

生体トリプトファン残基の 新規選択的修飾法の開発

東京薬科大学 生命科学部
分子生命科学科 創薬化学研究室
(薬学部 薬品化学教室)

教授 林 良雄

2023年8月29日

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : トリプトファン選択的修飾剤、およびこれを用いたTrp-S結合含有化合物の製造方法
- 出願番号 : 特願2022-154918 (2022-09-28 出願)
- 出願人 : 学校法人東京薬科大学[100%]
- 発明者 : 林 良雄 他3名

発明の背景と概要

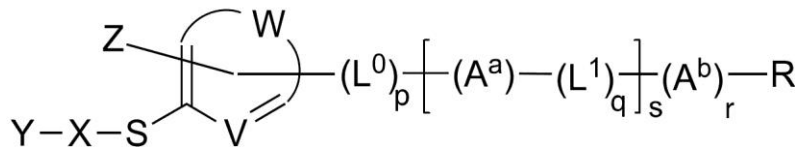
本発明は、**チオエーテル基の存在下で**、タンパク質等の分子中におけるトリプトファン残基を**選択的に修飾する化学式1**で表される、**トリプトファン選択的修飾剤**に関するものである。

トリプトファンは真核生物において全アミノ酸の約1%しか占めていないがほとんどのタンパク質に存在する。そのため、当該残基に対する特異的、選択的な反応は有望な化学修飾法の創製に繋がる可能性がある。トリプトファンは反応性が低いため、修飾するには強酸性、高温、有害な重金属試薬や有機溶媒の使用など過酷な反応条件が必要であり、生体分子への適応は難しいものが多く、また、酸化剤を用いる場合、過酸化体の副生するという課題があった。

本発明は、抗体等の機能性高分子に極力ダメージを与えずに、修飾、機能付加を可能にすることを目的としている。

一般式

[化学式1]



修飾試薬を構造規定
修飾方法を規定

本発明により、従来法のような過酷な反応条件を用いずとも、ペプチドやタンパク質等の分子内に含まれるメチオニン残基の近傍に位置するトリプトファン残基を選択的に修飾すること、およびトリプトファン残基に種々機能性物質を連結する、という大きな特徴を持つ。

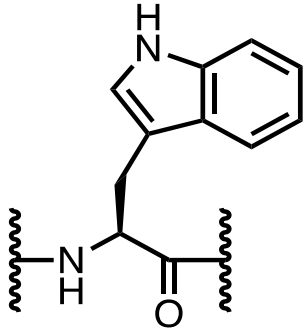
チオエーテル基が近傍に存在
するときだけ

トリプトファン残基を選択的に修飾できる
世界唯一の全く新しい化学修飾法

チオエーテル:メチオニン残基

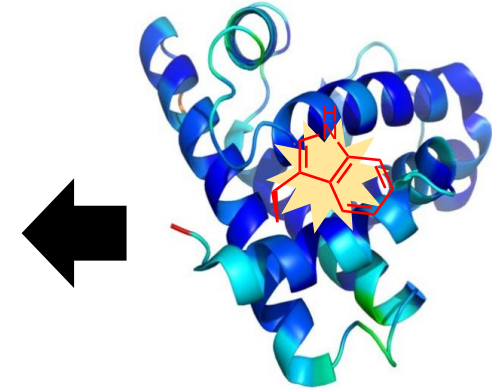
特徴:メチオニンの近傍に位置するトリプトファン
残基に種々機能性物質を連結

トリプトファンの生体分子での位置づけ



Trp

- **ほとんど全てのタンパク質に含まれる**
→ 普遍的な修飾が可能
- 真核生物において**存在割合が約1%程度¹⁾**
→ 非常に少ない → **選択的な修飾ができる**
- 分子内部に存在場合は修飾できない



選択的なタンパク質の化学修飾に利用できる

1) D. Gilis et al., *Genome Biol.*, 2001, 2, research0049.1-0049.12.

Trpを介した化学修飾の標的 (対象)

- **合成したペプチド**
- **組み替えタンパク質**
} 体外
- ✓ 生来の Trp残基を修飾点に利用
- ✓ 合成体 / 組み替え体へのTrpの新たな導入
- 生体内タンパク質 体内
- **天然のインドール化合物** 体外

その応用

- **架橋分子の創製**
抗体薬物複合体
タンパク質薬物複合体
ペプチド薬物複合体
放射性物質複合体
- **創薬・診断薬ツール**
創薬での多様な置換体提供
インドール天然物の標識

タンパク質の化学修飾といえば、Lys, Cysが有名だが、選択的修飾は難しい

創薬技術

ADC調製

薬物

PDC調製

薬物

ペプチド医薬品

ペプチド医薬品への修飾による
新たな機能付与
例) 脂肪鎖の導入
⇒アルブミン親和性向上に伴う
作用の持続化

組み換えタンパク

機能

遺伝子工学技術を応用し、
Trp-Metを挿入した人工タンパクへの修飾

診断技術

蛍光

放射

蛍光分子や放射性タグ修飾による
がん等の診断に

インドール天然物への標識

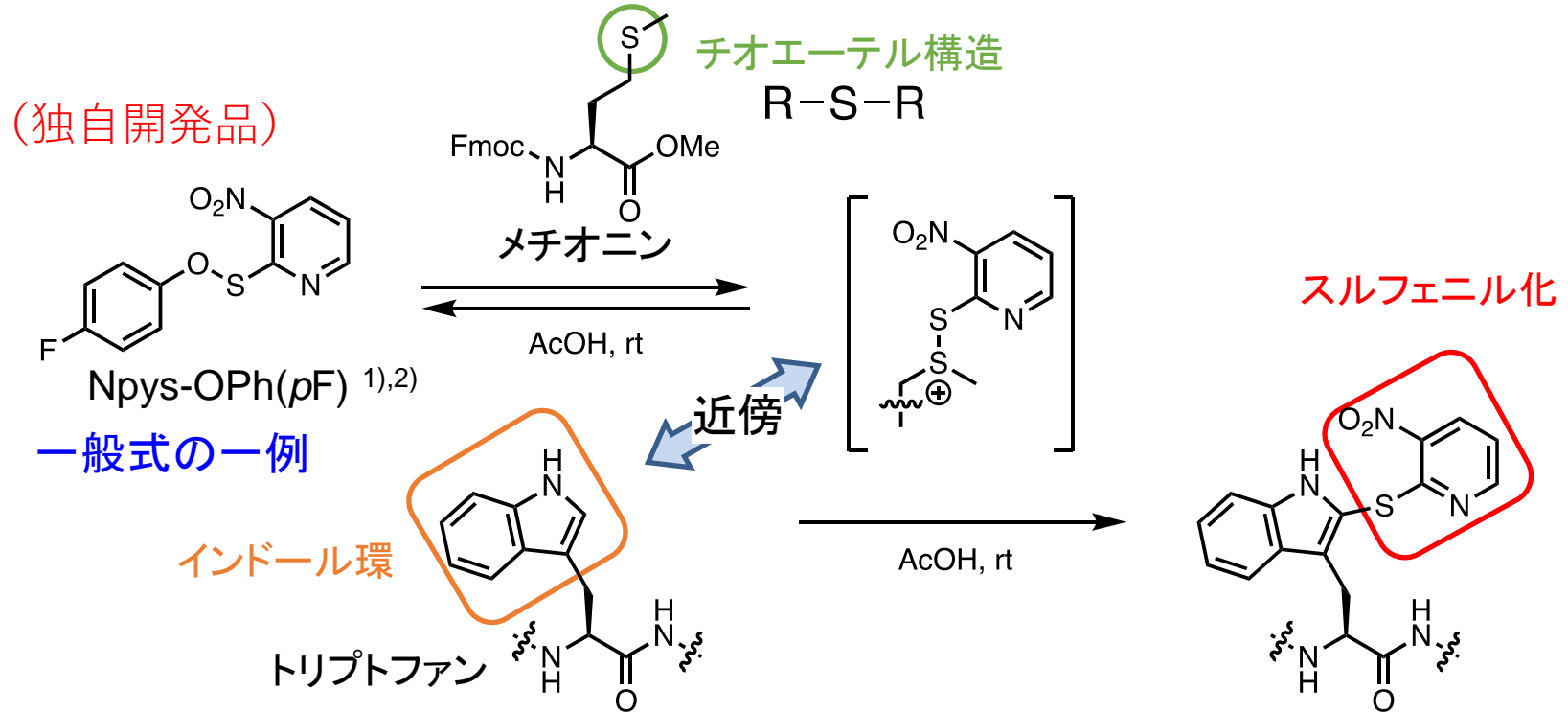
機能

ダプトマイシン

天然物を釣り餌としたケミカルバイオロジー、
多様な置換体の提供に繋がる

なぜチオール選択的なのか？ こんな面白いことができるのか？

チオエーテル依存的なトリプトファン残基インドールの選択的化学修飾法

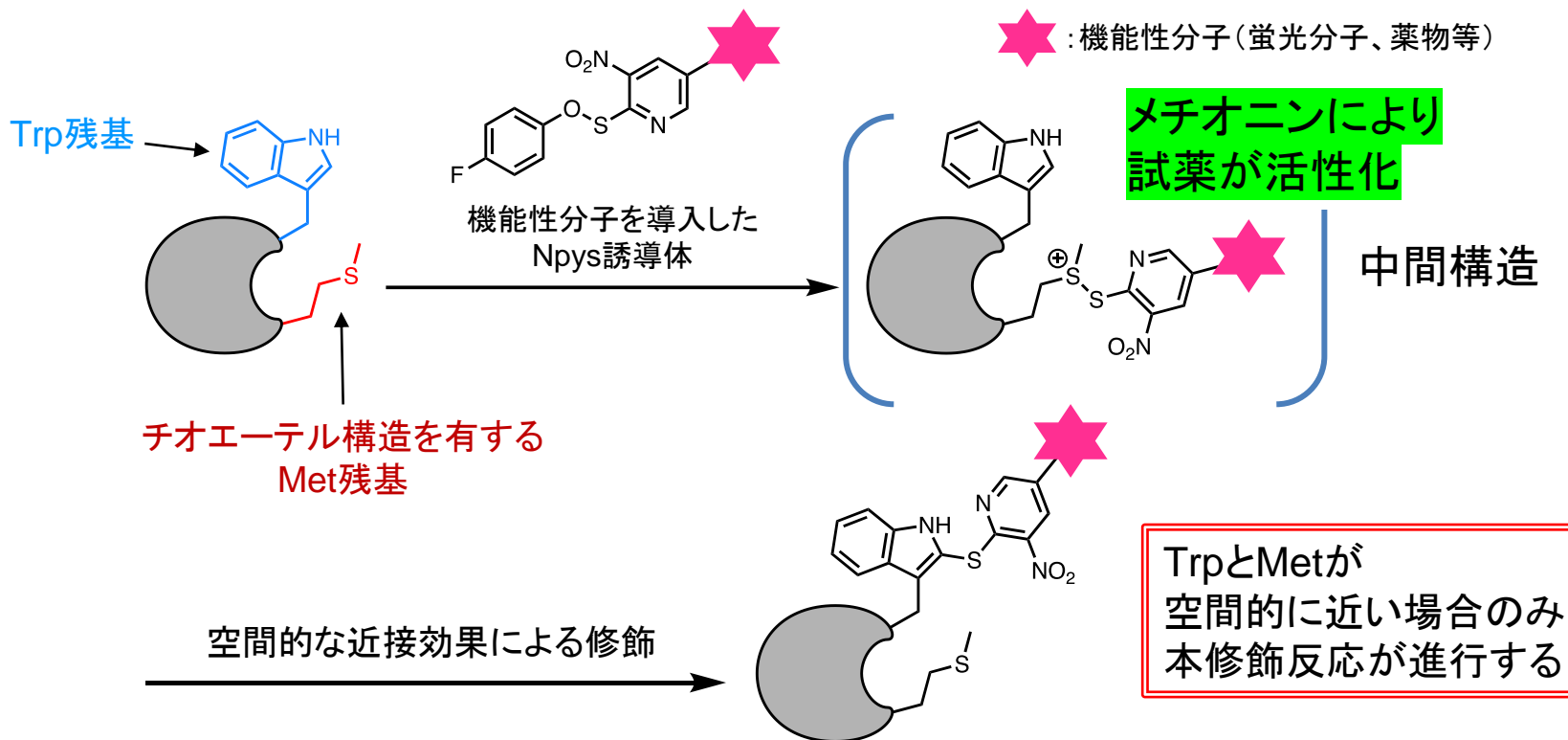


【本技術の特徴】

- 1) スルフェン酸エステルによるチオエーテル依存的Trp残基インドール環のスルフェニル化
- 2) Trp残基に対し、高い反応性、選択性
- 3) 比較的温和な条件で、ペプチド、タンパク質の化学修飾が可能

発明の技術概要②

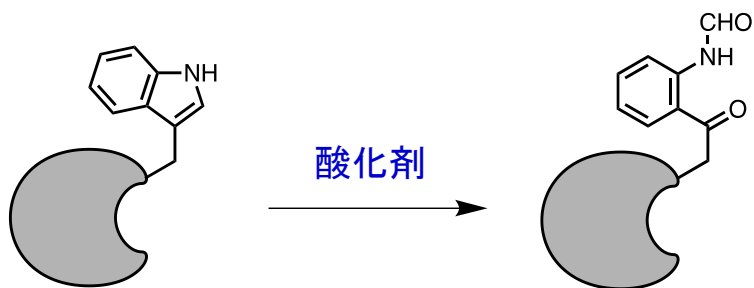
タンパク質・ペプチドにおける空間的に近いメチオニン残基依存的なトリプトファン残基修飾法 (CAMA-Trp modification)



【本技術の特徴】

- 4) メチオニン残基の近傍に位置するTrp残基を選択的に修飾 (CAMA-Trp modification)
- 5) Trp残基に蛍光物質など機能性分子を導入することも可能

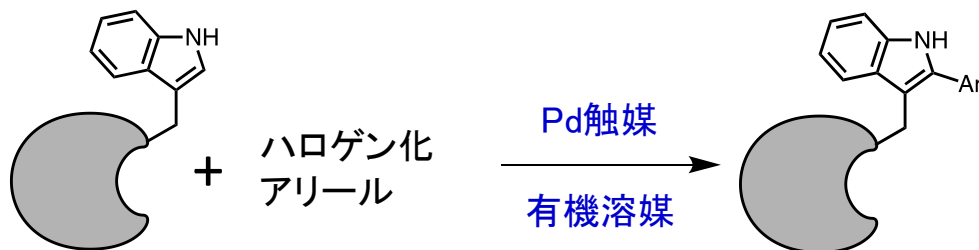
A) 従来法1 (酸化法)¹⁾



過酸化物やMetなど他のアミノ酸残基への副反応があるため、タンパク質などへの適応は困難

1) D. Manzanares *et al.*, *Biochemistry*, **2007**, 46, 5604-5615.

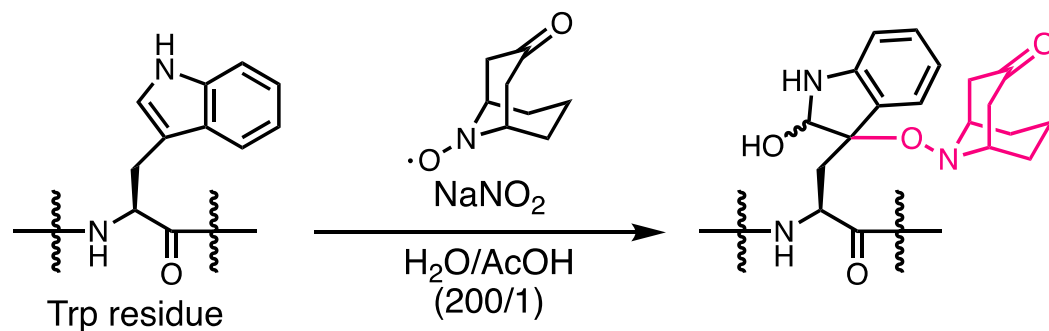
B) 従来法2 (C-H activation法)²⁾



高価で毒性にある重金属触媒を使用し、反応条件が過酷（高温、有機溶媒の使用）であるため、タンパク質などへの適応は困難

2) J. Ruiz-Rodríguez *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 1124-1127.

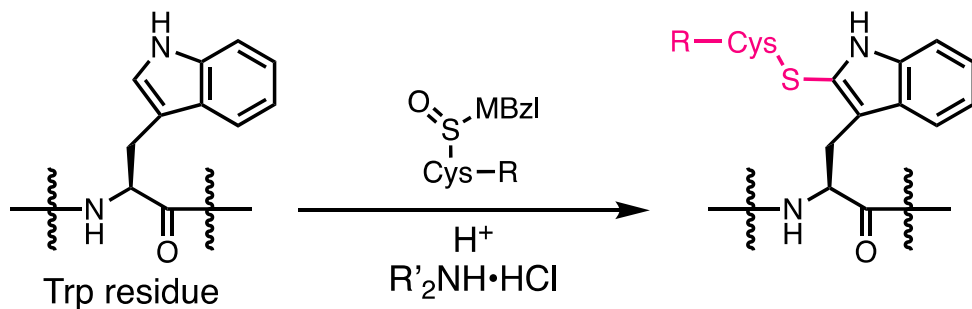
C) 従来法3 (有機ラジカル法)¹⁾



複数のTrp残基に対する選択性に乏しく、タンパク質においては単一の修飾体を得ることができないため、タンパク質などへの適応は困難

1) Y. Seki, M. Kanai *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 10798-10801.

D) 従来法4 (スルフェニル化法)²⁾



強酸条件下(トリフルオロ酢酸)の修飾反応であるため、タンパク質などへの適応は困難

2) D. Kobayashi, A. Otaka *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2022**, 13, 1125-1130.

👉 従来法とは異なる独自かつ効率的なトリプトファン残基化学修飾法の開発が求められる。

本発明の優位性 比較表

	本発明	酸化法	C-H activation 法	有機ラジカル法	スルフェニル化 法
構成	Thioether依存的なNpysによる修飾	H ₂ O ₂ などによるフェント ン反応	金属触媒を用いたアリール 付加反応	keto-ABNOを用いたC-O結 合形成	Cys側鎖スルホ キシドによるTrp のスルフェニル化
得られる 特性	Trp残基上にNpys 基を介した機能性 分子の付与	Trpインドール 環開裂による反応性 基の構築	Trpインドール 環のアリール 化を介した機 能化	タンパク質の Trp選択的バ イオコンジュ ゲーション	Trp-Cys架橋によ る機能性分子の 付与
適用 分野	有機合成 創薬化学 天然物合成 ケミカルバイオロ ジー	生化学 ペプチド タンパク質	有機合成 創薬 医化学	ケミカルバイ オロジー 生物製剤創薬	有機合成 創薬 製剤設計
その他	新規修飾法 新規合成法 位置選択的な制御	酸化的不活 性化	新規アミノ酸 誘導体、修飾 Trpペプチドの 提供	タンパク質中 表面のTrpを 標的	GLP-1の脂質化

本発明の優位性：結論

既存技術

蛋白中の多様なアミノ酸の中で
トリプトファン選択的修飾

本発明

蛋白中の特定のトリプトファン選択的修飾

今は、比類する技術のない
世界唯一の全く新しいTrp選択的化学修飾法

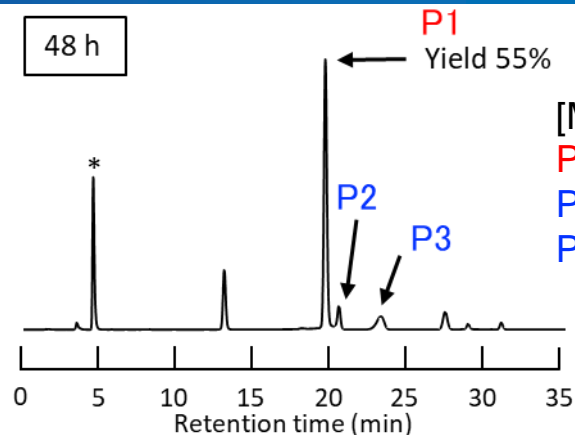
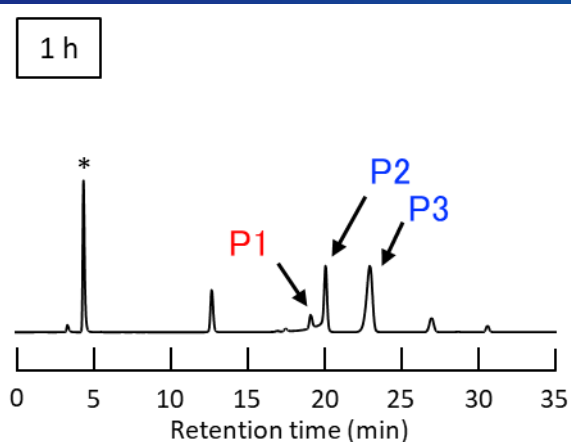
基幹技術となる

(特定トリプトファン選択的修飾法)

本発明の試薬へ架橋(導入する)する分子(医薬品など)は特許有効期間中にさらに革新がなされても、本発明の技術上に反映できる

アミノ酸に対する修飾
(化学的基礎)

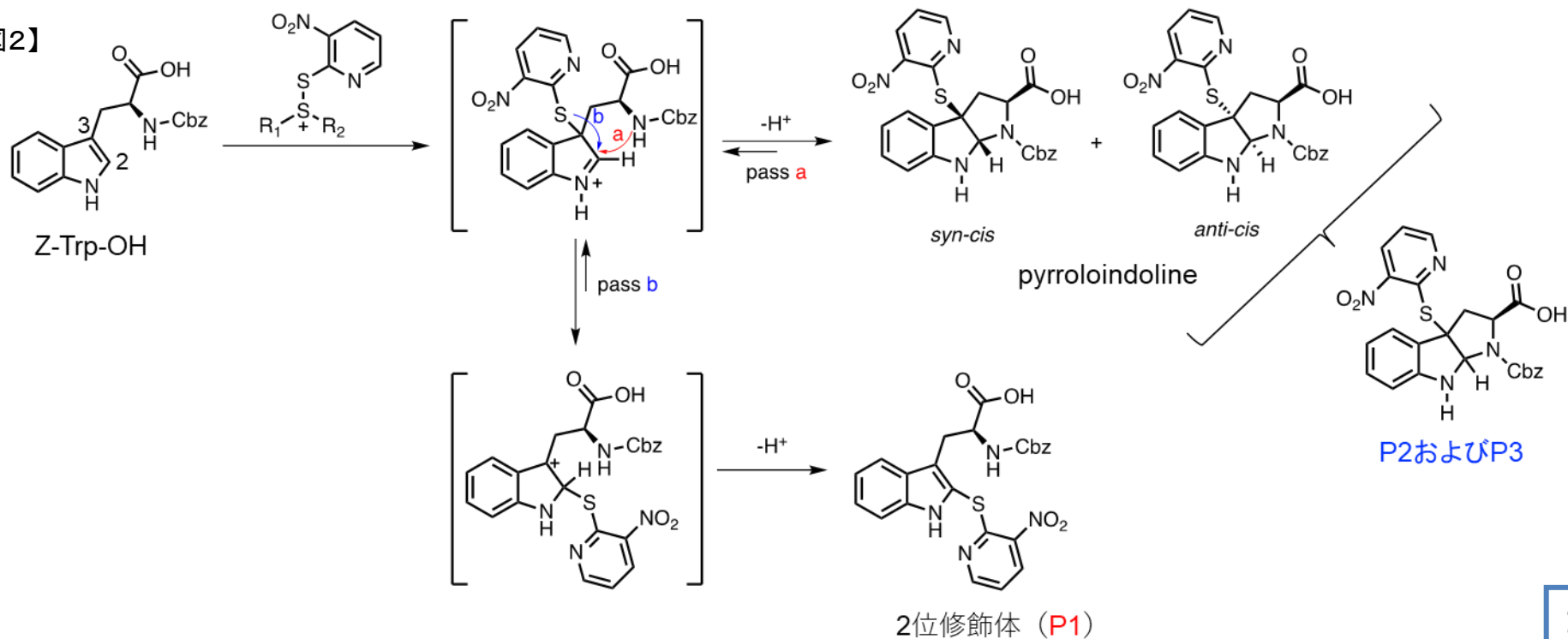
発明の技術内容 ②



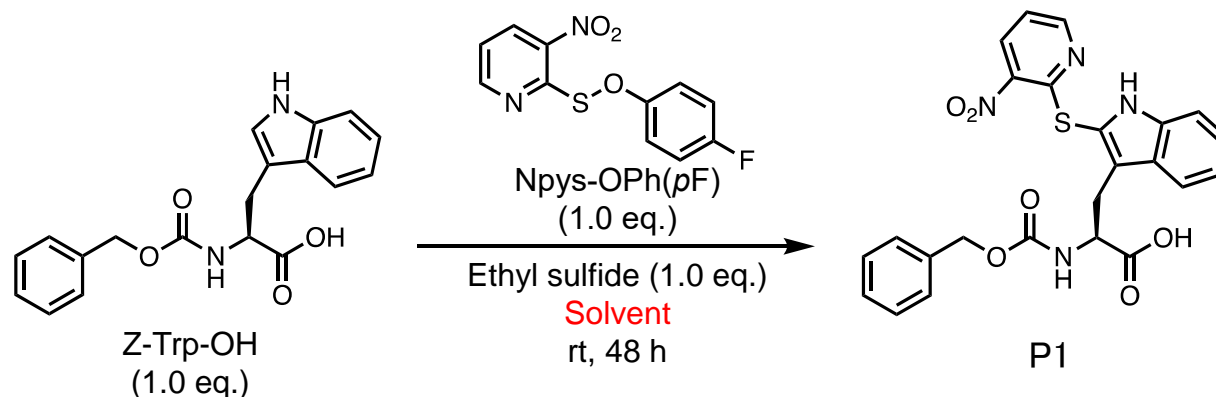
P1
Yield 55%

[M+Na]⁺
P1 : 515.1000
P2 : 515.1000
P3 : 515.1004

【図2】



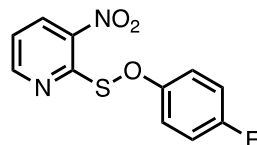
発明の技術内容 ③



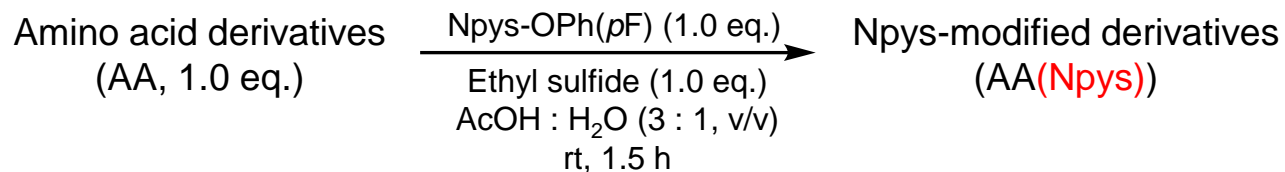
Entry	Solvent	Yield ^a (%)
1	75% AcOH aq.	55
2	0.4 M LiCl/75% AcOH aq.	60
3	37.5% AcOH溶液 (CH ₃ CN/75% AcOH aq. (1:1))	13
4	37.5% TFA溶液 (CH ₃ CN/75% TFA aq. (1:1))	95
5	37.5% HFIP溶液 (CH ₃ CN/75% HFIP aq. (1:1))	8
6	37.5% TFE溶液 (CH ₃ CN/75% TFE aq. (1:1))	5
7	酸無添加 (75% CH ₃ CN aq.)	5

TFAのような解離定数が低い (pKa=0.23) 酸を用いると、反応は効率的に進行することが示された。

^aYield (%) was calculated from peak areas in HPLC using a calibration curve.



本反応はトリプトファン選択的
であることが示唆された



【表2】

【Yield^a of AA(Npys)】

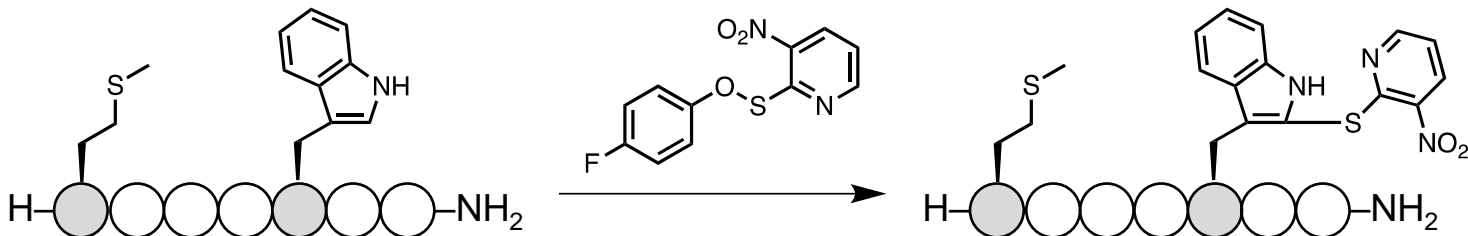
Entry	AA	AA(Npys)	Yield ^a (%)
1	Z-Trp-OH	Z-Trp(Npys)-OH	79%
2	Z-His-OH	Z-His(Npys)-OH	N. F.
3	Z-Lys-OH	Z-Lys(Npys)-OH	N. F.
4	Z-Arg-OH	Z-Arg(Npys)-OH	N. F.
5	Z-Tyr-OH	Z-Tyr(Npys)-OH	N. F.
6	Z-Ser-OH	Z-Ser(Npys)-OH	N. F.
7	Z-Thr-OH	Z-Thr(Npys)-OH	N. F.

^aPercent yield = 100 x [integ. AA(Npys) / (integ. AA + integ. AA(Npys))]

N.F.: Not Found

ただし、Cysには注意が必要、ジスルフィドは問題なし

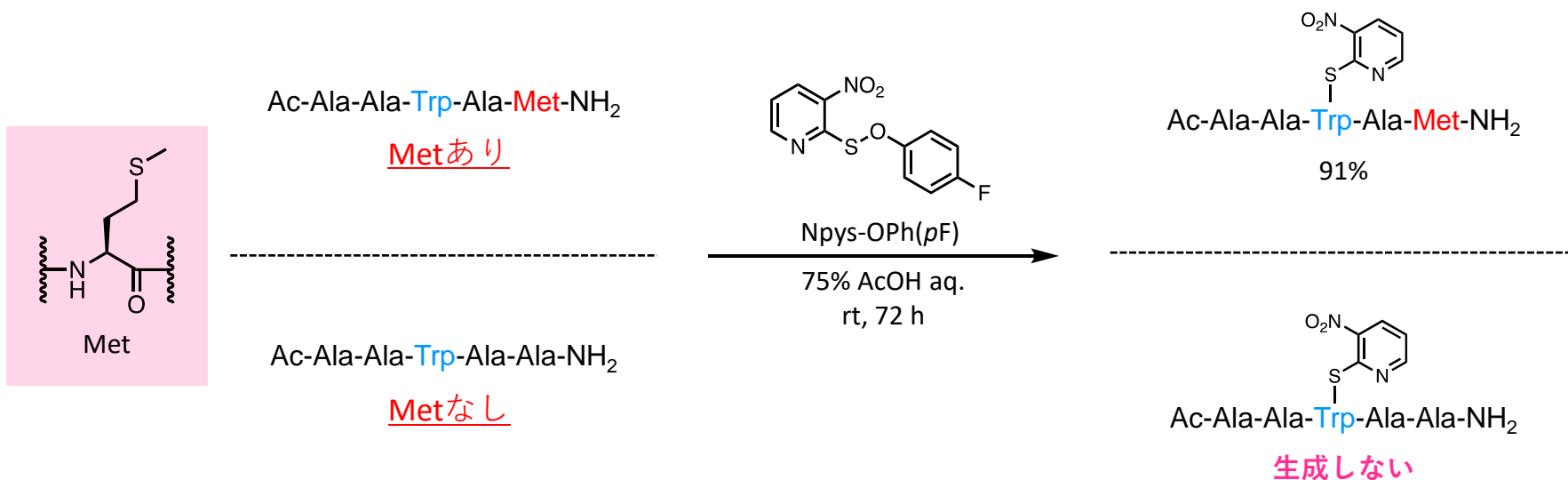
ペプチドに対する修飾



モデルペプチド

- Ac-Ala-Ala-Trp-Ala-Met-NH₂
- Ac-Ala-Ala-Trp-Ala-Ala-NH₂

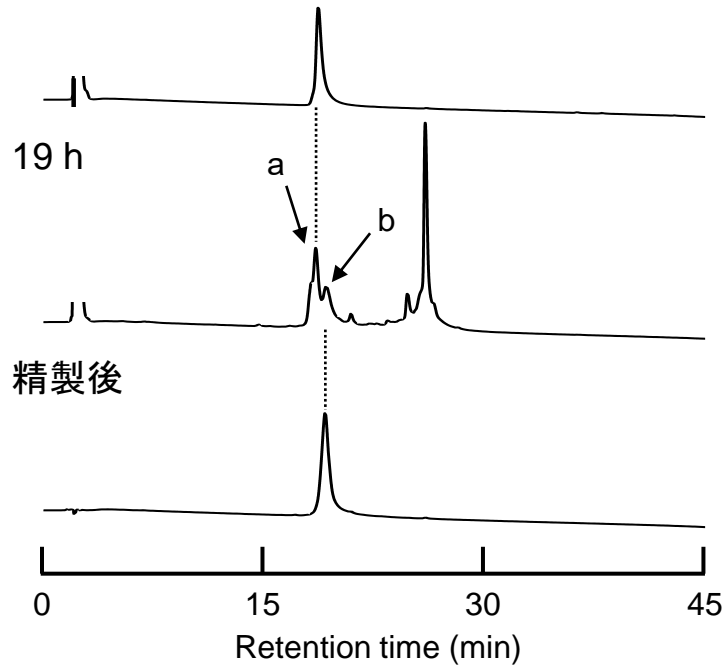
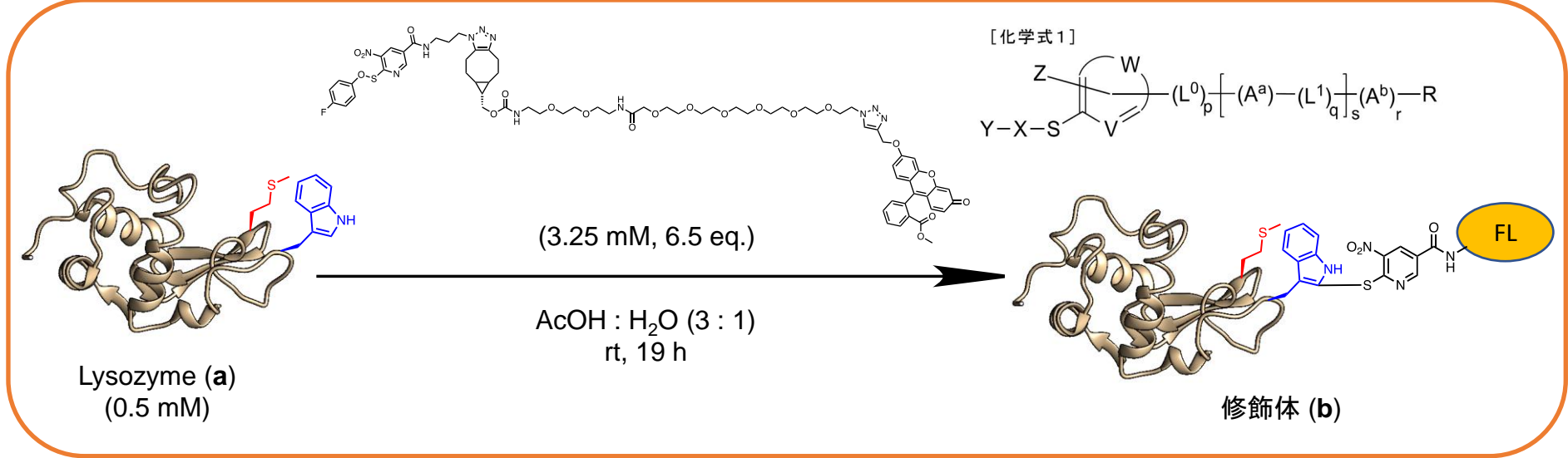
それぞれに対する反応性を確認する



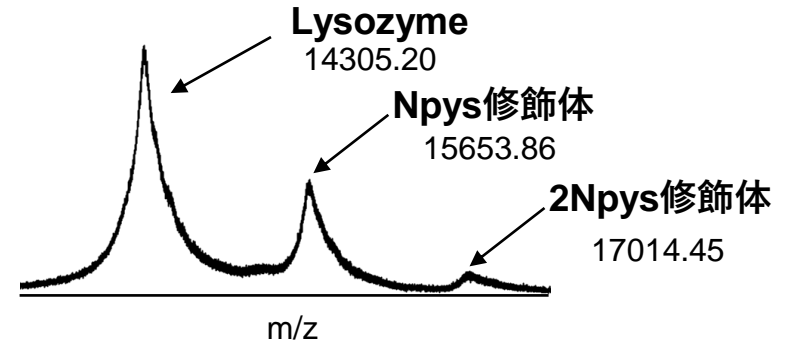
Met非含有では反応が進行しない

タンパク質における修飾

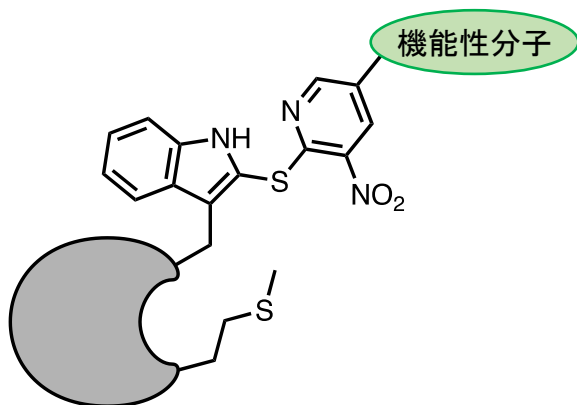
【図5】



MALDI-TOF (19時間後の反応溶液)



HPLC conditions, Gradient: milli Q water (0.1% TFA)/CH₃CN = 95 : 5 to 5 : 95 over 45 min, Flow rate : 1.0 mL/min, UV : 230 nm, Column : COSMOSIL Packed Column 5C₁₈-AR-II 4.6ID x 150 mm.



基礎研究

有機化学
ケミカルバイオロジー

親和性標識
(ビオチン等)

蛍光標識
放射性同位体標識

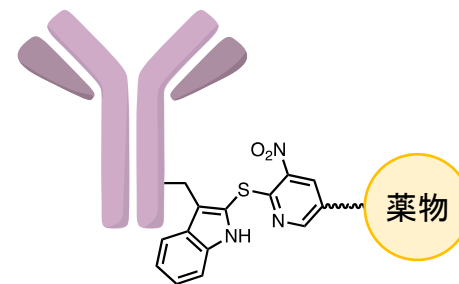
応用研究

創薬

ADC, PDCの調製
(均一な薬物結合による
医薬品の安定供給)

基礎研究をはじめ臨床研究に至るまで
数多くの分野への応用が期待できる

【ADC調製への応用】



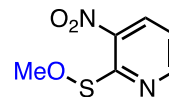
Met-Trp の仕組みにより、
位置選択的で均一な ADC の調製・供給

- 想定するビジネスモデル

- 試験研究用試薬

- ◆ Trp修飾剤（キット）としての販売

ジスルフィド形成試薬



国産化学社、富士フィルム和光を通じて販売

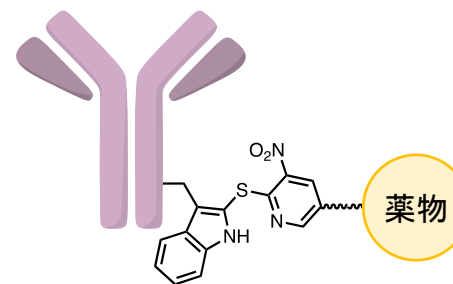
- Met-Trpを足掛かりとする新規架橋技術

- ◆ 架橋技術の導出

- ◆ 架橋技術を利用した架橋体の共同創製

- ペプチド医薬（ペプチド-薬物複合体の製造法）

- 抗体医薬（抗体-薬物複合体の製造法）



国際出願(PCT出願)にご協力いただける企業様を募集中です。

お問い合わせ先

東京薬科大学

イノベーション推進センター 林・稲場

T E L 042-676-5349

F A X 042-676-4714

e-mail sangaku-ml@toyaku.ac.jp