有しています。



EGF	Peptide purity [% area]	% D-Cys
A	81	3.9
B, TFA/H <sub>2</sub> O/TIPS	47	0.4
B, TFA/H <sub>2</sub> O/EDT	76	0.4
B, TFA/H <sub>2</sub> O/TIPS/EDT	81	0.4

Table 1

目的ペプチド (EGF(36-45)) の純度および D-Cys を含む不純物ペプチドの比較:  
A) Fmoc-Cys(Trt)-OH を用いた場合、B) Cys 型シュードプロリンジペプチドを用いた場合

TBTU/DIPEA を用いた縮合反応により合成した H-Lys-Cys-Phe-Pro-Glu-Tyr-Thr-Pro-Asn-Phe-OH (EGF(36-45)) において、a) Fmoc-Cys(Trt)-OH を用いて合成した場合 3.7% の D-Cys を含むペプチドが生成された一方で (Table 1 A)、Cys 型シュードプロリンジペプチドである Fmoc-Lys(Boc)-Ser( $\Psi^{\text{Dmp,H}}\text{pro}$ )-OH を用いた場合には、D-Cys の発生を 0.4% まで抑えることが出来ました (Table 1 B)。

### 3 ペプチド凝集対策

Ser および Thr 型シュードプロリンが、ペプチド凝集を防ぐことは十分に実証されています。シュードプロリンにおけるジメチルオキサゾリジン環は、cis-アミド結合が優位なことから、ペプチド鎖にねじれを与えます。

システインおよびジメトキシベンズアルデヒドからなるシュードプロリンは、cis-アミド結合を促進する効果が低いことが知られており、凝集の防止において効果が低いと予想されていました。そこで、Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$ ), または Fmoc-Ala-Cys( $\psi^{\text{Dmp,H}}\text{pro}$ )-OH を用いて、難病ペプチドインフルエンザウイルス赤血球凝集素の類似体を調整し、その効果を検証しました。

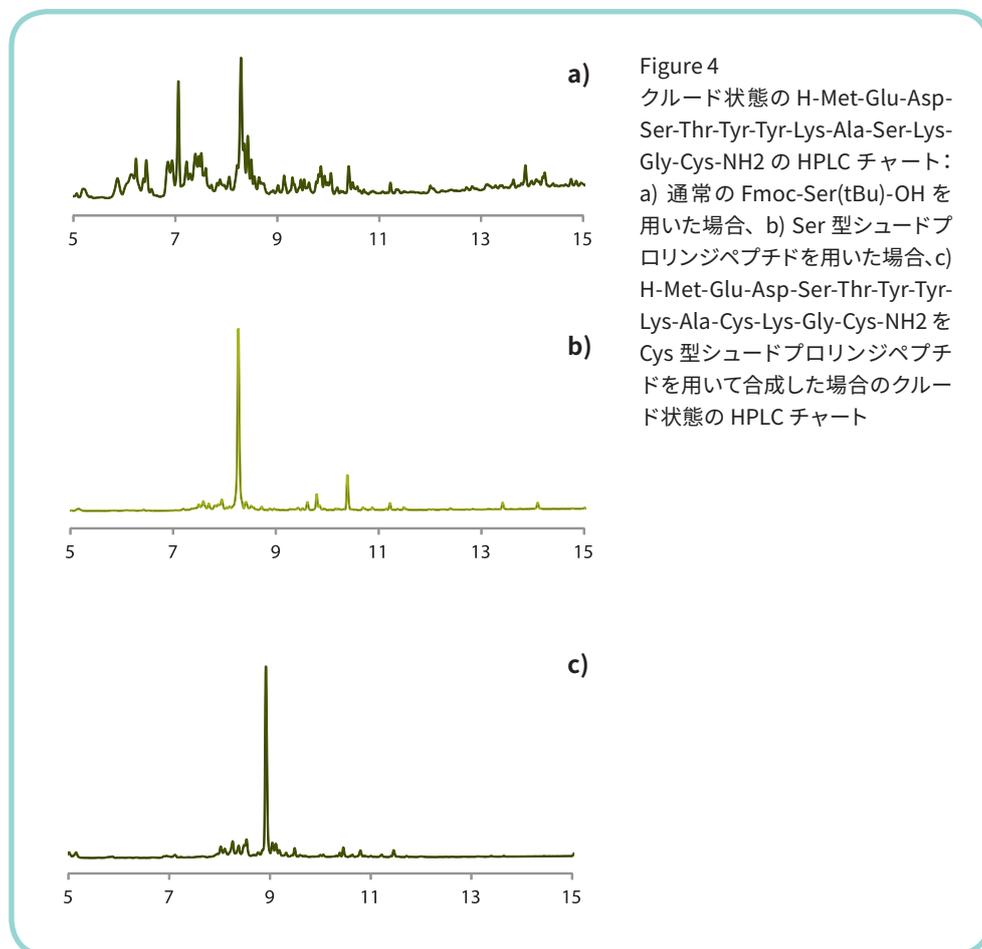


Figure 4 は、これらの合成から得られたクルードペプチドの HPLC チャート比較です。通常の Fmoc アミノ酸である Fmoc-Ser(tBu)-OH を用いて調整したペプチドは多くの不純物を含んでいる (Figure 4a) 一方で、Ser 型シュードプロリンを用いた場合 (Figure 4b) や、Cys 型シュードプロリンを用いて合成した誘導体 (Figure 4c) は、それぞれ不純物の純度を下げています。Cys 型シュードプロリンでもその効果は十分であることが証明されました。

### 4 切出し反応中におけるアルキル化対策

TFA を用いた Cys 型シュードプロリンの開環反応に伴い、反応性が高いジメトキシベンズアルデヒドが発生します。標準的な TFA/TIPS/水混合物による、EGF モデルペプチドの切出し反応に伴い、主に 2 つの副生成物、ジメトキシベンズアルデヒド由来の二量体ペプチドおよびジメトキシベンズアルデヒド付加物が生成されます。切出し反応中の混合物に EDT を添加することで、両方の副生成物の発生を抑え、クリーンな製品を得ることが可能となりました。混合物から TIPS を除き反応を進めても、ジメトキシベンズアルデヒドの発生は抑えられず、結論としては、Cys 型シュードプロリンの切出し反応時は、TFA/TIPS/水/EDT 混合物を使用することが望ましいでしょう (Figure 5、Table 2)。

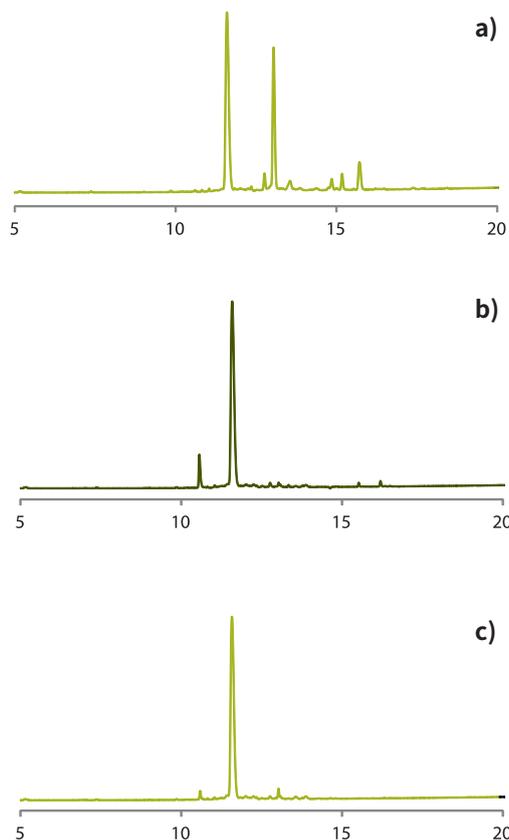


Figure 5  
 クロード状態の H-Lys(Boc)-Cys( $\psi^{\text{Dmp,Hpro}}$ )-Phe-Pro-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Pro-Asn(Trt)-Phe-Wang の HPLC チャート: a) TFA/TIPS/水 (95/2.5/2.5) にて切出した場合、b) TFA/EDT/水 (95/2.5/2.5) にて切出した場合、c) TFA/TIPS/水/EDT (92.5/2.5/2.5/2.5) にて切出した場合

## 5 結論

Cys 型シュードプロリンジペプチドは Cys 含有ペプチドの合成には最適なツールです。通常の Fmoc 保護 Cys に比べて、標準的な反応条件下においてエピマー化発生が抑えられます。Cys 型シュードプロリンは Ser 型/Thr 型シュードプロリンと同様に、長鎖ペプチド合成時における凝集を防ぐ効果を発揮します。切出し反応時における副生成物を抑制するために、反応混合物には EDT および TIPS の添加が有用です。

## 6 製品情報

カタログ番号	製品名	容量
852381	Fmoc-Ala-Cys( $\psi^{\text{Dmp,Hpro}}$ )-OH <b>NEW</b>	1g, 5g
852382	Fmoc-Leu-Cys( $\psi^{\text{Dmp,Hpro}}$ )-OH <b>NEW</b>	1g, 5g
852383	Fmoc-Val-Cys( $\psi^{\text{Dmp,Hpro}}$ )-OH <b>NEW</b>	1g, 5g
852384	Fmoc-Lys(Boc)-Cys( $\psi^{\text{Dmp,Hpro}}$ )-OH <b>NEW</b>	1g, 5g
852175	Fmoc-Ala-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852180	Fmoc-Ala-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852185	Fmoc-Asn(Trt)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852183	Fmoc-Asn(Trt)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852186	Fmoc-Asp(OtBu)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852199	Fmoc-Asp(OtBu)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852190	Fmoc-Gln(Trt)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852198	Fmoc-Gln(Trt)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852177	Fmoc-Glu(OtBu)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852196	Fmoc-Glu(OtBu)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852200	Fmoc-Gly-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852197	Fmoc-Gly-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g

カタログ番号	製品名	容量
852194	Fmoc-Ile-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852193	Fmoc-Ile-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852179	Fmoc-Leu-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852184	Fmoc-Leu-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852178	Fmoc-Lys(Boc)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852191	Fmoc-Lys(Boc)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852195	Fmoc-Phe-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852201	Fmoc-Phe-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852187	Fmoc-Ser(tBu)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852192	Fmoc-Ser(tBu)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852202	Fmoc-Trp(Boc)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852188	Fmoc-Trp(Boc)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852189	Fmoc-Tyr(tBu)-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852182	Fmoc-Tyr(tBu)-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852176	Fmoc-Val-Ser( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g
852181	Fmoc-Val-Thr( $\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	1g, 5g

## 7 文献情報

- [1] a) T. Haack & M. Mutter (1992) *Tetrahedron Lett.*, 33, 1589; b) M. Mutter, et al. (1995) *Pept. Res.*, 8, 145.
- [2] P. White, et al. in "Peptides 1998, Proc. of 25th European Peptide Symposium", Budapest, Akadémiai Kiadó, 1998, pp. 120.
- [3] C. Hyde, et al. (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43, 431.
- [4] R. von Eggelkraut-Gottanka, et al. (2003) *ChemBioChem*, 4, 425.
- [5] F. Shabanpoor, et al. (2007) *J. Pept. Sci.*, 13, 113.
- [6] a) P. White, et al. (2004) *J. Pept. Sci.*, 10, 18; b) P. White, et al. (2003) *Biopolymers*, 71, 338.
- [7] F. García-Martín, et al. (2006) *Biopolymers*, 84, 566.
- [8] S. Abu-Baker & G. A. Lorigan (2006) *Biochemistry*, 45, 13312.
- [9] V. Goncalves, et al. (2009) *J. Pept. Sci.*, 15, 417.
- [10] F. El Oualid, et al. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 10149.
- [11] S. N. Bavikar, et al. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 758.
- [12] P. Nagorny, et al. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 975.
- [13] C. Yves-Marie, et al. (2010) *J. Pept. Sci.*, 16, 98.
- [14] A. Ehrlich, et al. (1996) *J. Org. Chem.*, 61, 8831.
- [15] N. Schmiedeberg & H. Kessler (2002) *Org. Lett.*, 4, 59.

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](http://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](http://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9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](http://www.merckmillipore.jp/bio)

E-mail: [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com)

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