

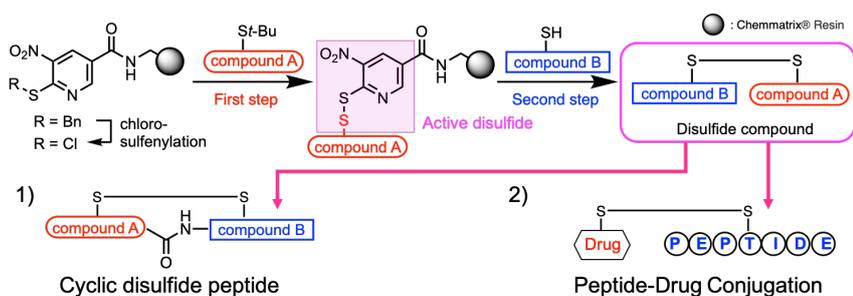
氏名（本籍）	さい がん 崔 岩（中国）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 322 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Development of 4-fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate as a new Npys protecting reagent and its application to efficient disulfide formation
論文審査委員	（主査）教授 林 良雄 教授 三浦 剛 教授 野水 基義

## 論文内容の要旨

### Introduction

The 3-nitro-2-pyridinesulfonyl (Npys) group was discovered as a widely-used functional group for the protection of amino (-NH<sub>2</sub>), hydroxy (-OH) and thiol (-SH) groups particularly in peptide chemistry. Npys-protected cysteine (Cys(Npys)), which prepare from reaction of conventional SH-protected cysteines with Npys chloride (Npys-Cl), can selectively react with another free SH to form a disulfide bond. Focused on this chemistry, we developed a one-pot Solid-Phase Disulfide Ligation (SPDSL) strategy with a key-point on the Npys-Cl resin, which includes two steps: (1) the *t*-Bu protected Cys-containing compound A is loaded onto the Npys-Cl resin via an active disulfide bond, and (2) compound A on the resin is readily transferred to another unprotected SH-containing compound B by a rapid and selective disulfide exchange reaction, resulting in the formation of a new disulfide compound (A-S-S-B) (**Figure 1**). This strategy was successfully applied to synthesize cyclic peptides and peptide-drug conjugates. However, Npys-Cl has some obvious defects, such as: instability issues with light or moisture and its tendency to dimerize with itself even at low temperatures.

Especially, in SPDSL strategy, laborious preparation of the Npys-Cl resin is a dragging step, which needed performing immediately prior to use.

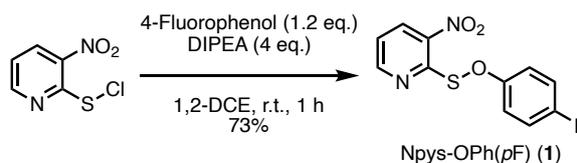


**Figure 1.** Solid-Phase Disulfide Ligation (SPDSL) strategy

To overcome these defects, in this thesis study, as new surrogates of Npys-Cl, 4-fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate (Npys-OPh(*p*F)) and its resin were developed. These compounds were applicable to i) Npys protections of amino, hydroxyl and thiol groups, ii) synthesis of mono-cyclic disulfide peptide oxytocin and disulfide-linked glycoconjugate in SPDSL strategy, and iii) total synthesis of disulfide-linked protein analogue.

## Chapter 1. Preparation and stability evaluation of Npys sulfenates as protecting reagents

Firstly, the synthesis of Npys phenoxides was investigated by coupling various phenols with Npys-Cl. Among these derivatives, Npys-OPh(*p*F) (**1**) was the best sulfenate in terms of the efficiency of its preparation and consequently **1** was mainly



**Scheme 1.** Synthesis of Npys-OPh(*p*F) (**1**)

used for further optimization of the sulfenate preparation process. As a result of optimization, **1** can be obtained with a yield of 73% in the presence of 1,2-dichloroethane (1,2-DCE) by using 1.2 equivalents of 4-fluorophenol and 4 equivalents of *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (**Scheme 1**).

Next, the Npys protection of functional groups of amino acids was examined using Npys-OPh(*p*F) (**1**). **1** successfully introduced an Npys group to the  $\alpha$ -amino group of HCl·H-Ala-*O**t*Bu and H-Leu-*O**t*Bu, the corresponding Npys-Ala-*O**t*Bu and Npys-Leu-*O**t*Bu were obtained with a yield of 91% and 87%, respectively. Next, the  $\epsilon$ -amino group of Fmoc-Lys-OH·HCl was also protected and Fmoc-Lys(Npys)-OH was synthesized with a yield of 85%. Moreover, the less nucleophilic hydroxy groups in Boc-Ser-OMe and Z-Tyr-OMe were also protected, giving the corresponding compounds with yields of 30% and 44%, respectively. The carboxy group of Fmoc-Gly-OH failed to react with **1**. The reaction with the unprotected thiol group of Z-Cys-OEt gave the protected compound, Z-Cys(Npys)-OEt in 14% yield (**Table 1**). Thus, **1** has the ability to protect amino, hydroxy and

**Table 1.** Npys protection of amino acid derivatives

Amino acid derivatives	Npys-OPh( <i>p</i> F) ( <b>1</b> ) (1 eq.)	
	DIPEA (4 eq.) DCM, r.t., 3-12 h	Npys-protected derivatives
Amino acid derivative	Npys-protected derivative	Yield (%) <sup>a</sup>
HCl·H-Ala- <i>O</i> <i>t</i> Bu	Npys-Ala- <i>O</i> <i>t</i> Bu	91
HCl·H-Leu- <i>O</i> <i>t</i> Bu	Npys-Leu- <i>O</i> <i>t</i> Bu	87
Fmoc-Lys-OH·HCl	Fmoc-Lys(Npys)-OH	85 <sup>b</sup>
Boc-Ser-OMe	Boc-Ser(Npys)-OMe	30 <sup>c</sup>
Z-Tyr-OMe	Z-Tyr(Npys)-OMe	44
Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Gly-O(Npys)	0
Z-Cys-OEt	Z-Cys(Npys)-OEt	14 <sup>d</sup>

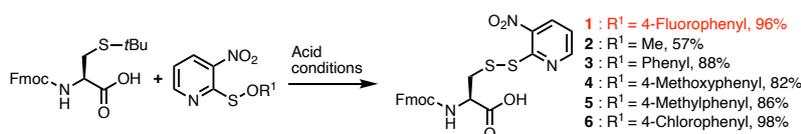
a: isolated yield after 3 h unless otherwise noted. b: isolated yield after 6 h. c: isolated yield when using 2 eq. of Npys-OPh(*p*F). d: dimer of Z-Cys-OEt was also isolated with a yield of 33%.

thiol groups.

Finally, the stability of **1** was also examined, both during storage and in solution. NMR analysis showed that 25% of Npys-Cl was converted to the dimer after 3 weeks under 4 °C. In contrast, no decomposition of **1** was observed after 2 months. Additionally, **1** was stable for more than 20 h but Npys-Cl was unstable in DMSO. Therefore, it is suggested that Npys-OPh(*p*F) (**1**) would be a practical agent of choice for Npys-based chemistry.

## Chapter 2. Use of solid-supported Npys-OPh(*p*F) (**7**) in the construction of disulfide-linked hybrid molecules

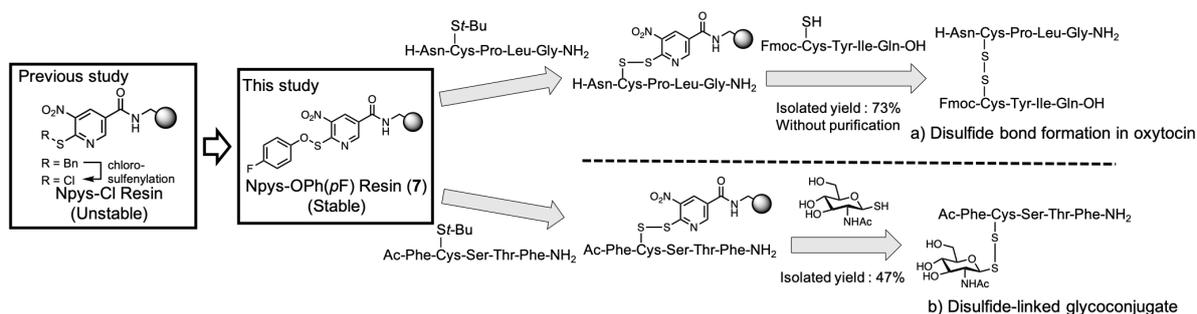
Npys-OPh(*p*F) (**1**), a newly developed prospective surrogate of Npys-Cl, could provide possibility to meet the



**Scheme 2.** Synthesis of Fmoc-Cys(Npys)-OH

dawn of discovering a new resin, which used as a stable surrogate of the conventional Npys-Cl resin in SPDSL strategy. In chapter 2, firstly, Fmoc-Cys(Npys)-OH was synthesized by coupling Fmoc-Cys(*t*-Bu)-OH with a variety of Npys-OR<sup>1</sup>s under acid conditions. The results are shown in **Scheme 2**, using **1**, a satisfactory yield of Cys(Npys) was obtained with 96%. On the other hand, Npys-OPh(*p*F) (**1**) has good storage and solution stability compared to Npys-Cl. Thus, **1** was chose as a representative compound.

Next, to apply the chemistry of Npys-OPh(*p*F) (**1**) to the SPDSL strategy, the Npys-OPh(*p*F) resin (**7**) was successfully developed and obviated a laborious activation step necessary when using the Npys-Cl resin. This new resin (**7**) was applied to synthesize asymmetric disulfide bond consisted of two thiol fragments. Resin (**7**) was applicable to the synthesis of the intermediate disulfide peptide of oxytocin from two peptide fragments and disulfide-linked glycoconjugate (**Scheme 3**).



**Scheme 3.** New Npys-OPh(*p*F) resin (**7**) using in (SPDSL) strategy

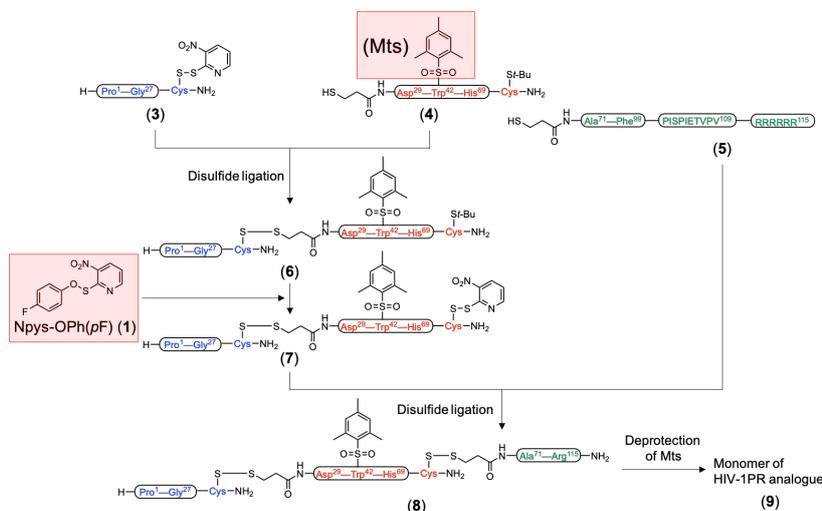
Finally, to demonstrate the usefulness of Npys-OPh(*p*F) resin (**7**), its stability was investigated under storage conditions. The conventional Npys-Cl resin must be used instantly after synthesis. By contrast, resin (**7**) is stable after 1 day although it gradually decomposed in one week. And surprisingly, resin (**7**) is stable under -20 °C more than 3 months. These

results indicated that the stable Npys-OPh(*p*F) resin (**7**) can contribute to create a disulfide-conjugate not only between peptides but also between peptide and sugar, and presumably, drugs, polynucleotides and proteins.

### Chapter 3. Modular chemical synthesis of the human immunodeficiency virus type 1 protease analog via serial disulfide-bond formation

Npys-protected cysteine (Cys(Npys)), prepared from the reaction between conventional SH-protected cysteines and Npys-OPh(*p*F) (**1**), can selectively react with another free SH to form the disulfide bonds. On the other hand, the intrinsic structures of proteins that have been developed during evolution have not always been optimized for their functions to an ideal and perfect state. Therefore, it may be possible to diversify the function of proteins by converting the unique amide bonds of proteins to other bonds. In chapter 3, converting them to more flexible disulfide bonds were considered and firstly a human immunodeficiency virus type 1 protease (HIV-1 PR) analogue was synthesized with two disulfide bonds in the main chain was synthesized by the disulfide-ligation method.

HIV-1 PR analogue composed of 115aa residues was divided into three fragments **3-5** (Scheme 4) and the first disulfide ligation was performed between fragment **3** with Cys(Npys) at the C-terminus and fragment **4** with free SH at the N-terminus. Then, resultant fragment **6** was converted to the Cys(Npys) form **7** using Npys-OPh(*p*F) (**1**), and directly ligated with fragment **5** to form the second disulfide. The final deprotection of Mts gave the double disulfide-linked HIV-1 protease monomer analogue **9**. The results suggest that Npys-based disulfide ligation can be expand to the synthesis of various protein analogues.



**Scheme 4.** Synthesis of disulfide-linked HIV-1 PR analog

### Conclusion

This thesis study demonstrated that the development of a new Npy sulfenate reagent, Npys-OPh(*p*F) (**1**), is a stable surrogate of the Npys-Cl and its resin in liquid- and solid-phase synthesis. This new reagent could protect amino, hydroxy and thiol groups in various amino acids. And in SPDSL strategy, Npys-OPh(*p*F) resin (**7**) was applicable to the disulfide

formation in oxytocin and glycoconjugate. The new Npys-OPh(*p*F)-based disulfide ligation was used to synthesize a disulfide-linked HIV-1 protease analogue. These results indicate that Npys-OPh(*p*F) (**1**) can contribute to the construction of various disulfide-linked molecules in peptide/protein chemistry, chemical biology and drug development.

#### **Publication**

1. **Y. Cui**, C. Rentier, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, *J. Pep. Sci.*, **24**, e3070 (2018).
2. **Y. Cui**, A. Taguchi, K. Kobayashi, H. Shida, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, *Org. Biomol. Chem.*, **18**, 7094-7097 (2020).
3. **Y. Cui**, A. Taguchi, H. Shida, S. Konno, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, *accepted*.

## 論文審査の結果の要旨

3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)基は、有機合成、ペプチド合成化学においてアミノ基、ヒドロキシ基およびチオール基の保護基として利用されている。当該保護基の導入には3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニルクロリド(Npys-Cl)が頻用されているが、光や湿気に対して不安定で保存が難しく、課題を残していた。そこで崔岩氏は、Npys-Clの代替物として4-fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate(Npys-OPh(pF))を新たに創製し、これを利用してジスルフィド環状ペプチドやペプチド-糖ジスルフィド架橋体、並びにジスルフィド結合を主鎖に有するタンパク質アナログの全合成研究を展開した。崔岩氏の博士学位申請論文は、これらの研究成果を3章に渡ってまとめたものである。

Npys基は、チオール基の保護では活性ジスルフィドとしても機能するため、遊離チオール基の共存下でジスルフィド交換反応が進行し、新たなジスルフィド結合を形成できる。所属研究室ではNpys基の当該特性に着目し、Npys-Cl樹脂を鍵化合物としたワンポット固相ジスルフィドライゲーション(SPDSL)法を開発し、環状ペプチドやペプチド-薬物複合体合成への応用を報告している。しかしSPDSL法に用いるNpys-Cl樹脂も不安定な化合物であり、反応に用いる際には用事調製が必要で、非効率であった。

そこで、第1章では、氏はNpys-Clに代わる安定なNpys基導入試薬の創製を目指した。すなわち、氏は種々のフェノールを塩基存在下にNpys-Clと反応させ、相当するスルフェン酸フェニルエステルを合成し、それらのNpys-Cl代替物としての可能性を検証した。その結果、合成したスルフェン酸エステル誘導体のうち、Npys-OPh(pF)が塩基性条件下、アミノ基に対してNpys-Clと同様の良好な反応性を示した。さらにNpys-Clより物理化学的安定性に優れ、低温下での長期保存が可能であった。すなわち、Npys-OPh(pF)がNpys-Clを代替し、Npys保護基の実用的な導入試薬になることを明らかにした。

第2章では、新たにNpys-OPh(pF)樹脂を合成し、当該樹脂がSPDSL法においてNpys-Cl樹脂の安定な代替物として利用できること示した。すなわち、先ずNpys-OPh(pF)を用いて、チオール基が保護されたシステイン誘導体と酸性条件での反応を検討した。その結果、Npys-Clと同様にNpys保護システイン誘導体(Fmoc-Cys(Npys)-OH)を、高収率で合成できることを見出した。次いで、Npys-OPh(pF)を担持した樹脂を合成し、これを用いて2つの異なるシステイン含有ペプチド断片からの非対称ジスルフィド合成を実施し、環状ジスルフィドペプチドであるオキシトシンの形式合成を達成した。また、従来の液相法では煩雑な精製工程を必要とするペプチド-糖架橋体の効率的合成にも成功した。これらの結果から、Npys-OPh(pF)樹脂は安定な化合物で、SPDSL法に適応可能であり、ペプチド間のみならず糖誘導体をジスルフィド結合にて容易にペプチドへ架橋できる試薬であることを示した。

第3章では、Npys-OPh(pF)によりジスルフィドライゲーション(DSL)が簡便に実施可能になったことから、タンパク質合成への応用を検討した。タンパク質の主鎖を構成するアミド結合を、簡単に構築できるジスルフィド結合へ部分的に変換した人工タンパク質の合成に挑んだ。具体的には、主鎖ペプチドに2つのジスルフィド結合を持つヒト免疫不全ウイルス1型プロテアーゼ(HIV-1 PR)アナログ

の合成である。合成途上での水溶性向上のため、親水性のオリゴアルギニン配列をC末端部に追加した115アミノ酸残基からなるHIV-1 PRアナログを合成した。配列全体を3つのフラグメントに分割し、それらをジスルフィド結合で架橋することで、容易にタンパク質を構築した。すなわち、C末端にCys(Npys)を持つフラグメントとN末端に遊離チオール基を持つフラグメントの間でDSLを行い、次に、得られたフラグメント中のCys(*t*Bu)をNpys-OPh(*p*F)を用いてCys(Npys)型フラグメントに変換し、これを3番目の遊離チオール基含有フラグメントとDSLして2個目のジスルフィドを形成させた。最後に一部の保護基の除去により、容易に2つのジスルフィド結合を主鎖に有するHIV-1 PRモノマーアナログの合成を達成した。本結果は、Npysを用いたDSLが多様なタンパク質誘導体の合成に応用できることを示唆している。

以上、崔岩氏の博士学位申請論文は、新規Npys基導入試薬(Npys-OPh(*p*F))がNpys-Clの安定な代替物であり、液相および固相合成において有効に利用できることを実証した。本試薬は、アミノ酸のアミノ基、ヒドロキシ基およびチオール基を保護することができ、さらに創製したNpys-OPh(*p*F)樹脂に基づくSPDSL法は、ペプチド架橋体の合成に適用可能である。加えてNpys-OPh(*p*F)を利用した新しいDSLにより、主鎖にジスルフィド結合を有するタンパク質誘導の合成も可能となった。これらの結果は、Npys-OPh(*p*F)がペプチド・蛋白質化学、ケミカルバイオロジー、医薬品開発において様々なジスルフィド架橋体構築に貢献できることを示すものである。したがって、本論文は博士(薬学)本学位申請論文として相応しい内容を有すると判断する。