

# 環状ペプチドの効率的合成方法

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本 敏幸



#### 創薬資源として有望な中分子ペプチド

#### 中分子ペプチドの利点

広い認識部位:タンパク質間相互作用(PPI)に有利

合成が簡便:ペプチド固相合成によって調製可能

#### 中分子ペプチドの難点

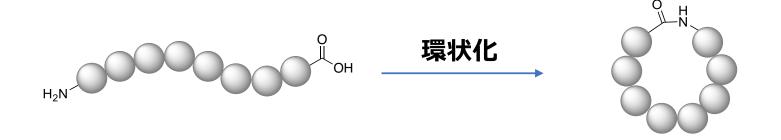
低い細胞膜透過性:細胞内の標的分子への作用困難

低い代謝安定性:代謝酵素による分解



#### 創薬資源として有望な中分子ペプチド

#### 大環状化によって中分子ペプチドの難点を克服



#### 環状中分子ペプチドの利点

細胞膜透過性:細胞内の標的分子への作用

代謝安定性:代謝酵素への抵抗性



#### ペプチド環化反応の問題点

#### 縮合剤によりペプチド環化反応の課題

分子内反応と分子間反応の競合:希釈条件が必要

C末端残基の異性化:望まない副産物の生成

環化点の位置選択性:保護基の着脱が必要

#### 酵素によるペプチド環化反応

#### 効率的なペプチド環化反応を実現

分子内反応が優先して進行する 立体異性体などの副産物が生成しない 保護基を必要とせず、高い位置選択性を実現 穏和な条件下、水系溶媒中で反応が進行する

## 天然物由来の生理活性環状ペプチド

## <u>抗生物質</u>

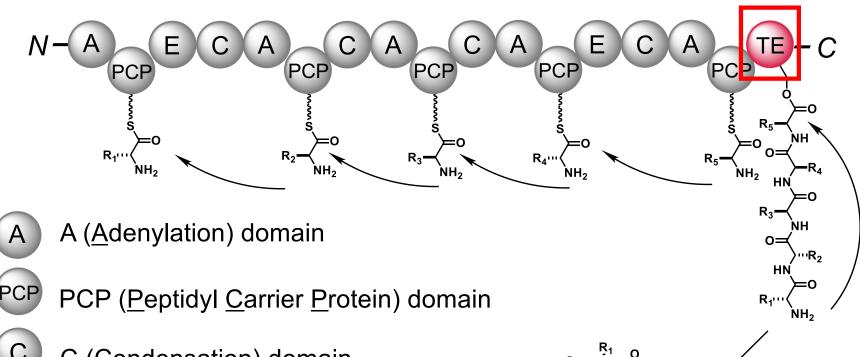
#### bacitracin

СООН

#### 免疫抑制剤

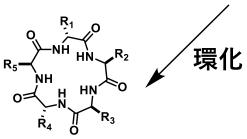
## 非リボソーム環状ペプチド

#### 非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)



- C (Condensation) domain
- TE (ThioEsterase) domain

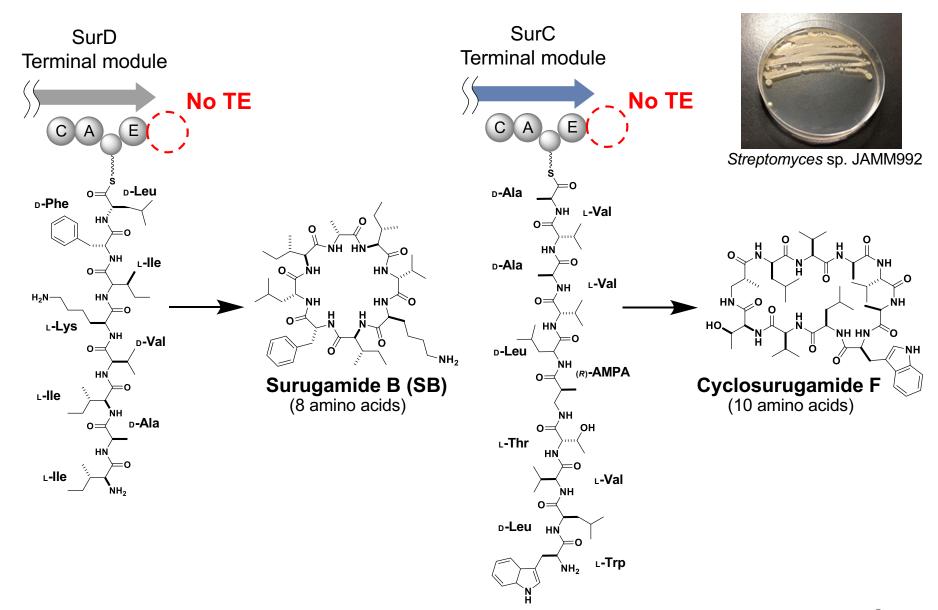
NRPS融合型で狭い基質特異性が課題



環状ペプチド

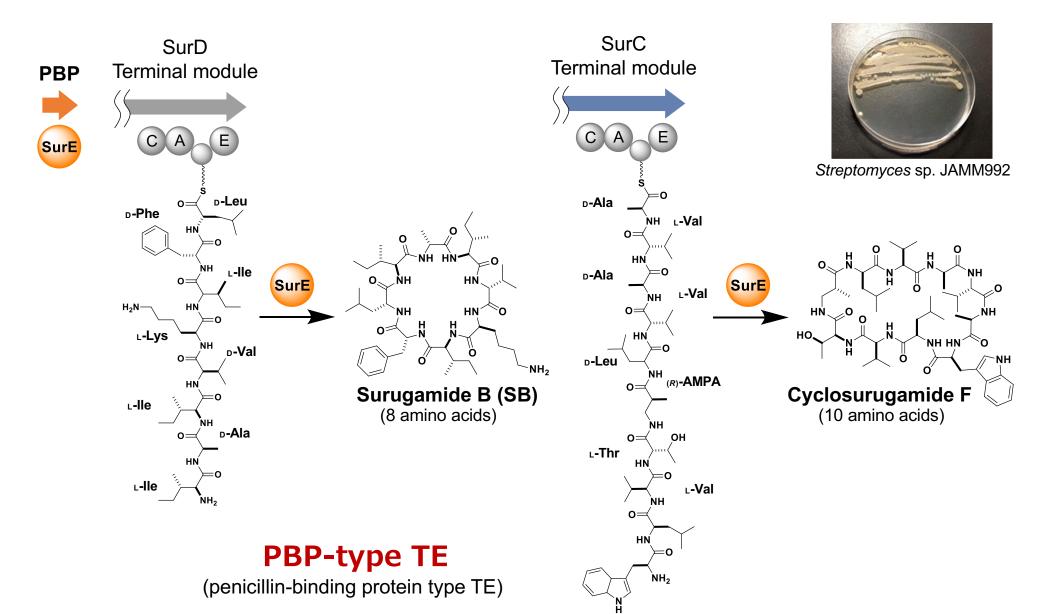


#### 新規非リボソームペプチド環化酵素



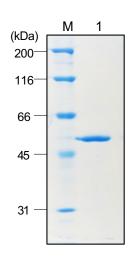


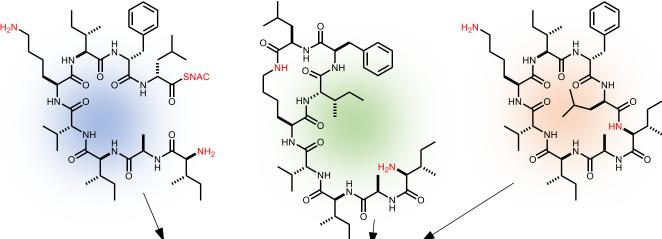
#### 新規非リボソームペプチド環化酵素





## SurEによるペプチド環化反応





#### Reaction mixture

20 mM Tris-HCl pH8.0

1.0 mM SB-SNAC

 $9.0 \mu g$  Recombinant **SurE** 

total

100 μl

↓ 30°C, 2 h

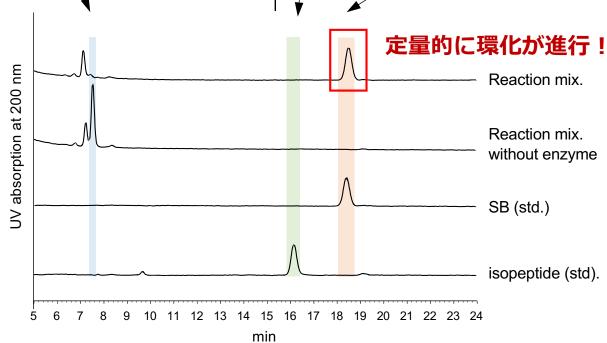
 $\downarrow$  add 100  $\mu I$  of 0.1% TFA

**HPLC** analysis

Colomn: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II

Mobile phase: 41% MeCN + 0.05% TFA

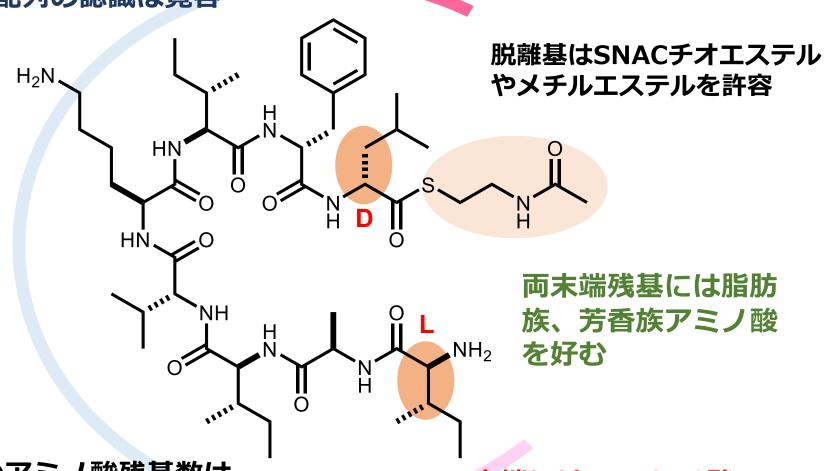
Flow: 0.8 ml/min





## SurEの基質特異性

#### 中央部配列の認識は寛容



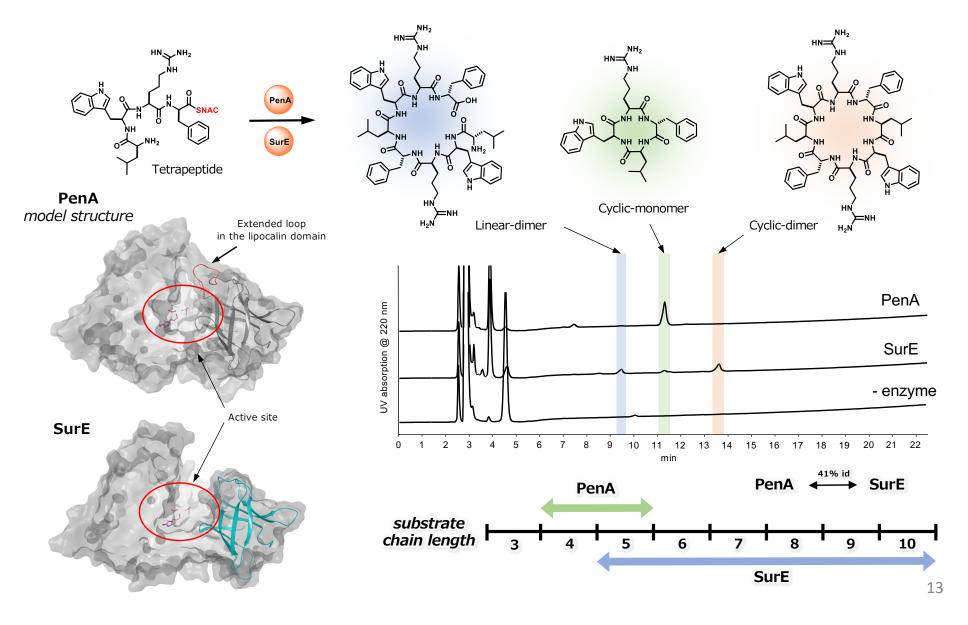
基質のアミノ酸残基数は 4~11残基を許容

C末端にはD-アミノ酸、N末端にはL-アミノ酸を要求



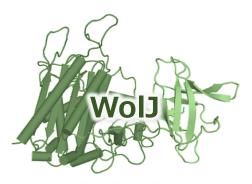
## PenAの基質特異性

#### 短鎖ペプチド基質の環化に特化したホモログ酵素PenA





## **PBP-type TE**



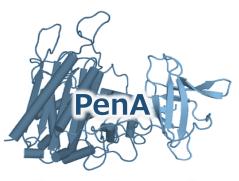
Wollamide

末端が親水性残基のペプチドを環化 「側鎖選択性」



**Desotamide** 

未端がグリシン残基のペプチドを環化「立体選択性」



**Pentaminomycin** 

4 残基の ペプチドを環化 「鎖長選択性」

#### 自然界には多数のSurE類似酵素が存在する

基質結合ポケットの比較

→ 側鎖・立体化学・鎖長に対する選択性の発現メカニズムを解明

→ 論理的な改変によるSurEの改良

適用基質を拡張した改良型生体触媒を開発



## 想定される用途

多様な環状ペプチドを簡便に合成することができる。脱離基を工夫することで、ペプチド固相合成産物から精製工程を経ることなく、直接酵素環化を実現(総収率80%以上)。スケールアップへシームレスに展開可能。環状ペプチドの製造に適用することで酵素反応のメリットを生かすことができる。

ヒット化合物 (環状ペプチド)

#### 創薬シーズの探索

試験管レベルでのペプチド合成技術 多様なペプチドを一挙に合成可能

探索ステージ



環状ペプチド製造技術の確立

新規ペプチド環化酵素 PBP-type TE

プロセスステージ



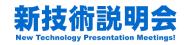


## 実用化に向けた課題

基質選択性の制限を補完できる複数のホモログや機能改変酵素をすでに開発済み。両末端アミノ酸残基への特異性は克服しつつある。

現在のところ大スケールでの反応条件の最適化が未達である。今後、スケールアップに関する実験データを取得し、プロセスレベルに適用していく場合の条件設定を行っていく。

PBP type-TEは環化反応のみならず、ライゲーション反応も触媒可能なことを確認済み。今後の実用化に向けて、さらに詳細な酵素機能解析を実施中。



## 企業への期待

未解決の大スケールでの環化反応の検証については、酵素反応の技術を有する企業との共同研究により克服できると考えている。

酵素反応による製造技術を持つ企業との共同研究を希望。

また、環状ペプチドの製造を検討中の企業、医薬分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。



## 本技術に関する知的財産権

発明の名称:ペプチド類の大環状化酵素

出願番号: 特願2020-518267

出願人: 北海道大学

発明者: 脇本敏幸、倉永健史、松田研一

発明の名称:ペプチド類の大環状化酵素

出願番号: PCT/JP2019/017707

出願人: 北海道大学

発明者: 脇本敏幸、倉永健史、松田研一



#### 産学連携の経歴

2018年

プレスリリース

https://www.hokudai.ac.jp/news/180618\_pr.pdf

**Angew. Chem. Int. Ed.** 57, 9447-9451 (2018)

2020年-2022年 JST A-STEP 育成型に採択

「環状ペプチドの効率的合成方法の開発」

2020年

プレスリリース

https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/200507\_pr.pdf

*Nature Catalysis* 3, 507-515 (**2020**)



## お問い合わせ先

国立大学法人 北海道大学

産学・地域協働推進機構

TEL 011-706 - 9532

FAX 011-706-9550

techtf@mcip.hokudai.ac.jp