

明 細 書

発明の名称：新規な人工タンパク質触媒

技術分野

[0001] 本発明は、新規な人工タンパク質触媒に関する。

背景技術

[0002] 現在、触媒を利用した「生体内合成化学治療」に関する試みが検討されている。生体内合成化学治療は、活性や毒性のない原料または試薬を体内に導入して、体内の特定の場所で当該原料または試薬を触媒によって活性化して、効果を発現させるコンセプトである。そのような中、治療用途に適用可能な新たな触媒の開発に関する関心が高まっている（非特許文献1）。

[0003] そのような触媒の開発における障壁の1つは、生体内物質からの触媒の保護である。例えば、金属触媒（*metalloenzyme*）である金（Au）、パラジウム（Pd）、およびルテニウム（Ru）などは、細胞内で0.5～10 mM、また血漿中で約2～20 μ Mの範囲で存在するチオール含有グルタチオン（GSH）に曝されると、急速に失活することが知られている。

[0004] 現時点では、多くの研究において、人工金属酵素または金属触媒錯体のいずれかを介して、細胞またはゼブラフィッシュなどの哺乳動物以外のモデルでのみしか触媒反応の検討が行われていない（非特許文献2～17）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Rebelein, J. G. ; Ward, T. R. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018, 53, 106–114.

非特許文献2：Miller, M. A. ; Askevold, B. ; Mikula, H. ; Kohler, R. H. ; Pirovich, D. ; Weissleder, R. *Nat. Commun.* 2017, 8, 15906.

非特許文献3：Clavadetscher, J. ; Hoffmann, S.

; Lillienkamp, A. ; Mackay, L. ; Yusop, R. M. ; Rider, S. A. ; Mullins, J. J. ; Bradley, M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2016, 55, 15662–15666.

非特許文献4: Clavadetscher, J. ; Indrigo, E. ; Chankeshwara, S. V. ; Lillienkamp, A. ; Bradley, M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2017, 56, 6864–6868.

非特許文献5: Weiss, J. T. ; Dawson, J. C. ; MacLeod, K. G. ; Rybski, W. ; Fraser, C. ; Torres-Sanchez, C. ; Patton, E. E. ; Bradley, M. ; Carragher, N. O. ; Unciti-Broceta, A. Nat. Commun. 2014, 5, 3277.

非特許文献6: Perez-Lopez, A. M. ; Rubio-Ruiz, B. ; Sebastian, V. ; Hamilton, L. ; Adam, C. ; Bray, T. L. ; Irusta, S. ; Brennan, P. M. ; Lloyd-Jones, G. C. ; Sieger, D. ; Santamaria, J. ; Unciti-Broceta, A. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2017, 56, 12548–12552.

非特許文献7: Bray, T. L. ; Salji, M. ; Brombin, A. ; Perez-Lopez, A. M. ; Rubio-Ruiz, B. ; Galbraith, L. C. A. ; Patton, E. E. ; Leung, H. Y. ; Unciti-Broceta, A. Chem. Sci. 2018, 9, 7354–7361.

非特許文献8: Liu, Y. ; Pujals, S. ; Stals, P. J. M. ; Paulohrl, T. ; Presolski, S. I. ; Meijer, E. W. ; Albertazzi, L. ; Palmans, A. R. A. J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 3423–3433.

非特許文献9: Li, J. ; Yu, J. ; Zhao, J. ; Wang, J. ; Zheng, S. ; Lin, S. ; Chen, L. ; Yang, M. ; Jia, S. ; Zhang, X. ; Chen, P. R. Nat. Chem. 2014, 6, 352-361.

非特許文献10: Vidal, C. ; Tomas-Gamasa, M. ; Destito, P. ; Lopez, F. ; Mascarenas, J. L. Nat. Commun. 2018, 9, 1913.

非特許文献11: Destito, P. ; Sousa-Castillo, A. ; Couceiro, J. R. ; Lopez, F. ; Correa-Duarte, M. A. ; Mascarenas, J. L. Chem. Sci. 2019, 10, 2598-2603.

非特許文献12: Tonga, G. Y. ; Jeong, Y. ; Duncan, B. ; Mizuhara, T. ; Mout, R. ; Das, R. ; Kim, S. T. ; Yeh, Y. -C. ; Yan, B. ; Hou, S. ; Rotello, V. M. Nat. Chem. 2015, 7, 597-603.

非特許文献13: Streu, C. ; Meggers, E. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2006, 45, 5645-5648.

非特許文献14: Volker, T. ; Dempwolf, F. ; Graumann, P. L. ; Meggers, E. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014, 53, 10536-10540.

非特許文献15: Tomas-Gamasa, M. ; Martinez-Calvo, M. ; Couceiro, J. R. ; Mascarenas, J. L. Nat. Commun. 2016, 7, 12538.

非特許文献16: Yusop, R. M. ; Unciti-Broceta, A. ; Johansson, E. M. V. ; Sanchez-Martin, R. M. ; Bradley, M. Nat. Chem. 2011, 3, 239-243.

非特許文献17: Unciti-Broceta, A. ; Johansson

, E. M. V. ; Yusop, R. M. ; Sanchez-Martin, R. M. ; Bradley, M. Nat. Protoc. 2012, 7, 1207-1218.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、生体内物質からの触媒の保護を可能にし、生体内合成化学治療に対する潜在的有用性を有する新規な人工タンパク質触媒を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] ヒト血清アルブミン (HSA) は、血漿中に豊富に存在する 66.5 kDa のタンパク質で、血清中での半減期は約 19 日間であることが知られている (Peters, T., Jr. Adv. Protein Chem. 1985, 37, 161-245.)。HSA は、さまざまなホルモン、脂肪酸、および低分子薬剤に対するキャリアタンパク質であることが知られており、多種類のリガンドに対する、メジャー結合サイトおよびマイナー結合サイトが HSA に複数存在することが確認されている (Ghuman, J. ; Zunszain, P. A. ; Petitpas, I. ; Bhattacharya, A. A. ; Otagiri, M. ; Curry, S. J. Mol. Biol. 2005, 353, 38-52.)。

[0008] 本発明者らは、生体適合性の人工タンパク質触媒を設計するために、タンパク質として HSA を選択し、HSA の疎水性結合ポケットに金属触媒を収容することを検討した。そして、触媒として金属触媒であるルテニウムを用い、クマリン誘導体 (ワルファリンなど) との結合 (相互作用) が知られているアルブミン薬物結合サイト I に、金属触媒を固定したところ、インビトロ条件下、20 mM GSH の存在下でさえ、結合したルテニウムの触媒活性を保護することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0009] すなわち、本発明は以下の特徴を包含する：

[1] タンパク質と金属触媒または有機触媒から選択される触媒との複

合体であって、

前記タンパク質は、その立体構造内に疎水性スポットを有するタンパク質であり、

前記複合体は、前記触媒が親水性環境に暴露されないまたは実質的に暴露されないように、前記触媒を前記疎水性スポット内に収容する、
複合体。

[0010] [2] [1]に記載の複合体であって、

前記タンパク質は、天然のまたは人工のタンパク質である、
複合体。

[0011] [3] [1] または [2] に記載の複合体であって、

前記タンパク質は、ヒト血清アルブミン (HSA)、免疫グロブリン G (IgG)、免疫グロブリン A (IgA)、トランスフェリン、アンチトリプシン、ハプトグロビン、 α 1-酸性糖タンパク質、ミオフィェリン (Myoferlin)、Trk 受容体、エストロゲン受容体、および葉酸受容体からなる群より選択される、
複合体。

[0012] [4] [1] から [3] のいずれかに記載の複合体であって、

前記金属触媒は、ホウ素触媒、マグネシウム触媒、アルミニウム触媒、ケイ素触媒、カルシウム触媒、スカンジウム触媒、チタン触媒、バナジウム触媒、クロム触媒、マンガン触媒、鉄触媒、コバルト触媒、ニッケル触媒、銅触媒、亜鉛触媒、イットリウム触媒、ジルコニウム触媒、ニオブ触媒、モリブデン触媒、ルテニウム触媒、ロジウム触媒、パラジウム触媒、銀触媒、インジウム触媒、スズ触媒、バリウム触媒、ハフニウム触媒、タングステン触媒、レニウム触媒、オスミウム触媒、イリジウム触媒、白金触媒、金触媒、およびランタノイドルイス酸触媒からなる群より選択される、
複合体。

[0013] [5] [4] に記載の複合体であって、

前記ランタノイドルイス酸触媒は、イットリビウム触媒、ランタン触媒、

セリウム触媒、サマリウム触媒、ユーロピウム触媒、ガドリニウム触媒、テルビウム触媒、ツリウム触媒、およびルテチウム触媒からなる群より選択される、

複合体。

[0014] [6] [1] から [5] のいずれかに記載の複合体であって、

前記タンパク質は、ヒト血清アルブミンであり、

前記触媒が金属触媒である、

複合体。

[0015] [7] [6] に記載の複合体であって、

前記金属触媒は、ルテニウム触媒である、

複合体。

[0016] [8] [6] または [7] に記載の複合体であって、

前記ヒト血清アルブミンの疎水性スポットは、アルブミン薬物結合サイト I (drug site I) である、

複合体。

[0017] [9] [6] から [8] のいずれかに記載の複合体であって、

前記金属触媒は、ヒト血清アルブミンに対するリガンドを介して前記疎水性スポットに結合している、

複合体。

[0018] [10] [9] に記載の複合体であって、

前記リガンドは、ワルファリン、アザプロパゾン、アセノクマロール、フェニルブタゾン、サリチル酸塩、インドメタシン、フェニトイン、トルブタミド、クロルプロパミド、イオフェノキサート、ヨジパミド、スルファジメトキシム、フェノプロクソモン、グリベンクラミド、スルファチアゾール、テノキシカム、カンプトテシン、バルジデンデアジ、アンデレラタン、ジアデレアル、アンデレラタン、ジアデレアル、アンデレラタン、ジアデレアルタン、プロダン、ビリルビン、エイコサノイド、およびカルボキシーメチル-プロピル-フランプロパノエート（尿毒症毒素）、およびクマリンからな

る群より選択される、

複合体。

[0019] [11] [9] または [10] に記載の複合体であって、

前記金属触媒は、前記リガンドに結合したリンカーを介して前記疎水性ス
ポットに結合している、

複合体。

[0020] [12] [11] に記載の複合体であって、

前記リンカーは、両末端にアミノ基およびカルボキシル基を有する、アル
キル鎖またはポリエチレングリコール（PEG）鎖である、

複合体。

[0021] [13] [12] に記載の複合体であって、

前記リンカーは、 $C_1 \sim C_3$ アルキルまたは重合度 1 ～ 3 の PEG 鎖である
複合体。

[0022] [14] [1] から [13] のいずれかに記載の複合体であって、

前記タンパク質の表面が生体内の標的部位と相互作用するように修飾され
る、

複合体。

[0023] [15] [14] に記載の複合体であって、

前記修飾は、糖鎖による修飾である、

複合体。

[0024] [16] [1] から [13] のいずれかに記載の複合体であって、

前記タンパク質が、生体内の標的部位と相互作用する部分をさらに含む、
複合体。

[0025] [17] [14] または [15] に記載の複合体であって、

前記タンパク質は、ヒト血清アルブミンである、

複合体。

[0026] [18] [1] から [17] のいずれかに記載の複合体を含む組成物。

[0027] [19] 薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である、 [1

８］に記載の組成物。

[0028] 〔２０〕 〔１９〕に記載の組成物であって、
前記複合体によって活性化され得るプロドラッグと組み合わせて使用される、
組成物。

[0029] 〔２１〕 〔１９〕に記載の組成物であって、
前記複合体によって活性化され得るプロドラッグをさらに含む、
組成物。

[0030] 〔２２〕 〔１９〕に記載の組成物であって、
特定の細胞を選択的にタギングするために用いられる、
組成物。

[0031] 〔２３〕 〔２２〕に記載の組成物であって、
前記細胞にタギングされる化学物質と組み合わせて投与される、
組成物。

[0032] 〔２４〕 〔１８〕に記載の組成物であって、
バイオセンサーとして使用される、
組成物。

[0033] 〔２５〕 〔１８〕に記載の組成物であって、
エチレンを検出するためのバイオセンサーとして使用される、
組成物。

[0034] 〔２６〕 プロドラッグを含む医薬組成物であって、
前記プロドラッグは、〔１〕から〔１７〕のいずれかに記載の複合体によって活性化され得るものであり、
前記医薬組成物は、〔１〕から〔１７〕のいずれかに記載の複合体と組み合わせて使用される、
医薬組成物。

[0035] 〔２７〕 組み合わせ医薬であって、
〔１〕から〔１７〕のいずれかに記載の複合体を含む第１の薬剤と、

前記複合体によって活性化され得るプロドラッグを含む第2の薬剤とを含む、組み合わせ医薬。

[0036] 以上述べた本発明の一または複数の特徴を任意に組み合わせた発明も、本発明の範囲に含まれることを、当業者であれば理解するであろう。

発明の効果

[0037] 本発明によれば、生体内物質からの触媒の保護を可能にする、新規な人工タンパク質触媒が提供される。

図面の簡単な説明

[0038] [図1]図1は、ルテニウム触媒Ru1-3、6とHSAとの反応によって得られた産物の蛍光アッセイ結果を示す。

[図2]図2は、HSAとワルファリンまたはイブプロフェンとの反応後に、ルテニウム触媒Ru1-3、6との反応を行った際の飽和結合曲線を示す。

[図3]図3は、本願実施例で用いた、aIb-Ru複合体の触媒能力を試験するための実験系を示す。

[図4]図4は、異なる条件における、aIb-Ru複合体の触媒能力の評価結果を示す。

[図5]図5は、異なる条件における、aIb-Ru複合体の触媒能力の評価結果を示す。

[図6]図6は、ArM活性（人工金属酵素活性）に関して、GSHの存在下または非存在下での、基質1a-eのミカエリス-メンテンのカイネティック（速度論的）パラメーターを示す。

[図7]図7は、ルテニウム触媒Ru1-3、6が、ヒト血清アルブミン（PDB: 1H9Z）にドッキングされる際の分子モデリングを示す。

[図8]図8は、GARMRu1(2, 3-Sia)がSW620ヒト結腸腺癌細胞によりよく蓄積することを示す細胞イメージングの結果である。

[図9]図9は、GARMRu1(2, 3-Sia)の蓄積に関する、SW620ヒト結腸腺癌細胞、HeLaヒト子宮頸癌由来細胞およびA549ヒト肺基底上皮腺癌細胞間での比較を示す。

[図10]図10は、GAR₁M-R₁複合体によるプロドラッグ1gおよび1hの活性化に関する速度論的実験を示す。

[図11]図11は、癌細胞株に対する、プロドラッグ、プロドラッグおよびa₁b-R₁、またはプロドラッグおよびGAR₁M-R₁による細胞増殖抑制効果の比較を示す。

[図12]図12は、AR₁Mエチレンプローブ(AEP)の合成スキームを示す。

[図13]図13は、AEPプローブと比較したa₁b-R₁化合物の観測された蛍光強度を示す。

[図14]図14は、この研究における様々なタンパク質化合物の折り畳み構造の変化を調べるための、CDスペクトルの比較を示す。

[図15]図15は、AEPを用いたキウイフルーツの異なる発達段階(未熟成と熟成)における様々な小器官(外側の果皮や子房室、柱軸)に発現するエチレン生産量の変化を観測した結果を示す。サンプル数は、外側の果皮(n=24)、子房室(n=2)、柱軸(n=4)であり、統計分析は1対のサンプルのt-testを用いて行った。*P<0.03、**P<0.002、***P<0.0002、****P<0.0001、ns=重要でない部分。

[図16]図16は、野生型Col-0(b)の、AEP(100μM)を作用させた表皮の蛍光強度と明視野顕微鏡でのイメージング画像(40倍拡大)、およびエチレン生合成促進剤であるACC(1mM)をさらに添加して検出した結果を示す。

[図17]図17は、ACC添加によりシロイヌナズナから生産されるエチレンの量を蛍光強度で観察した結果を示す。全ての値は3組の実験で得られた。統計分析はテューキーの多重比較検定の一元配置分散分析を用いて行った。*P<0.03、**P<0.002、***P<0.0002、****P<0.0001、ns=重要でない部分。

[図18]図18は、GAR₁Mで処理したHeLa細胞と処理しなかったHeLa細胞のフローサイトメトリー結果の比較を示す。

[図19]図19は、GAR Mで処理したマウス腹腔由来マクロファージと処理しなかったマウス腹腔由来マクロファージのフローサイトメトリー結果の比較を示す。

[図20]図20は、GAR Mで処理したHeLa細胞およびマウス腹腔由来マクロファージ、ならびにGAR Mで処理しなかったHeLa細胞およびマウス腹腔由来マクロファージ、のフローサイトメトリー結果の比較を示す。なお、左上図および左下図のQ3の値は、それぞれ99.09%および43.06%である。

[図21]図21は、実施例8で行った細胞接着アッセイの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0039] 本発明は、新規な人工タンパク質触媒に関する。具体的に、本発明に係る人工タンパク質触媒は、タンパク質と金属触媒または有機触媒から選択される触媒との複合体（以下、「本発明の複合体」とも称する。）である。

[0040] 本発明の複合体は、その立体構造内に疎水性スポットを有するタンパク質の前記疎水性スポット内に、親水性環境に暴露されないまたは実質的に暴露されないように触媒を収容する構成によって特徴付けることができる。すなわち、本発明の複合体は、触媒の親水性環境への暴露または実質的暴露を回避することによって、生体内物質から触媒を保護することができる。本発明の複合体は、タンパク質に存在する疎水性スポットのうちの1カ所のみ触媒を収容していてもよいし、複数箇所（またはすべて）に触媒を収容していてもよい。

[0041] 本発明の複合体はまた、触媒の親水性環境への暴露または実質的暴露を回避する構成を有している一方、当該構成を有していてもなお、触媒が対象とする反応を促進し得ることによっても特徴付けることができる。すなわち、本発明の複合体は、好ましい実施形態において、触媒を生体内物質から保護しつつ、生体内で所望の活性を発揮し得る。

[0042] 本発明において、「触媒が親水性環境に実質的に暴露されない」とは、親水性環境からの触媒の保護が認められる限度で親水性環境への暴露が許容さ

れることを指す。「親水性環境からの触媒の保護が認められる」は、フリーの触媒を生体内環境に暴露した場合に比較して、本発明の複合体に収容された触媒の活性が同一環境下でより長期に維持されることを指し、例えば、代謝回転（TON）によって評価することができる。暴露が許容される程度は、使用する触媒の種類、または組み合わせて使用されるタンパク質の種類などによって変化し得る。

[0043] 本発明の一実施形態において、「触媒が親水性環境に実質的に暴露されない」は、タンパク質の疎水性スポットに収容された際の触媒の相対溶媒接近可能表面積（SASA）が、5.0以下、好ましくは4.0以下、より好ましくは3.5以下、より好ましくは3.0以下、より好ましくは2.5以下、より好ましくは2.0以下、より好ましくは1.5以下、より好ましくは1.0以下、より好ましくは0.9以下、より好ましくは0.8以下、より好ましくは0.7以下、より好ましくは0.6以下、より好ましくは0.5以下、より好ましくは0.4以下、より好ましくは0.3以下、より好ましくは0.2以下、またはより好ましくは0.1以下であることを意味する。

[0044] 本発明の別の実施形態において、「触媒が親水性環境に実質的に暴露されない」は、触媒の表面積全体の、50%以上、好ましくは55%以上、より好ましくは60%以上、より好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、またはより好ましくは99%以上が、タンパク質の疎水性スポット内部に収容されることを意味する。あるいは、「触媒が親水性環境に実質的に暴露されない」は、親水性環境に対する触媒の露出面積が、触媒の表面積全体の、50%以下、好ましくは45%以下、より好ましくは40%以下、より好ましくは35%以下、より好ましくは30%以下、より好ましくは25%以下、より好ましくは20%以下、より好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下、より好ましくは4%以下

、より好ましくは3%以下、より好ましくは2%以下、またはより好ましくは1%以下であることを意味する。

[0045] 本発明の複合体に使用することができるタンパク質は、触媒の収容を可能にする1つ以上の疎水性スポットを有する限り制限されず、天然または人工のタンパク質を用いることができる。人工のタンパク質には、天然のタンパク質の一部に人工的に変異を導入した変異タンパク質を挙げることができる。

[0046] 一実施形態において、本発明の複合体に使用されるタンパク質は、その疎水性スポットのいずれかに対して結合または相互作用するリガンドの入手が容易なタンパク質である。そのようなタンパク質は、リガンドを介した触媒の複合体化を容易にする点で好ましい場合がある。

[0047] 具体的な実施形態において、本発明の複合体に使用されるタンパク質は、ヒト血清アルブミン (HSA)、免疫グロブリンG (IgG)、免疫グロブリンA (IgA)、トランスフェリン、アンチトリプシン、ハプトグロビン、および α 1-酸性糖タンパク質などから選択されるタンパク質である。これらのタンパク質は、血液中を自由に移動可能なタンパク質であるため、ドラッグデリバリーシステムに適していると考えられる。さらに別の具体的な実施形態において、本発明の複合体に使用されるタンパク質は、ミオフェルリン (Myoferlin)、Trk受容体、エストロゲン受容体、および葉酸受容体などから選択されるタンパク質である。これらのタンパク質は、がん細胞で多く発現することが知られているため、これに対するリガンドおよび金属を配位させることで、癌を直接的に死滅させることが可能な複合体の製造が可能であると考えられる。

[0048] 本発明の複合体に使用することができる有機触媒または金属触媒は、特に制限されず、当業者が任意に選択することができる。一実施形態において、本発明の複合体に使用することができる有機触媒または金属触媒は、所与のプロドラッグを活性型に変更する活性を有するものである。

[0049] 例えば、本発明の複合体に使用される有機触媒として、これに限定される

ものではないが、プロリン誘導体、四級アンモニウム塩誘導体を基盤とする相間移動触媒、チオ尿素誘導体、チアゾリウム塩やイミダゾリウム塩から得られるN-ヘテロサイクリックカルベン誘導体、環状ケトン誘導体、4-ジメチルアミノピリジン誘導体、アミノ酸を代表とする二級アミンなどを挙げることがきる。

[0050] 例えば、本発明の複合体に使用される金属触媒として、これに限定されるものではないが、ホウ素触媒、マグネシウム触媒、アルミニウム触媒、ケイ素触媒、カルシウム触媒、スカンジウム触媒、チタン触媒、バナジウム触媒、クロム触媒、マンガン触媒、鉄触媒、コバルト触媒、ニッケル触媒、銅触媒、亜鉛触媒、イットリウム触媒、ジルコニウム触媒、ニオブ触媒、モリブデン触媒、ルテニウム触媒、ロジウム触媒、パラジウム触媒、銀触媒、インジウム触媒、スズ触媒、バリウム触媒、ハフニウム触媒、タングステン触媒、レニウム触媒、オスミウム触媒、イリジウム触媒、白金触媒、金触媒、およびランタノイドルイス酸触媒などを挙げることができる。また、前記ランタノイドルイス酸触媒として、これに限定されるものではないが、イットリビウム触媒、ランタン触媒、セリウム触媒、サマリウム触媒、ユーロピウム触媒、ガドリニウム触媒、テルビウム触媒、ツリウム触媒、およびルテチウム触媒などを挙げることができる。

[0051] タンパク質の疎水性スポットに触媒を収容させるための手段としては、例えば、前記疎水性スポットと相互作用するまたは結合するリガンドを介して疎水性スポット内に触媒を結合する手法を挙げることができる。この場合、リガンドと触媒（例えば金属触媒）との連結には、適宜ペプチド、炭化水素鎖、PEGなどのリンカーを用いることができる。使用するリンカーの長さは、触媒が疎水性スポット内に収容され、親水性環境から暴露されないまたは実質的に暴露されない長さとするべきである。すなわち、疎水性スポット、これと相互作用するリガンド、および使用される触媒のサイズに対して、使用されるリンカーが長すぎる場合には、リンカーおよびリガンドを介して触媒を疎水性スポットに結合する際に、触媒が疎水性スポット内に収まらず

、その一部または全部が疎水性スポットから親水性環境に暴露し、親水性環境に対する十分な保護が得られない可能性がある。

[0052] タンパク質の疎水性スポットに触媒を収容させるための別の手段としては、例えば、タンパク質の疎水性ポケット内またはその近位に存在するシステインまたはリジンの側鎖官能基（それぞれチオール基およびアミノ基）に対して、マレイミドまたはスクシンイミドを作用させて活性化し、触媒と共有結合させる手法を挙げることができる。

[0053] タンパク質の疎水性スポットに触媒を収容させるためのさらに別の手段としては、疎水性ポケットを構成するアミノ酸配列の特定の位置に突然変異を導入して二重結合またはアジドを導入し、メタセシスやクリック反応を行って、触媒と共有結合させる手法を挙げることができる（Young TS, Ahmad I, Brock A, Schultz PG., *Expanding the genetic repertoire of the methylotrophic yeast Pichia pastoris.*, *Biochemistry*. 2009. 48 (12) : 2643-53. ; Wang L, Schultz PG., *Expanding the genetic code.*, *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004. 44 (1) : 34-66.）。この場合、触媒（例えば金属触媒）として、ペプチドまたはPEGなどのリンカーを有する触媒を使用することができる。

[0054] 一実施形態において、本発明の複合体は、生体内の標的部位と相互作用するように修飾される。これにより、本発明の複合体が生体内の所望の部位に誘導される／または所望の部位を標的化することができる。この関連で、「生体内の標的部位と相互作用する」とは、生体内の他の部位と比較して、有意に強い指向性で標的部位に集積または典型的には結合することを意味し得る。本発明において、標的部位は、特定の臓器もしくは器官、または特定の細胞腫などであり得る。

[0055] そのような修飾として、例えば、糖鎖修飾を挙げることができる。例えば

、アスパラギン結合型糖鎖（N-結合型糖鎖）は、タンパク質修飾に用いることで、その糖鎖のクラスターおよび／または結合数に応じて、特定の臓器への指向性が変化することが知られている（Tanaka, K., et al., Angew. Chem. Int. Ed., 49, 8195-8200 (2010); Latypova, L., et al., Adv. Sci., 1600394 (2017); Ogura, A., et al., Chem. Commun., 54, 8693-8696 (2018); Taichi, M., et al., Adv. Sci., 1700147 (2017)）。例えば、末端にシアル酸を有する糖鎖は肝臓に、または末端にガラクトースを有する糖鎖は腸管に速やかに到達することが知られている。したがって、選択された生体内標的部位に応じて、適切な糖鎖構造および糖鎖数で本発明の複合体を修飾することで、前記標的部位への指向性が高められた複合体とすることができる。

[0056] 一実施形態において、糖鎖修飾として、例えば、様々な種類のがんに相互作用するシアル酸、ガラクトサミン、ガラクトース、またはマンノースを非還元末端に有する糖鎖を複数個（例えば5～30個）用いることができる。代替的な実施形態において、糖鎖修飾として、フコースを有する糖鎖を用いることができる。当該実施形態において、修飾する複数個の糖鎖は同種類であっても複数種類であってもよく、各糖鎖のサイズは、1糖から25糖の範囲とすることができる。

[0057] 別の実施形態において、糖鎖修飾として、例えば、肝臓、脾臓、腸管、胆嚢、膀胱、または脳内などの特定の臓器に選択的に移行するシアル酸、ガラクトサミン、ガラクトース、またはマンノースを非還元末端に有する糖鎖を複数個（例えば5～30個）用いることができる。当該実施形態において、修飾する複数個の糖鎖は同種類であっても複数種類であってもよく、であってもよく、各糖鎖のサイズは、1糖から25糖の範囲とすることができる。

[0058] 修飾部位は、典型的には、前記複合体のタンパク質表面である。タンパク質表面の特定部位を糖鎖修飾する方法は、当業者に公知であり、いずれの方

法を用いて行ってもよい。本発明においては、例えば、国際公開第2008/096760号、日本国特許第6327547号、国際公開第2017/002918号などに記載されるクリック反応によって、タンパク質表面に糖鎖修飾を導入することができる。

[0059] 別の実施形態において、本発明の複合体は、生体内の標的部位と相互作用する部分をさらに含む。この関連で、「標的部位と相互作用する」とは、他の部位と比較して、有意に強い指向性で標的部位に集積または典型的には結合することを意味し得る。本発明において、標的部位は、特定の臓器もしくは器官、または特定の細胞腫などであり得る。

[0060] 本発明において、「生体内の標的部位と相互作用する部分」は、抗体またはそのフラグメント、ペプチドリガンドまたはその断片、DNAやRNA、あるいはpNA（ペプチド核酸）またはその断片などであり得る。この関連で、「生体内の標的部位と相互作用する部分」は、例えば、複合体に用いられるタンパク質との融合タンパク質として製造してもよいし、複合体に用いられるタンパク質と「生体内の標的部位と相互作用する部分」とを別々に調製し、当業者に公知の手段によって結合（例えば共有結合）させてもよい。

[0061] 具体的な実施形態において、本発明は、タンパク質と金属触媒との複合体である人工金属酵素（artificial metalloenzyme；ArM）に関する。好ましい実施形態において、本発明のArMは、HSAと金属触媒との複合体であって、前記複合体は、金属触媒が親水性環境に暴露されないまたは実質的に暴露されないように、金属触媒をHSAの疎水性スポットに収容することを特徴とする。

[0062] この実施形態において、HSAと共に使用される金属触媒は、例えば活性化の対象となるプロドラッグの種類などに応じて、当業者が適宜選択することができる。本発明の一実施形態において、HSAと共に使用される金属触媒はルテニウムである。

[0063] この実施形態において、金属触媒を収容するHSAの疎水性スポットは、特に制限されず、1つの疎水性スポットが金属触媒を収容してもよいし、複

数の疎水性スポットが金属触媒を収容してもよい。H S Aの疎水性スポットとしては、アルブミン薬物結合サイトⅠおよびアルブミン薬物結合サイトⅡを挙げることができる。一実施形態において、本発明の複合体は、H S Aのアルブミン薬物結合サイトⅠに金属触媒を収容する。

[0064] この実施形態においては、金属触媒とH S Aに対するリガンドとを連結し、前記リガンドを介して疎水性スポット内に金属触媒を結合させることによって、H S Aの疎水性スポットに金属触媒を収容させることができる。この目的に使用することができるリガンドは、金属触媒を収容する疎水性スポットに応じて変化しうる。例えば、H S Aのアルブミン薬物結合サイトⅠに金属触媒を収容させる場合には、前記リガンドとして、ワルファリン、アザプロパゾン、アセノクマロール、フェニルブタゾン、サリチル酸塩、インドメタシン、フェニトイン、トルブタミド、クロルプロパミド、イオフェノキサート、ヨジパミド、スルファジメトキシ、フェノプロクソモン、グリベンクラミド、スルファチアゾール、テノキシカム、カンプトテシン、バルジデンドアジ、アンデレラタン、ジアデレアル、アンデレラタン、ジアデレアル、アンデレラタン、ジアデレアルタン、プロダン、ビリルビン、エイコサノイド、およびカルボキシーメチルプロピルフランプロパノエート（尿毒症毒素）、およびクマリンから選択することができる。あるいは、H S Aのアルブミン薬物結合サイトⅡに金属触媒を収容させる場合には、前記リガンドとして、ジアゼパム、ケトプロフェン、クロフィブレート（*chlofibrate*）、イブプロフェン、イオパノエート（*iopanoate*）、アジドデオキシチミジン、フルフェナメート（*flufenamate*）、エタクリネート（*ethacrynate*）、ナプロキセン、フルルビプロフェン、シクロプロフェン、ベノキサプロフェン、フルクロキサシリン、クロロチアジド、ピルプロフェン、プロポフォル、イソフルラン、ダンシルサルコシン、ダンシルグリシン、アルキルアミノクマリン酢酸、ヒドロキシフラボン、レートリプトファン、中鎖脂肪酸アニオン（例えばオクタノエート）、レーチロキシ、クロライドイオン、ヨード酢酸、硫酸インドキシ

ル、および馬尿酸（尿毒素）から選択することができる。本発明の一実施形態において、HSAの疎水性スポットは薬物結合サイトIであり、当該サイトにルテニウムを収容するために、リガンドとしてクマリン誘導体、例えば7-ジメチルアミノクマリンが使用される。

[0065] 金属触媒と前記リガンドとの連結は、リンカーを介して行ってもよい。この目的に使用できるリンカーは、典型的には、両末端にアミノ基およびカルボキシ基を有するアリキル鎖やポリエチレングリコール（PEG）鎖などを用いることができる。具体的に、アルキル鎖リンカーとしては、例えば、 $-NH-(CH_2)_x-CO-$ （式中、 x は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、例えば1～15の整数とすることができる。）、 $-NH-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CO-$ （式中、 y は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、例えば1～15の整数とすることができる。）、または $-NH-(CH_2CH_2O)_z-CH_2CH_2-CO-$ （式中、 z は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、例えば1～15の整数とすることができる。）等を挙げることができる。

[0066] 金属触媒と前記リガンドとの連結にリンカーを用いる場合には、使用するリンカーの長さは、金属触媒がHSAの疎水性スポット内に収容され、親水性環境に暴露されないまたは実質的に暴露されない長さとする点に留意すべきである。例えば、リガンドとしてクマリンまたはその誘導体（例えば7-ジメチルアミノクマリン、7-ジエチルアミノクマリン（DEAC））を用いてHSAのアルブミン薬物結合サイトIにルテニウムを収容する場合、「親水性環境に実質的に暴露されない」は、親水性環境に対するルテニウムの露出面積が、ルテニウムの表面積全体の40%以下、好ましくは35%以下であり得る。あるいは、「親水性環境に実質的に暴露されない」は、HSAのアルブミン薬物結合サイトIに収容された際のルテニウムのSASAが、3.0以下、好ましくは1.0以下であり得る。また、その際に使用される例示的なリンカーは、 $-NH-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CO-$ であり

、その際、 y は1から6の整数、好ましくは1から3の整数であり得る。

[0067] H S Aと金属触媒との複合体である本発明のA r Mは、一実施形態において、H S Aの表面が糖鎖で修飾されている。糖鎖修飾の内容は、生体内の標的に応じて変化し得る。H S A表面上の修飾位置は、糖鎖の導入が可能であれば特に制限されず、例示的にはH S A表面にある30位のリジン残基を挙げることができる。

[0068] 本発明の複合体は、当該複合体に収容された触媒の種類に応じて、生体内でプロドラッグを活性化することができる。好ましくは、本発明の複合体は、当該複合体に収容された触媒の種類に応じて、生体内の特定の位置に集積し、当該位置選択的にプロドラッグを活性化することができる。

[0069] したがって、本発明は、別の態様において、本発明の複合体を含む組成物に関する。

[0070] 本発明の組成物は、一実施形態において、本発明の複合体によって活性化され得るプロドラッグと組み合わせて使用される医薬組成物である。当該実施形態において、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体、および場合により、本発明の複合体によって活性化され得るプロドラッグをさらに含む単剤形態であってもよい。本発明において使用することができる、本発明の複合体によって活性化され得るプロドラッグとしては、例えば各種抗がん剤を挙げることができ、これに限定されるものではないが、具体的にマイトマイシンC、ドキソルビシン、タキソール、エンドキシフェンなどを例示することができる。

[0071] 本発明の医薬組成物は、別の実施形態において、本発明の複合体と当該複合体によって活性化され得るプロドラッグとが別々の薬剤として提供される組み合わせ医薬の形態である。本発明の組み合わせ医薬において、本発明の複合体を含む第1の薬剤と、当該複合体によって活性化され得るプロドラッグを含む第2の薬剤とは、同時または異時に対象に投与することができる。

[0072] 本発明の組成物は、別の態様において、本発明の複合体によって活性化され得るプロドラッグおよび任意の薬学的に許容される担体を含む医薬組成物

に関し、当該医薬組成物は、本発明の複合体と組み合わせて使用されることによって特徴付けることができる。

[0073] 本発明の医薬組成物は、一実施形態において、生体内にある特定の細胞を選択的にタギングするために用いることができる。本発明において、「タギング」とは、内在するまたは外的に投与し得る、細胞機能を破壊することができる（例えば接着阻害剤）または免疫学的応答を誘発することができる非毒性の化学物質を用いて、標的の細胞にタグ付けすることをいう。そのような化学物質は、任意の金属触媒によって非活性型から活性型に変換される生体内または生体外化学物質や、任意の金属触媒によってその機能が強化される生体内または生体外化学物質であり得る。治療用途におけるこのような手法は、選択的細胞タギング（S e C T）と称され、細胞毒性の高い薬剤を用いて癌細胞を直接除去する従来の化学療法とは対照的に、周囲の組織を著しく傷つけることなく、間接的に標的細胞（例えば癌細胞）の死を導くことができることが期待される。例えば、本願実施例においては、がん細胞表面上に発現されたインテグリンに対する c R G D - p r o p a r g y l e s t e r (c R G D - P E) の結合性が本発明の複合体によって増強され、転移を阻害できる可能性が示されている。

[0074] 本発明の組成物は、別の実施形態において、バイオセンサーとして用いることができる。具体的に、本発明の複合体において、金属触媒と、それ自体蛍光性を有するおよび／またはアルブミン等タンパク質との結合によって蛍光性が増強されるリンカー（例えばクマリン誘導体）と、金属触媒と検出対象物質との反応によって離脱し得るクエンチャーとを用いることによって、検出対象物質の種類に応じた適切なバイオセンサーとして、本発明の複合体または組成物を設計することができる。本発明の具体的な実施形態において、本発明の組成物は、植物中のエチレンを検出するためのバイオセンサーとして用いられる。

[0075] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0076] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

[0077] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語および科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書および関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、または、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0078] 第1の、第2のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられる場合があるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第1の要素を第2の要素と記し、同様に、第1の要素は第2の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

[0079] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、しかしながら、本発明はいろいろな形態により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0080] [実施例1] a l b - R u の製造

金属触媒の溶媒中への暴露を防止することができる（結合ポケットを有する）生体適合性人工金属酵素（A r M）の設計のために、アルブミンの薬物結合サイト I（d r u g s i t e I）（偽活性部位としての疎水性結合ポケット）を利用した。その目標を達成するために、クマリン誘導体（ワルファリンなど）の結合（相互作用）が知られている薬物結合サイト I に、金属触媒を固定した（G h u m a n, J. ; Z u n s z a i n, P. A. ; P e t i t p a s, I. ; B h a t t a c h a r y a, A. A. ; O t a g i

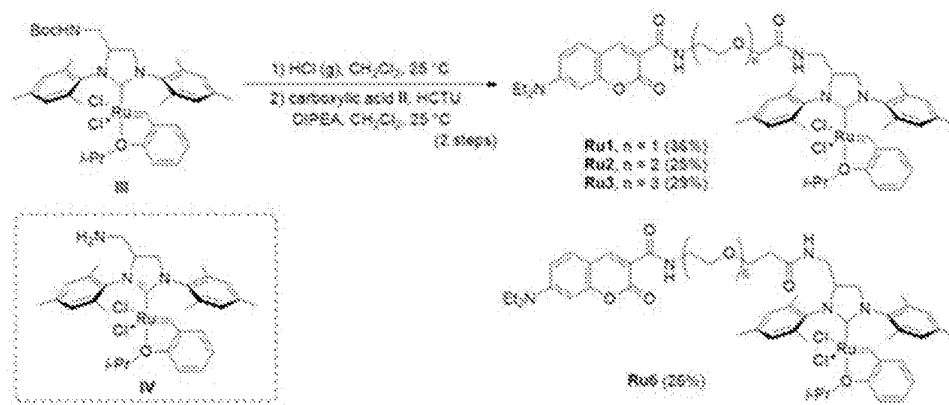
ri, M. ; Curry, S. J. Mol. Biol. 2005, 353, 38-52)。金属触媒の固定には、異なるPEGリンカー長を有するクマリン-Ru錯体Ru1~3、6を用いた。

[0081] 1. クマリン-Ru錯体の調製

1-1. 一般手順B

下記の反応スキームにしたがって、クマリン結合ルテニウム錯体Ru1~3、6を合成することができる。

[化1]



[0082] ルテニウム錯体IIIは公知技術(Lo, C. ; Ringenberg, M. R. ; Gnanndt, D. ; Wilson, Y. ; Ward, T. R. ChemComm 2011, 47, 12065-12067 ; Kajetanowicz, A. ; Chatterjee, A. ; Reuter, R. ; Ward, T. R. Catal. Lett. 2014, 144, 373-379 ; Zhao, J. ; Kajetanowicz, A. ; Ward, T. R. Org. Biomol. Chem. 2015, 13, 5652-5655)に従って調製される。ジクロロメタン(3 mL)中のルテニウム錯体III(80.0 mg、0.106 mmol)の溶液に25 °Cで塩酸ガスをバブリングする。塩酸ガスは、塩化アンモニウムに濃硫酸を滴下することで調製される。45分間攪拌した後、ジクロロメタン(1 mL)を注射器で反応物に加え、同じ温度で攪拌する。さらに15分後、反応物を減圧濃縮して

アミン I V を得て、これを精製することなく次の反応に使用する。

[0083] 別のフラスコで、ジクロロメタン (1 mL) に溶かしたカルボン酸 I I a (1.1 当量) およびカップリング剤 H C T U (1.3 当量) の溶液を 25 °C で 30 分間攪拌する。この反応物に、ジクロロメタン (1 mL) に溶かしたアミン I V (1 当量)、続いて同じ温度で N、N-ジイソプロピルエチルアミン (10 当量) を加えた。6 時間攪拌した後、1 M H C l 水溶液を加えることによって反応を停止させる。生成物をジクロロメタンで 3 回抽出し、合わせた有機抽出層を飽和重曹水およびでブライン洗浄し、乾燥し (硫酸ナトリウムによる)、そして減圧濃縮する。濃縮残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、クマリン-R u 錯体 R u 1 ~ 3, 6 を得ることができる。

[0084] 1-2. クマリン-R u 錯体 R u 1 の調製

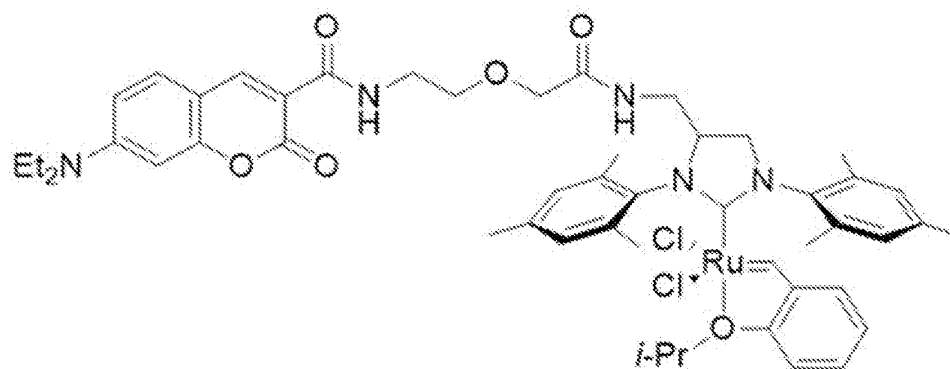
一般手順 B に従って、ルテニウム錯体 I I I (80.1 mg、0.106 mmol)、カルボン酸 I I a (42.4 mg、0.117 mmol)、H C T U (57.6 mg、0.139 mmol) および N、N-ジイソプロピルエチルアミン (137 mg、1.06 mmol) から得られる反応物を、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (cyclohexane/EtOAc/CHCl₃/MeOH=40/40/15/5) による精製後に、目的のクマリン-R u 錯体 R u 1 (37.7 mg、35.6%) を緑色固体として得る。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 1.24-1.27 (m, 12H), 2.37-2.51 (br m, 18H), 3.47 (q, 4H, J=7.1 Hz), 3.53-3.71 (m, 6H), 3.79 (m, 1H), 3.93 (d, 1H, J=15.3 Hz), 3.99 (d, 1H, J=15.3 Hz), 4.05 (dd, 1H, J₁=J₂=10.0 Hz), 4.33 (dd, 1H, J₁=J₂=10.0 Hz), 4.75-4.84 (br m, 1H), 4.89 (sept, 1H, J=6.1 Hz), 6.50 (d, 1H, J=2.3 Hz), 6.66 (dd, 1H, J₁=2.3 Hz, J

$_2 = 9.1 \text{ Hz}$), 6.78 (d, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$), 6.85 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 7.7 \text{ Hz}$), 6.91 (dd, 1H, $J_1 = 1.7 \text{ Hz}$, $J_2 = 7.7 \text{ Hz}$), 7.02 (s, overlapped, 2H), 7.04 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, $J = 9.1 \text{ Hz}$), 7.48 (ddd, 1H, $J_1 = 1.7 \text{ Hz}$, $J_2 = J_3 = 7.7 \text{ Hz}$), 8.67 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 16.50 (s, 1H);

HRMS (ESI) m/z 964.3355 (964.3359 calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{61}\text{ClN}_5\text{O}_6\text{Ru}$, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$).

[化2]



Ru1

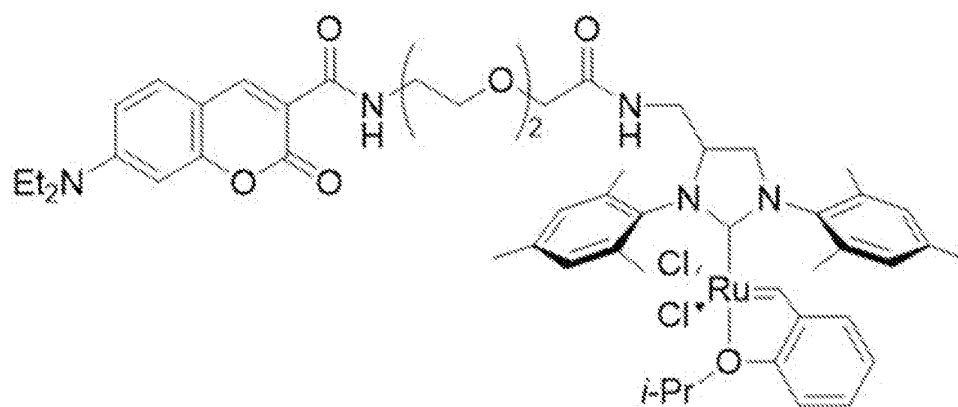
[0085] 1-3. クマリン-Ru錯体Ru2の調製

一般手順Bに従って、ルテニウム錯体III (80.1 mg、0.106 mmol)、カルボン酸Ib (47.4 mg、0.117 mmol)、HCTU (57.1 mg、0.138 mmol) およびN、N-ジイソプロピルエチルアミン (137 mg、1.06 mmol) から得られる反応物を、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (cyclohexane/EtOAc/CHCl₃/MeOH=40/40/15/5) による精製後、目的のクマリン-Ru錯体Ru2 (27.9 mg、25.2%) を緑色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ) 1.22–1.26 (m, 12H), 2.26–2.46 (br m, 18H), 3.38–3.54 (m, 4H), 3.61–3.70 (m, 10H), 3.74–3.82 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 4.11 (dd, 1H, $J_1=J_2=10.3\text{ Hz}$), 4.28 (dd, 1H, $J_1=J_2=10.3\text{ Hz}$), 4.66–4.75 (br m, 1H), 4.88 (sept, 1H, $J=6.1\text{ Hz}$), 6.47 (d, 1H, $J=2.3\text{ Hz}$), 6.65 (dd, 1H, $J_1=2.3\text{ Hz}$, $J_2=9.0\text{ Hz}$), 6.77 (d, 1H, $J=7.6\text{ Hz}$), 6.83 (dd, 1H, $J_1=J_2=7.6\text{ Hz}$), 6.89 (dd, 1H, $J_1=1.9\text{ Hz}$, $J_2=7.6\text{ Hz}$), 6.98–7.01 (br m, 4H), 7.43 (d, 1H, $J=9.0\text{ Hz}$), 7.47 (ddd, 1H, $J_1=1.9\text{ Hz}$, $J_2=J_3=7.6\text{ Hz}$), 8.67 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 16.47 (s, 1H);

HRMS (ESI) m/z 1008.3613 (1008.3622 calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{65}\text{ClN}_5\text{O}_7\text{Ru}$, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$).

[化3]



Ru2

[0086] 1–4. クマリン–Ru錯体Ru3の調製

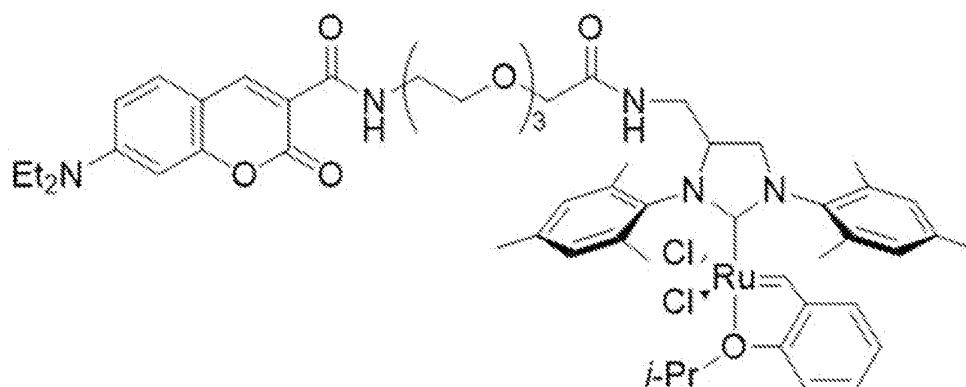
一般手順Bに従って、ルテニウム錯体III (28.8mg、38.1 μmol)、カルボン酸Ic (18.9mg、42.0 μmol)、HCT

U (21.3 mg、51.5 μmol) およびN、N-ジイソプロピルエチルアミン (49.7 μg 、385 μmol) から得られる反応物を、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (cyclohexane/EtOAc/CHCl₃/MeOH=40/40/15/5) による精製後、目的のクマリン-Ru錯体Ru3 (12.0 mg、28.9%) を緑色の固体として得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 1.22–1.28 (m, 12H), 2.34–2.44 (br m, 18H), 3.46 (q, 4H, J=7.2 Hz), 3.55–3.70 (m, 14H), 3.71–3.80 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 4.04 (dd, 1H, J₁=J₂=10.7 Hz), 4.27 (dd, 1H, J₁=J₂=10.7 Hz), 4.57–4.65 (m, 1H), 4.89 (sept, 1H, J=6.2 Hz), 6.47 (d, 1H, J=2.3 Hz), 6.65 (dd, 1H, J₁=2.3 Hz, J₂=8.8 Hz), 6.79 (d, 1H, J=7.7 Hz), 6.84 (dd, 1H, J₁=J₂=7.6 Hz), 6.89 (dd, 1H, J₁=1.9 Hz, J₂=7.6 Hz), 7.01–7.05 (br m, 4H), 7.42 (d, 1H, J=8.8 Hz), 7.47 (ddd, 1H, J₁=1.9 Hz, J₂=J₃=7.6 Hz), 8.67 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 16.47 (s, 1H);

HRMS (ESI) m/z 1088.3661 (1088.3648 calcd for C₅₄H₇₀Cl₂N₅O₈Ru, [M+H]⁺).

[化4]

**Ru3**

[0087] 1-5. クマリン-Ru錯体Ru6の調製

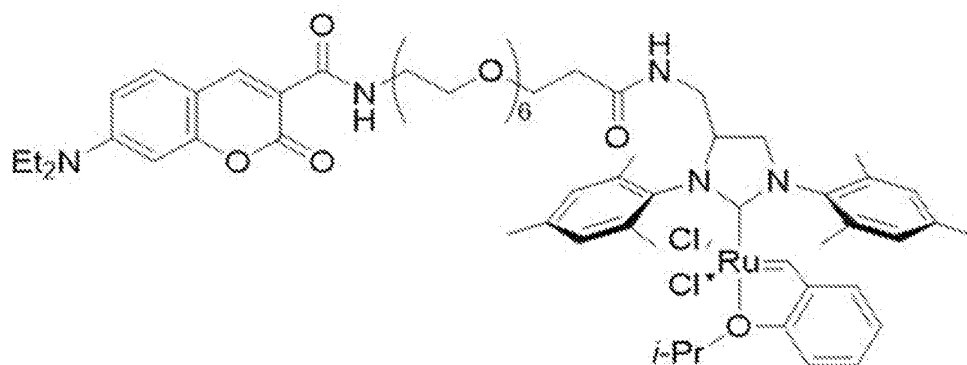
一般手順Bに従って、ルテニウム錯体III (80.4 mg、0.106 mmol)、カルボン酸Id (69.9 mg、0.117 mmol)、HCTU (57.5 mg、0.139 mmol) およびN、N-ジイソプロピルエチルアミン (137 mg、1.06 mmol) シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (cyclohexane/EtOAc/CHCl₃/MeOH=20/20/55/5) による精製後、目的のクマリン-Ru錯体Ru6 (34.4 mg、26.3%) を緑色の固体として得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 1.21-1.30 (m, 12H), 2.37-2.45 (br m, 18H), 3.45 (q, 4H, J=7.3 Hz), 3.56-3.68 (m, 31H), 3.99 (dd, 1H, J₁=J₂=10.5 Hz), 4.25 (dd, 1H, J₁=J₂=10.5 Hz), 4.53-4.62 (br m, 1H), 4.91 (sept, 1H, J=6.1 Hz), 6.49 (d, 1H, J=2.3 Hz), 6.64 (dd, 1H, J₁=2.3 Hz, J₂=8.8 Hz), 6.80 (d, 1H, J=7.6 Hz), 6.86 (dd, 1H, J=7.6 Hz), 6.90 (dd, 1H, J₁=1.9 Hz, J₂=7.6 Hz), 7.03-7.07 (br m, 4H), 7.42 (d, 1H, J=8.8 Hz), 7.48

(ddd, 1H, $J_1 = 1.9 \text{ Hz}$, $J_2 = J_3 = 7.6 \text{ Hz}$), 8.68 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 16.47 (s, 1H);

HRMS (ESI) m/z 1234.4603 (1234.4593 calcd for $\text{C}_{61}\text{H}_{84}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Ru}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

[化5]



Ru6

[0088] 2. a l b - R u の製造

a l b - R u の製造は、ルテニウム触媒 R u 1 - 3、6 と、ヒト血清アルブミン (H A S) とを反応して、a l b - R u 錯体を形成することによって行った。

反応液の組成は、30 μM のヒト血清アルブミン (以下、H S A とする。50 n m o l、300 μM ストック溶液 (水溶液) を 167 μL 使用) と、様々な濃度の触媒 (R u 1 - 3、6) を含んだ。触媒は、例えば、37 μM の R u 1 (62 n m o l、370 μM ストック溶液 (ジオキサン溶液) を 167 μL 使用) を使用した。総反応容量は、10% ジオキサンを含む P B S 緩衝液 (p H 7. 4) で 1670 μL とした。H S A 添加による反応開始後、反応混合物は穏やかに混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。そして、反応溶液は、A m i c o n (登録商標) の超遠心フィルター (30 k D a) を用いて、P B S 緩衝液で洗浄し、濃縮した。次いで、濃縮した a l b - R u 溶液は P B S 緩衝液で希釈し、50 μM ストック溶液として、100

0 μ L を得た。

[0089] A l b - R u 錯体形成の確認は、クマリン系分子は溶媒の極性に敏感であるという事実に依拠する蛍光アッセイを用いた。R u 1 - 3, 6 を用い、リガンド-アルブミンの 1 : 1 の反応で得られた蛍光強度（測定値）を図 1 に示す。

対照（リガンドのみ、あるいは H S A のみ）と比較し、a l b - R u 複合体形成の指標と考えられる、有意に高い蛍光レベルが検出された。

[0090] また、R u 1 - 3, 6 の結合部位を間接的に確定するために、H S A の溶液を 2 当量のいずれかの結合リガンド（ワルファリン、イブプロフェン）と共に 37 °C で 1 時間プレインキュベートした。その後、アルブミンと結合リガンドの混合物を用いて、R u 1 - 3, 6 の飽和結合曲線を作成した（図 2）。

[0091] 図 2 の結果から、R u 1 - 3, 6 の結合はイブプロフェンの存在下で影響を受けないが、ワルファリンの存在下で有意に減少することが明らかとなった。この結果は、H S A の薬物結合サイト I がこれらの化合物の主な結合部位であることを強く示唆している。

[0092] [実施例 2] a l b - R u の反応性の検証

次に、a l b - R u 複合体の、オレフィン 1 a ~ 1 d およびエンイン 1 e の閉環メタセシス（RCM）を触媒する能力を調べた（図 3）。また、a l b - R u 1 ~ 3, 6 は、異なる P E G リンカー長を有するため、併せて、疎水性結合ポケットの有効サイズおよび適合性も検証した。

[0093] 反応液は基本的には、1 : 9 のジオキサン : P B S 緩衝液（p H 7. 4）中に、基質としての 1 a - e と a l b - R u 複合体（すなわち R u 1 ~ 3, 6）を含んだ。反応は、37 °C で 2 時間のインキュベート後、ドデカンチオールでクエンチし、さらにメタノールで希釈し、サンプルはフィルター濾過し、H P L C 分析を行い、それぞれの生成物 2 a - e への代謝回転（T O N）を算出した。対照として、液中フリーのルテニウム触媒（f r e e - i n - s o l u t i o n）、R u 1 - 3, 6 を用いる反応も同様の条件下で実施

した。

[表1]

Entry	Sub.	Catalyst	Catalyst Linker Length				
			Ru1 (n = 1)		Ru2 (n = 2)	Ru3 (n = 3)	Ru6 (n = 6)
			TON	r	TON	TON	TON
1	1a	ab-Ru	0.9 ± 0.01	0.35	0.3 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01
2		Ru	2.6 ± 0.05		1.5 ± 0.04	1.3 ± 0.01	0.8 ± 0.10
3	1b	ab-Ru	2.3 ± 0.06	0.34	0.8 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.5 ± 0.01
4		Ru	6.9 ± 0.01		6.3 ± 0.02	5.2 ± 0.01	5.5 ± 0.03
5	1c	ab-Ru	0.4 ± 0.19	0.25	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
6		Ru	1.6 ± 0.02		1.9 ± 0.02	1.5 ± 0.10	1.6 ± 0.36
7	1d	ab-Ru	19.7 ± 0.17	0.59	2.8 ± 0.04	0.9 ± 0.01	0.5 ± 0.03
8		Ru	33.2 ± 0.18		26.8 ± 3.77	26.0 ± 0.17	34.7 ± 0.18
9	1e	ab-Ru	29.9 ± 0.20	0.57	1.2 ± 0.05	1.3 ± 0.01	0.6 ± 0.03
10		Ru	52.5 ± 0.10		55.7 ± 0.34	56.6 ± 0.10	41.5 ± 0.15

[0094] この実験での最初の観察の1つは、(クマリンアンカーとルテニウム触媒の間の) PEGリンカーの長さの増加と、活性の減少との間の相関関係であった。例えば、基質4, 4-ビス((ベンゾイルオキシ)メチル)-1, 6-ヘプタジエン1d(エントリー7)の代謝回転は、a l b-R u 1(19.7)の存在下で最も高く、a l b-R u 2(2.8)の存在下で急激に低下し、a l b-R u 6(0.5)の存在下でごくわずかなレベルを示した。用いたすべてのリンカー長で、液中フリーのルテニウム触媒、R u 1を使用して得られた代謝回転(TON)が一般に28~35の範囲内(エントリー8)に留まることを考えると、この観察結果は、疎水性結合ポケットが、長いリンカーを有するクマリンアンカー-触媒複合体を収容できないことを示唆する。

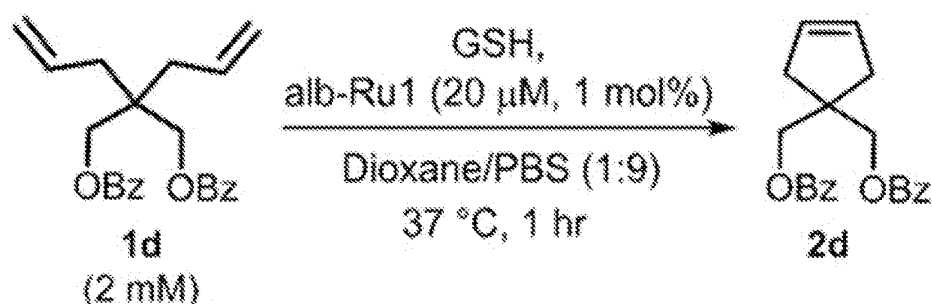
[0095] [実施例3] a l b-R uの生体適合性の検証

a l b-R u複合体が閉環メタセシス、およびエンイン交差メタセシスを触媒する活性を示すことを確認した後、次いで、グルタチオンの作用を評価することによって、生体適合性の証明を目指した。この研究のために、化合物1dをモデル基質として選択した。

[0096] この研究での重要な実験の1つは、グルタチオンに対するa l b-R u 1の触媒保護能力を調べることであった。下記に示すように、1mol%のa l b-R u 1を用いて、基質1dを様々な濃度のGSH添加と共に反応させた。なお、a l b-R u 1の濃度に応じて、グルタチオンは等量数を加えた

。

[化6]



[0097] その結果、20 mM GSH (alb-Ruに対して1000当量のGSH)まで、(算出した)TONの変化は見られなかった。100 mMおよび200 mMのGSH添加で、最終的に対照と比較してそれぞれ60%および82%のTON減少が認められた。

[0098] 次の検討では、GSH保護能力の閾値上限を知るため、金属触媒保護の持続時間を評価した。具体的には、alb-Ru1を、GSH、ドデカンチオール、またはPBS緩衝液(ブランクとして)のいずれかと共に様々な時間にわたってプレインキュベートした後、基質1dを反応液に添加し、そして反応1時間の後にTON値を算出した。図4には、生理学的に適切なGSH濃度(200 μM、alb-Ru1に対して10当量)で行った実験を示している。

[0099] GSHと6時間プレインキュベーション後に測定されたTON値は、一般的に、ブランク(PBS緩衝液)と比較してわずかな減少しか示さなかった。対照的に、閾値上限のGSH(20 mM、alb-Ru1に対して1000当量)を用いた実験では、反応性に対して著名な(はるかに大きな)効果を示した(図5)。

[0100] この場合、GSHと1時間プレインキュベーション後では、活性の約50%の減少が観察され、一方で、4時間のプレインキュベーションでは、活性

はほぼ消失した。

- [0101] A l b - R u 複合体の生体適合性をさらに評価するために、基質 1 d を、10 mol % の a l b - R u 1 複合体と 37℃ で 2 時間インキュベートした。2 d の生成収率は、1 : 8 : 1 ウシ胎児血清 / D M E M 培地 / ジオキサンで約 2 % であり、そして 1 : 8 : 1 正常ラット血清 / P B S 緩衝液 / ジオキサンで約 1 % であった。しかしながら、回収した出発物質 1 d がそれぞれおよそ 8 % および 3 % であったので、低い生成収率は、血清中に通常、存在するタンパク質による基質の捕捉あるいは分解に起因する可能性が高い。
- [0102] A r M 活性（人工金属酵素活性）に関して、G S H の添加有りと添加無しで、基質 1 a - e のミカエリス-メンテンのカイネティック（速度論的）パラメーターを算出した（図 6）。
- [0103] その結果、G S H 添加の有無にかかわらず、A r M 活性において、1 a - 1 e で測定されたカイネティック数値はわずかな変化（誤差内）のみであった。ただし、特に重要であったのは、これらの基質の間で観測された触媒効率（ k_{cat}/K_M ）の違いである。特に、基質 1 e は約 $3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{cat}/K_M 値を示し、この値は天然酵素の反応性（ $k_{cat}/K_M \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ）と比べると見劣りがするが、この結果から非天然金属の A r M が、天然酵素と同等の反応性に達する可能性があることが強調される。
- [0104] [実施例 4] グルタチオン耐性のメカニズム

アルブミンの薬物結合サイト I の疎水性結合ポケットにおける侵入および立体配座の程度を予測するために、AutoDockTools の GUI インタフェースで AutoDock 4.2 (Morris, G. M. ; Huey, R. ; Lindstrom, W. ; Sanner, M. F. ; Bewley, R. K. ; Goodsell, D. S. ; Olson, A. J. J. Comput. Chem. 2009, 30, 2785-2791.) を用いて、化合物 Ru 1 - 3, 6 を、ヒト血清アルブミン (PDB : 1H9Z) にドッキングする分子モデリングの研究を行った。その結果は、アルブミンの薬物結合サイト I の結合ポケットが、比較的短い PEG リンカー長を有する

クマリニールテニウム触媒（例えば、Ru1）の結合を収容するのに十分な深さであるという根本的仮説を裏づける。しかしながら、図7に示されるように、PEGリンカー長が徐々に長くなると（例えば、Ru6）、結合ポケットの外側にルテニウム部分が押し出され、溶液中の生体分子へのその露出を増加させる。

[0105] この理論は、ドッキングするリガンドのルテニウム原子の、相対溶媒接近可能表面積（SASA）の計算によっても、より長いPEGリンカーとの相関が増加するという事実でさらに支持された。なお、図7において、ゼロ値は溶媒に露出していない原子を示している。

[0106] [実施例5] 人工金属酵素のターゲティング

治療用ArMの開発を推進させるために考慮すべきもう1つの側面は、体内の特定の臓器／細胞への局在化を促進するためのターゲティング方法論の必要性である。

[0107] 成功すれば、プロドラッグ療法への適応が可能になり、それは細胞傷害性分子に基づく抗がん療法など、副作用リスクのある医薬品候補の開発に特に有益である。

[0108] 異なる真核細胞の表面を包むグリコカリックスの複雑さは変化していることから、特定の複合型N-グリカン集合体を結合したグリコアルブミンが、異なる癌細胞間で、異なる認識能や結合性を発揮できることが見出されている。これらのグリコアルブミンがin vivo担体として作用する能力があるかを試験することを目的とした重要な研究では、プロパルギルエステルを基にしたタンパク質ラベリングに関して、金触媒を含むグリコアルブミンがそのN-グリカン構造によって生きたマウスの特定の臓器に局在化し、in vivo触媒活性を示した（Tsubokura, K. ; Vong, K. K. H. ; Pradipta, A. R. ; Ogura, A. ; Urano, S. ; Tahara, T. ; Nozaki, S. ; Onoe, H. ; Nakao, Y. ; Sibgatullina, R. ; Kurbangalieva, A. ; Watanabe, Y. ; Tanaka, K. Angew. C

hem. Int. Ed. Engl. 2017, 56, 3579–3584.
)。

- [0109] 癌に対する適応性を開発検討するために、標的基として、シアル酸 α (2, 3) 結合末端のN-グリカンの均一な集合体を選択した。この選択は、シアル酸 α (2, 3) 結合を有するグリコアルブミン (2, 3-Sia) がSW620ヒト結腸腺癌細胞に優先的に蓄積することができ、またA549ヒト肺基底上皮腺癌細胞およびHeLaヒト子宮頸癌由来細胞に対しても中等度の結合を示した、以前の研究に基づいてなされた (Ogura, A. ; Urano, S. ; Tahara, T. ; Nozaki, S. ; Sibgatullina, R. ; Vong, K. ; Suzuki, T. ; Dohmae, N. ; Kurbangalieva, A. ; Watanabe, Y. ; Tanaka, K. ChemComm 2018, 54, 8693–8696.)。この効果は、 α (2, 3) 結合シアル酸の既知の受容体と知られているガレクチン-8の過剰発現によって起こされる可能性が高い (Lahm, H. ; Andre, S. ; Hoeflich, A. ; Fischer, J. R. ; Sordat, B. ; Kaltner, H. ; Wolf, E. ; Gabius, H. -J. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2001, 127, 375–386 ; Carlsson, S. ; Oberg, C. T. ; Carlsson, M. C. ; Sundin, A. ; Nilsson, U. J. ; Smith, D. ; Cummings, R. D. ; Almkvist, J. ; Karlsson, A. ; Leffler, H. Glycobiology 2007, 17, 663–676.)。
- [0110] 初めに、ルテニウム触媒Ru1を固定したグルコシル化ArM (GARMrM) -Ru1 (2, 3-Sia) を調製した後、SW620ヒト結腸腺癌細胞へのターゲティング能 (標的化能) を結合実験にて評価した。GARMrM-Ru1 (2, 3-Sia) の癌細胞への特異的結合を評価するために、癌細胞は96ウェルの透明底プレートに 10^4 細胞/wellの密度で播種し、一晚培養した。その後、培地を除去し、[1] GARMrM-Ru1 (2, 3-Si

a)、[2] a l b-R u、[3] G A (2, 3-S i a)、または[4] R u 1をいずれも最終濃度10 μ Mとなるように添加した。細胞を37℃で3時間インキュベートした後、培地を除去し、PBS緩衝液で洗浄し(3回)、ホルムアルデヒド試薬を用いてプレートに固定した。細胞観察はキーエンス社製BZ-X710 A l l - i n - o n e F l u o r e s c e n c e M i c r o s c o p e (登録商標)を用いて行い、蛍光画像と明視野画像を記録した。クマリン由来蛍光の検出には、E T - E B F P 2 / C o u m a r i n / A t t e n u a t e d D A P I F i l t e r S e t C a t # 4 9 0 2 1 (C h r o m a T e c h n o l o g y C o r p . , V e r m o n t , U S A)を用いた。イメージ画像は20倍の倍率で撮り、BZ-Xアナライザー(キーエンス社)ソフトウェアを用いて解析した。

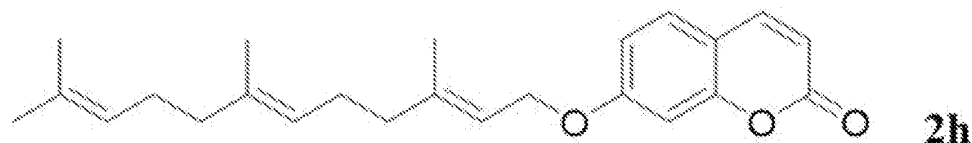
[0111] 結果を図8に示す。HSAに結合したクマリンの蛍光発光を利用した細胞イメージングによって、G A r M-R u 1 (2, 3-S i a)とインキュベートしたSW620ヒト結腸腺癌細胞において、その対照と比較して、より強い蛍光蓄積が認められた。

[0112] 追加試験として、H e L aヒト子宮頸癌由来細胞およびA549ヒト肺基底上皮腺癌細胞を用いて同様の実験も行った。以前の報告と一致して、G A r M-R u 1 (2, 3-S i a)のSW620ヒト結腸腺癌細胞への蓄積は、H e L aヒト子宮頸癌由来細胞およびA549ヒト肺基底上皮腺癌細胞のそれより高いことが観察された(図9)。

[0113] [実施例6] プロドラッグ療法

次いで、G A r M-R u複合体の標的化抗癌治療への適応性を検討した。閉環メタセシスによって活性化される薬物候補の初期検討として、ウンベリプレニン(2h)を選択した。

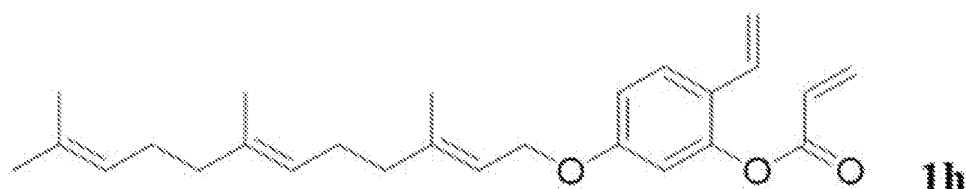
[化7]



[0114] フェルラ属植物から抽出される天然物として知られているウンベリプレニンは、様々な癌細胞株に対して細胞傷害活性が示されていた (Shakeri, A. ; Iranshahy, M. ; Iranshahi, M. J. Asian. Nat. Prod. Res. 2014, 16, 884-889 ; Rashidi, M. ; Khalilnezhad, A. ; Amani, D. ; Jamshidi, H. ; Muhammadnejad, A. ; Bazi, A. ; Ziaei, S. A. J. Cell. Physiol. 2018, 233, 8908-8918 ; Jun, M. ; Bacay, A. F. ; Moyer, J. ; Webb, A. ; Carrico-Moniz, D. Bioorganic Med. Chem. Lett. 2014, 24, 4654-4658.)。その細胞毒性のメカニズムは、細胞をG1期に停止させ、さらにカスパーゼ-8および9の活性化、Bcl-2およびMcl-1のダウンレギュレーションによってアポトーシスを誘導することが示されている (Barthomeuf, C. ; Lim, S. ; Iranshahi, M. ; Chollet, P. Phytomedicine 2008, 15, 103-111 ; Gholami, O. ; Jeddi-Tehrani, M. ; Iranshahi, M. ; Zarnani, A. H. ; Ziaei, S. A. Iran J. Pharm. Res. 2013, 12, 371-376 ; Gholami, O. ; Jeddi-Tehrani, M. ; Iranshahi, M. ; Zarnani, A. H. ; Ziaei, S. A. Iran J. Pharm. Res. 2014, 13, 1387-1392.)。その非常に高い疎水性 (主にファルネシル部分によって付与される) のため、ウンベリプレニンのプロドラッグ (1h) はアルブミンベースのArMに対し

て理想的な基質であると理論づけた。

[化8]



[0115] これを検証するため、単純化したクマリン誘導体 1 g およびウンベリプレニンのプロドラッグ 1 h の両方を用いて速度論的実験を行った（図 10）。

[0116] クマリン前駆体は通常、水性条件下で RCM 反応性が劣ることが知られているが、クマリン誘導体 1 g のごく僅かな反応性 ($k_{cat}/K_M < 1$) は予想外であった。この説明として、前駆体 1 g がアルブミンに対して非常に低い結合親和性 (K_D 約 $129 \mu M$) を有するという結合実験の結果が示している。一方、疎水性のプロドラッグ 1 h の有意に高い活性 (1 g と比較して少なくとも 1500 倍高い k_{cat}/K_M) は、疎水性結合ポケットへの進入を促進する 1 h の長いアルキル鎖部分におそらく起因する。

[0117] 次に、GAR M に基づく抗癌アプローチの、in cellulo 活性を評価するための一連の実験を行った。

設定した特定の濃度 (SW620 ヒト結腸腺癌細胞では $32 \mu M$; HeLa ヒト子宮頸癌由来細胞および A549 ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞では $64 \mu M$) のプロドラッグ 1 h を使用し、添加する GAR M-Ru1 の量を変化させることで、細胞傷害性試験を行った。

[0118] 細胞生存率測定は、プロメガ社、CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) を用いて行った。培養細胞は、Falcon (登録商標) の 96 穴マイクロプレートに、約 10^3 細胞/well の密度で播種し、一晩培養した。その後、培地を除去し、様々な濃度の化合物を添加した。化合物を溶解するために DMSO を使用し、細胞への添加の際には、DMSO 濃度は 1% とした。96 時間インキュベーションした後、

細胞の培養液を、新鮮な培地 $85 \mu\text{L}$ に置換した。その後、 $15 \mu\text{L}$ の MTS 試薬を添加し、 37°C で 2.5 時間のインキュベートした後、 490 nm で吸光度を測定した。対照とした 1% DMSO を添加した細胞の吸光度を 100% とし、細胞生存率を算出した。

糖鎖によるターゲティング効果を説明するために、対照として、糖鎖のない a l b - R u 1 を用いて、同様な条件下での実験を行った。これらの結果から、3つの癌細胞株すべてにおいて、プロドラッグ 1 h と G A r M - R u 1 の混合物は、細胞増殖を有意に減少 ($< 5\%$) し、その効果はプロドラッグ 1 h と G A r M - R u 1 の対応する濃度での効果を超えていた (図 11)。別の重要な観察は、プロドラッグ 1 h と a l b - R u 1 の混合物の細胞傷害活性は、はるかに有効性が低いことであった。このことは、糖鎖によるターゲティング (標的化) が、細胞表面や細胞内への金属触媒の局在化に重要であることを示唆する。

[0119] [実施例 7] エチレンを検出する人工メタロエンザイム (A r M) (A r M エチレンプローブ; A E P) の合成

[0120] 図 12 は、A r M エチレンプローブ (A E P) の合成スキームを記載する。

7-ジエチルアミノクマリン (D E A C) 自体が発する蛍光は、周囲の溶媒の極性に高い感受性を有しており、D E A C - R u の量子収率は、極性環境下 (10% ジオキサン/水) から非極性環境下 (60% ジオキサン/水) への変化により、約 20 倍に増加する。そこで、本合成では、オレフィンを含む D A B C Y L 失活剤 (クエンチャー) と、a l b - R u との反応に基づいて、A E P を合成した。

[0121] 7-1. A E P の調製

$30 \mu\text{M}$ H S A 溶液 (50 nmol 、 $300 \mu\text{M}$ 水溶液から $167 \mu\text{L}$) と $37 \mu\text{M}$ D E A C - R u 溶液 (62 nmol 、 $370 \mu\text{M}$ ジオキサン溶液から $167 \mu\text{L}$) を混合させることにより、a l b - R u を調製した。反応溶液は 10% ジオキサンを含む pH 7.4 の P B S 緩衝溶液で、全量を

1670 μL とした。HSA添加による反応開始後、反応溶液を穏やかに攪拌し、37度で1時間インキュベートした。続いてアミコンウルトラ遠心式フィルター(30 kDa)を用いて反応溶液を濃縮し、PBS緩衝溶液で3回洗浄した。濃縮したalb-Ru溶液に水を加えて50 μL に薄め、1 mMのストック溶液を得た。AEP溶液を調製するために、100 μM alb-Ru溶液(50 nmol、1 μM 水溶液から50 μL)と500 μM DABCYLクエンチャー溶液(250 nmol、555 μM のDMSO:水=1:8溶液から450 μL)の混合溶液を作製した。反応溶液を穏やかに攪拌し、37度で5分間インキュベートした。続いてアミコンウルトラ遠心式フィルター(30 kDa)を用いて反応溶液を濃縮し、PBS緩衝溶液で3回洗浄した。濃縮したAEP溶液に水を加えて500 μL に薄め、100 μM のストック溶液を得た。

[0122] タンパク質複合体(alb-Ru、AEP)の蛍光強度は、JASCO FMP-963 microplate readerの付いたJASCO FP-6500 Spectrofluorometerを用いて測定した。サンプルを準備するため、alb-RuとAEPの両方を10 μM の濃度の水溶液に調製した。そしてサンプルを96ウェルマイクロプレートにアリコート(100 μL)し、 $\lambda_{\text{EX}}=420\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{EM}}=463\text{ nm}$ で測定した。全ての測定は3回行った。

[0123] また、この研究で用いたタンパク質複合体(alb-Ru、AEP)の主な構造変化を見分けるため、円偏光二色性(CD)分析を行った。CDスペクトルは0.1 cmのセルを使い、J-1500 Circular Dichroism Spectrometer(JASCO)を用いて測定した。10%ジオキサンの水溶液をブランクとして使い、これをスキャン中に自動的にサンプルから差し引いた。データは200-250 nmを100 nm/minのスキャン速度で記録した。各タンパク質複合体の濃度は2.3 μM に保った。

[0124] [結果]

アルブミンの結合ポケットの中に存在するRuQ複合体 (DEAC-Ru-DAICYL complex) は、クエンチャーのため蛍光強度は著しく低く、これは図13でalb-RuとAEPプローブの蛍光強度を比較しても明らかである。さらに、これらの円偏光二色性 (CD) が完全に重なったことから、タンパク質の大きな構造変性は見られないことが確認された (図14)。

[0125] 7-2. AEPによるエチレンの検出

AEPによるエチレンの検出メカニズムは、エチレンをAEP中のルテニウム触媒と反応させることにより、DAICYLクエンチャーに置き換えて、蛍光シグナルに活性化することによる。そこで、本実施例では、果物および植物におけるエチレンの検出にAEPを用いた。

[0126] [キウイフルーツのイメージング]

未熟な、あるいは熟成したキウイフルーツは食料品店で購入した。外側の果皮や子房室、柱軸を含む断片を得るため、キウイフルーツをキッチンナイフでおよそ2.0 cm x 4.5 cmの大きさに切ることにより、キウイフルーツの断片を準備した。エチレン生産を追跡するため、10 cmのシャーレの中心に170 μ LのAEP (400 μ M溶液) を注いだ。続いて、サンプルをAEP溶液の上に作用させた。サンプルを室温でインキュベートして、イメージングを特定の時間 (1、24時間後) に行った。イメージングでは、ET-EBFP2/Coumarin/Attenuated DAPI Filter Set Cat#49021 (Chroma Technology Corp.) を備えたKeyence BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope (登録商標) を用いた。明視野像 (カラー) は25分の1秒、蛍光画像は3.5分の1秒の露出設定で得られた。複数のイメージング画像は4倍率で得て、画像結合と分析はBZ-X Analyzerソフトウェア (Keyence) を用いて行った。

[0127] [シロイヌナズナのイメージング]

シロイヌナズナは23度の土で $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で育てた。10時間明るく、14時間暗くする光周性を適用した。エチレン生産を追跡するため、まず4-6週間の植物から葉を取り入れた。続いて鉗子を用いて、葉から透明な表皮の皮を剥がし、96ウェルの透明底プレートに置いた。水($100 \mu\text{L}$)を加えた後、傷のストレスの効果を除外するために室温で12時間、サンプルをインキュベートした。実験の条件により、1 mMのACC溶液(55 mM の水溶液を $2 \mu\text{L}$)、 $4.8 \mu\text{M}$ の flg22 、あるいは elf18 溶液($5 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ の水溶液)、 $\text{OD}_{600}=0.02$ の*Pseudomonas*細菌溶液($2 \mu\text{L}$ の $\text{OD}_{600}=1.0$ の標準溶液)など、様々な溶液を必要に応じて添加した。ACCと*Pseudomonas*細菌を含む実験では、室温で12時間のインキュベートを適用した。一方で、PAMPを含む実験では室温で6時間のインキュベートを行なった。続いて、これらの溶液を表皮の皮のサンプルから完全に取り除き、 $100 \mu\text{M}$ のAEP溶液(ストック溶液から $50 \mu\text{L}$)を添加した。30分後、溶液を完全に取り除いて水で洗浄後、ET-EBFP2/Coumarin/Attenuated DAPI Filter Set Cat#49021 (Chroma Technology Corp.)を取り付けたKeyence BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope (登録商標)を用いてイメージングを行った。イメージング画像は20倍率、40倍率で得られ、明視野像(モノクロ)は400分の1秒、蛍光画像は30分の1秒の露出設定で得られた。複数のイメージング画像は4倍率で得て、分析はBZ-X Analyzerソフトウェア(Keyence)を用いて行った。

[0128] [結果]

果物でのエチレンの空間的検出

一般的にクリマクテリック型果実は、熟成の過程において自己触媒型エチレン(システム2)の生産が進む。傷によるストレスや病原体感染などの外的な刺激も同様である。この研究ではまず初めに、内因性のエチレンをAE

Pプローブによって調べた。熟成の間、キウイフルーツでは外側の果皮でACSアイソジーンのアップレギュレーションを介してエチレン生産量が増加することが報告されている。AEPを用いたキウイフルーツのイメージング実験では、異なる発達段階（未熟成と熟成）における様々な小器官（外側の果皮や子房室、柱軸）に発現するエチレン生産量の変化を観測することに焦点を当てた。図15にまとめているように、果実が未熟成から熟成するにつれ、外側の果皮に著しい蛍光強度の増大が観測された。一方、キウイフルーツの子房室と柱軸における蛍光強度の変化はそれほど観測されなかった。これらの結果より、果物の熟成と熟成期間におけるエチレンの発現を検出するのにAEPの使用は有望な手段であることが明らかにされた。

[0129] 植物中のエチレン検出

植物中のAEP検出の効果を調査するために、小さな顕花植物であるシロイヌナズナ（アブラナ科）をモデル植物として選んだ。AEPによりエチレンの発生を検出できることを確実に示すため、エチレン生成を制御することが知られている低分子とエチレン生成に携わる様々な植物変異体を用いて比較実験を行った。

[0130] この研究では、野生型のモデル植物としてシロイヌナズナのCol-0エコタイプを使用した。さらに、acs1/2/6/4/5/9/7/11やeto1-1など、広範囲にわたる様々な植物変異体も使用した。変異体acs1/2/6/4/5/9/7/11は8つのACS遺伝子をノックアウトした変異体であり、病原体が侵入した際でも、エチレン量が増加しない。これは、ACSがエチレンの生合成経路に関わる重要な役割を担うからである。さらにもう1つの変異体として、エチレンを過剰生産するeto1-1を用いた。ethylene-overexpression protein 1 (ETO1) の発現を通して、プロテアソーム依存的な分解が抑制され、ACS活性は正に制御される。これは、タイプII ACSのC末端とETO1の間の相互作用に基づいている。

[0131] AEPを添加、あるいは添加せずに、室温にてインキュベートしたCol

ー0のイメージング画像を、図16に示した。図17で定量したように、著しい蛍光強度の増大が観測され、それによってシロイヌナズナの表皮の皮におけるエチレン検出にAEPが利用できることが確認された。ポジティブコントロールとして、ACCによって外因的に刺激されたCol-0（のエチレン生産物）と比較した。予想通り、野生型Col-0に比べてより高い蛍光強度の増大を示した。

[0132] [実施例8] グルコシル化ArgMによるがん細胞に対するcRGDの選択的タギング

多くの研究において、環状Arg-Gly-Asp (cRGD) ペンタペプチドが、がん細胞表面上に過剰発現された $\alpha v \beta_3$ および $\alpha v \beta_5$ インテグリンを阻害し、細胞外マトリックスへの接着を防止するのに効果的であることが報告されている (J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. Nat. Rev. Cancer 10, 9-22 (2010). ; M. Pfaff, K. Tangemann, B. Muller, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. J. Biol. Chem. 269, 20233-20238 (1994). ; および M. Aumailley, M. Gurrath, G. Muller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, Arg-Gly-655 Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of 656 cell adhesion to vitronectin and laminin

fragment P1. FEBS Lett. 291, 50-54 657 (1991).)。また、血管内皮細胞上に発現されたインテグリンに対するRGDベースのアンタゴニストが、血管新生の阻害によって腫瘍の退行を促進することが示されている(P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 79, 1157-1164 (1994). ;およびD. G. Stupack, D. A. Cheresh, Integrins and angiogenesis. Curr. Top. Dev. Biol. 64, 207-238 (2004).)。

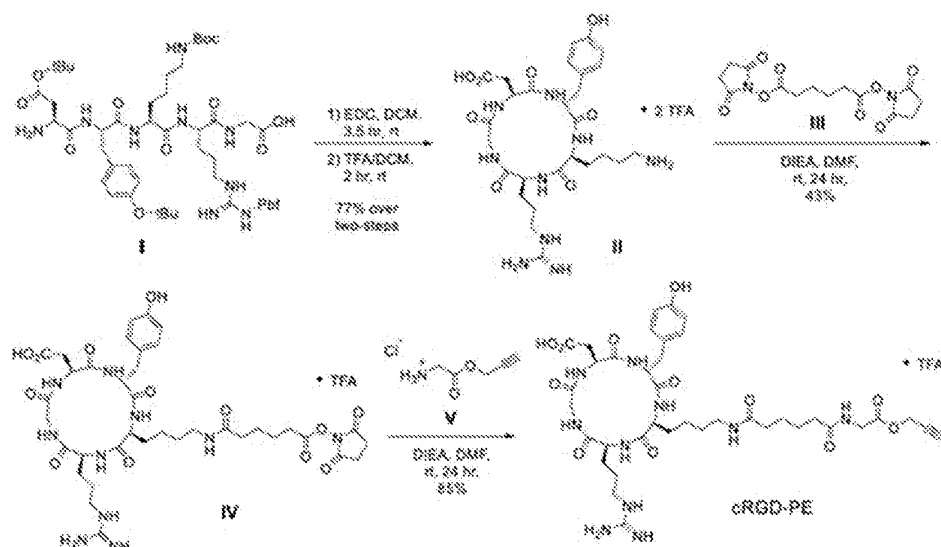
本実施例では、グルコシル化ArM (GA rM) が、微小転移の播種プロセスを模倣する、単一細胞レベルでのがん細胞の接着を破壊するための選択的細胞タギング (SeCT) 療法に使用し得るかを検討した。具体的に、HeLaを標的とするGA rM複合体を癌細胞に選択的に蓄積した後、表面タンパク質にcRGDを選択的にタグ付けすることで、できるかについて検証した。

[0133] 8-1. cRGD-PEの調製

cRGD-PEの調製に用いたスキームは下記のとおりであった：

[0134]

[化9]



[0135] (化合物 I の調製)

標準的な固相ペプチド合成手法によって合成した。固相担体から切り離した後、混合物を直接、40分間にわたる20–80%アセトニトリル水溶液(0.1% TFA)の線形勾配条件の逆相HPLCにより精製した。収量: 2.92 g, 89%, ESI-HRMS m/z calcd for $C_{53}H_{83}N_9O_{14}S$ ($[M+H]^+$) 1102.5853, found 1102.5859.

[0136] (化合物 II の調製)

化合物 I (90.1 mg, 0.0833 mmol) と EDC (17.6 mg, 0.0916 mmol) を塩化メチレン (0.5 mL) に溶かした。続いて溶液を室温で3.5時間攪拌した。ワークアップのため、塩化メチレンを加えて有機層を水/飽和食塩水で洗浄、硫化マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。得られた残渣の質量分析により、目的物の生成を確認した。ESI-HRMS m/z calcd for $C_{53}H_{81}N_9O_{13}S$ ($[M+H]^+$) 1084.5747, found 1084.5744.

続いてこの得られた保護されたペプチドをTFA/塩化メチレン(1:1)の溶液に2時間溶かすことにより、脱保護を行った。混合物を減圧下で濃

縮し、直接、40分間にわたる20–80%アセトニトリル水溶液(0.1% TFA)の線形勾配条件の逆相HPLCにより精製した。収量: 54.5 mg, 77% (2工程収率)。ESI-HRMS m/z calcd for $C_{27}H_{41}N_9O_8$ ($[M+H]^+$) 620.3151, found 620.3169.

[0137] (化合物IIIの調製)

アジピン酸(1.0 g, 6.84 mmol)のDMF(20 mL)溶液を攪拌し、N-ヒドロキシスクシンイミド(3.0 g, 27.4 mmol)とEDC(5.14 g, 27.4 mmol)を加えた。溶液を室温で24時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮し、粗生成物を200 mLのアセトンに溶かして250 mLの1 M塩酸水溶液を滴下した。2時間後、白色沈殿物を濾取し、水とアセトンで洗浄して目的物を得た(1.75 g, 77%)。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25°C) δ 2.84 (s, 4 H), 2.83 (s, 4 H), 2.67 (t, $J=3.5$ Hz, 4 H), 1.89 (t, $J=3.5$ Hz, 4 H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 25°C) 169.4, 168.4, 30.7, 25.9, 23.9。ESI-HRMS m/z calcd for $C_{14}H_{17}N_2O_8$ ($[M+H]^+$) 341.0979, found 341.0973.

[0138] (化合物IVの調製)

化合物II(28.8 mg, 0.034 mmol)と化合物III(23.2 mg, 0.068 mmol)のDMF(680 mL)溶液を攪拌し、DIEA(16.8 μ L, 0.10 mmol)を加えた。溶液を室温で24時間攪拌した後、混合物を直接、化合物Iの調製に用いたものと同じ条件の逆相HPLCで精製し、目的化合物を得た(14.0 mg, 43%)。 1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 25°C) δ 7.00 (d, $J=6.5$ Hz, 2 H), 6.68 (d, $J=6.5$ Hz, 2 H), 4.74 (t, $J=7.0$ Hz, 1 H), 4.41 (q, $J=7.0$ Hz, 1 H), 4.26–4.30 (m, 2 H), 3.91–3.86 (m, 1 H), 3.22–3.

1.8 (m, 1H), 3.14–3.10 (m, 1H), 3.09 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.91–2.85 (m, 2H), 2.84–2.78 (m, 5H), 2.59 (t, J = 9.5 Hz, 2H), 2.64–2.60 (m, 1H), 2.58 (dd, J = 16.5, 9.0 Hz, 1H), 2.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.92–1.82 (m, 1H), 1.74–1.60 (m, 6H), 1.57–1.44 (m, 3H), 1.44–1.32 (m, 2H), 1.09–0.90 (m, 2H); ESI-HRMS m/z calcd for $C_{37}H_{53}N_{10}O_{13}$ ($[M+H]^+$) 845.3788, found 845.3769.

[0139] (cRGD-PEの調製)

化合物IV (4.2 mg, 3.9 μ mol) と化合物V (1.1 mg, 7.8 μ mol) のDMF (200 μ L) 溶液を攪拌し、DIEA (3.3 μ L, 19.6 μ mol) を加えた。溶液を室温で24時間攪拌した後、混合物を直接、化合物Iの調製に用いたものと同じ条件の逆相HPLCで精製し、cRGD-PEを得た (3.2 mg, 85%)。 δ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 25°C) 7.02 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 6.71 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.76 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.44 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.29–4.20 (m, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.91 (dd, J = 9.5, 3.0 Hz, 1H), 3.25–3.20 (m, 1H), 3.18–3.11 (m, 1H), 3.11 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.96 (s, 1H), 2.88 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.85 (dd, J = 16.5, 8.0 Hz, 1H), 2.58 (dd, J = 16.5, 8.0 Hz, 1H), 2.29 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.92–1.84 (m, 1H), 1.74–1.60 (m, 6H), 1.59–1.42 (m, 3H), 1.41 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.09–0.80 (m, 2H); ESI-H

RMS m/z calcd for $C_{38}H_{55}N_{10}O_{12}$ ($[M+H]^+$)
843.3995, found 843.4006.

[0140] 8-2. GAR M複合体の調製

以前に報告された手法を用いて、末端が α (2, 3) -シアル酸の糖鎖-アルデヒドプローブ (R. Sibgatullina, K. Fujiki, T. Murase, T. Yamamoto, T. Shimoda, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, Highly reactive “RIKEN click” probe for glycoconjugation on lysines. Tetrahedron Lett. 58, 1929-1933 (2017).)、およびクマリンに結合した金触媒 (K. Tsubokura, K. K. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, A. Kurbangalieva, Y. Watanabe, K. Tanaka, In vivo gold complex catalysis within live mice. Angew. Chem. Int. Ed. 56, 3579-3584 (2017).) を合成した。

[0141] ヒト血清アルブミン (5.3 mL の水溶液、66.7 nmol) 溶液に末端 α (2, 3) -シアル酸の糖鎖-アルデヒドプローブのDMSO溶液 (3.8 mMのストック溶液から1 μ mol、1.5当量、260 μ L) を大気下で加えた。溶液を穏やかに攪拌し、37℃で一晩インキュベートした。続いて溶液をアミコンウルトラ遠心式フィルター (30 kDa) を用いて濃縮し、水で洗浄した。不溶性の副生成物をデュラポアメンブレン (Durapore PVDF 0.45 μ m (登録商標)) を用いて除去した後、水を加えて希釈し、糖鎖アルブミンの1.0 mMストック溶液を得た。結合した糖鎖数の確認は、MALDI-TOF-MS (positive mode) を用いて行い、これにより1分子のアルブミン当たり6.2分子の糖鎖が結

合した糖鎖アルブミンの分子量（85.8 kDa）を検出した。プロトコルの次の工程では、糖鎖アルブミン溶液（66.7 nmol）のPBS緩衝溶液（60.6 μ L、pH 7.4）に、クマリン-金複合体（66.7 nmol）のDMSO溶液（6.1 μ L）を加えた。溶液を穏やかに攪拌し、37度で1時間インキュベートした後、溶液をアミコンウルトラ遠心式フィルター（30 kDa）を用いて濃縮し、PBS緩衝溶液で洗浄することにより、目的のGAR M複合体を得た。

[0142] （細胞）

HeLa癌細胞は、RGD特異的なインテグリン（ $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ ）を過剰発現していることが知られているため、本研究において、HeLa細胞をモデルとして選択した。HeLa細胞は、理化学研究所の細胞培養開発室から提供されたものを用いた。

[0143] HeLa細胞は、10%の熱不活性ウシ胎児血清（FBS）と1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で培養した。HeLa-Luc細胞株は、10%FBS、および0.01%ピューロマイシンを含むDMEMで培養したホタルルシフェラーゼとピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼによるHeLa細胞の安定なトランスフェクションにより作製した。HeLa-V細胞株は、10%FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、および0.8%ジェネティシンを含むDMEMで培養したホタルルシフェラーゼとVenus（V）によるHeLa細胞の安定なトランスフェクションにより作製した。全ての細胞株は5%二酸化炭素を含む37℃のインキュベーターで増殖させた。マウスマクロファージは既に記載されているように（A. Ray, B. N. Dittel, Isolation of mouse peritoneal cavity cells. Jove, e1488723（2010））、0.9%生理食塩水（6 mL）を投与したBALB/c-nu/nuマウスの腹腔から採取した。

[0144] 8-3. GAR MのHeLa細胞への選択性の検証

G A r MがH e L a細胞に対し、より選択的にターゲティングできるかを確かめるために、一連のフローサイトメトリー研究を行った。クマリン誘導体の蛍光強度はアルブミンに結合すると増加することが知られているので、フローサイトメトリーにおける $\lambda_{Ex}=405\text{ nm}/\lambda_{Em}=470\text{ nm}$ で測定した蛍光強度は、クマリンを結合したG A r M複合体が細胞に結合したかどうかの指標となる。

- [0145] フローサイトメトリーおよびセルソーティングは、Sony SH800 Cell Sorter（ソニー株式会社）を用いて、一般的な手法により行った。フローサイトメーターには405、488、561、638 nmのレーザーが装備されており、G A r M検出の場合には $\lambda_{Ex}=405\text{ nm}/\lambda_{Em}=470\text{ nm}$ 、Venus（V）検出の場合には $\lambda_{Ex}=515\text{ nm}/\lambda_{Em}=528\text{ nm}$ の励起／発行波長のゲートをそれぞれ用い、結果はSony SH800ソフトウェアを用いて解析した。
- [0146] まず、細胞培養系で、G A r Mで処理したH e L a細胞と処理しなかったH e L a細胞では、フローサイトメトリーでの明らかなピークの違いがみられた（図18）。G A r M処理H e L a細胞と未処理H e L a細胞を混合することにより、この特徴はより強調され、明確に2つとして定義されるピークが見られた。
- [0147] 次に、コントロール実験として、マウスの腹腔から抽出したマクロファージを用い、G A r Mの結合能力を調べた。フローサイトメトリーのヒストグラム（図19）を比較すると、G A r Mを添加した場合と添加しなかった場合のマクロファージの間にはわずかな違いしか観測されず、これは予想通り、結合性は皆無かそれに近いことを示唆している。
- [0148] 選択性を検証する最終テストでは、G A r Mの添加または無添加でインキュベートしたマクロファージとH e L a細胞の組み合わせを観測した（図20）。この実験では、H e L a細胞とマクロファージを区別して観測するために、Venus（V）黄色蛍光タンパク質を発現するH e L a-V細胞株を使用した。フローサイトメトリーのプロファイルから、Venus発現H

e L a細胞とマクロファージは明確に区別できる。G A r Mを添加すると、H e L a－V細胞の大部分がG A r M結合を表す右上の部分に移動することが分かった。一方、マクロファージではこのような変化は見られなかった。結果として、このデータは、G A r Mが細胞レベルで優先的にH e L a癌細胞に結合できることを強く示している。

[0149] 8－4．細胞接着アッセイ

インテグリンに基づく細胞接着を妨害するS e C T標識試薬（G A r M／c R G D－P E）の能力は、i n v i t r oの細胞接着アッセイにより確認した。細胞接着アッセイは、R & D S y s t e m（ミネアポリス、アメリカ合衆国）から購入したヒト由来フィブロネクチンコーティング96ウェルマイクロプレート（H u m a n F i b r o n e c t i n C o a t e d 96－W e l l M i c r o p l a t e s）を用いて行った。

[0150] 付着した細胞は、市販のMTSアッセイであるC e l l T i t e r 96 A q u e o u s O n e S o l u t i o n細胞増殖アッセイ（P r o m e g a）を用いて定量した。本実験に用いたH e L a細胞は、増殖培地をD M E M（無血清）に交換することにより、実験の16時間前に血清フリーとした。続いて、細胞を 6×10^5 c e l l / m Lのストック溶液の濃度まで継代培養し、さらなる遠心分離によって残ったトリプシンを除去した。次にH e L a細胞（細胞ストック溶液から360 μ L）、c R G D－P E（0、160、320、640、1280、2560、5120、10240 μ Mのストック水溶液から45 μ L）、そしてG A r M（400 μ MのP B S緩衝溶液から45 μ L）を用いて、エッペンドルフチューブに混合溶液を調製した。並行して、G A r Mを45 μ LのP B S緩衝溶液のみに置き換え、コントロール溶液も準備した。ロッキングシェーカーを用いて室温で1時間、インキュベーションを行った。次に、細胞をスピンドウン（0.8 p p mで4分間）して上澄み液を除いた後、450 μ LのD M E Mのみ（無血清）に再懸濁する洗浄工程を2回行った。フィブロネクチンコーティング96ウェルマイクロプレートに、130 μ Lの標識化したH e L a細胞混合物を各ウ

エルに添加し、続いてこのプレートを37℃で10分間インキュベートした。培地を除去した後、付着した細胞をPBS緩衝溶液で3～4回洗浄した。非特異的結合細胞を除去するため、断続的にPBS緩衝溶液を上下にピペティングした。最後の工程では、100μLのDMEM（10%FBS+1%ペニシリン・ストレプトマイシン）と20μLのMTS試薬を添加した。37℃で4時間インキュベートした後、SpectraMax iD3 multi-mode microplate reader（Molecular Devices、アメリカ合衆国）を用いて490nmでの終点の吸光度を得た。

[0151] 結果を図21に示す。フィブロネクチンでコーティングされたプレート上での細胞接着は、予想通り、SeCT標識試薬（GAR/cRGD-PE）で処理したHeLa細胞で著しい違いが観察された。これらの違いは特にcRGD-PEの処置濃度が高いと、より明白であり、これは、細胞表面上に触媒的に結合したcRGDがより高い濃度であることを示している。

請求の範囲

- [請求項1] タンパク質と金属触媒または有機触媒から選択される触媒との複合体であって、
前記タンパク質は、その立体構造内に疎水性スポットを有するタンパク質であり、
前記複合体は、前記触媒が親水性環境に暴露されないまたは実質的に暴露されないように、前記触媒を前記疎水性スポット内に収容する、
複合体。
- [請求項2] 請求項1に記載の複合体であって、
前記タンパク質は、天然のまたは人工のタンパク質である、
複合体。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の複合体であって、
前記タンパク質は、ヒト血清アルブミン（HSA）、免疫グロブリンG（IgG）、免疫グロブリンA（IgA）、トランスフェリン、アンチトリプシン、ハプトグロビン、 α 1-酸性糖タンパク質、ミオフィェルリン（Myoferlin）、Trk受容体、エストロゲン受容体、および葉酸受容体からなる群より選択される、
複合体。
- [請求項4] 請求項1から3のいずれか1項に記載の複合体であって、
前記金属触媒は、ホウ素触媒、マグネシウム触媒、アルミニウム触媒、ケイ素触媒、カルシウム触媒、スカンジウム触媒、チタン触媒、バナジウム触媒、クロム触媒、マンガン触媒、鉄触媒、コバルト触媒、ニッケル触媒、銅触媒、亜鉛触媒、イットリウム触媒、ジルコニウム触媒、ニオブ触媒、モリブデン触媒、ルテニウム触媒、ロジウム触媒、パラジウム触媒、銀触媒、インジウム触媒、スズ触媒、バリウム触媒、ハフニウム触媒、タングステン触媒、レニウム触媒、オスミウム触媒、イリジウム触媒、白金触媒、金触媒、およびランタノイドル

イス酸触媒からなる群より選択される、
複合体。

- [請求項5] 請求項4に記載の複合体であって、
前記ランタノイドルイス酸触媒は、イットリビウム触媒、ランタン触媒、セリウム触媒、サマリウム触媒、ユーロピウム触媒、ガドリニウム触媒、テルビウム触媒、ツリウム触媒、およびルテチウム触媒からなる群より選択される、
複合体。
- [請求項6] 請求項1から5のいずれか1項に記載の複合体であって、
前記タンパク質は、ヒト血清アルブミンであり、
前記触媒が金属触媒である、
複合体。
- [請求項7] 請求項6に記載の複合体であって、
前記金属触媒は、ルテニウム触媒である、
複合体。
- [請求項8] 請求項6または7に記載の複合体であって、
前記ヒト血清アルブミンの疎水性スポットは、アルブミン薬物結合サイトI (drug site I) である、
複合体。
- [請求項9] 請求項6から8のいずれか1項に記載の複合体であって、
前記金属触媒は、ヒト血清アルブミンに対するリガンドを介して前記疎水性スポットに結合している、
複合体。
- [請求項10] 請求項9に記載の複合体であって、
前記リガンドは、ワルファリン、アザプロパゾン、アセノクマロール、フェニルブタゾン、サリチル酸塩、インドメタシン、フェニトイン、トルブタミド、クロルプロパミド、イオフェノキサート、ヨジパミド、スルファジメトキシシン、フェノプロクソモン、グリベンクラミ

ド、スルファチアゾール、テノキシカム、カンプトテシン、バルジデ
ンデアジ、アンデレラタン、ジアデリアル、アンデレラタン、ジアデ
リアル、アンデレラタン、ジアデリアルタン、プロダン、ビリルビン
、エイコサノイド、およびカルボキシーメチルプロピルフランブ
ロパノエート（尿毒症毒素）、およびクマリンからなる群より選択さ
れる、

複合体。

[請求項11] 請求項9または10に記載の複合体であって、
前記金属触媒は、前記リガンドに結合したリンカーを介して前記疎
水性スポットに結合している、

複合体。

[請求項12] 請求項11に記載の複合体であって、
前記リンカーは、両末端にアミノ基およびカルボキシル基を有する
、アルキル鎖またはポリエチレングリコール（PEG）鎖である、

複合体。

[請求項13] 請求項12に記載の複合体であって、
前記リンカーは、 $C_1 \sim C_3$ アルキルである

複合体。

[請求項14] 請求項1から13のいずれか1項に記載の複合体であって、
前記タンパク質の表面が生体内の標的部位と相互作用するように修
飾される、

複合体。

[請求項15] 請求項14に記載の複合体であって、
前記修飾は、糖鎖による修飾である、

複合体。

[請求項16] 請求項1から13のいずれか1項に記載の複合体であって、
前記タンパク質が、生体内の標的部位と相互作用する部分をさらに
含む、

複合体。

- [請求項17] 請求項 1 4 または 1 5 に記載の複合体であって、
前記タンパク質は、ヒト血清アルブミンである、
複合体。
- [請求項18] 請求項 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の複合体を含む組成物。
- [請求項19] 薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である、請求項 1
8 に記載の組成物。
- [請求項20] 請求項 1 9 に記載の組成物であって、
前記複合体によって活性化され得るプロドラッグと組み合わせて使
用される、
組成物。
- [請求項21] 請求項 1 9 に記載の組成物であって、
前記複合体によって活性化され得るプロドラッグをさらに含む、
組成物。
- [請求項22] 請求項 1 9 に記載の組成物であって、
特定の細胞を選択的にタギングするために用いられる、
組成物。
- [請求項23] 請求項 2 2 に記載の組成物であって、
前記細胞にタギングされる化学物質と組み合わせて投与される、
組成物。
- [請求項24] 請求項 1 8 に記載の組成物であって、
バイオセンサーとして使用される、
組成物。
- [請求項25] 請求項 1 8 に記載の組成物であって、
エチレンを検出するためのバイオセンサーとして使用される、
組成物。
- [請求項26] プロドラッグを含む医薬組成物であって、
前記プロドラッグは、請求項 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の複

合体によって活性化され得るものであり、

前記医薬組成物は、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の複合体と組み合わせて使用される、
医薬組成物。

[請求項27]

組み合わせ医薬であって、

請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の複合体を含む第 1 の薬剤
と、

前記複合体によって活性化され得るプロドラッグを含む第 2 の薬剤
と

を含む、組み合わせ医薬。