

## ペプチド合成 ご依頼上の補足事項

ご依頼頂いたペプチドは可能な限りご希望のスペックとなるよう最善を尽くします。しかしながら、ペプチドに含まれる特定のアミノ酸の存在や組み合わせにより、技術的なコントロールが困難である合成上の問題が事前に予測される場合があります。

以下に挙げた項目は合成上問題を生じさせる可能性のある要因です。これらの要因によりスペック上の問題が生じた場合、納期を延長したり、ご相談の上でご希望よりも低いスペックで納品させて頂くことがありますので、予めご了承ください。低いスペックへの変更時は合成料金を見積金額から減額いたします。

### 1. 酸化されやすいアミノ酸を含む場合

システイン、メチオニン、トリプトファン、あるいはチロシンは、酸化の影響を受けやすいアミノ酸です。これらのアミノ酸が酸化された場合、酸化物の混在により最終的な純度にネガティブな影響を与える可能性があります。特にシステインやメチオニンなど、硫黄を含むアミノ酸は酸化されやすい傾向にあり、SH 基を有するシステインについてはアミノ酸配列中に 2 箇所以上存在すると分子内・分子間のジスルフィド結合を形成し、不純物となる可能性があります。システイン酸化物は製造工程中に増加する傾向にあるため、HPLC 精製による除去が難しい場合があります。

### 2. 疎水性アミノ酸が多く含まれる場合

別表 1 に示した疎水性アミノ酸が多く含まれるペプチドは、水溶性が大きく低下いたします。ペプチドの精製は逆相 HPLC を用いますが、水と有機溶媒を混合した移動相にペプチド試料を溶解する必要があります。水溶性の低いペプチドは HPLC の移動相に適合せず、不純物の除去が困難な場合があります。また、疎水性アミノ酸の連続や偏在は Fmoc アミノ酸のカップリング効率にも影響を与えます。HPLC による精製が困難だけでなく、精製を実施する前段階での収率も低い傾向があるため、最終的に純度・収量ともに不足する可能性が高くなります。

### 3. N 末端にグルタミル基 (Gln, Q)が存在する場合

N 末端のグルタミル基は自発的に環状化してピログルタミル基という環状化構造になる傾向があります。したがって N 末端がグルタミル基の場合、グルタミル基-ピログルタミル基が混在する構造になる可能性があります。N 末端グルタミル基の構造をターゲットとする場合には、ピログルタミル基の混入により最終純度が低下する可能性があります。

### 4. 酸性アミノ酸が多く含まれる場合

逆相 HPLC による精製は低 pH 域で実施いたします。負電荷の多いペプチド、すなわち酸性アミノ酸を多く含むペプチドは低 pH 域では逆相 HPLC カラム中の移動が不安定になることがあります。HPLC カラムからの溶出が不安定な場合、不純物を除去しづらいことがあります。

### 5. アスパラギン酸を含む、特定のアミノ酸の組み合わせが存在する場合

アスパラギン酸と他のアミノ酸の組み合わせ (Asp-X) は、分子内脱水を引き起こす「アスパルチミド形成」とよばれる現象を生じる傾向があります。弊社ではアスパルチミド形成を抑制するための原料やカップリング方法を採用しておりますが、これらの効果が 100% 発揮されないことがあります。その場合、アスパラギン酸残基が脱水されたペプチドが不純物として混在し、HPLC により除去しづらいことがあります。

## 6. 30 アミノ酸以上の長いペプチドの場合

Fmoc 法による合成ペプチドは Fmoc アミノ酸を C 末端から N 末端の方向に順番にカップリングさせることにより得られます。Fmoc アミノ酸の組み合わせごとにカップリング効率に差が存在しますが、この組み合わせだけではなく、ペプチド中のどの位置に存在するかによっても立体化学的な影響を受けます。立体構造が複雑かつ可塑性が低い状態では、アミノ酸のカップリング効率が大きく低下する、いわゆる「ボトルネック」が生じることがあります。

一般的な傾向として 30 アミノ酸以上のペプチド合成では、ボトルネックが生じる確率が長さに応じて上昇いたします。カップリング効率が極端に下がると最終的な粗精製ペプチドの収率が大きく低下し、収率次第では HPLC 精製に進行できないことがあります。その場合はカップリングの条件を変更して再合成を試みます。カップリング効率のボトルネックを解消するための原料を用いることがありますが、効果は 100% 発揮されないことがあります。収率を改善できない場合は最終的な純度あるいは合成量にネガティブな影響を与える可能性があります。

## 7. ペプチドの初期収率に対する、目標の合成量および純度の関係

アミノ酸のカップリングを終えた直後の粗精製ペプチドの収率を、「初期収率」とします。別表 2 では、初期収率とペプチドの最終スペックの関係を示します。最終スペックで要求される値が高いほど、高い初期収率を要求いたします。初期収率が低いと、純度や合成量を確保するために繰り返し合成あるいは精製を行う必要があり、その場合は納期の延長やスペックの変更をお願いすることがあります。

別表 1. アミノ酸の性質による分類

親水性アミノ酸	酸性: アスパラギン酸(D), グルタミン酸(E) 塩基性: アルギニン(R), リシン(K), ヒスチジン(H)
中性アミノ酸	グリシン(G), セリン(S), スレオニン(T), システイン(C) アスパラギン(N), グルタミン(Q), チロシン(Y), プロリン(P)
疎水性アミノ酸	アラニン(A), バリン(V), ロイシン(L), イソロイシン(I) メチオニン(M), トリプトファン(W), フェニルアラニン(F)

別表 2. ペプチドの初期収率に対する、目標の合成量および純度の関係

初期収率 (HPLC 純度)	目標純度および到達難易度			目標合成量および到達難易度		
低い (1-20%)	高 >95% 難 ←	低 >80% →やや易	高 >50%	多 >50mg 難 ←	少 20mg →やや易	少 1mg
中程度 (21-50%)	高 >95% やや難 ←	低 >80% →やや易	高 >50%	多 >50mg やや難 ←	少 20mg →やや易	少 1mg
高い (51-90%)	高 >95% やや易 ←	低 >80% →易	高 >50%	多 >50mg やや易 ←	少 20mg →易	少 1mg