

金属触媒アミド結合形成反応を活用した  
生物活性分子の複合化と治療戦略

Therapeutic *in vivo* Bioconjugation by  
Metal-Catalyzed Amide Bond Formation

2019年2月

坪倉 一輝

Kazuki TSUBOKURA

金属触媒アミド結合形成反応を活用した  
生物活性分子の複合化と治療戦略

Therapeutic *in vivo* Bioconjugation by  
Metal-Catalyzed Amide Bond Formation

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
化学・生命化学専攻 ケミカルバイオロジー研究

2019年2月

坪倉 一輝

Kazuki TSUBOKURA

## 略語表

略号	正式名称	和名
Ac	acetyl	アセチル
Ala (A)	L-alanine	L-アラニン
Arg (R)	L-arginine	L-アルギニン
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	アシアロ糖タンパク質受容体
Asp (D)	L-aspartic acid	L-アスパラギン酸
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl	<i>tert</i> -ブトキシカルボニル
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -butyl	<i>tert</i> -ブチル
Cy7.5	cyanine7.5	シアニン 7.5
DDS	drug delivery system	ドラッグデリバリーシステム
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide	<i>N,N</i> -ジイソプロピルカルボジイミド
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ECM	extracellular matrix	細胞外マトリックス
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド

EPR 効果	enhanced permeability and retention effect	(相当する和名なし)
Et	ethyl	エチル
FACS	fluorescence activated cell sorter	蛍光活性化細胞ソーティング
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
Gly (G)	glycine	グリシン
HATU	1-[bis (dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate	<i>N,N,N',N'</i> テトラメチル- <i>O</i> -(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスファート
HCTU	<i>O</i> -(6-chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> tetramethyluronium hexafluorophosphate	<i>O</i> -(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)- <i>N,N,N',N'</i> テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート
HFIP	hexafluoroisopropanol	1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole	1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
HOBt	1-hydroxybenzotriazole	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
Ile (I)	L-isoleucine	L-イソロイシン



Leu (L)	L-leucine	L-ロイシン
D-Lys (k)	D-lysine	D-リシン
Lys (K)	L-lysine	L-リシン
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
Me	methyl	メチル
MMP	matrix metalloproteinase	マトリックスメタロプロテアーゼ
NHS, OSu	<i>N</i> -hydroxysuccinimide	<i>N</i> -ヒドロキシスクシンイミド
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
Orn	L-ornithine	L-オルニチン
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミド電気泳動
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydro benzofuran-5-sulfonyl	2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝食塩水
D-Phe (f)	D-phenylalanin	D-フェニルアラニン
Phe (F)	L-phenylalanine	L-フェニルアラニン
D-Pro (p)	D-proline	D-プロリン
Pro (P)	L-proline	L-プロリン

ROI	region of interest	(相当する和名なし)
SDS	sodium dodecyl sulfate	ラウリル硫酸ナトリウム
Ser (S)	L-serine	L-セリン
TAMRA	carboxytetramethylrhodamine	カルボキシテトラメチルローダミン
TES	triethylsilane	トリエチルシラン
Tf	trifluoromethanesulfonyl	トリフルオロメタンスルホニル
TFA	trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
THF	tetrahydrofuran	テトラヒドロフラン
Thr (T)	L-threonine	L-トレオニン
TOF	time of flight	飛行時間型
Trt	trityl	トリチル
Val (V)	L-valine	L-バリン

## 目次

第一章	序論	1
第二章	生体内における特定臓器内での触媒反応の開発	12
2.1.	序論	
2.2.	結果	
2.2.1.	水中での反応の開発	
2.2.1.1.	グアニジル化反応	
2.2.1.2.	アミド化反応	
2.2.2.	生体内で利用するための触媒の合成	
2.2.3.	BALB/c マウス内での金触媒によるアミド化反応	
2.3.	結論	
第三章	生体内でのペプチドの複合化によるがんの転移抑制	52
3.1.	序論	
3.2.	結果	
3.2.1.	がん転移抑制ペプチドの誘導化	
3.2.2.	糖鎖クラスターによるがん細胞への相互作用の検証	
3.2.3.	フローサイトメトリーによる糖鎖クラスターの相互作用の検証とその選択性	
3.2.4.	転移抑制ペプチドの複合化による治療戦略	
3.2.4.1.	細胞毒性の検討	
3.2.4.2.	マウスがん転移モデルの作成	
3.2.4.3.	c(RGDyK) ペプチドを複合化した HeLa 細胞の抗転移作用の評価	
3.2.4.4.	生体内反応による抗転移作用の評価	
3.3.	結論	
第四章	ペプチドの複合化によるがんの増殖抑制と治療戦略	76
4.1.	序論	
4.2.	結果	
4.2.1.	ペプチドの環化反応の検討	
4.2.1.1.	N末端のアミンを用いた環化反応	
4.2.1.2.	リシン残基側鎖のアミンを用いた環化反応	
4.2.2.	ペプチドの複合化による <i>in vitro</i> での毒性検討	
4.2.2.1.	金触媒の合成	
4.2.2.2.	がん細胞に対するペプチドの複合化による増殖抑制試験	
4.2.3.	<i>In vivo</i> でのペプチドの複合化によるがん増殖抑制	
4.3.	結論	

第五章 総括	94
Experimental section	97
参考文献	131
付録	136
謝辞	140

## 第一章 序論

これまでの抗がん剤によるがんの化学療法は、しばしば医薬品が及ぼす正常な組織への副作用が大きな問題となっている<sup>[1]</sup>。例えば、抗がん剤として利用されているフルオロウラシル (1) は、DNAの構成成分であるチミンの生合成を阻害することで、がん細胞の分裂を抑制し、がんを治療することが知られている<sup>[2]</sup>。しかし、この化合物はがん細胞以外の正常細胞へも作用してしまう。特に血球細胞や毛根細胞など分裂が早い細胞に対する影響が大きく、血球の減少や脱毛といった副作用を引き起こすことが報告されている (図 1)<sup>[3]</sup>。

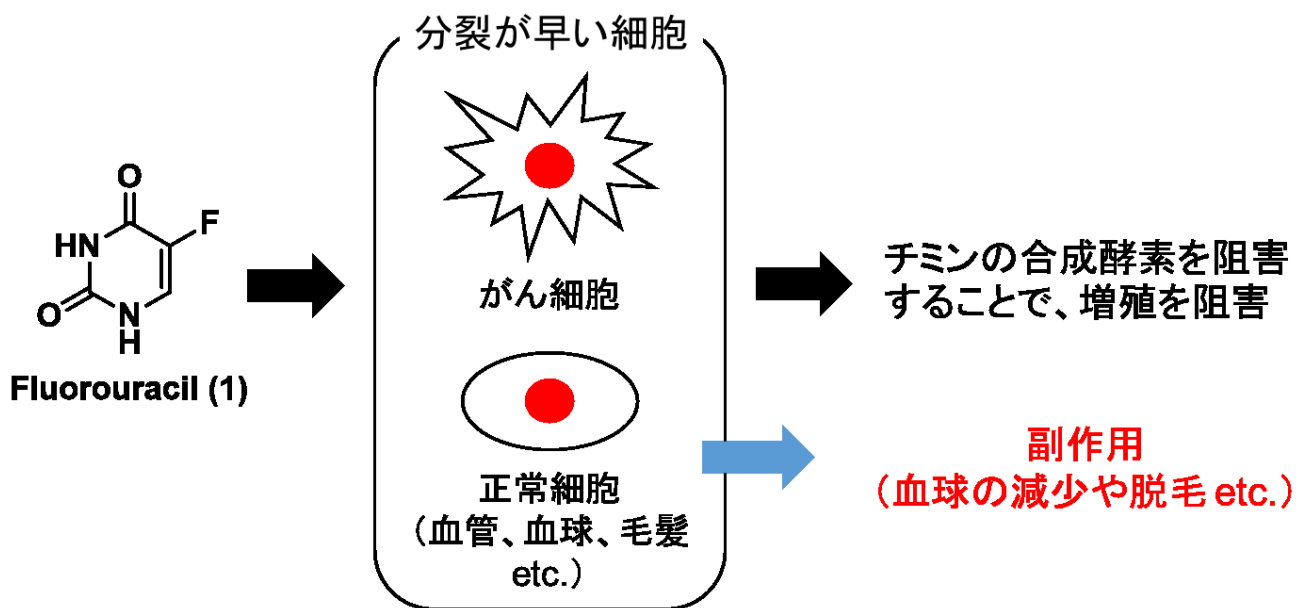


図 1 抗がん剤フルオロウラシル (1) の作用機序

このような副作用の問題を回避するべく、これまでに様々な治療技術開発が行われてきた。その一例として挙げられるのがプロドラッグである<sup>4)</sup>。プロドラッグとは既知の薬剤に対して、溶解度や生体吸収性の向上、さらには副作用の低減を目的として保護基を導入した分子を指す。この保護基により活性を減弱させた薬剤が、特定臓器や組織内の細胞に取り込まれ、酵素反応や酸加水分解といった脱保護反応が進行して標的組織でのみ薬剤が生成するため、正常組織への副作用を低減できる(図2)<sup>5)</sup>。そのため、がんを高発現している酵素を用いれば、プロドラッグをがん治療に利用できる。しかし、このような酵素の報告例はカルボキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼといった加水分解酵素が多く、プロドラッグに利用可能な保護基は、そのほとんどが加水分解反応により除去できるものに限られている<sup>6)</sup>。

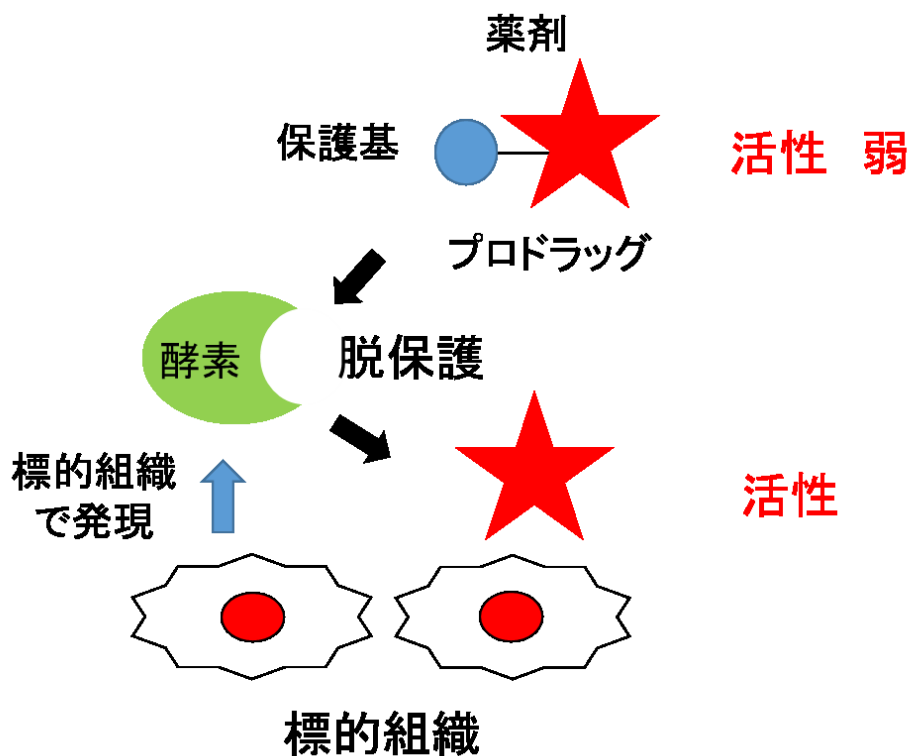


図2 プロドラッグの原理

そこで近年では抗体により、がん細胞が発現していないニトロレダクターゼや $\beta$ -ラクタマーゼといった酵素<sup>[7]</sup>をあらかじめがん細胞に輸送して、プロドラッグ療法に利用する技術が開発されている(図3)<sup>[8]</sup>。しかしながら、この方法は酵素を分子量の大きい抗体に結合させる必要があるため酵素の機能が損なわれてしまうこと、あるいは酵素が結合したことにより抗体のターゲティング能力が失われてしまうこと、動物内での酵素に対する拒絶反応が起こるといった問題がある<sup>[9]</sup>。

このようにプロドラッグ技術は、局所的な化学反応により副作用を低減できるが、多くは加水分解酵素に依存しているため、利用できる保護基には限りがある。そのため、これまでにフラスコ内で行われてきた有機化学反応を腫瘍組織で行い、局所的に様々な抗がん剤を自在に合成する技術を開発できれば、プロドラッグのような保護基の制限を回避したより汎用性の高い医療技術への応用が期待できる。

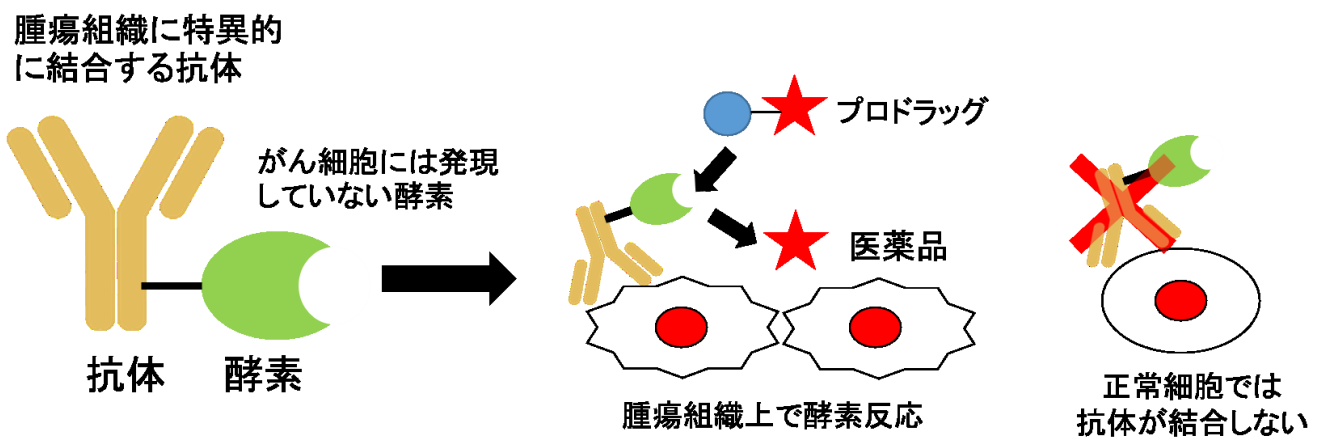
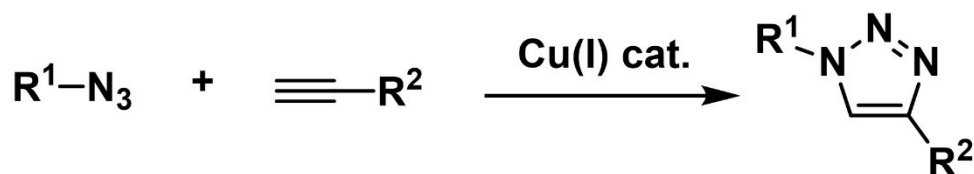


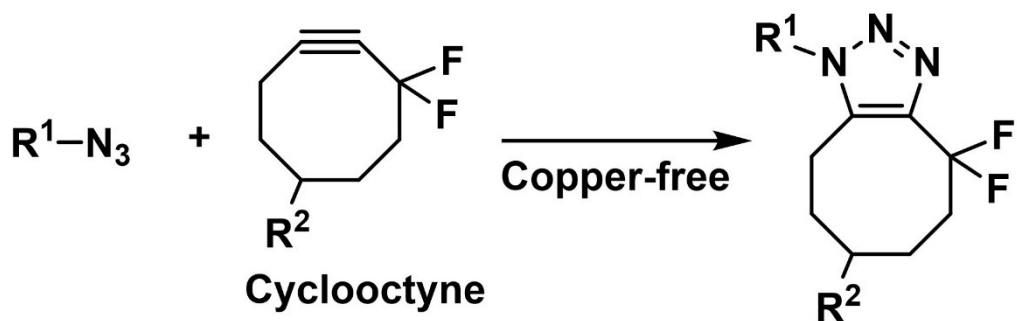
図3 生体内での酵素反応を利用したがんのプロドラッグ療法

しかし、生体内という複雑な系で目的の反応のみを選択的に行うことは、水中、40 °Cと極めて温和な条件下、さらにはタンパク質中のシステイン、リシンの側鎖チオールや側鎖アミンなどの反応性の高い官能基との副反応も考えられるため難しい。そのため、多くの研究者は「生体直交型」と呼ばれる反応を用いて、生きた細胞内や動物内で有機化学反応を実施する方法を開発してきた (図 4)<sup>[10]</sup>。その中でも、Huisgen らは、1 価の銅触媒存在下、アジドと末端アルキンとの間で [3+2] 双極子付加環化反応が進行し、トリアゾール化合物を与えることを報告した (図 4a)<sup>[11]</sup>。その後、Sharpless、Meldal らは、このアジドとアルキンが高選

a) 銅触媒による[3+2]双極子付加環化反応



b) 無触媒条件下での[3+2]双極子付加環化反応



c) 逆電子要請型Diels-Alder反応

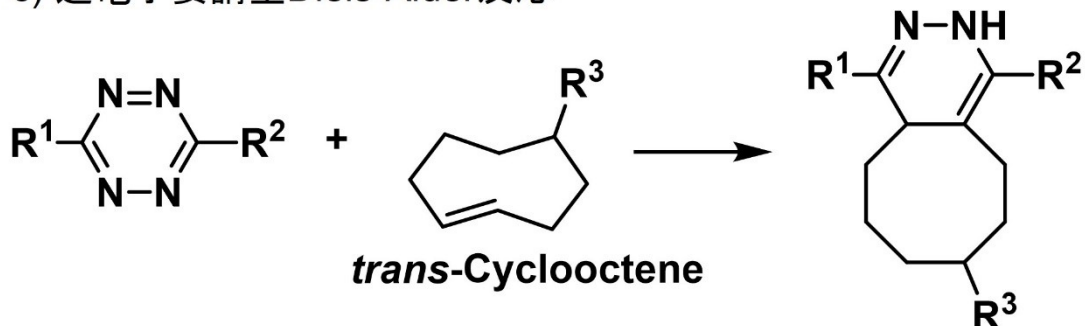


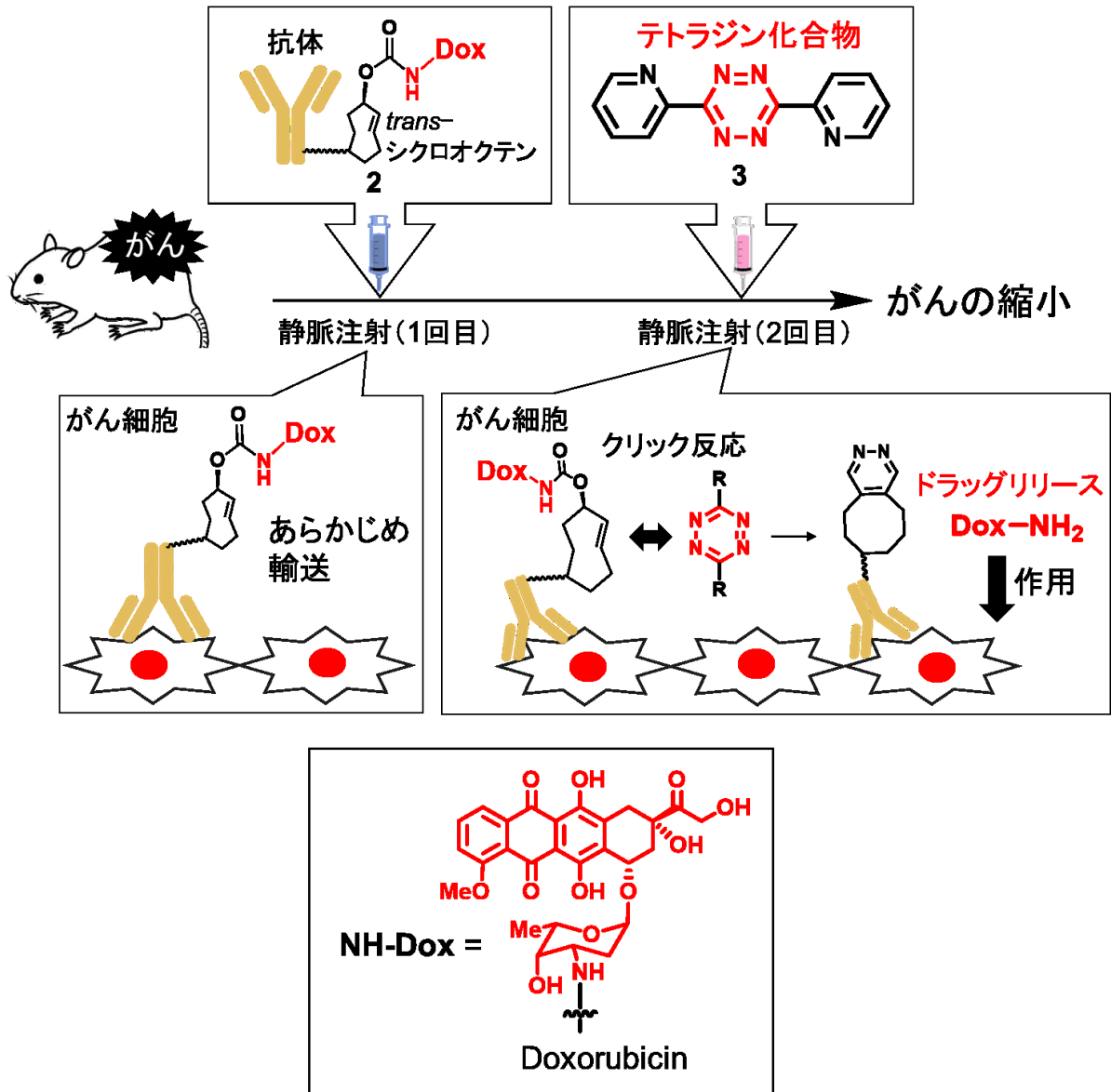
図 4 様々な生体直交型の反応例



択的・高収率・高速で進行することを発見し、クリック反応と名付けた。これを機にクリック反応は、タンパク質をはじめとする生体分子への化学修飾<sup>[12]</sup>、またはゼブラフィッシュ体内で、様々な用途に利用されてきた<sup>[13]</sup>。しかしながら、1 価の銅は非常に高い毒性を有していることから、生きた細胞や動物内でこの反応を展開する場合には、細胞や動物に与える負担が大きかった。そこで、2007 年 Bertozzi らは、侵襲性の低い方法として、歪んだアセチレンであるシクロオクチン誘導体とアジド化合物が、ひずみ解消エネルギーを駆動力としてトリアゾール化合物を与えること、そして生きた細胞に対しても反応が展開できることを報告した (図 4b)<sup>[10, 14]</sup>。さらに、2008 年 Fox らは、歪んだアルケンである *trans*-シクロオクテンとテトラジンが、逆電子要請型 Diels-Alder 反応により、ジヒドロピリダジン化合物を与えることを報告した (図 4c)<sup>[15]</sup>。

この Fox らの反応は、反応濃度が $\mu\text{M}$  程度でも 40 分程度で、反応が完結するほど効率が良く、2016 年には Robillard らによって、がんの新しい治療戦略へと応用された (図 5a)<sup>[16]</sup>。まず、彼らはヒト直腸がん細胞 (LS174T 細胞) に集積能を示す抗体に抗がん剤であるドキソルビシンを *trans*-シクロオクテンを介して結合させた **2** を、腫瘍を移植したマウスに投与し、あらかじめがん細胞上にドキソルビシンを輸送した。続いて、26 時間後にテトラジン試薬 **3** を静脈注射することで、腫瘍組織にたどり着いたテトラジン試薬 **3** とあらかじめ抗体により輸送されていた *trans*-シクロオクテンが反応する。これにより、ジヒドロピリダジンが生成し、脱プロトンとそれに次ぐ脱炭酸を伴いながらドキソルビシンが放出され (図 5b)、腫瘍を縮小させることに成功した。しかしながら、この方法に利用できる薬剤は、現段階でドキソルビシンに限られており、未だに汎用性の問題を抱えていた。

### a) 治療戦略



### b) ドキソルビシンの放出のメカニズム

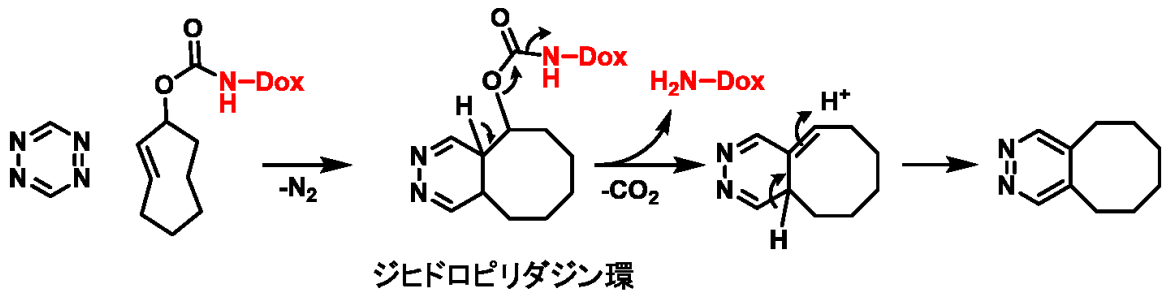


図 5 生体直行型の反応を利用したドラッグリリース

そこで、近年着目されているのが金属触媒反応の開発である。例えば、2017年 Bradley らは 0 価パラジウムのナノ粒子に RGD 配列を有する環状ペプチドを結合させるとがん細胞に効率的に取り込まれることに着目し、Suzuki-Miyaura 反応をヒトグリオーマ細胞 (U87-MG 細胞) 内で行い、抗がん活性化合物を合成できる方法を開発した (図 6)<sup>[17]</sup>。すなわち、まず彼らのはがん細胞に 0 価パラジウムナノ粒子を取り込ませ、続いて医薬品の原料となるヨード化合物 **4** とボロン酸化合物 **5** を細胞に投与し、Suzuki-Miyaura 反応により抗がん活性化合物 PP-121 (**7**) を細胞内で合成し、毒性を発現させることに成功した。さらに彼らは同論文内において、より効率的にがん細胞死を誘導するために、0 価パラジウムナノ粒子を触媒としたプロドラッグ **6** の脱プロパルギル化反応を、Suzuki-Miyaura 反応と同時に行い、二つの抗がん活性化合物を細胞内で合成すること、そしてその毒性を強力に発現させることに成功した。このような金属触媒反応を利用すれば、一つの触媒から複数の抗がん剤を合成することが可能となるため、プロドラッグの問題点であった保護基の汎用性の問題を解決した新しい技術となり得るといえる。しかしながら、この方法はパラジウムナノ粒子の粒径 (207 nm) が大きいこと、血中などに存在しているシステイン側鎖のメルカプト基やリシン側鎖のアミノ基などの反応性の高い官能基により、パラジウム触媒が被毒され失活してしまうといった問題点があった。そのため、生きた動物内では行われておらず、細胞内レベルでの検討に留まっていた。

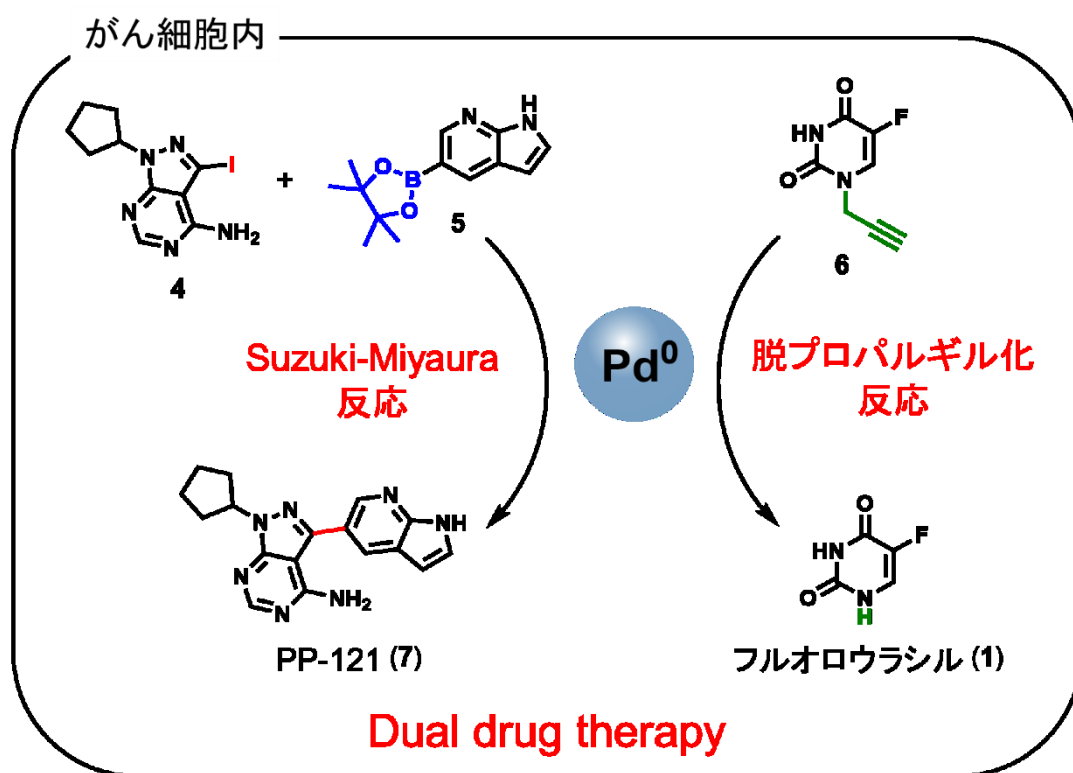
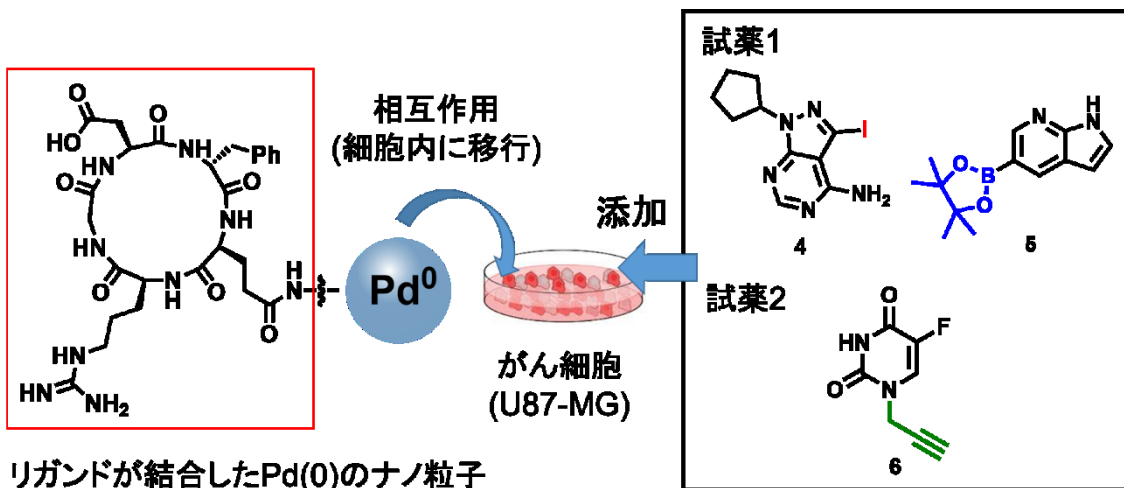


図 6 細胞内での金属触媒反応を利用した抗がん活性化合物の合成

一方、近年では様々な研究グループにより生体内で利用可能な金属触媒の開発研究がなされており、ゼブラフィッシュ体内という生きた動物内で利用することができる金属触媒の開発も報告されている (図 7)<sup>[18]</sup>。まず、パラジウムまたは金といった金属触媒を内包した樹脂をゼブラフィッシュの胚に直接注射することで、卵黄嚢に金属触媒が内包されたゼブラフィッシュを作成し、次いでローダミン試薬 **8** を投与する。ここで試薬 **8** は、プロパルギルカルバメート基によりアミノ基が保護されていることにより消光しているが、触媒が集積している卵黄嚢では、金属触媒によりアミノ基の脱保護が進行し、スピロ環が開環した **9** が生成することで、強い蛍光を与える。このような金属触媒反応を哺乳動物であるマウス体内の腫瘍組織周辺のみで行うためには、金属触媒をあらかじめ輸送するドラッグデリバリーシステム (DDS) が必要となる。しかし、金属触媒の活性を保持したまま腫瘍組織周辺へと輸送することが困難なため実現されていなかった。

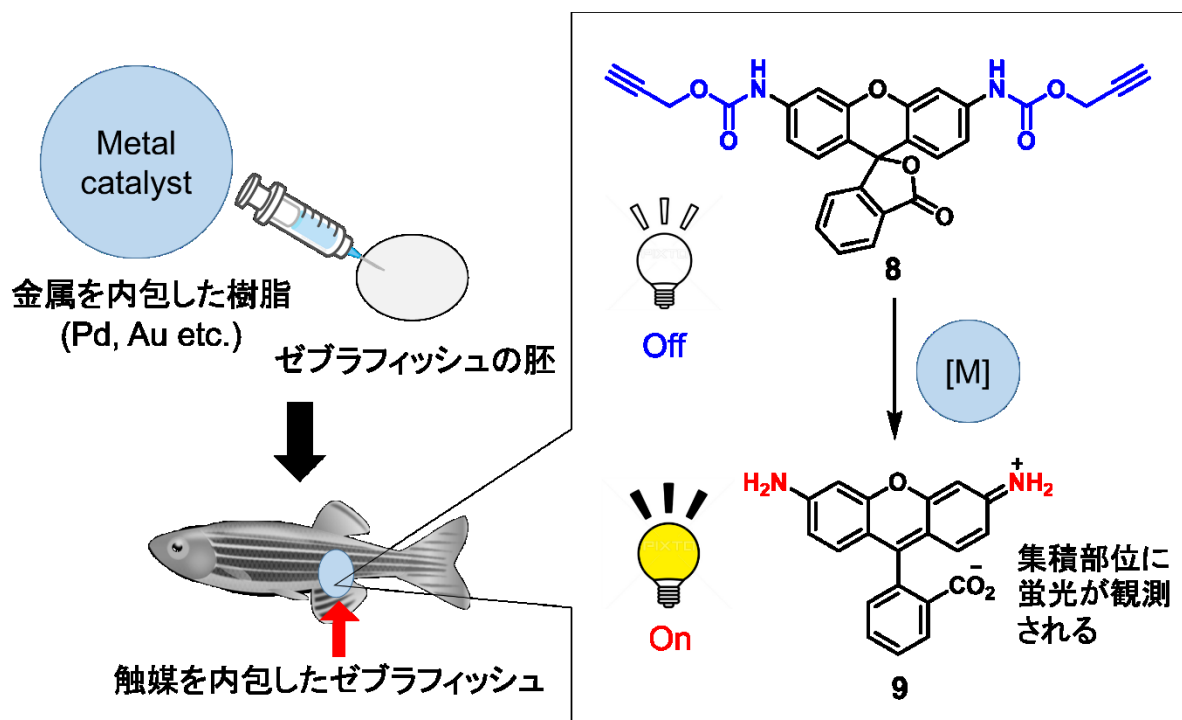


図 7 ゼブラフィッシュ体内での金属触媒反応

このような金属触媒の DDS となり得る技術の一つとして近年開発されているのが、リポソーム、高分子ミセルまたはウイルスの外壁であるカプシドである (図 8)<sup>[19]</sup>。これらの DDS 担体は粒径 100 nm 程度のサイズであり、薬剤を内包させて腫瘍を有するマウスに投与すると、腫瘍付近の血管に存在している微細な隙間を一方的に透過して腫瘍組織へと集積し、がん細胞内へと移行した後に薬剤を放出することが知られていた。一方で、正常な血管にはこのような微細な隙間は存在していないため、これらの粒径の大きい DDS 担体は正常な血管を透過しない。このような現象は Enhanced Permeability and Retention 効果 (EPR 効果) と呼ばれ、DDS 担体の粒径サイズという物理的な性質を利用する受動的ターゲティング法として利用されてきた<sup>[20]</sup>。しかし、この腫瘍組織周辺の血管に存在している微細な隙間の存在は、腫瘍組織を構成しているがん細胞の種類に依るところが大きく、受動的ターゲティングはすべてのがん細胞に利用できるものではない<sup>[21]</sup>。そのため、がん細胞上へ確実に金属触媒を輸送させるためには、金属触媒の DDS 担体が腫瘍組織を認識する能動的ターゲティング法を利用している必要がある。

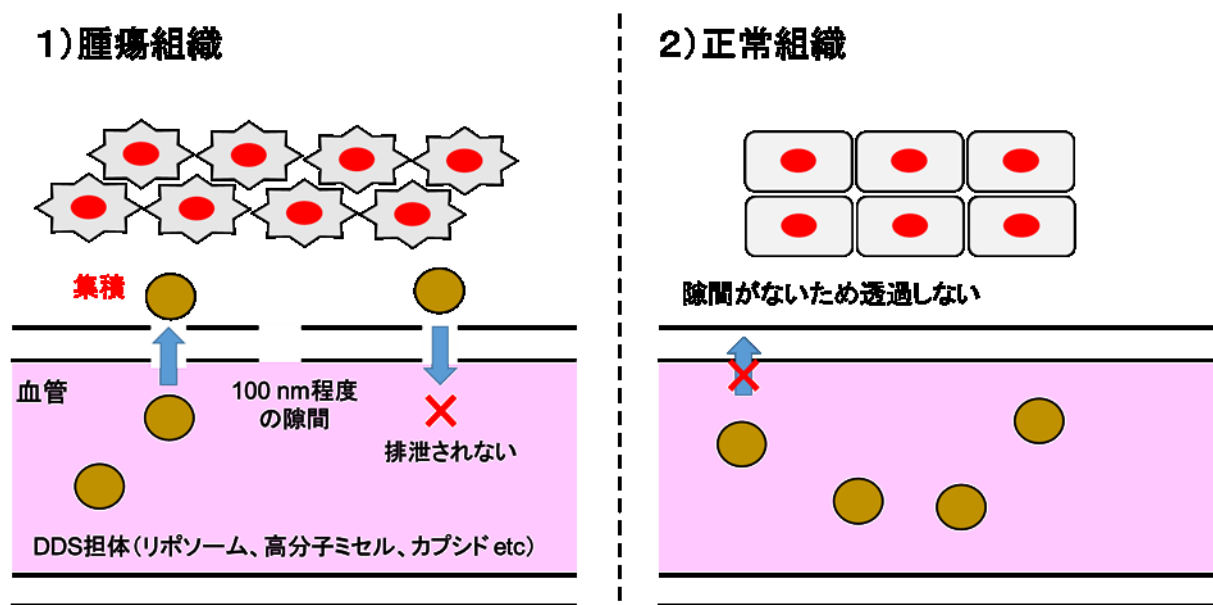


図 8 EPR 効果による DDS 担体のターゲティング

この能動的ターゲティング法を利用した金属触媒の DDS 担体となり得るものとして、抗体が挙げられる。がん細胞に局在している抗原を標的とした抗体を使用すれば、能動的なターゲティングにより高い選択性で金属触媒を輸送できると考えられる。そのため、抗体は金属触媒の DDS 担体として魅力的であると考えられるが、そのような例は未だ報告されていなかった<sup>[22]</sup>。その大きな理由が、標的の腫瘍組織への集積に必要な時間が 6 時間～1 日程度と長いことにある<sup>[23]</sup>。すなわち、集積時間が長いと反応性の高い金属触媒は、血中に共存しているタンパク質中のリシン側鎖アミンやシステイン側鎖チオールによる被毒が起こり失活してしまうことが考えられる。そのため、生体内で金属触媒反応を行う場合には、高い選択性で金属触媒を輸送できる能動的なターゲティング、および金属触媒の失活が起こる前に数分程度で迅速に腫瘍へと輸送できるようなシステムが必要であった。

本博士論文では、能動的ターゲティング能力を有する DDS 担体に金属触媒を担持することで、標的とする臓器で金属触媒反応を行う方法を開発した。さらに本方法を用いて、腫瘍組織上で金属触媒反応を行い、新たな治療戦略の検討を行ったので以下に述べる。

## 第二章 生体内における特定臓器内での触媒反応の開発

### 2.1. 序論

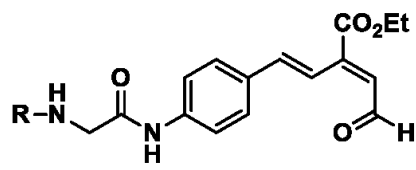
本章では、生体内の標的とする臓器内で金属触媒反応を行う方法の開発について述べる。

第一章で述べたように金属触媒の DDS 担体には、能動的ターゲティングと速やかな移行が必要であった。

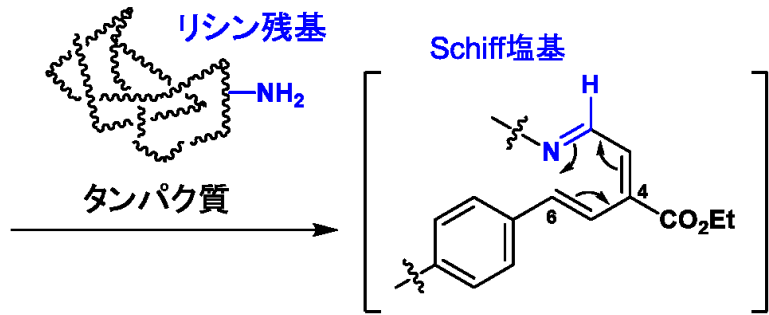
このような状況下、理化学研究所田中生体機能合成化学研究室では、独自に見出した「理研クリック反応」を利用することにより、タンパク質中のリシン残基の側鎖アミン選択的に様々な機能性分子を導入する方法を開発していた (図 9)<sup>[24]</sup>。すなわち、機能性分子が結合したアルデヒド試薬に対して、タンパク質を加えるとリシン残基の側鎖アミンとアルデヒドが反応し、Schiff 塩基を形成する。この Schiff 塩基は、6 位の芳香環からの電子供与と 4 位のエトキシカルボニル基の電子求引によって加速された分子内  $6\pi$  アザ電子環状反応により、速やかにジヒドロピリジン環へと変換され、タンパク質に機能性分子を導入できる。さらに、本反応はアルデヒド試薬の当量を制御することによって、タンパク質に導入できる機能性分子の数をコントロールすることができる。田中らは、この理研クリック反応を利用することで、糖鎖と細胞の分子認識を基本原理とした、迅速かつ高い選択性の能動的ターゲティング法による DDS 担体「糖鎖クラスター」の開発研究を行った<sup>[25]</sup>。



# 理研クリック反応



R = Fluorescence, Biomolecule etc.



6πアザ電子環状反応

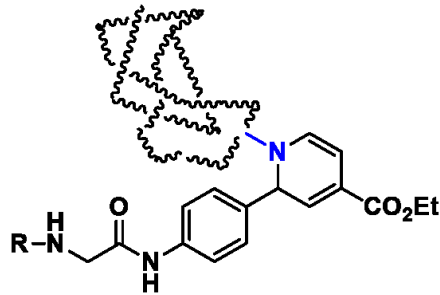
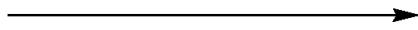


図 9 理研クリック反応

糖鎖は、図 10 に示したグルコース **10**、マンノース **11**、ガラクトース **12**、*N*-アセチルグルコサミン **13**、*N*-アセチルノイラミン酸 (シアル酸) **14** をはじめとする単糖がグリコシド結合を介して複数結合した分子で、タンパク質中のアミノ酸残基であるセリン/スレオニンの側鎖酸素原子に結合する *O*-結合型糖鎖、またはアスパラギンの側鎖窒素原子に結合する *N*-結合型糖鎖が存在する<sup>[26]</sup>。これらの糖鎖は、その一つの重要な機能として細胞が他の細胞または組織を認識するために利用されることが知られている<sup>[27]</sup>。例えば、赤血球は細胞表面層上に髭状に複数種類の糖鎖が広がっていることが知られている (図 11)<sup>[28]</sup>。この複数種類の糖鎖を、他の細胞上に存在している糖鎖の受容体であるレクチンが互いに認識することで、細胞は他の細胞と赤血球を識別している。すなわち、図 11 下段左に示されるように、赤血球上に発現している赤、青、黒の糖鎖と相互作用するレクチンを発現している細胞は、赤血球上の 3 種類の糖鎖とレクチンが同時に作用することで、細胞が赤血球を高選択的に認識する。しかし、図 11 下段右に示したように、対応するレクチンが存在しなかった場合には、細胞間での相互作用が非常に弱く、細胞が赤血球を認識しない。

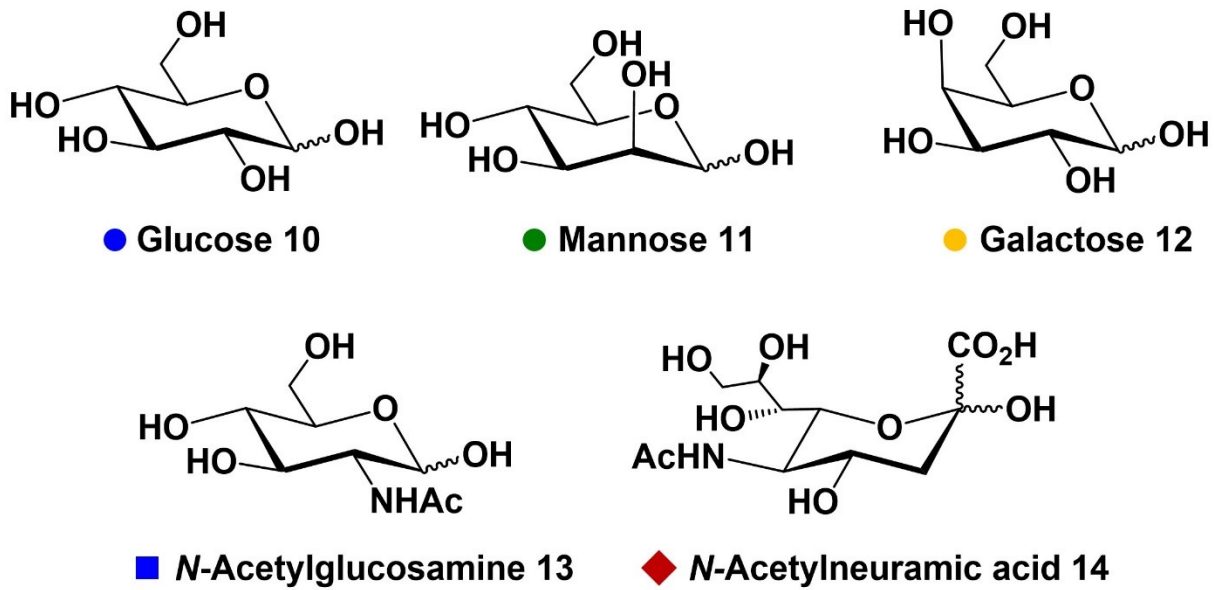


図 10 糖鎖を構成する単糖

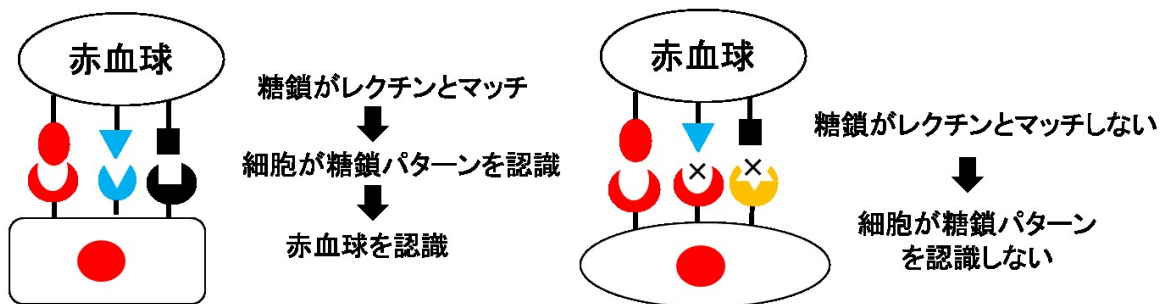
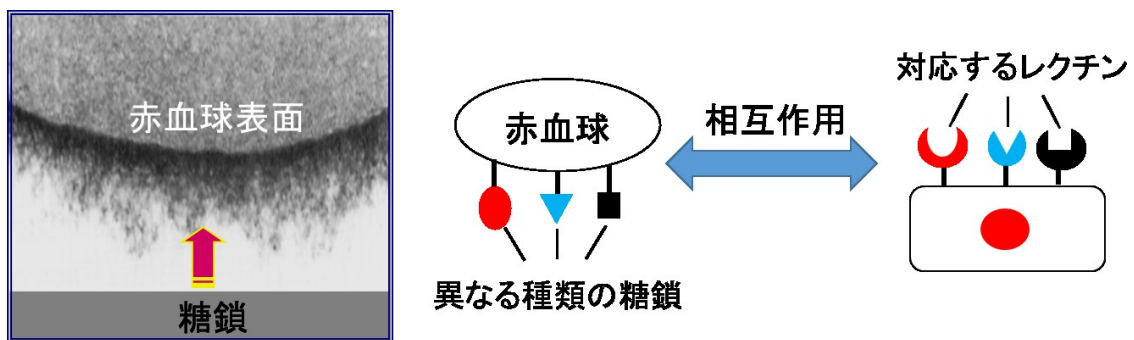
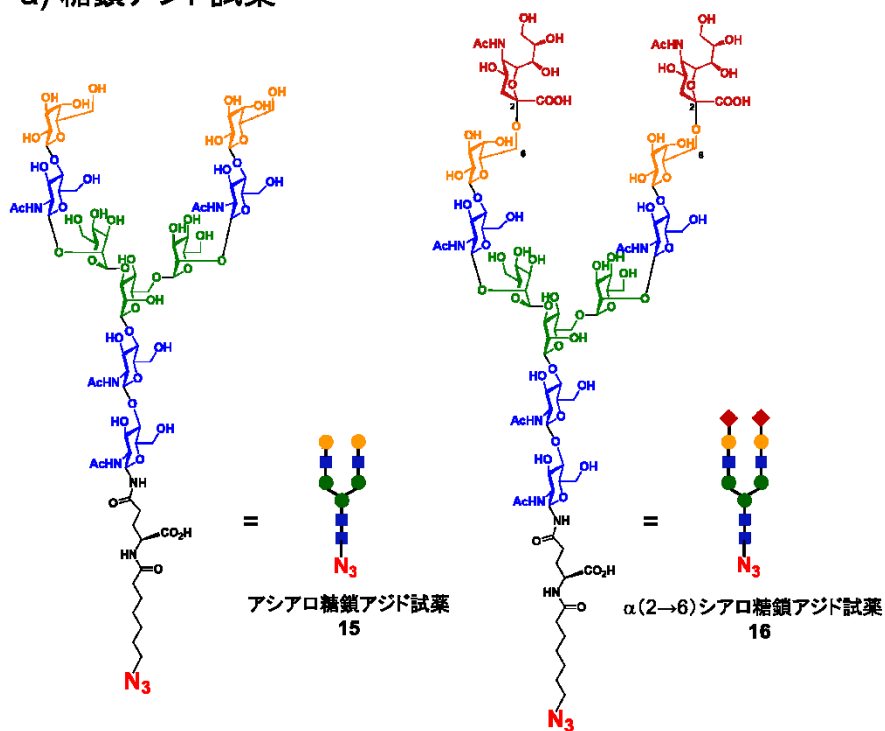


図 11 糖鎖と細胞の相互作用 概念図 (写真: 文献 27 Figure1 より引用)

そこで田中らは、シクロオクチンと共役アルデヒドが結合した理研クリック試薬 **17** を利用し、図 12a に示したアシアロ糖鎖アジド試薬 **15**、または $\alpha(2\rightarrow6)$ シアロ糖鎖アジド試薬 **16** をヒト血清アルブミン (HSA) に 10 分子導入することで、対応するレクチンが発現している細胞を認識する糖鎖を持つ DDS 担体を合成した (図 12b)。

まず、理研クリック試薬 **17** に対し、アジドの結合した糖鎖 **15**、**16** を作用させ、糖鎖と共役アルデヒドを結合させた化合物 **18**、**19** を調製した。ついで、HSA に対して **18**、**19** を 20 当量以上作用させることで、理研クリック反応により、それぞれの糖鎖が 10 個のリシン残基の側鎖アミンに導入されたアシアロ糖鎖クラスター**20**、 $\alpha(2\rightarrow6)$ シアロ糖鎖クラスター**21** をそれぞれ合成した。

a) 糖鎖アジド試薬



b) 糖鎖クラスターの合成

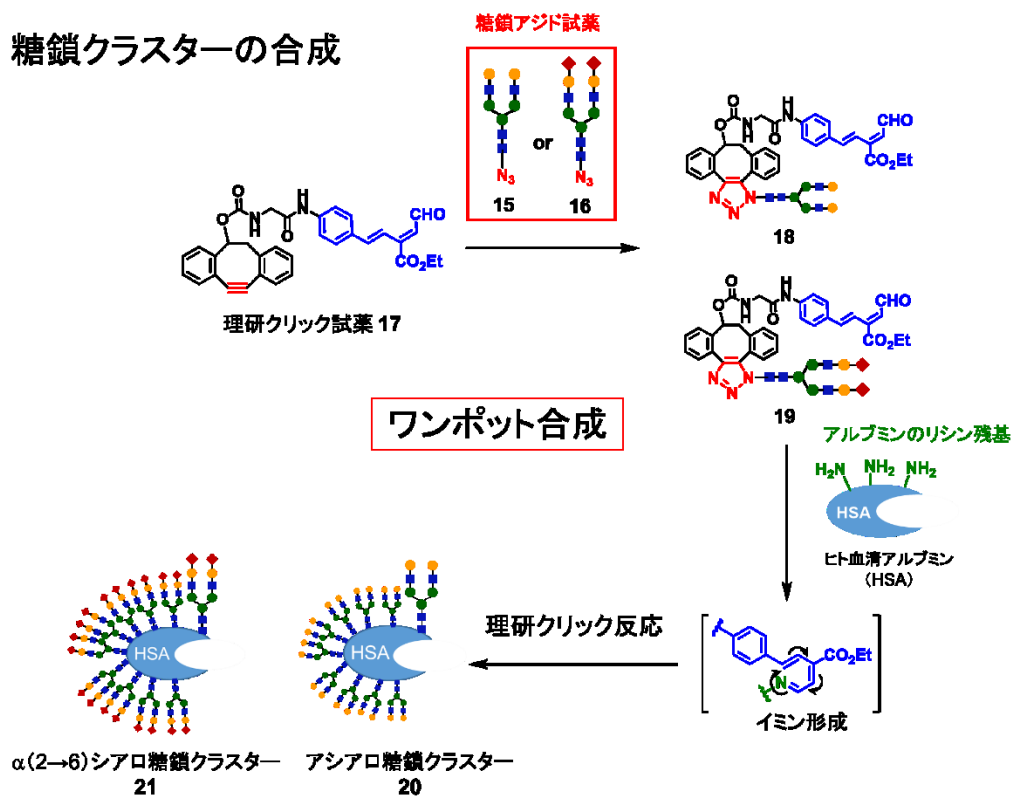


図 12 糖鎖クラスターの合成

**アシアロ糖鎖クラスター20** と、 **$\alpha(2\rightarrow6)$  シアロ糖鎖クラスター21** に蛍光基を結合させマウスに静脈注射したところ、それぞれの糖鎖クラスターは異なる挙動を示した (図 13)。すなわち、糖鎖を導入していない HSA をマウスに静脈注射した場合には (図 13a)、静脈の血流に乗ってはじめに肝臓へと流れ、すぐに体全体に広がってしまう。これに対して**アシアロ糖鎖クラスター20** では、結合している複数のアシアロ糖鎖が、図 14 左側に示したように、肝細胞に発現しているアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) と同時に相互作用するため、エンドサイトーシスが起りやすく、速やかに肝細胞へ取り込まれる。その後、30 分程度で肝細胞から胆管へと移行し、腸管に排泄される (図 13b)。一方で、 **$\alpha(2\rightarrow6)$  シアロ糖鎖クラスター21** でも同様に肝臓内で ASGPR との相互作用が起こる。通常、シアロ糖鎖と ASGPR の結合は解離定数が 10~100 mM 程度と弱い<sup>[29]</sup>、複数のシアロ糖鎖が結合した **$\alpha(2\rightarrow6)$  シアロ糖鎖クラスター21** の場合、図 14 右側①に示すように複数のシアロ糖鎖と肝細胞上の ASGPR が複数結合を形成する形で相互作用が起こる。しかし、②個々の結合は弱いため、肝細胞へのエンドサイトーシスが起る前に、ASGPR から離れてしまう。③その後、再び①のように ASGPR と再び相互作用を形成することで、肝臓内に留まる。滞留中の糖鎖クラスターは、数時間かけて ASGPR との相互作用が形成不可能となるまで代謝され、腎臓へ移行した後に膀胱から排泄されることが見出されていた (図 13c)。

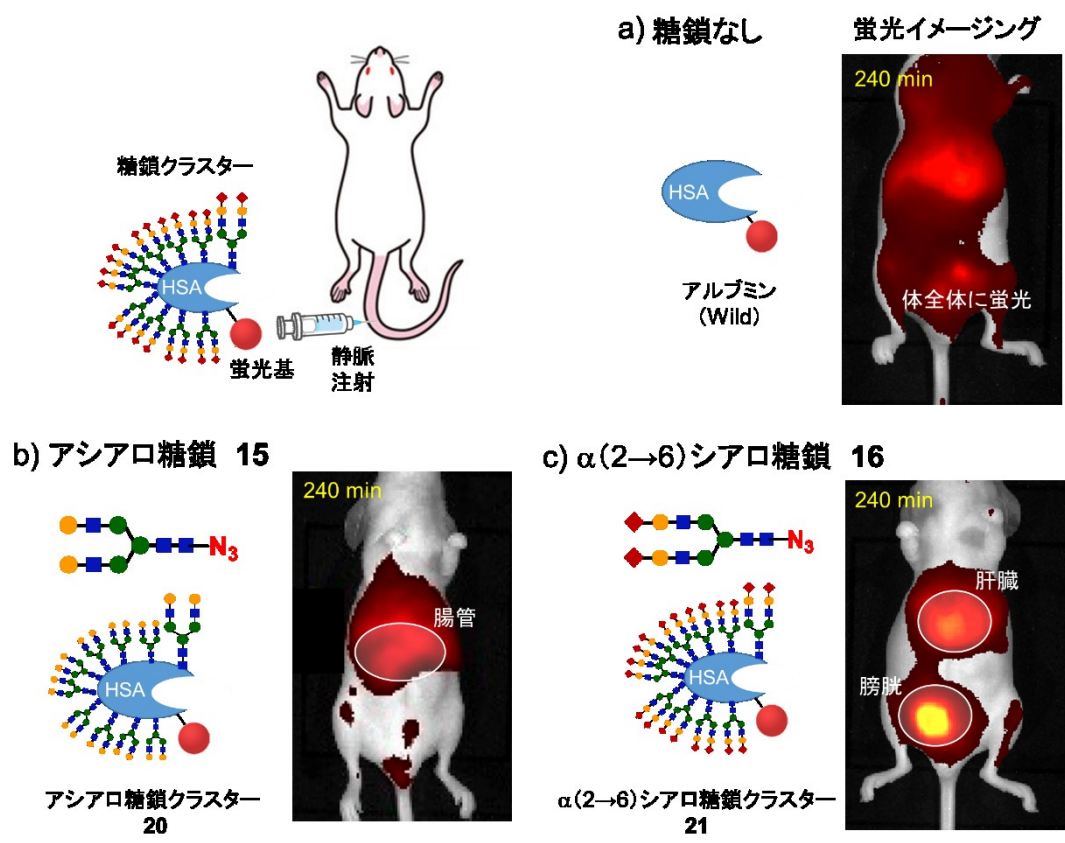


図 13 糖鎖クラスターの選択性 (イメージング画像：文献 25a Figure 3.より引用)

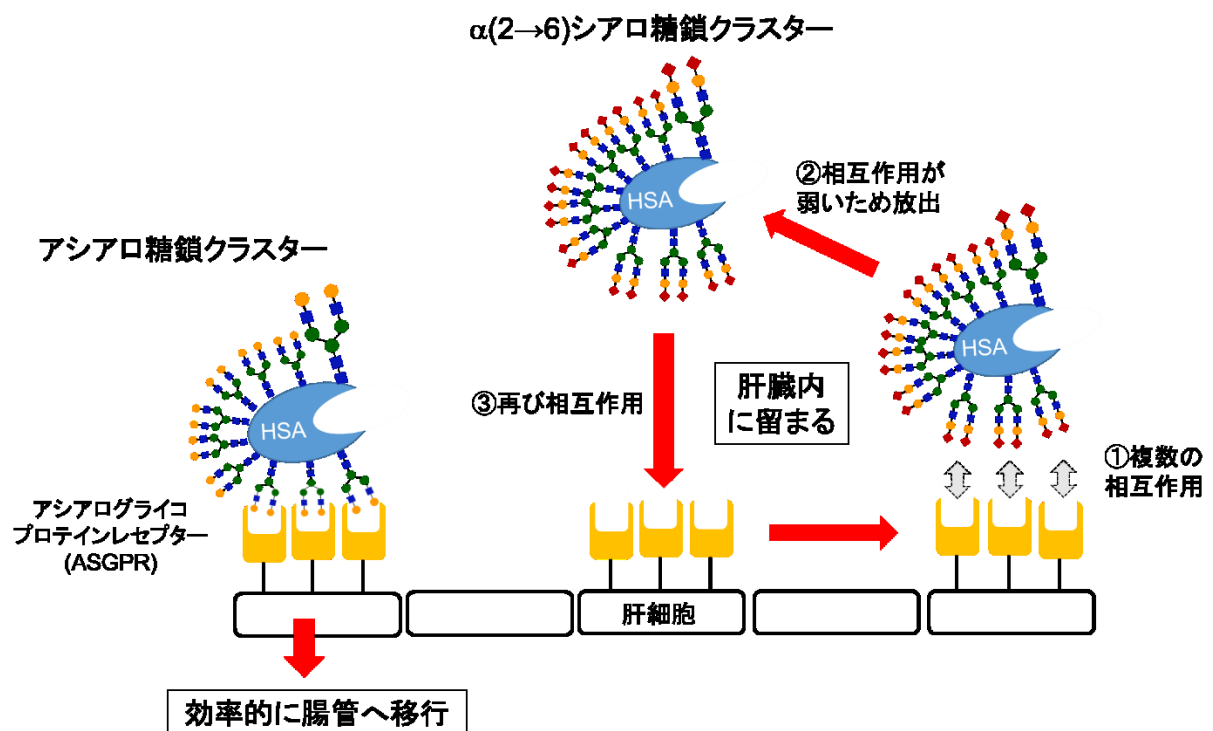


図 14 選択性の発現メカニズム

## 2.2. 結果

### 2.2.1. 水中での反応の開発

#### 2.2.1.1. グアニジル化反応

このような糖鎖クラスターに金属触媒を担持すれば、生きた動物内の標的臓器で局所的に金属触媒反応を行うことができると考えた。そこで本研究では、水中で進行可能な金属触媒反応の開発に着手した。

ここではまず、アミノ基のグアニジル化反応に着目した。グアニジノ基を有する化合物は、水溶液中では正電荷を帯びているため、様々なタンパク質と相互作用することができ、多様な生物活性を発現することが知られている<sup>[30]</sup>。また、生物活性分子に含まれるアミノ基をグアニジル化した化合物は、元の分子と比較してその生物活性が向上するという報告も存在する。例えば、インフルエンザの薬剤として知られるオセルタミビル **22** は、ウイルス感染細胞に発現しているノイラミニダーゼを阻害することで、体内でのウイルスの拡散を防いでいることが知られているが、この化合物に含まれるアミノ基をグアニジル化すると、ノイラミニダーゼ阻害活性が上昇することが報告されている (図 15)<sup>[31]</sup>。

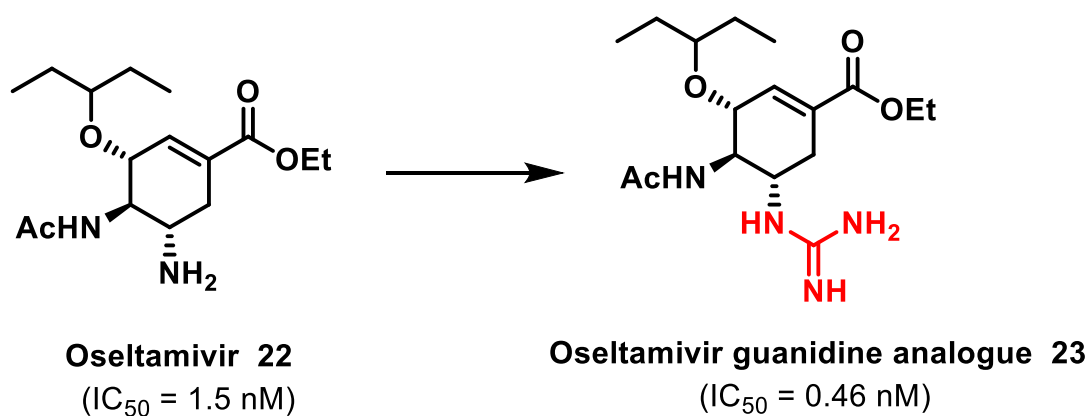


図 15 グアニジル化による活性の向上



このようにアミノ基のグアニジル化反応は、より高い生物活性を有する化合物の合成に有用であるため、本反応を生体内の疾患組織上で局所的に行うことができれば、副作用を低減した新しい疾患治療のアプローチの提案につながると期待できる。

これまでの水中でのアミノ基のグアニジル化反応には、シアナミドを利用する方法が報告されていた (図 16)<sup>[32]</sup>。この方法は様々なアミン基質に対して、過剰量の HCl とシアナミド **24** を水中に加え、封管条件で 180 °C に加熱することでグアニジル化合物を得る手法である。しかしながら、シアナミドの活性化に高い反応温度と過剰量の酸が必要であるため、生体内に近いより温和な条件でのシアナミドの活性化が必要である。そこで、種々の金属触媒を用いるシアナミドによるアミノ基のグアニジル化反応を検討した。

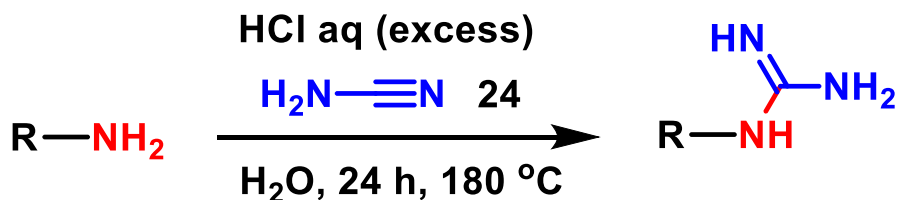
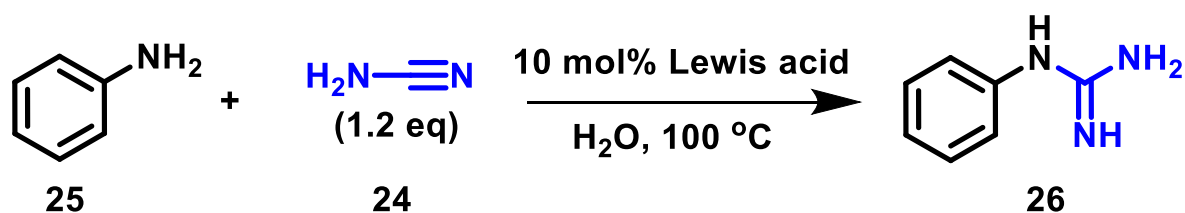


図 16 水中でのグアニジル化反応 (従来法)

まず、アニリン **25** に対して、10 mol%の種々の希土類金属トリフレートに触媒とし、1.2当量のシアナミド **24** を水中、100 °Cの条件で作用させ、グアニジル化合物の収率を測定した (表 1)。その結果、Nd(OTf)<sub>3</sub>、Zn(OTf)<sub>3</sub>、Cu(OTf)<sub>2</sub>、AgOTf、La(OTf)<sub>3</sub>、Tm(OTf)<sub>3</sub>については、グアニジン化合物 **26** はほとんど得られなかった。一方で、Y(OTf)<sub>3</sub>を用いた際には43%と中程度の収率でグアニジル化を行うことができた。さらに、Yb(OTf)<sub>3</sub>、In(OTf)<sub>3</sub>、Sc(OTf)<sub>3</sub>を用いた場合に81%、82%、95%という高収率でグアニジル化合物 **26** が得られた。最も収率の高かった Sc(OTf)<sub>3</sub>に関してさらに触媒量を5 mol%、2 mol%と低減させたところ、収率の低下が見られたため、10 mol% Sc(OTf)<sub>3</sub>が最適な条件であると判断した。

表 1 希土類ルイス酸による反応検討



Lewis acid	yield %	Lewis acid	yield %
Nd(OTf) <sub>3</sub>	5	Y(OTf) <sub>3</sub>	43
Zn(OTf) <sub>2</sub>	9	Yb(OTf) <sub>3</sub>	81
Cu(OTf) <sub>2</sub>	10	In(OTf) <sub>3</sub>	82
AgOTf	12	Sc(OTf) <sub>3</sub> (10 mol%)	95
InCl <sub>3</sub>	16	Sc(OTf) <sub>3</sub> (5 mol%)	66
La(OTf) <sub>3</sub>	19	Sc(OTf) <sub>3</sub> (2 mol%)	34
Tm(OTf) <sub>3</sub>	24		

ついで、シアナミド **24** と  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  を重水中で作用させ、反応溶液を  $^{13}\text{C}$  NMR で確認することで反応機構の検討を行った (図 17)。メタノールを標準物質として測定を行ったところ、シアナミド中のシアノ基のシグナルが 118 ppm から 162 ppm へとシフトしていることがわかった。Wang らの Yb 錯体によるグアニジル化反応の報告では、その中間体として Yb-カルボジイミド錯体が提唱されているが<sup>[33]</sup>、この結果はカルボジイミド中間体の生成を示唆している (図 17 下図)。すなわちカルボジイミド  $^{13}\text{C}$  NMR シグナルは、およそ 140-160 ppm 程

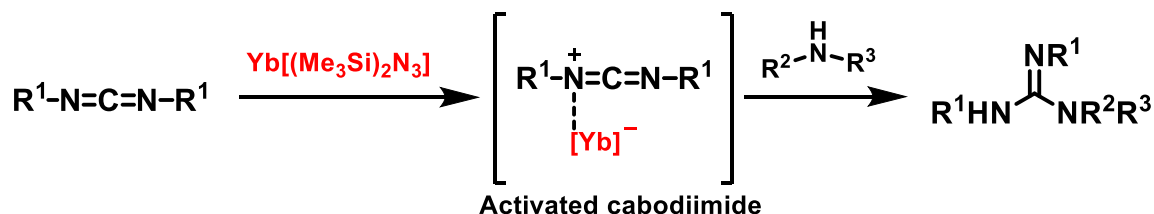
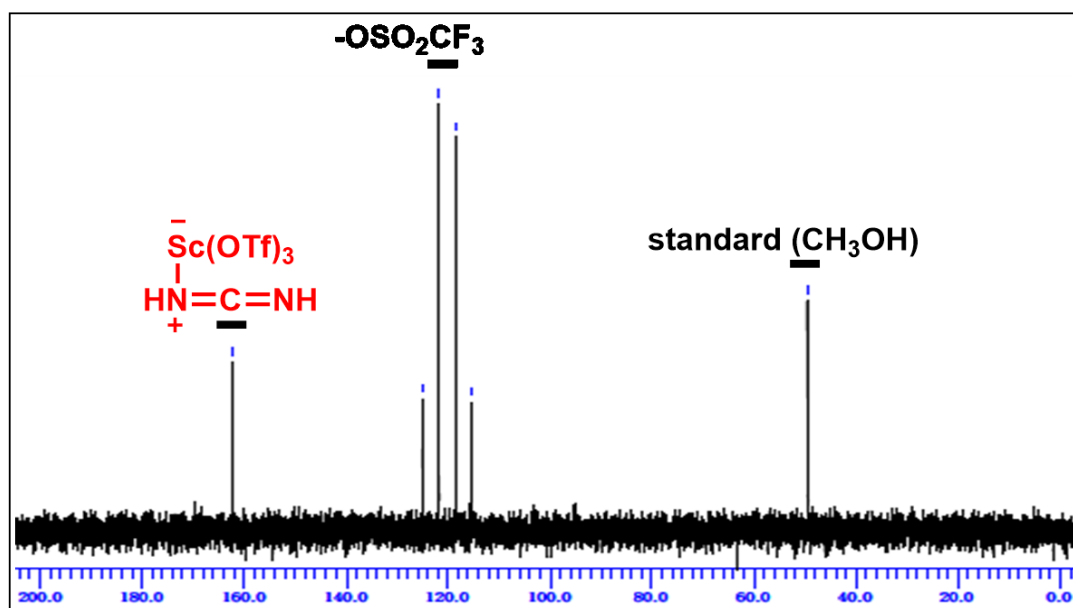
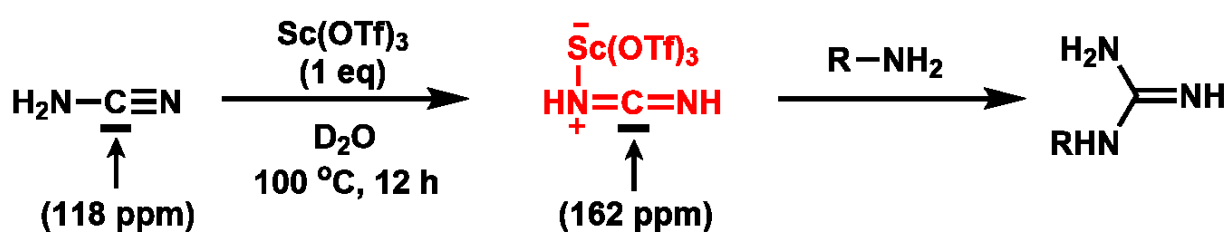


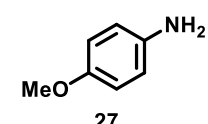
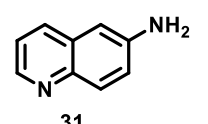
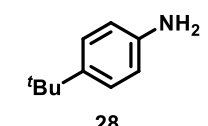
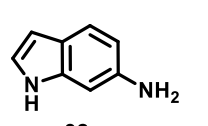
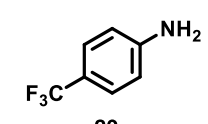
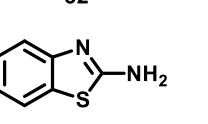
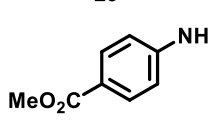
図 17  $^{13}\text{C}$  NMR による中間体の検討と Wang らにより提唱された中間体

度に観測されるが、今回観測された 162 ppm のシグナルは、Wang らの提唱する反応中間体と良い一致を示した。そのため、反応機構として、まず  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  がシアナミドに作用し、カルボジイミド中間体を形成する。この中間体に対してアミンが反応することで、グアニジル化が進行したと考えられる。

さらに、種々のアリアルアミンに対するグアニジル化反応を行うことで基質一般性を確認した (表 2)。Entry 1、2 ではメトキシ基および *tert*-ブチル基といった電子供与性基で置換されたアニリン **27** および **28** を用いた場合には、それぞれ 80% および 67% の収率で目的物を与えた。一方で、Entry 3、4 では、エステルやトリフルオロメチル基などの電子求引性基で置換されたアニリン **29** および **30** を用いて検討したところ、それぞれ 88% および 67% の収率でグアニジル化合物を与えた。また、Entry 5-7 では、ヘテロ原子を含んだアリアルアミンについて検討した。その結果、Entry 5 の 6-アミノキノリン **31** では 57%、Entry 6 の 6-ア

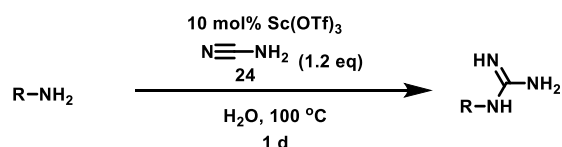
表 2 アリアルアミンの基質検討 (\*溶媒に  $\text{H}_2\text{O}$ -dioxane=1:1)

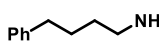
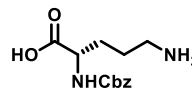
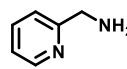
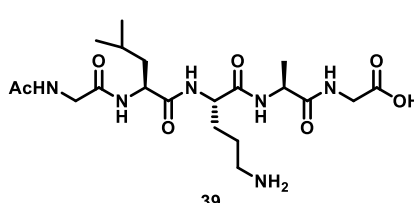
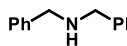
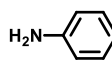

$$\text{Ar-NH}_2 \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}, 100\text{ }^\circ\text{C}, 1\text{ d}]{\begin{matrix} 10\text{ mol}\% \text{ Sc}(\text{OTf})_3 \\ \text{N}\equiv\text{NH}_2 \text{ (1.2 eq)} \\ \mathbf{24} \end{matrix}} \text{Ar-NH-C(=NH)-NH}_2$$

Entry	Amine	Yield	Entry	Amine	Yield
1	 <b>27</b>	80%	5	 <b>31</b>	57%
2	 <b>28</b>	67%*	6	 <b>32</b>	quant
3	 <b>29</b>	88%	7	 <b>33</b>	31%*
4	 <b>30</b>	63%			

ミノインドール **32** では定量的に、Entry 7 の 2-アミノベンズチアゾール **33** では 31%の収率でグアニジル化合物が得られた。最後にアルキルアミンについて同様の条件で検討を行った (表 3)。その結果、Entry 1 の 1 級アルキルアミン **34** では 68%、Entry 2 のピコリルアミン **35** では 56%の収率で目的物を得た。Entry 3、4 では 2 級アミンについても反応検討した。その結果、Entry 3 のアミン **36** では 46%、Entry 4 のモルホリン **37** では 83%の収率で目的物を与えた。また、Entry 5 のオルニチン誘導体 **38** では、68%の収率でグアニジル化合物を得た。最後に Entry 6 では Ac-Gly-Leu-Orn-Ala-Gly-OH の配列の直鎖ペプチド **39** に対して検討を行った。その結果、56%の収率で目的物を得た。以上のように、金属触媒を用いたよりマイルドな水中グアニジル化反応について検討を加えたが、いずれも動物の体温である 40 °C 程度では進行しないことが明らかとなったため (Entry 7)、本反応を生体内反応には適用できないと判断した。

表 3 アルキルアミンに対する基質検討 (\*溶媒に H<sub>2</sub>O-dioxane=1:1)



Entry	Amine	Yield	Entry	Amine	Yield
1	 <b>34</b>	68%*	5	 <b>38</b>	68%
2	 <b>35</b>	56%	6	 <b>39</b>	56%
3	 <b>36</b>	46%*	7	 <b>25</b> (40 °C)	N.R.
4	 <b>37</b>	83%			

### 2.2.1.2. アミド化反応

一方、共同研究先である田中研究室では、*C* 末端にプロパルギルエステルを有するグリシン **40** に対して、ヘキシルアミン **41** などの単純なアルキルアミンを作用させると、プロパルギルエステルとアミノ基が水中、室温といった温和な条件で進行することが見出されていた (図 18)<sup>[34]</sup>。

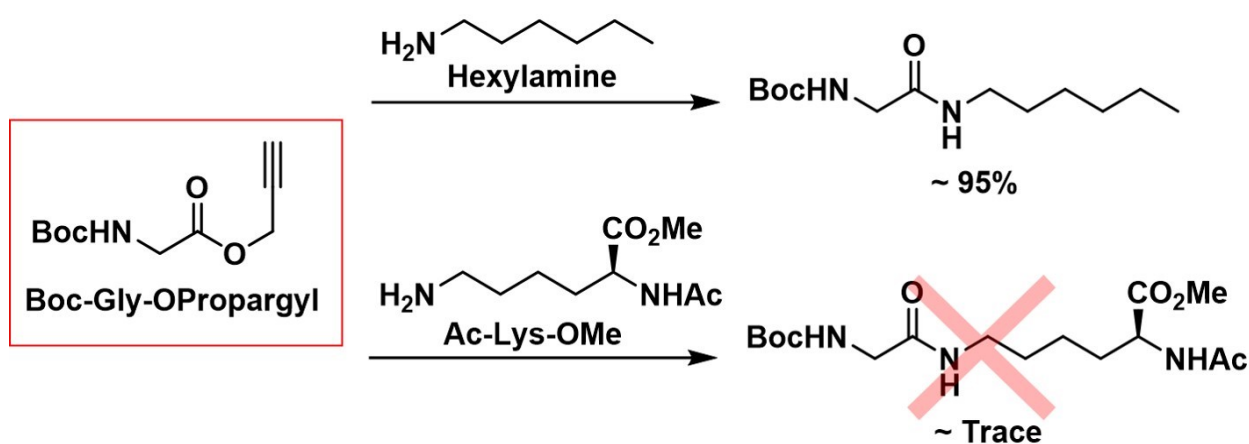


図 18 プロパルギルエステルとアミンによるアミド結合形成反応

しかしながら、この反応はアミノ酸のリシン **43** などの生体分子やより複雑な構造を有するアミンとは反応が進行しないため、金属触媒を作用させプロパルギルエステルを活性化させることができれば、より複雑な構造を有するアミンと反応を行うことができると考えた。そこで反応の触媒として金触媒に着目した。Nayan らはプロパルギルエステルを含む基質に対して、水中で金を作用させることで、 $\beta$ -オキソプロピルエステルが生成することを報告した (図 19)<sup>[35]</sup>。この反応は、まず金がプロパルギルエステルと相互作用し、エステルの酸素原子からの電子の押し出しにより、正電荷を持ったジオキソラン中間体を形成する。これに対して、水が付加しケト・エノール互変異性により、 $\beta$ -オキソプロピルエステルが形成される。

このようなプロパルギルエステルに金触媒を作用させて誘導したジオキソラン中間体に対して、水の代わりにアミンを作用させれば、アミド化反応が進行すると考えた。

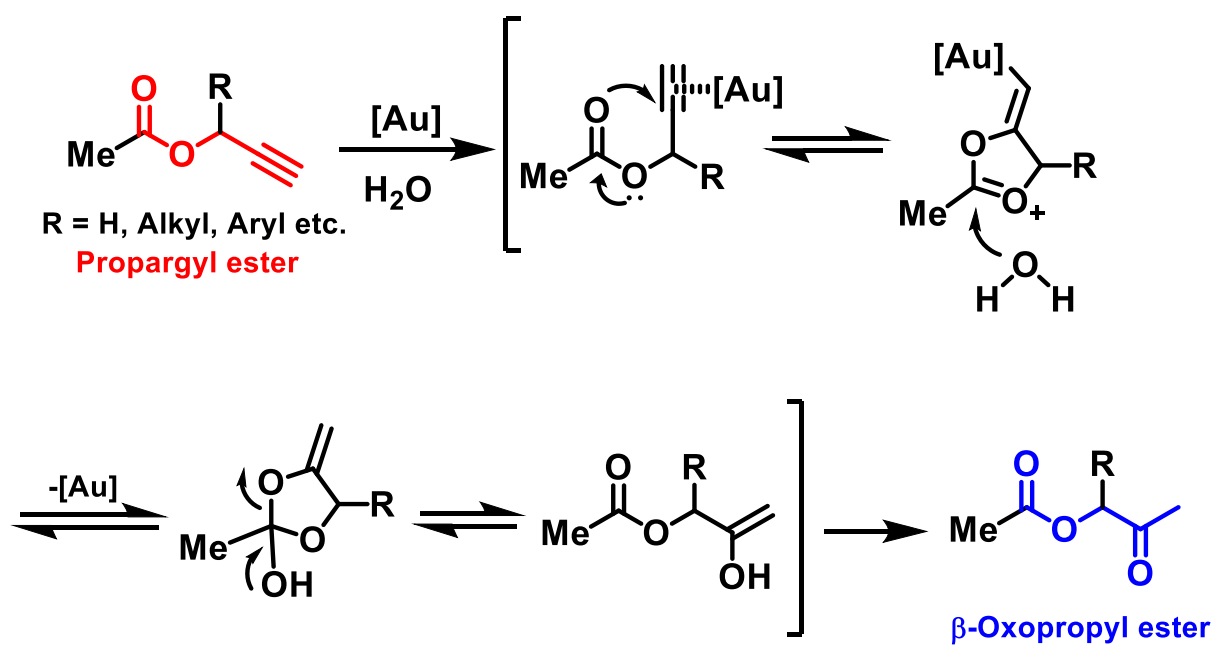
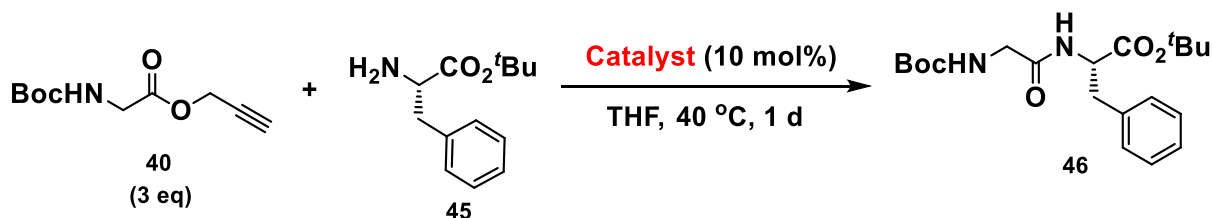


図 19 金触媒によるプロパルギルエステルの水和反応

そこで、これまでに種々報告されている金を利用して、フェニルアラニン誘導体 **45** とグリシンのプロパルギルエステル誘導体 **40** をモデル基質として、触媒の検討を行った (表 4)。すなわち、THF 中、40 °C、16 時間の条件下で、1 価と 3 価の金を 10 mol% 含む触媒についての反応検討を実施した。Entry 1 では一般的な 3 価の金触媒を利用して反応を行ったところ、30%の収率で目的物を与えた。また、Entry 2、3 では 1 価の金触媒について検討したが、どちらも反応は進行しなかった。また金以外の遷移金属として、1 価の銅についても検討を行ったが、目的物は得られなかった。以上の検討から、3 価の金を含む触媒が本反応に適しているという結果が得られた。

表 4 触媒検討

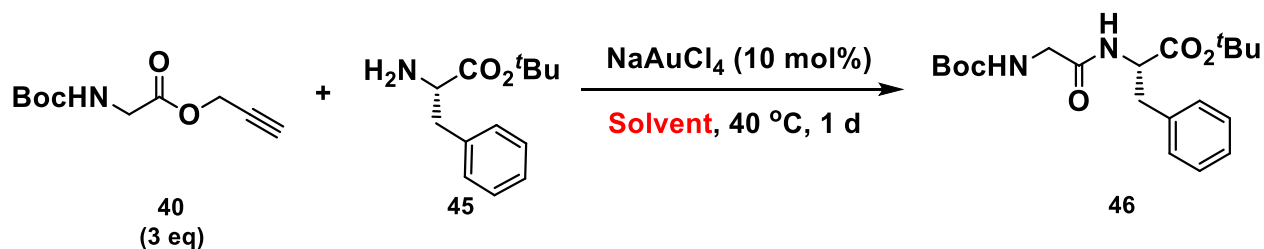


Entry	Catalyst	Yield
1	NaAuCl <sub>4</sub>	30%
2	AuNTfPPh <sub>3</sub>	N.R.
3	AuI	N.R.
4	CuOTf	N.R.



続いて、溶媒の検討を行った (表 5)。Entry 1 の THF 溶媒での収率は 30%であり、Entry 2 でプロトン性溶媒として用いた MeOH では、プロパルギルエステルとのエステル交換が進行したのみであった (収率 0%)。Entry 3 のアセトニトリルについても検討を行ったが収率の向上は認められなかった。しかしながら、Entry 4 の水系溶媒 (THF:H<sub>2</sub>O=5:1) では、25%の収率で目的物を与えたため、本反応が水中でも進行することが分かった。

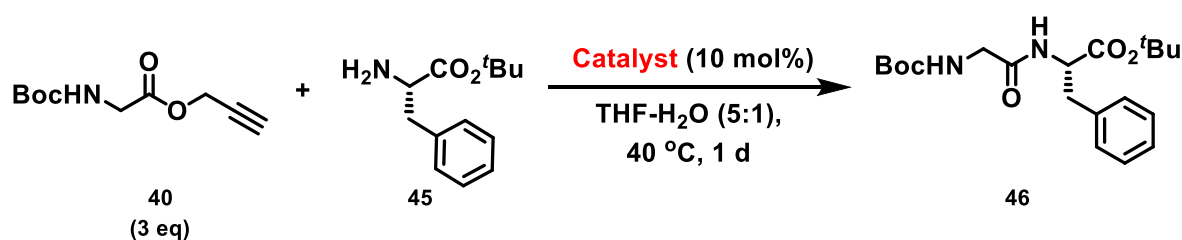
表 5 溶媒検討



Entry	Solvent	Yield
1	THF	30%
2	MeOH	0%
3	MeCN	8%
4	THF-H <sub>2</sub> O (5:1)	25%

以上の結果、3 価の金を含む触媒が本反応に適していることが明らかとなったため、次に 3 価の金を糖鎖クラスターに担持するための配位子について検討を行った (表 6)。水中での反応例が報告されている配位子を有する種々の金触媒について検討した結果、Entry 1 のサレンを配位子とする 3 価の金触媒 47<sup>[36]</sup>では 11%と収率が低下した。Entry 2 のポルフィリンを配位子とする 3 価の金触媒 48<sup>[37]</sup>では反応が進行しなかった。一方、Wong らによって報告された触媒 49<sup>[38]</sup>を利用した Entry 3 では通常の 3 価の金触媒 (NaAuCl<sub>4</sub>) と同程度の収率 (20%) で反応が進行することが明らかとなった。

表 6 触媒の配位子検討



Entry	Catalyst	Yield
1	 47	11%
2	 48	Trace
3	 49	20%

## 2.2.2. 生体内で利用するための触媒の合成

糖鎖クラスターに担持した金触媒とプロパルギルエステル基質をマウスに投与すれば、特定臓器に集積した金触媒によって試薬が活性化されるため、たとえフラスコ内での収率が低くとも、細胞膜タンパク質などの多量にアミンが存在している環境下では、より効率的に生体内でも検出できるレベルで反応が進行するものと考えた。そこで、この金触媒 **49** をもとに糖鎖クラスターに担持するための触媒合成を検討した。

金触媒 **49** を *in vivo* で利用するために、糖鎖クラスターの鑄型となっている HSA と強く相互作用するジエチルアミノクマリンと金触媒 **49** を結合させることとした (図 20)。HSA には、サブドメイン IB と IIA の間に疎水性のドメインが存在しており、この疎水性ドメインとジエチルアミノクマリンが解離定数  $3\ \mu\text{M}$  程度で結合することが報告されていた<sup>[39]</sup>。そこで、

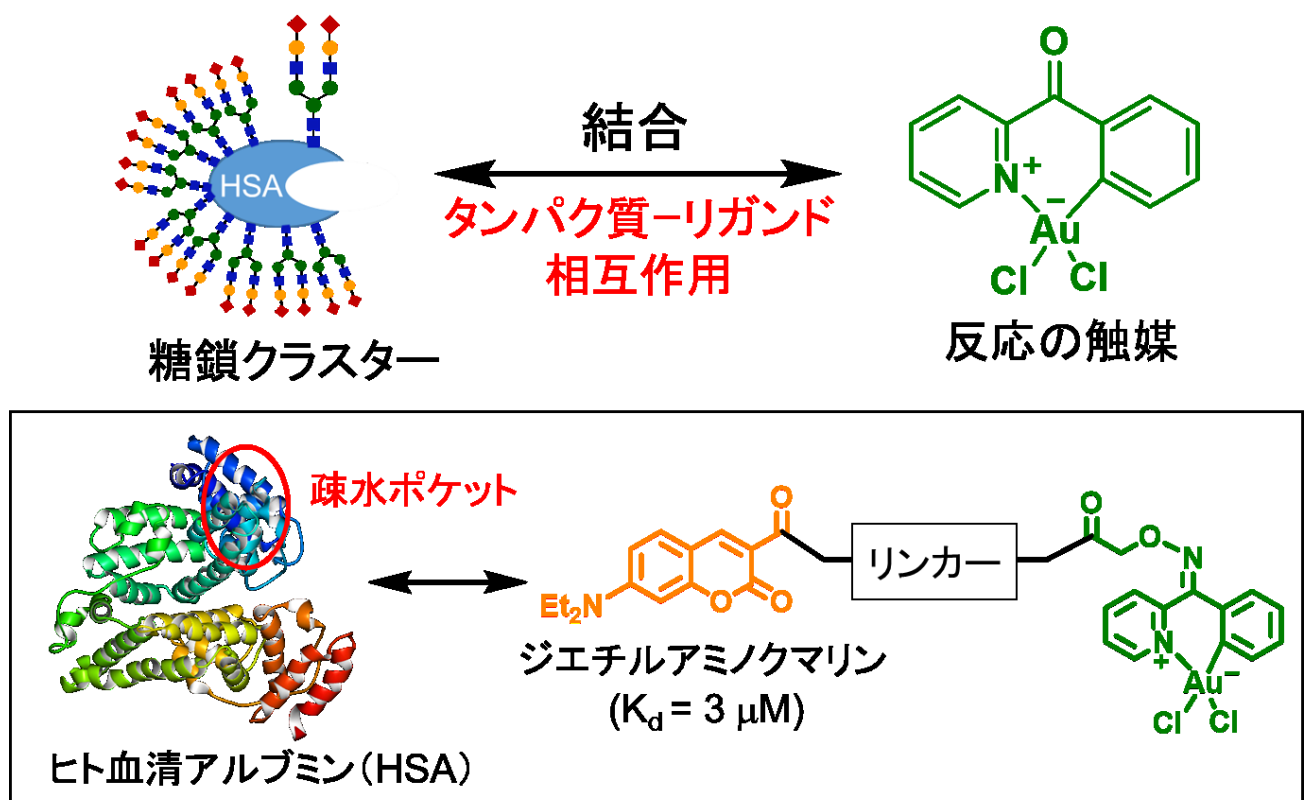


図 20 糖鎖クラスターと金触媒の相互作用

ジエチルアミノクマリンと金触媒 **49** を結合させた触媒を合成すれば、ジエチルアミノクマリンを介して金触媒 **49** と糖鎖クラスターを結合させた糖鎖クラスター金触媒 (**Glyco-Au**) を合成することができると考えた。

市販の 2-ベンゾイルピリジン **50** に対して、 $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を作用させることにより、ピリジンの窒素原子上に正電荷を有する錯体 **51** を形成させた<sup>[40]</sup>。続いて、 $\text{AgOTf}$  を 2 当量加え、プロピオニトリル中、加熱還流を行い、C-Au 結合を形成させ、Wong らの触媒 **49** を合成した<sup>[41]</sup>。合成した触媒のケトン部位に対して、室温、ジクロロメタン-メタノール混合溶媒 (1:1) 条件下で、ヒドロキシアミン化合物 **52** を作用させることにより、生体中でも安定と考えられているオキシム **53** を形成させた (図 21)。

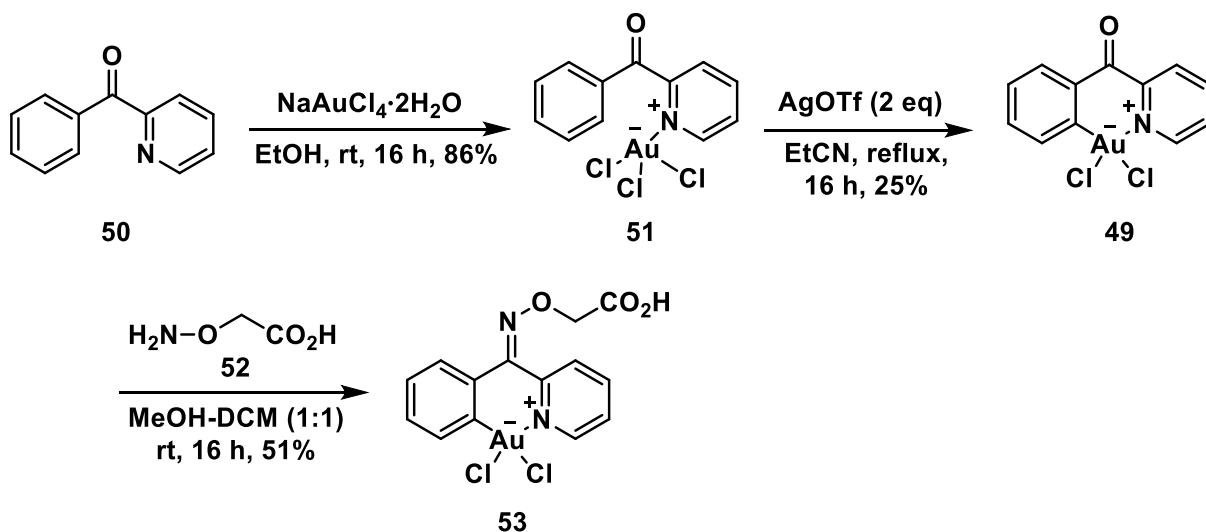


図 21 金触媒フラグメントの合成

続いて、市販のジエチルアミノクマリン誘導体 **54** に対して、エチルエステルを水-メタノール (1:1) 混合溶媒中、還流条件で、NaOH により 90%の収率で加水分解した<sup>[42]</sup>。生成したカルボン酸 **55** に対して、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) を作用させ、ポリエチレングリコール鎖を有するアミン **56** と縮合し、94%の収率で目的物 **57** を得た。これにより、リンカーにポリエチレングリコール鎖を導入し、より親水性を向上させた触媒を合成することができると考えた。続いて、結合しているアジドを Pd/C を用いて還元し、90%の収率で目的のアミン **58** へと誘導した (図 22)。

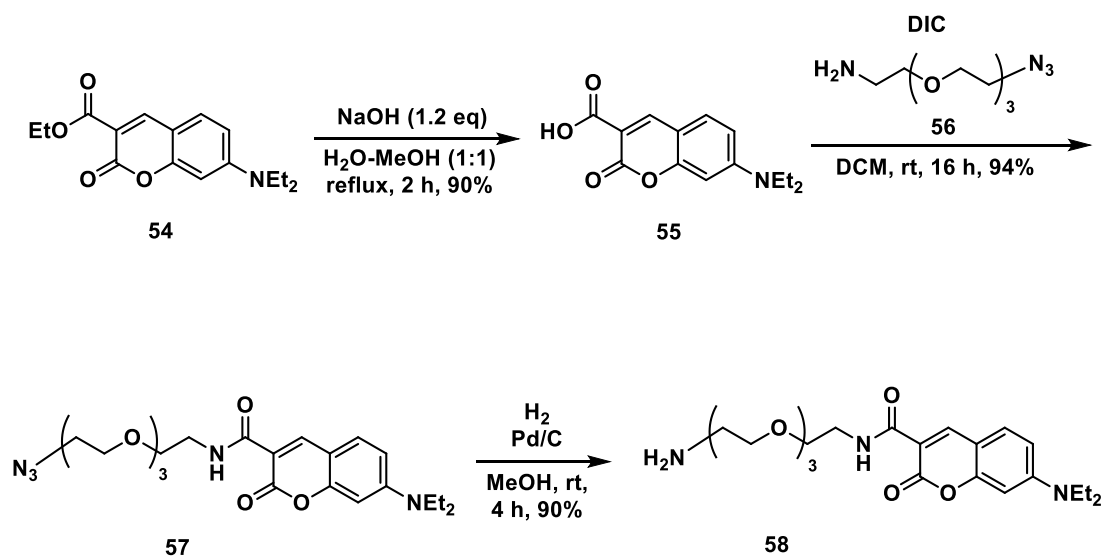


図 22 ジエチルアミノクマリンフラグメントの合成

合成したジエチルアミノクマリンのアミン誘導体 **58** と金触媒のカルボン酸誘導体 **53** を DIC と HOAt 存在下、ジクロロメタン中、室温の条件で攪拌し、目的とする触媒 **59** を 56% の収率で得た (図 23)。

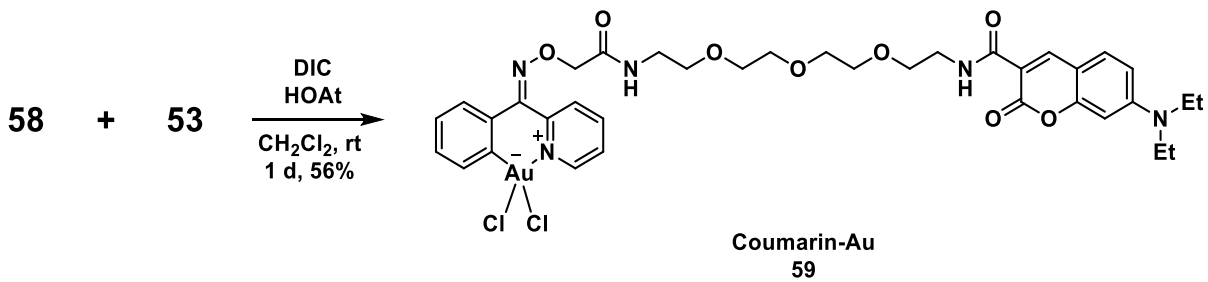
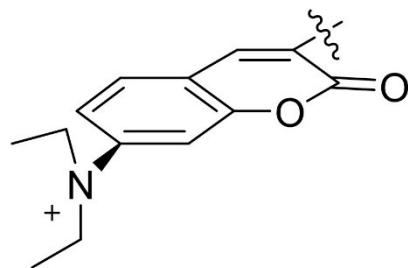


図 23 ジエチルアミノクマリン金触媒 59 の合成

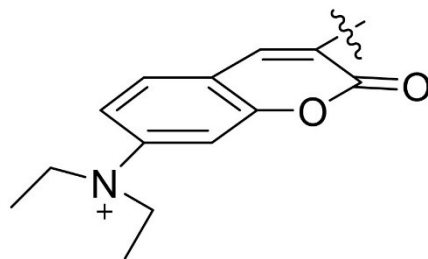
続いて、合成した触媒について糖鎖クラスターと相互作用可能であることを確認した (図 24、25)。ジエチルアミノクマリンは、溶媒効果により励起状態の構造が変化し、蛍光を伴う放射過程と蛍光を伴わない無放射過程を経るエネルギー遷移が知られている (図 24)<sup>[43]</sup>。プロトン性溶媒では、ジエチルアミノクマリン中の C-N 結合が回転し、ふたつのエチル基がクマリン骨格の  $\pi$  軌道と直交する励起状態となり、無放射遷移でのエネルギー遷移となる。一方、非プロトン性溶媒を利用した場合、C-N 結合の回転は起こらずに励起状態が形成されるため、放射過程でのエネルギー遷移が起こり、蛍光が観測される。仮にジエチルアミノクマリンが、糖鎖クラスターと疎水性相互作用により結合した場合、ジエチルアミノクマリンを取り巻く環境は、非プロトン性溶媒と同様の環境に置かれるといえる。したがって、水溶液中では蛍光を発しない触媒の蛍光を観測することができれば、糖鎖クラスターと相互作用し、糖鎖クラスターに金触媒を結合させた **Glyco-Au** が生成したといえる。

プロトン性溶媒



$\pi$  軌道とエチル基が直交する励起状態  
無放射過程

非プロトン性溶媒



構造変化を伴わない励起状態  
放射過程

図 24 ジエチルアミノクマリンの遷移状態の構造

合成した金触媒 **59** の 10  $\mu\text{M}$  アセトニトリル溶液を、HSA 水溶液 (20 nmol/200  $\mu\text{L}$ ) に加え、励起波長 420 nm、測定波長 466 nm でジエチルアミノクマリンの蛍光を測定した (図 25)。その結果、ジエチルアミノクマリンの蛍光が 6 倍程度上昇した。これにより、本触媒がアルブミンと相互作用可能であることが示唆された。

続いて、**アシアロ糖鎖クラスター20** に対して、同様に触媒を相互作用させた。その結果、HSA と同様に 8 倍程度の蛍光の増大を観測することができた。これにより、**アシアロ糖鎖クラスター20** と金触媒 **59** がジエチルアミノクマリンを介して結合した糖鎖クラスター金触媒 **60 (Glyco-Au<sup>Gal</sup>)** を調製することができた。

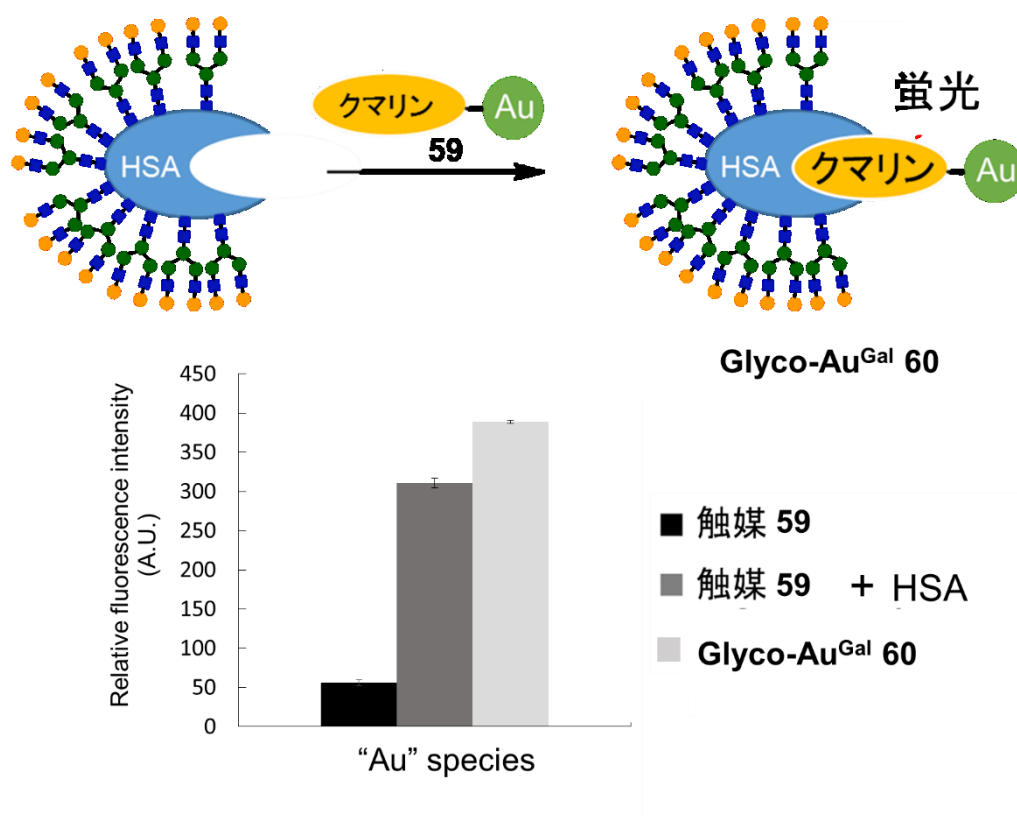


図 25 ジエチルアミノクマリンの蛍光測定 (ex/em=420 nm/466 nm) (n=3、Mean $\pm$ SD)

続いて調製した **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** の触媒能についての検討を行った (図 26、27)。調製した **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** に対して、蛍光基を有するプロパルギルエステルを作用させ、糖鎖クラスター中に存在している 49 残基のリシン側鎖アミンへのアミド化反応を実施し、蛍光基の蛍光強度の経時変化を追うことで反応を追跡することとした。まず、蛍光基としてジエチルアミノクマリンの蛍光と波長が重ならないテトラメチルローダミン (TAMRA) を利用して、蛍光プローブの合成を行った (図 26)。Boc-Gly-OH **61** に対して、DMF 中、炭酸カリウム存在下、プロパルギルブロミド **62** を加えることにより、カルボン酸プロパルギルエステルした **40** を収率 97% で得た<sup>[44]</sup>。続いて、*N* 末端を 4N HCl/dioxane で処理することで Boc 基を除去し、H-Gly-OPropargyl **63** を得た。続いて DMF 中、*N*-Boc- $\gamma$ -アミノブチル酸 **64** と H-Gly-

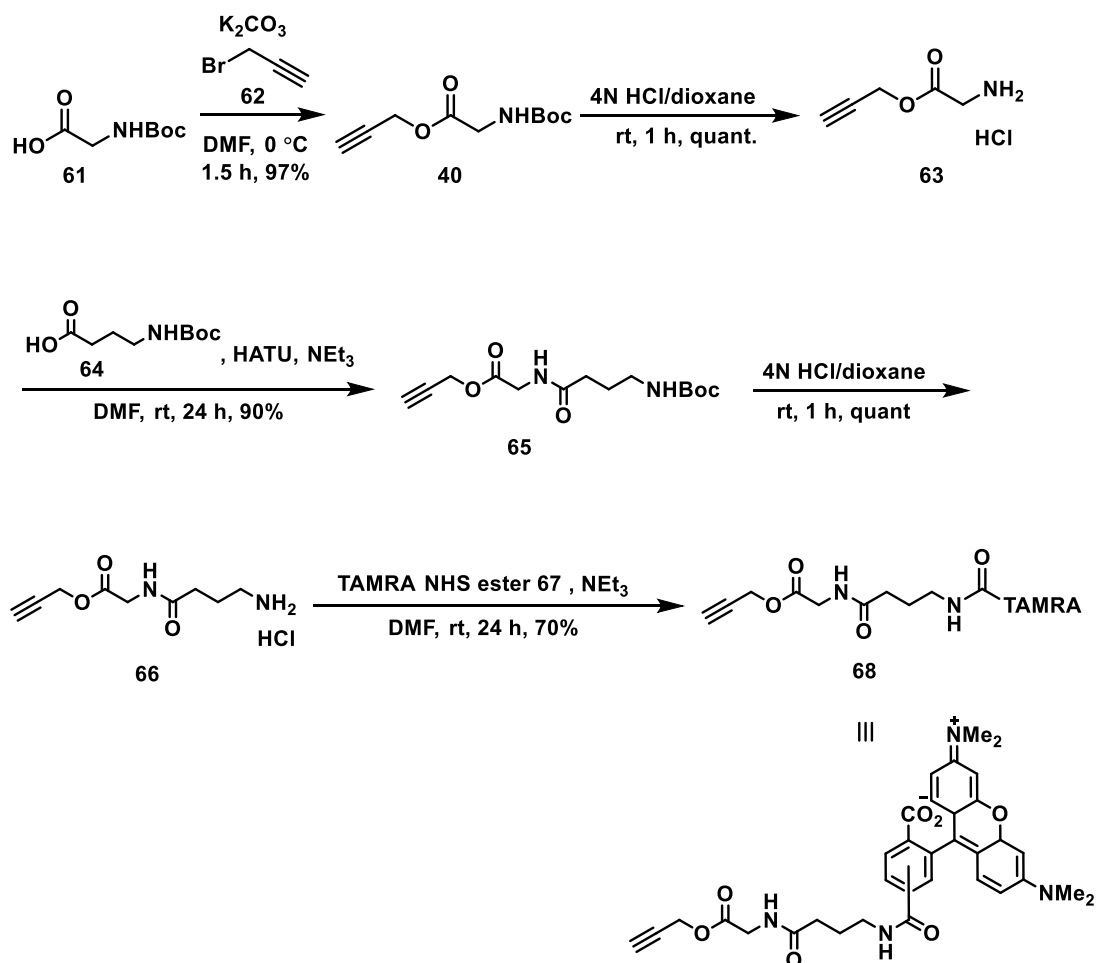


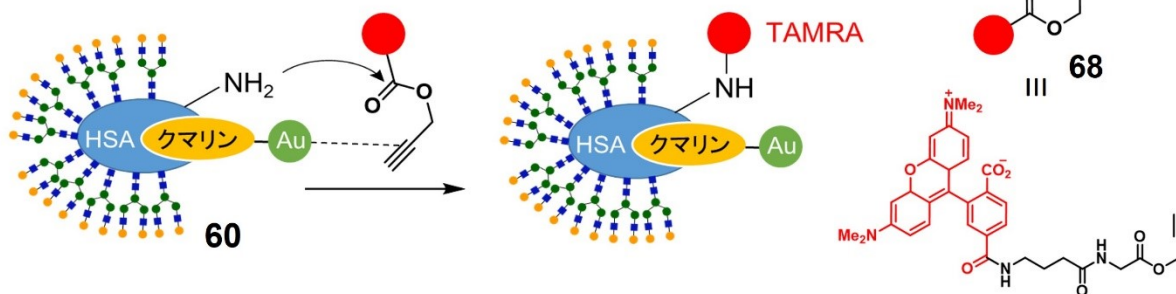
図 26 TAMRA-Propargyl **68** の合成



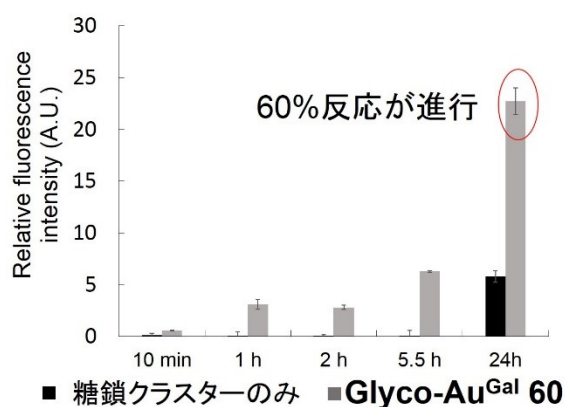
OPropargyl **63** を縮合剤 HATU とトリエチルアミン存在下で作用させたところ、90%の収率で化合物 **65** を得た。再び 4 *N* HCl/dioxane で Boc 基を除去し、脱保護体 **66** を定量的に得た。脱保護体 **66** を DMF 中、トリエチルアミン存在下で市販の 5, 6-TAMRA スクシンイミジルエステル誘導体 **67** と作用させ、目的物である TAMRA プロパルギルエステル (TAMRA-Propargyl) **68** を 70%の収率で合成した。

TAMRA-Propargyl **68** と調製した **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** を作用させ、実際に蛍光の経時変化を追跡した (図 27)。**Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** の PBS-DMSO (4:1) 溶液 (10 nmol/500  $\mu$ L) に対して、TAMRA-Propargyl **68** 100 nmol を作用させた。10、60、120、330、1440 分の反応時間で TAMRA の蛍光 (励起 : 555 nm、蛍光 : 585 nm) を測定したところ、経時的に蛍光強度が増大していることが確認された (図 27b : 灰色)。一方で、コントロールとして金触媒を担持していない条件 (**アシアロ糖鎖クラスター-20** のみ) では、蛍光の増大は触媒担持条件と比較して 30%程度と低く観測されたため、担持されている金触媒がプロパルギルエステルを活性化していることが示唆された (図 27b : 黒)。また、1440 分後の反応液を MALDI-TOF Mass で質量分析したところ、6 個の TAMRA が結合したシグナルを確認することができた (図 27c)。これにより、本反応は 1440 分で 60%程度反応が進行するということを確認することができた。一方で、金触媒を担持していない糖鎖クラスターに対しても同様の条件で反応を行ったが、蛍光は 10~330 分で増加せず、1440 分でも金触媒存在下の 20%という値で検出された (図 27b : 灰色)。このようにアミノ基 (リシン側鎖) が 49 個と多量に存在する糖鎖クラスターに対しては、フラスコ内での収率 (20%) と比較して反応性の向上が認められた。そのため本反応を、よりアミンが過剰に存在している生体内で試行すれば、検出できるレベルの効率で反応が進行すると考えられた。

a) 反応スキーム



b) 蛍光による反応追跡



c) 反応の定量

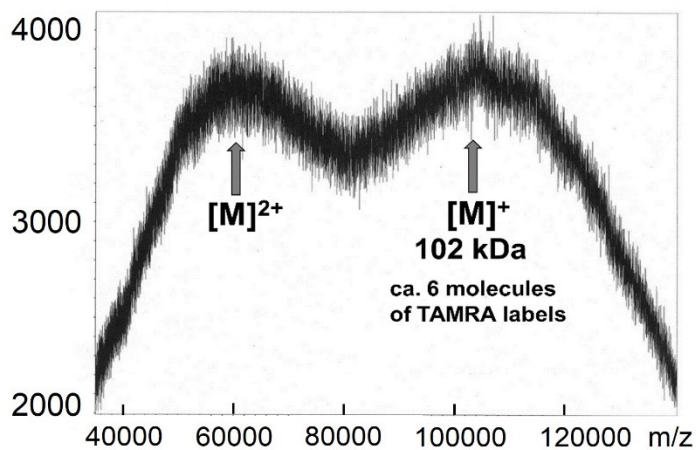
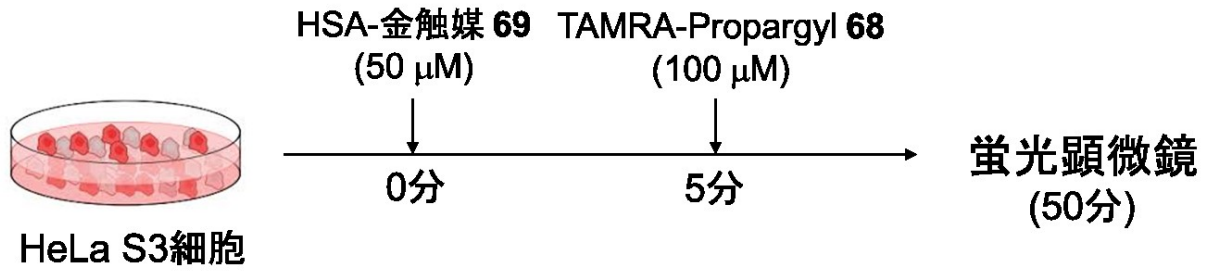


図 27 触媒能の検討

b 灰 : Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60+TAMRA-Propargyl 68 (10 eq)、n=3、Mean±SD、b 黒 : アシアロ糖鎖クラスター20+TAMRA-Propargyl 68 (10 eq)、n=3、Mean±SD (ex/em=555 nm/580 nm) ; c : MALDI-TOF Mass (マトリックスとしてα-シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸を使用した)

反応の進行が確認されたため、続いて細胞表層上のタンパク質に存在しているアミノ基に対する検討を行った (図 28)。ここでは、細胞に対して試薬を添加するため、糖鎖によるターゲティングは必要ないと考え、糖鎖を修飾していない HSA に対して金触媒を担持した HSA-金触媒 **69** と TAMRA-Propargyl **68** を HeLa S3 細胞に添加することで、HeLa S3 細胞表層のアミンに対する蛍光標識化が進行するかを確認した。HSA-金触媒 **69** と TAMRA-Propargyl **68** を終濃度 50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  となるように培地中の HeLa 細胞に添加し、1 時間、37  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションした。その後、Hoechst33342 で核を染色し、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、蛍光顕微鏡で TAMRA の蛍光を観察した。TAMRA-Propargyl **68** と HSA-金触媒 **69** を共存させた場合では蛍光が観測されたが、プロパルギルエステルが加水分解された TAMRA-OH **70** と HSA-金触媒 **69** を添加しても反応は進行せず、蛍光は観察されなかった。以上より、本アミド化反応が細胞培養条件という環境下でも期待通りに進行することが示された。

a) 反応検討



b) 蛍光顕微鏡観察

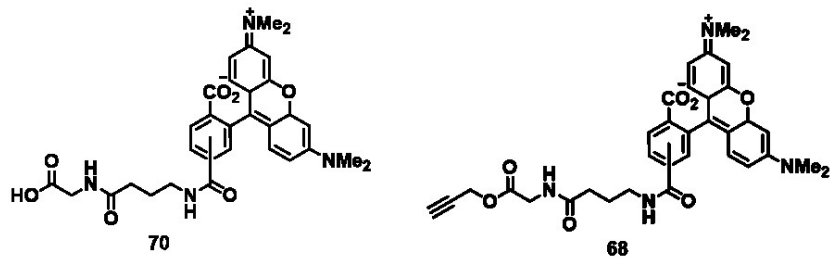
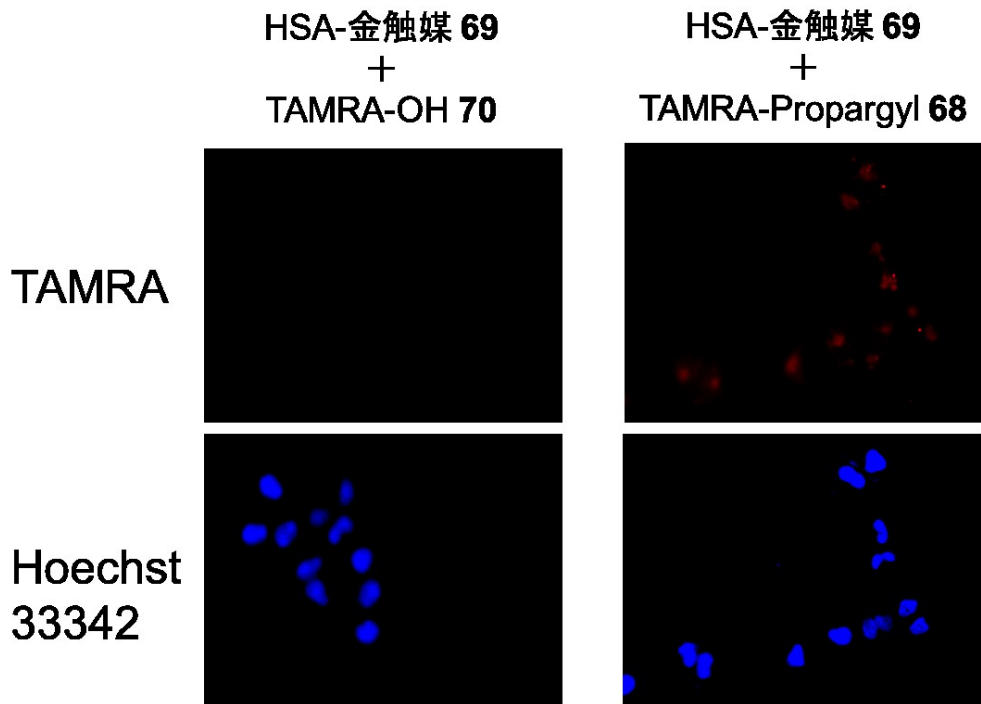


図 28 細胞培養条件下における触媒反応の検討

HeLa S3 細胞 ( $2 \times 10^4$  cell) に対して、HSA-金触媒 **69** と化合物 **68**、**70** をそれぞれ終濃度  $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$  となるように添加した。; b : Hoechst33342 で染色し、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡 (ex/em=530 nm/580 nm) で観察した。

### 2.2.3. BALB/c マウス内での金触媒によるアミド化反応

次に開発した触媒を用いて生体内で本反応を行い、反応の進行を検出するために生体透過性に優れた近赤外の蛍光を発する<sup>[45]</sup> Cyanine7.5 (Cy7.5) をプロパルギルエステルに結合させたプローブとして利用することとした。この際に Cy7.5 の導入を TAMRA と同様にγ-アミノブチル酸を介してプロパルギルエステルと結合させることを計画したが、Cy7.5 の疎水性が高く水系溶媒に全く溶解しなかった。そのため、リンカーに親水性ペプチドを導入し、より親水性の高いプローブを合成した。

まず、C末端をグリシンとして固相合成によりペプチドの伸長を行った (図 29)。あらかじめグリシンが結合している 2-クロロトリチル樹脂 (H-Gly-Trt(2-Cl)-resin) **71** に対して、Fmoc 保護されたアルギニン Fmoc-Arg(Pbf)-OH **72**、縮合剤 HCTU、HOBt(6-Cl)をそれぞれ 4 当量、さらに塩基としてジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を 6 当量加え、振盪しペプチドの伸長を行った。続いて、20%ピペリジン/DMF 溶液を作用させ、Fmoc 基を除去した。次に Boc 基で保護されたグリシン Boc-Gly-OH **61** を先ほどと同様の条件で伸長し、最後に 20%ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP)/CHCl<sub>3</sub> 溶液を作用させることで樹脂からの切り出しを行い、87%の収率で 3 残基のペプチド **73** を得た。

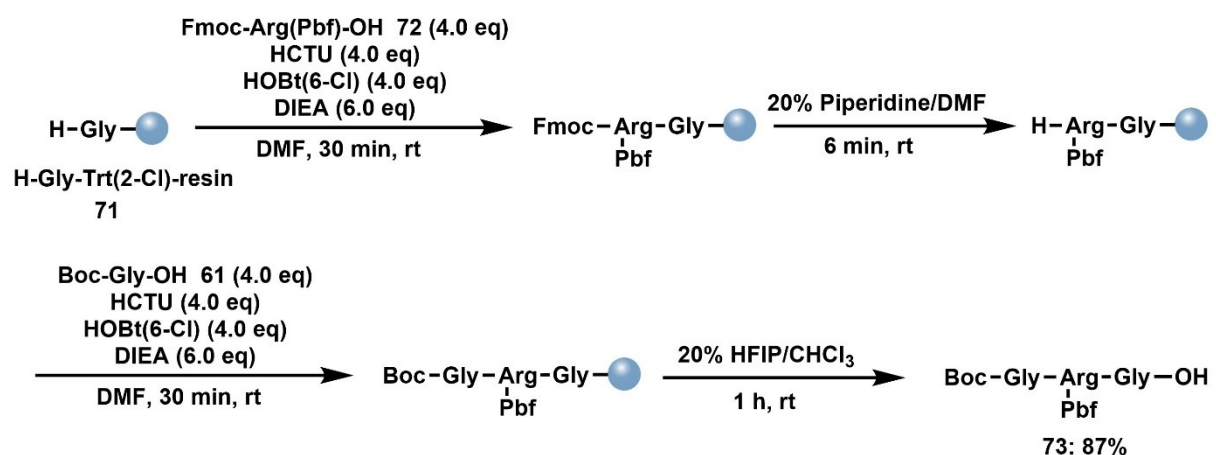


図 29 固相合成によるペプチドリッカーの合成

合成したトリペプチド **73** の C末端を、これまでと同様の手段を用いて  $K_2CO_3$  およびプロパルギルブロミドを作用させることによりプロパルギルエステル化を行い、その後 TFA で保護基をすべて除去した (図 30)。反応混合物を二層分配 ( $H_2O-CHCl_3$ ) によって分画し、得られた水層を濃縮したのに対して、トリエチルアミン存在下、DMF 中で Cy7.5-スクシンイミジルエステル (Cy7.5-NHS ester) **74** を作用させ、HPLC で精製を行って近赤外蛍光基 Cy7.5 を有する水溶性のプロパルギルエステル (Cy7.5-Propargyl) **75** を 3 工程、37% で得た。

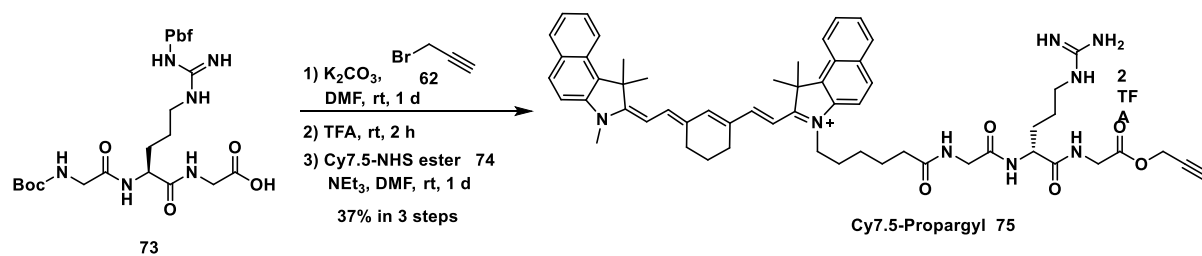


図 30 Cy7.5-Propargyl エステル 75 の合成

合成したプローブとアミンが反応するか確認を行った (図 31)。前項 2.2.2.図 27b と同様に、アシアロ糖鎖が結合した **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** に対して、Cy7.5-Propargyl **75** を作用させてアミド化反応を行い、その蛍光強度 (励起: 780 nm、蛍光: 830 nm) の経時変化の測定を行った。その結果、経時的に蛍光基の蛍光量の増加が確認されたことから、Cy7.5-Propargyl **75** は **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** により活性化され、アミンと反応するという結果が示された (図 31: 灰色)。一方で触媒が存在しない場合、10~120 分の間で蛍光量の増加は確認されず、1200 分においても触媒存在下の 40% で蛍光が観測された (図 31: 黒)。

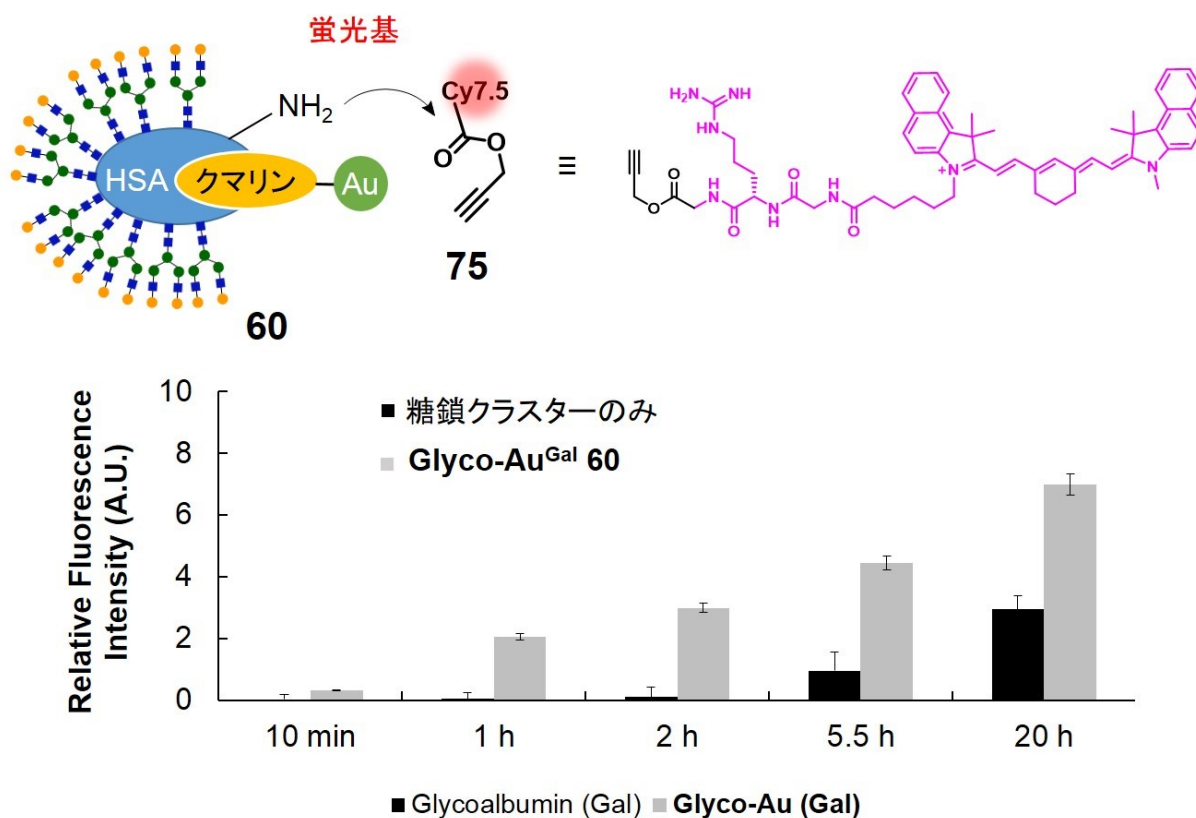


図 31 **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** と Cy7.5-Propargyl **75** の反応性

灰: **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60**+Cy7.5-Propargyl **75** (10 eq)、n=3、Mean±SD (ex/em=780 nm/830 nm)、黒: アシアロ糖鎖クラスター20+Cy7.5-Propargyl **75** (10 eq)、n=3、Mean±SD

続いて、腸管に移行する **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** と肝臓に移行する $\alpha(2\rightarrow6)$ シアロ糖鎖クラスターに金触媒を担持した **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** を用いて、腸管細胞または肝細胞の膜タンパク質中のアミンに対して、**Cy7.5-Propargyl 75** をアミド化反応により蛍光標識化することを田原、野崎、浦野、田中らとともに計画し (図 32)、予備検討として試薬の濃度条件を検討した (図 33)。

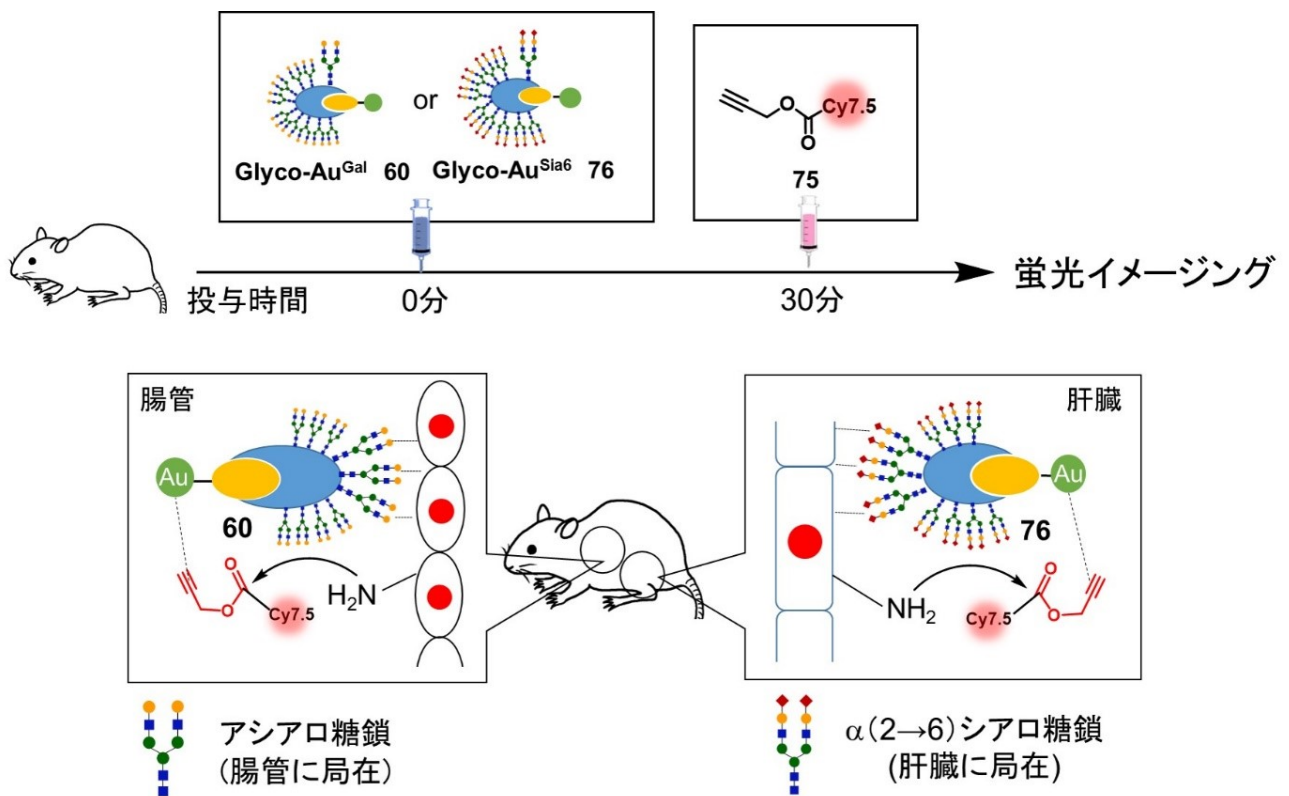
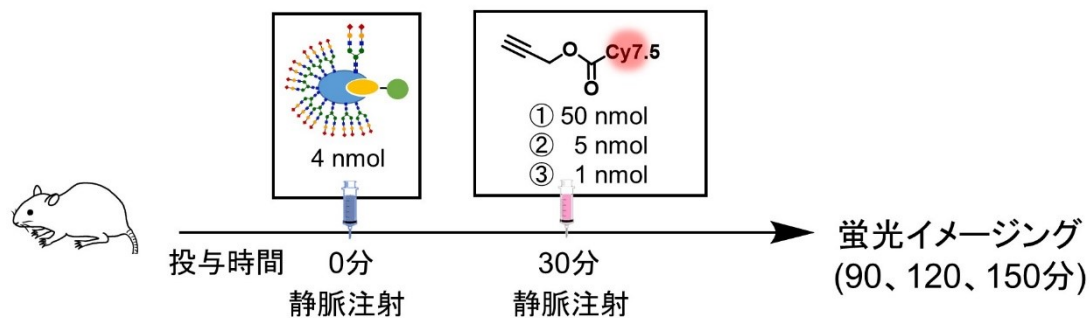


図 32 生体内の蛍光プローブによる蛍光標識化



BALB/c ノードマウスに対して、これまでに肝臓への移行が認められていた 4 nmol の **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76**<sup>[25a]</sup>を静脈注射し、糖鎖クラスターの移行が起こり始めることが確認されていた 30 分後<sup>[25a]</sup>に 1 nmol、5 nmol、50 nmol の **Cy7.5-Propargyl 75**を投与した (図 33a)。蛍光イメージングで、触媒投与後 90-150 分にかけての蛍光の経時変化を測定したところ、**Cy7.5-Propargyl** を 50 nmol 使用した条件 (図 33b-①) では、蛍光が非常に強く観測されてしまったため、装置の検出限界に達してしまうことが分かった。一方で、**Cy7.5-Propargyl** を 5 nmol を使用した場合 (図 33b-②) には蛍光が装置の測定範囲内で観測されたが、1 nmol の場合 (図 33b-③) には蛍光がほとんど観測されず、バックグラウンドとの差を見ることができなかった。この検討から、**Cy7.5-Propargyl 75** 5 nmol が利用した装置の検出に適していることが示された。

### a) 投与計画



### b) 蛍光イメージング

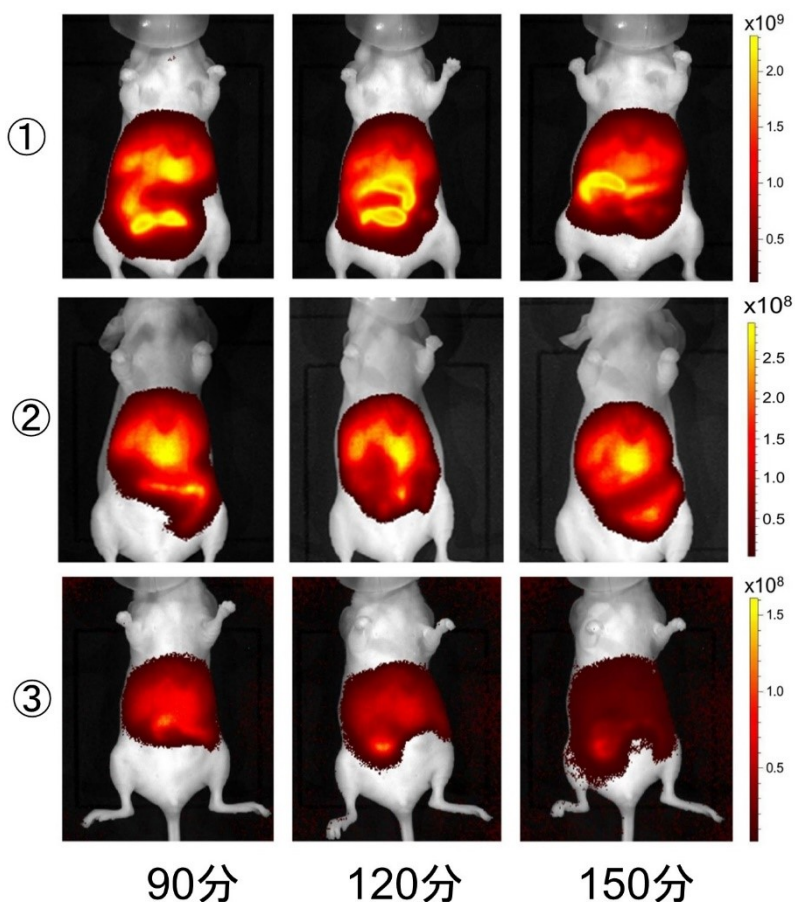


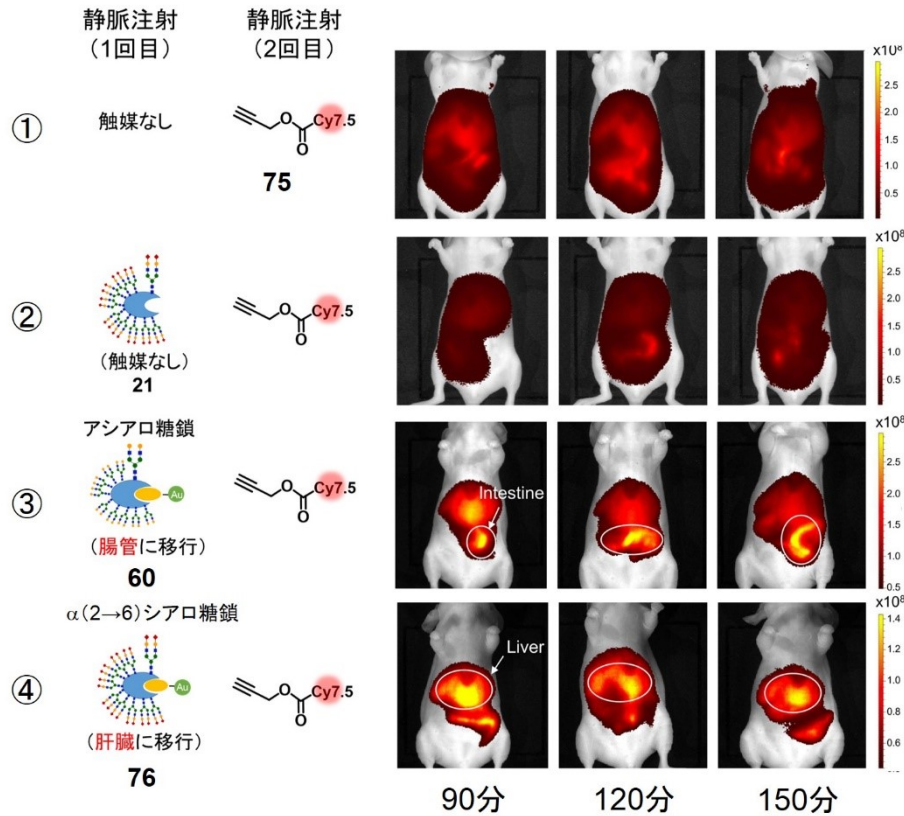
図 33 生体内反応に向けた Cy7.5-Propargyl 75 の濃度検討

BALB/c ノードマウスに対して **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** の生理食塩水溶液を 4 nmol/100  $\mu$ L 静脈注射し (最初の投与を 0 分として図に表記)、Cy7.5-Propargyl 75 の生理食塩水溶液をそれぞれ 1 nmol/100  $\mu$ L、5 nmol/100  $\mu$ L、50 nmol/100  $\mu$ L の濃度で投与 (30 分)、その後蛍光イメージングを行った (90、120、150 分) (ex/em=780 nm/830 nm)。; b-①: **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** (0 分)+50 nmol/100  $\mu$ L Cy7.5-Propargyl 75 (30 分)、b-②: **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** (0 分)+5 nmol/100  $\mu$ L Cy7.5-Propargyl 75 (30 分)、b-③: **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** (0 分)+1 nmol/100  $\mu$ L Cy7.5-Propargyl 75 (30 分)

この検討をもとに本反応をマウス体内で行った。腸管に移行する **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** と肝臓に移行する **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** をヌードマウスに対して、それぞれ 4 nmol 静脈注射し、30 分後に **Cy7.5-Propargyl 75** を 5 nmol 静脈注射して 30 分ごとに蛍光イメージングを行った (n=4)。その結果、図 34a-①に示したように触媒を静脈注射しなかったマウスについては、**Cy7.5-Propargyl 75** 由来の蛍光が 90-150 分にかけて体全体から観測された。また、図 34a-②のように金触媒を担持していない肝臓に移行する **α(2→6) シアロ糖鎖クラスター-21** を投与した場合でも、蛍光は体全体から観測されたことから、糖鎖クラスターが **Cy7.5-Propargyl 75** の DDS 担体として働き、肝臓に試薬を集積させるという可能性は否定できた。そこで、図 34a-③に示した腸管に移行する金触媒 **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** を静脈注射したマウスでは、腸管と考えられる位置で蛍光が観測された。一方、図 34a-④に示した肝臓に移行する金触媒 **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** を用いた場合では、蛍光が肝臓と考えられる位置に観察された。

また、マウスごとに **Region of interest (ROI)** を測定し、それぞれの臓器での蛍光の局在を定量した (図 34b)。肝臓の位置の蛍光量を[肝臓]、腸管の位置の蛍光量を[腸管]とし、蛍光存在比として[肝臓]/[腸管]を計算した。触媒を投与しなかったマウスの蛍光存在比を 1 とした場合、1 よりも大きい値の場合ではコントロール条件 (図 34b-①) と比較して肝臓の位置への蛍光の局在、1 よりも小さい値の場合では腸管の位置への蛍光の局在が確認できる。その結果、図 34b 右図に示したように腸管に移行する触媒を投与したマウスでは、0.46 という値が計算されたためコントロールと比較して 2 倍程度腸管の位置への蛍光の局在が確認された。一方で、肝臓に移行する **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** を利用したマウスは、2.25 という値が計算されたため、およそ 2 倍の肝臓の位置への蛍光の局在が確認された。

### a) 蛍光イメージング(経時変化)



### b) 蛍光の定量結果

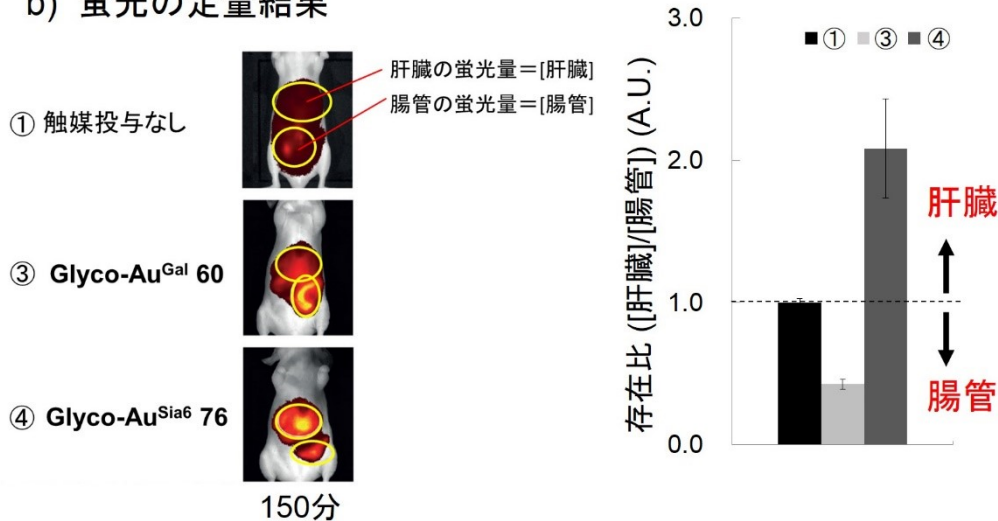
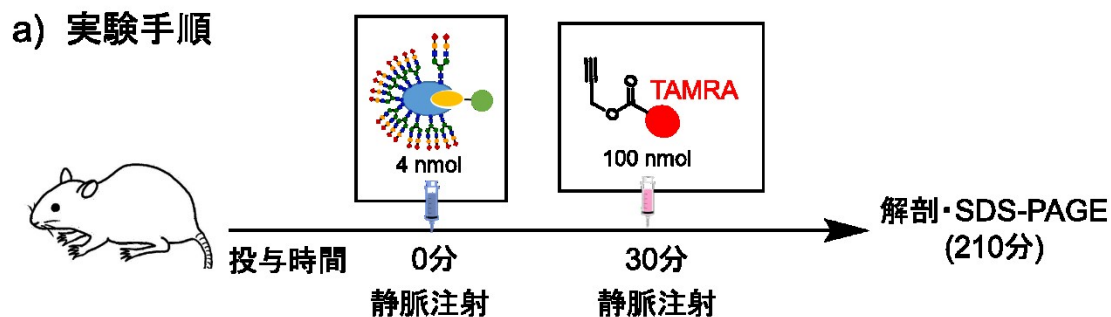


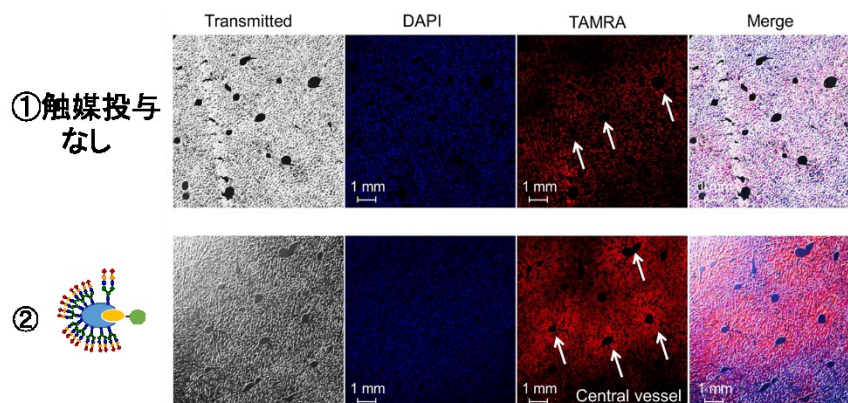
図 34 蛍光イメージングによる生体内でのアミド化反応の追跡

BALB/c ノードマウスに対して **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60**、**Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** の生理食塩水溶液を 4 nmol/100  $\mu$ L 静脈注射し (0 分)、**Cy7.5-Propargyl 75** の生理食塩水溶液を 5 nmol/100  $\mu$ L で静脈注射 (30 分)、その後蛍光イメージングを行った (90、120、150 分) (ex/em=780 nm/830 nm)。; a-①: 100  $\mu$ L 生理食塩水 (0 分)+**Cy7.5-Propargyl 75** (30 分)、a-②:  $\alpha$ (2→6) シアロ糖鎖クラスター-21 (0 分)+**Cy7.5-Propargyl 75** (30 分)、a-③: **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** (0 分)+**Cy7.5-Propargyl 75** (30 分)、a-④: **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** (0 分)+**Cy7.5-Propargyl 75** (30 分); b: 肝臓と腸管の蛍光量 ([肝臓]、[腸管]) を定量し、[存在比]=[肝臓]/[腸管]を計算した ([存在比]<1: 肝臓に蛍光が局在、[存在比]>1: 腸管に蛍光が局在、n=4、Mean $\pm$ SD)。

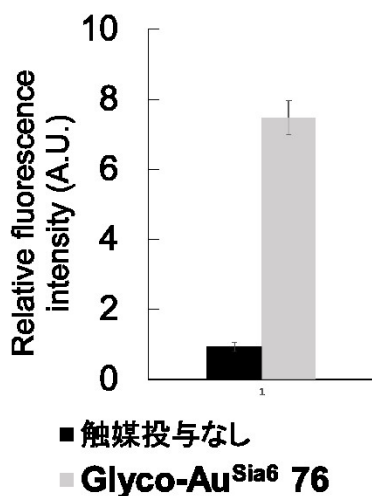
実験に使用したマウスは屠殺後に解剖し、蛍光標識化された肝臓の組織やタンパク質の詳細についての解析を行った (図 35)。この際には、蛍光顕微鏡で観察されるのに適した TAMRA を蛍光基として用い、細胞表層上のアミンと確実に反応を行うため過剰量の TAMRA-Propargyl 68 を投与することとした。Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 と TAMRA-Propargyl 68 を投与し、触媒投与から 210 分後に肝臓を取り出し組織を固定後に切片を作成して蛍光顕微鏡観察を行った (図 35a)。その結果、Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 を静脈注射しなかったマウスの肝臓では TAMRA の蛍光が全く観測されなかったが、Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 を静脈注射したマウスの肝臓では糖鎖クラスターが相互作用する ASGPR が発現しているという報告例がある中心静脈周辺<sup>[46]</sup>に蛍光が観測された (図 35b)。この蛍光の定量を行ったところ、Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 を投与したマウスは、対照実験マウスと比較して 8 倍程度蛍光が強く観測された。取り出した肝臓についてはライセートとして SDS-PAGE を行い、TAMRA の蛍光を観察した。その結果、触媒を投与していないマウスである Lane 1、2 では蛍光は全く観測されなかったのに対して、触媒を投与したマウスの Lane 3、4 ではスメア状に蛍光が観測された。以上の結果から、肝臓内で触媒反応が起こり様々なタンパク質に対して蛍光ラベル化反応が進行したことが明らかとなり、糖鎖クラスターを利用することで肝臓や腸管といった標的臓器で、開発した金触媒によるアミド化反応を実施できることを示せた<sup>[47]</sup>。



b) 蛍光顕微鏡観察



c) 蛍光定量



d) SDS-PAGE

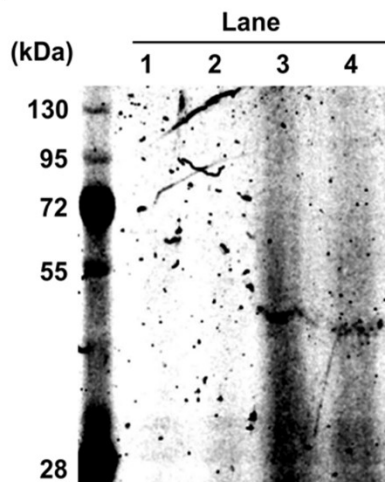


図 35 SDS-PAGE による蛍光分析

BALB/c ノードマウスに対して Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 の生理食塩水溶液を 4 nmol/100  $\mu$ L 静脈注射 (0 分)、続いて TAMRA-Propargyl 68 の生理食塩水溶液を 100 nmol/100  $\mu$ L で静脈注射 (30 分)、その後マウスを解剖した (210 分)。; b-① : 100  $\mu$ L 生理食塩水 (0 分)+TAMRA-Propargyl 68 (30 分)、b-② : Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 (0 分)+TAMRA-Propargyl 68 (30 分) ; c : 蛍光顕微鏡 (ex/em=555 nm/580 nm) の蛍光を示した画像から Image J を利用して定量した (n=3、Mean $\pm$ SD) ; d : 取り出した肝臓のライセートで SDS-PAGE を行い、波長 532 nm の光を照射した。マーカー : Protein Ladder One Triple-color、Lane 1、2 : Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 を投与しなかったマウスの肝臓、Lane 3、4 : Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76 を投与したマウスの肝臓

### 2.3. 結論

著者は所属研究室と共同研究先の理研 田中生体機能合成化学研究室で開発された糖鎖クラスターを利用し、生体内での標的臓器で局所的に金属触媒反応を行うことを目指した研究を行った。まず、水中で行うことができる金属触媒反応の開発を行い、 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  を触媒として、シアナミド **24** を活性化し、アミノ基をグアニジル化する反応と 3 価の金を触媒としてプロパルギルエステルを活性化し、アミンを反応させるアミド化反応を開発した。水中、 $40\text{ }^\circ\text{C}$  という生体条件でも反応が進行するアミド化反応については、リガンドの検討を行い、ジエチルアミノクマリンと金触媒を結合させた触媒 **59** を合成し、糖鎖クラスターと作用させることで **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** および **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** を合成した。

この触媒を用いて、本触媒反応を生体内の特定の臓器で実施することを計画した。まず腸管または肝臓に移行する **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** と **Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** と合成した **Cy7.5-Propargyl 75** を静脈注射した。その結果、触媒を静脈注射しなかったマウスでは、**Cy7.5-Propargyl 75** の蛍光が体全体から検出された。一方で、**Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60** を利用した際には、腸管の位置で蛍光が観測され、**Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** では肝臓の位置で蛍光が観測された。肝臓で触媒反応を検討したマウスについては肝臓切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察したところ、中心静脈周辺の細胞で蛍光基の蛍光が観測された。また、肝臓のライセートを SDS-PAGE にて分析したところ、触媒を静脈注射していないマウスの肝臓では蛍光が観測されなかったのに対して、触媒を静脈注射したマウスの肝臓では蛍光が観測された。以上の結果から、生体内の特定の臓器で触媒反応を実施する方法が開発できた。

生体内における本金属触媒反応を利用すれば、標的とする臓器・組織内で薬剤を合成する新しい疾患治療戦略につながることを期待できる。



### 第三章 生体内でのペプチドの複合化によるがんの転移抑制

#### 3.1. 序論

本章では、第二章で述べた生体内での金触媒によるアミド結合形成反応を利用した、がん転移抑制戦略について述べる。がんの転移はがん患者の生死に大きくかかわる部分であり、患者の死亡率のうち90%は転移が原因となっている<sup>[48]</sup>。がんの転移にはリンパ行性と血行性の二種類が存在し、どちらも共通したメカニズムで起こる<sup>[49]</sup>(図36)。まず、①原発巣と呼ばれるがん細胞の転移のもととなる腫瘍組織では、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が過剰に発現しており、細胞外マトリックス層(ECM層)を分解することで、血管またはリンパ管に小さな隙間を作り、管内へと侵入する。②管内では、様々な免疫細胞により攻撃を受けるが、駆逐できなかつたがん細胞については様々な臓器や組織に拡散し、侵入と同様の機構によって作られた隙間から血管の外側へと移行する。続いて、③フィブロネクチンやビトロネクチンなどの接着分子とがん細胞が相互作用することで、細胞接着が起こりがん細胞の浸潤増殖のための足場を形成する<sup>[50]</sup>。④形成された足場を中心にごん細胞は増殖し、新し

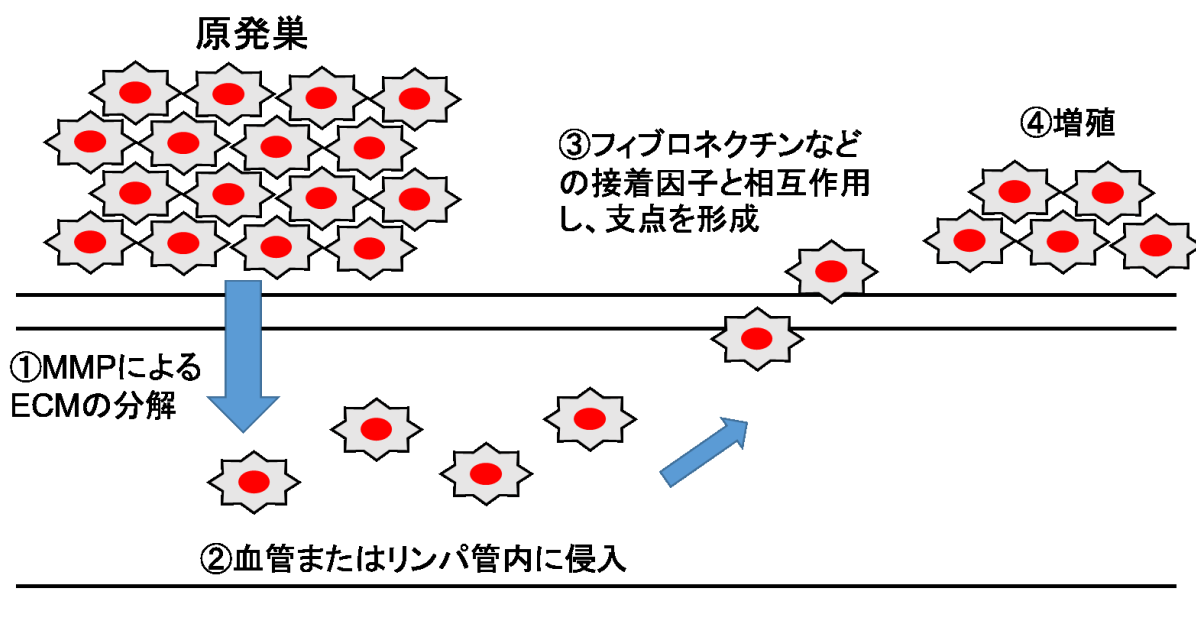


図 36 転移のメカニズム



いがん組織が出来上がることで転移が完了する。このようなメカニズムにおいて、がん細胞の転移には細胞接着が非常に重要な役割を果たしている<sup>[51]</sup>。この接着を阻害することができれば、続く細胞の増殖が抑えられる結果、がんの転移が阻害されると期待される。

この過程で重要となる細胞接着の機能はがん細胞上に過剰に発現している受容体インテグリンによって担われている。インテグリンは、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるヘテロ二量体で、これらの組み合わせにより様々なサブタイプのインテグリンが存在しており、がん細胞の種類によって発現しているインテグリンの種類は異なる。このインテグリンはフィブロネクチンやビトロネクチン、ラミニンなどに存在している Arg-Gly-Asp の配列 (RGD 配列) を認識し、強く相互作用することで細胞接着が起こっている (図 37)<sup>[52]</sup>。そのため、がん細胞の接着阻害活性を示す RGD 配列を有する化合物をもとに様々な抗がん活性化合物が医薬品の候補化合物として報告されてきた。特に構造が強固となる環状 RGD ペプチドは、多くのがん細胞に発現

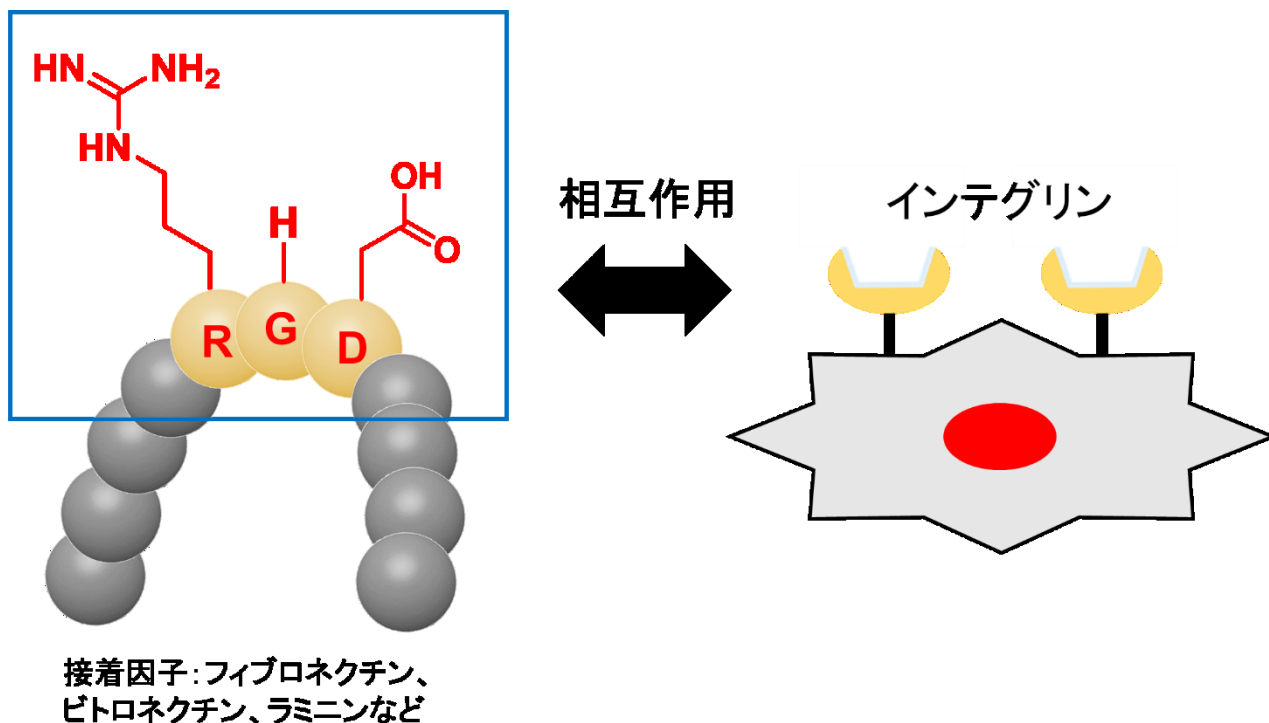


図 37 接着因子とインテグリンの相互作用

しているインテグリン $\alpha_v\beta_3$  に対する活性が高く、細胞接着阻害能も高いため、注目されている。その中でもアルギニン (R)、グリシン (G)、アスパラギン酸 (D)、D-フェニルアラニン (f)、バリン (V) の5残基からなる環状ペプチド cilengitide 77 は、インテグリンとの相互作用により血管新生阻害活性と転移抑制効果が認められており、実際に臨床の Phase III まで治験が行われていた (図 38)<sup>[53]</sup>。しかし、このような活性の発現には高い濃度が必要であり、複数回の投与を要することから臨床開発からドロップアウトしてしまった<sup>[54]</sup>。

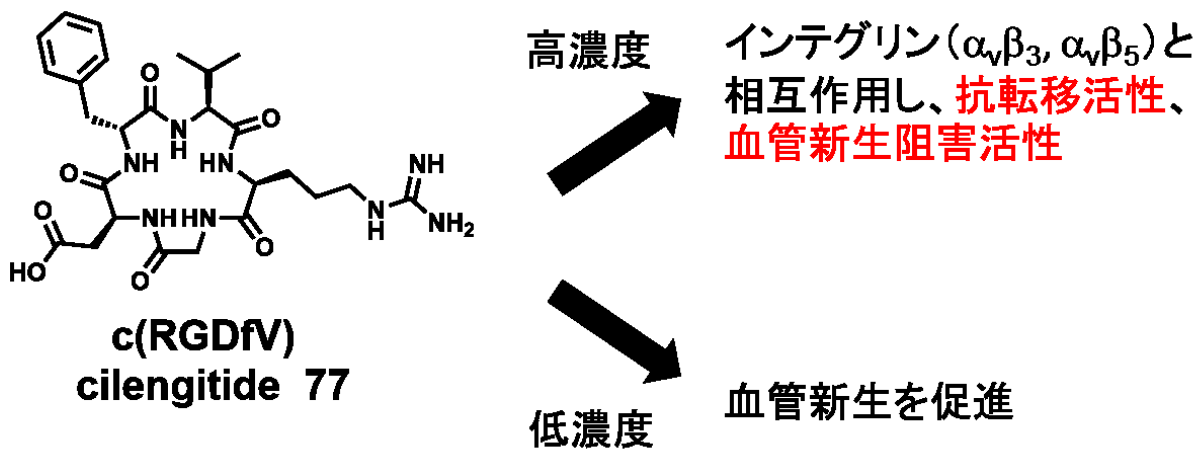


図 38 RGD 薬剤を利用したがんの治療法の開発

このように RGD 配列を有している薬剤は、血管新生阻害または転移阻害といった抗がん活性を有しているが、その活性には体内での濃度が非常に重要となる。そこで、図 39 に示すように、がん細胞への相互作用が確認されている<sup>[55]</sup> $\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖 78 が結合した $\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖クラスター79 に金触媒を担持したがん細胞を認識可能な金触媒 Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80 を利用して、がん近傍に存在する RGD ペプチドをアミド結合という形で確実に捕捉できる。そのため、RGD ペプチドが低濃度であったとしても、がん細胞表層上に RGD ペプチドが結合して、がん細胞上に RGD ペプチドが存在する環境を構築できるため、効率的にインテグリンと相互作用して、がん細胞の転移を抑制できると考えた (図 40)。

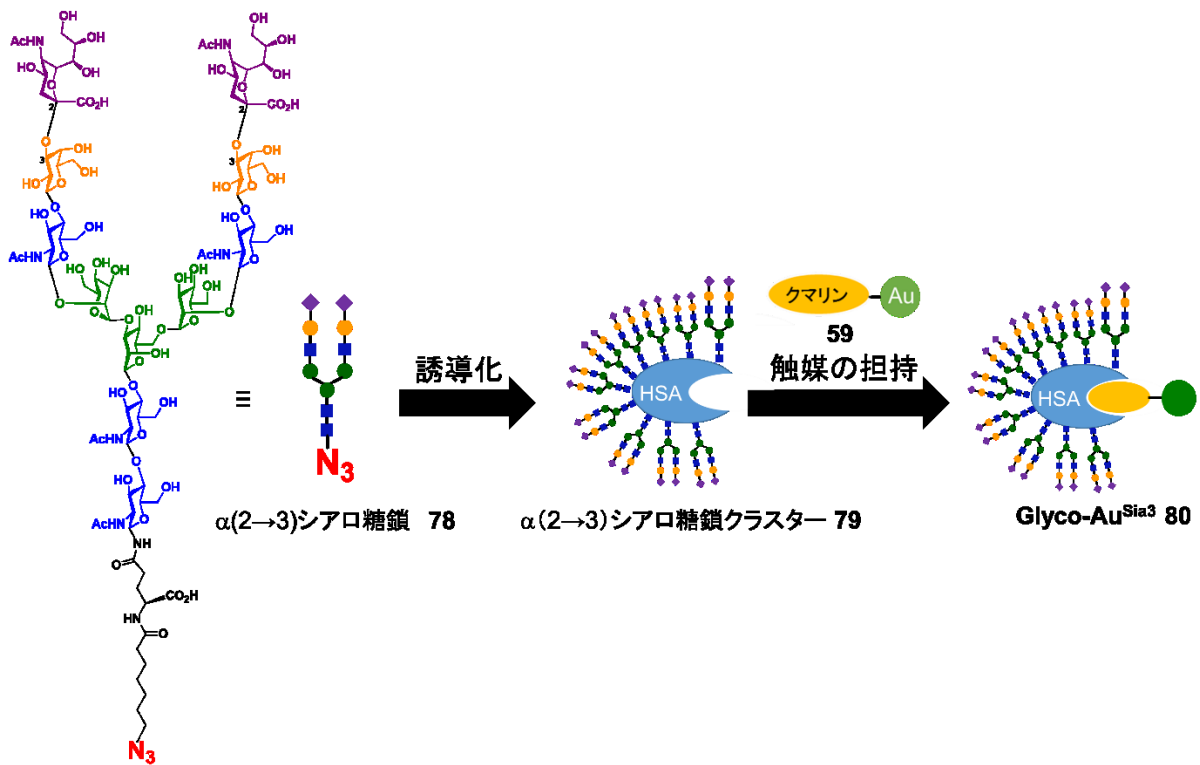
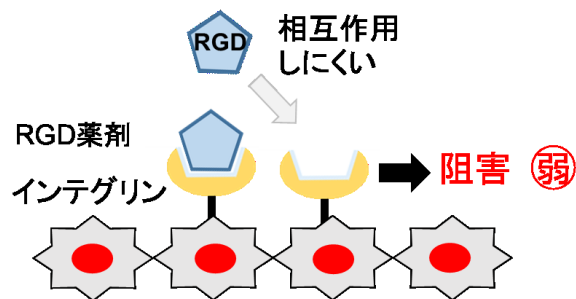


図 39  $\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖が結合した触媒 Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80

a) 通常の薬剤投与



b) アミド化による転移阻害

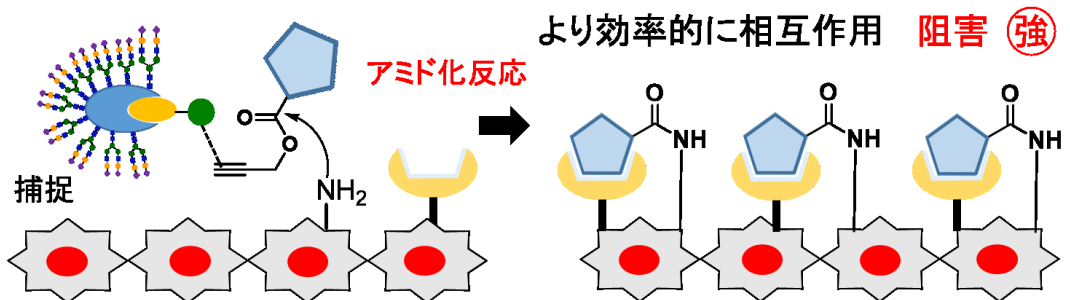


図 40 アミド結合形成反応を利用した転移阻害 研究戦略

本章において著者は、第二章で見出した金触媒アミド化反応を、生物活性分子を細胞表面上の膜タンパク質のリシン残基に結合させる「複合化」へと展開し、治療的なアプローチへと展開したので述べる。

## 3. 2. 結果

### 3. 2. 1. がん転移抑制ペプチドの誘導化

これまでにインテグリンと相互作用する環状 RGD ペプチドは種々報告されているが、プロパルギルエステルの導入が容易なリシン残基を含んでいることから、本研究では環状 RGDyK ペプチドを利用することとした (図 41)<sup>[56]</sup>。まずは RGD とプロパルギルエステルが結合した試薬の合成を行った。グリシントリチル樹脂 (H-Gly-Trt(2-Cl)-resin) **71** に対して、縮合剤 HCTU、HOBt(6-Cl)、Fmoc-Arg(Pbf)-OH **72** をそれぞれ 4 当量、さらに DIEA を 6 当量加え、振盪攪拌することでペプチドを伸長した。続いて Fmoc 基をピペリジンにより除

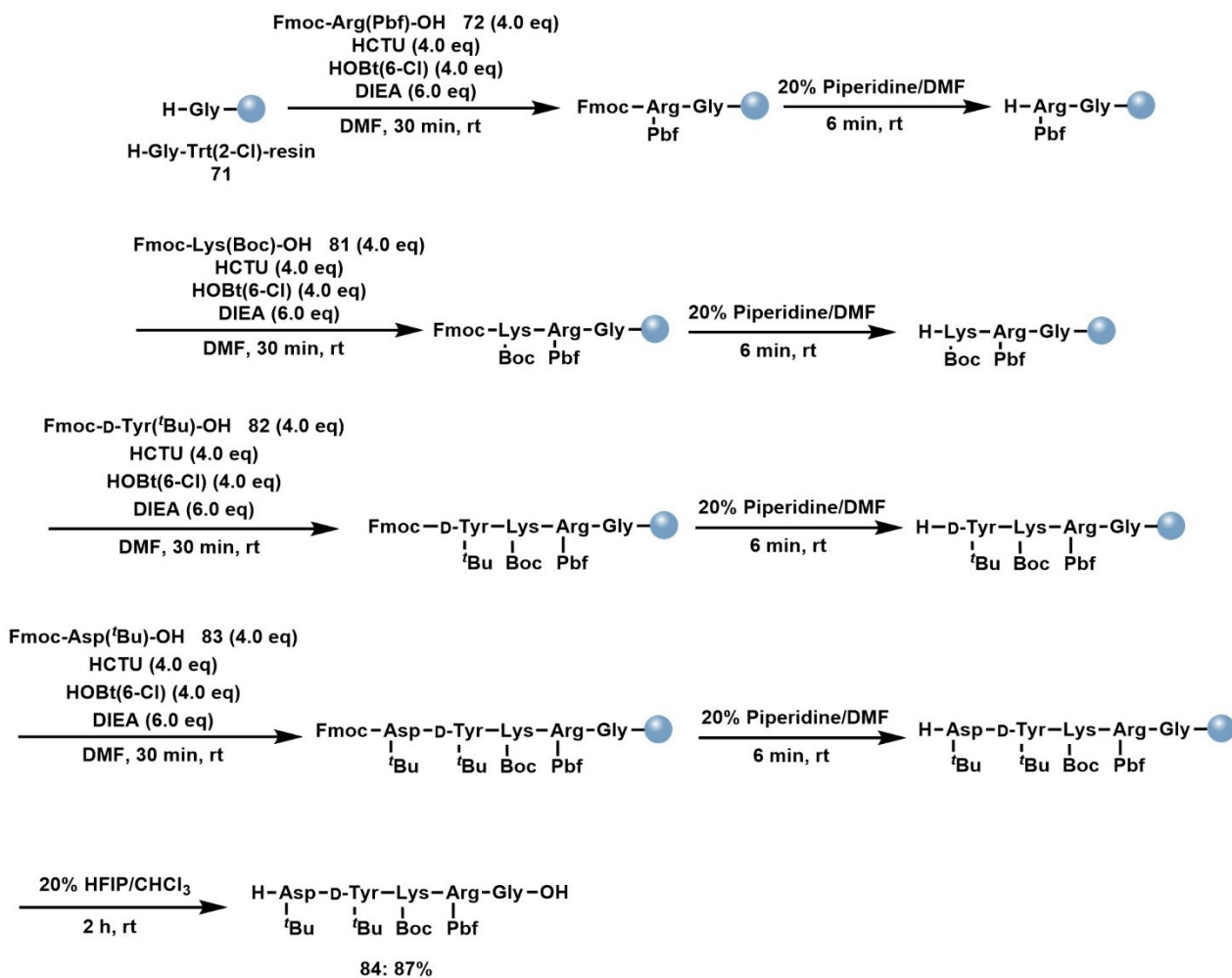


図 41 RGD ペプチドの固相合成

去した。その後、同様の条件で Fmoc-Lys(Boc)-OH **81** を伸長し、Fmoc 基を除去した。同様に縮合と脱保護を繰り返し、D-Tyr(*t*Bu) **82**、Asp(*t*Bu) **83** を伸長し、樹脂上に H-Asp(*t*Bu)-D-Tyr(*t*Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly を合成した。最後に樹脂上のペプチドを 20% HFIP/CHCl<sub>3</sub> 溶液で処理することで、ペプチドを樹脂から切り出し、総収率 87%で目的の直鎖ペプチド **84** を得た。

合成した直鎖ペプチド **84** の *N*末端と *C*末端をジクロロメタン中 (濃度 50 mM)、EDC により縮合し、環状 RGDyK ペプチド **85** を 97%の収率で合成した。続いて環状ペプチドに結合している保護基を TFA:H<sub>2</sub>O:トリエチルシラン (TES)=90:5:5 で処理し環状ペプチドの脱保護を行い、77%の収率で環状 RGDyK ペプチド **86** を得た (図 42)。

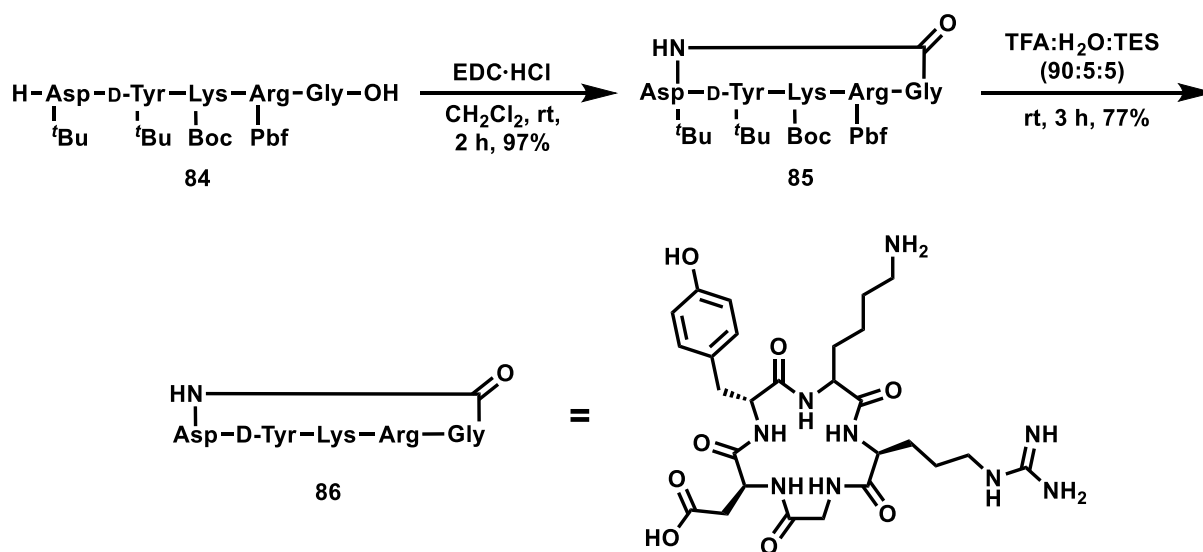


図 42 c(RGDyK) **86** の合成

さらに、環状 RGDyK ペプチドプロパルギルエステル (c(RGDyK)-Propargyl) への誘導化を行った (図 43)。アジピン酸 **87** を出発原料として文献に従い<sup>[57]</sup>、両末端のカルボン酸をスクシンイミジルエステル化した Bis-NHS エステル化合物 **88** を 75%の収率で得た。続いて、この化合物に合成した環状 RGDyK ペプチド **86** を DMF 中、DIEA 存在下で作用させたところ、リシン残基の側鎖アミンにスクシンイミジルエステルが導入された化合物 **89** を収率 45%で得た。最後にグリシンプロパルギルエステル **66** を作用させることにより、c(RGDyK)-Propargyl **90** を 75%の収率で得た。

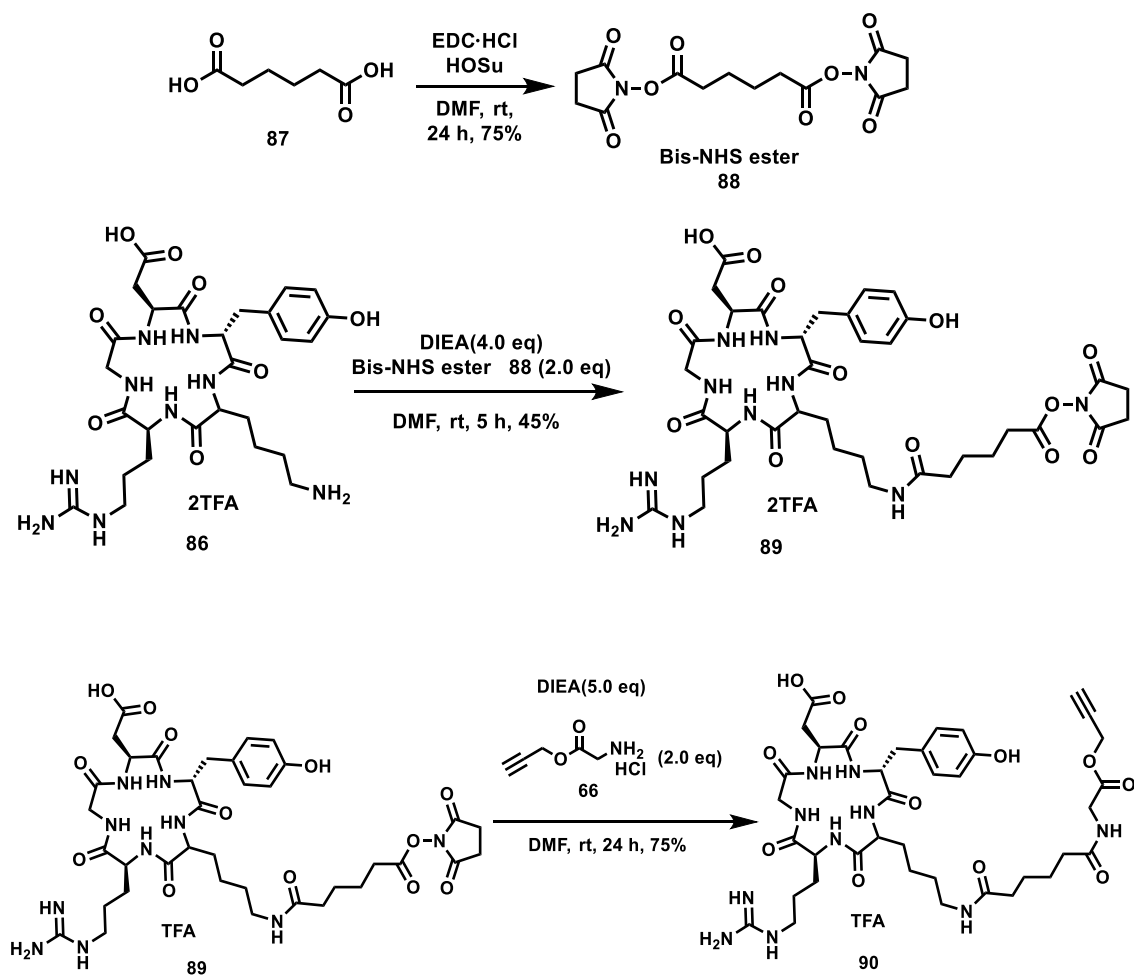


図 43 c(RGDyK)-Propargyl **90** の合成

### 3.2.2. 糖鎖クラスターによるがん細胞への相互作用の検証

既に糖鎖クラスターのがん細胞種の特異性についてはこれまでも検討がなされていたが<sup>[55]</sup>、ここでは糖鎖クラスターのがん細胞への相互作用について再度検討した。がん細胞には、 $\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖と相互作用可能な RNase A、Galectin-1、Galectin-8、L-selectin といったレクチンが過剰に発現していることが報告されている<sup>[55, 58]</sup>。そこで、がん細胞である A549 細胞、HeLa S3 細胞に対して、蛍光基 TAMRA が結合した **$\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖クラスター-79** 20 pmol を 24 時間作用させ、がん細胞への相互作用を蛍光イメージングにより評価した。その結果、HeLa S3 細胞と A549 細胞のどちらの細胞種でも蛍光が観測された。したがって、この **$\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖クラスター-79** は、A549 細胞と HeLa S3 細胞と相互作用することを確認できた。

後述する実験では、蛍光タンパク質 Venus やルシフェラーゼを発現させた細胞を用いることを計画していた。そこで、 **$\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖クラスター-79** と相互作用し、これらのタンパク質を発現させやすく、さらに細胞生着を阻害することで増殖を抑制することができる HeLa229 細胞（以下 HeLa 細胞と示す）を本実験系に用いた。



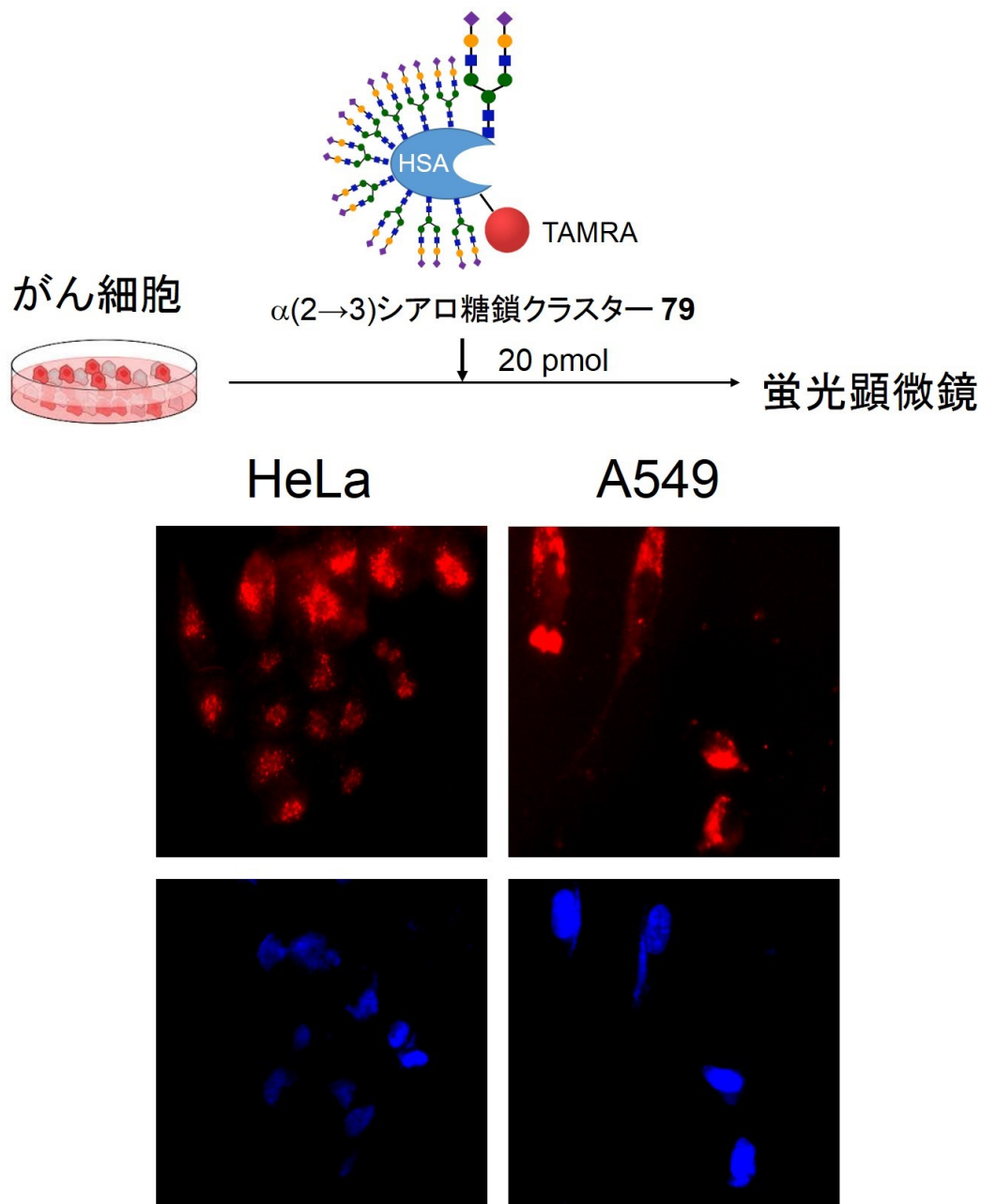


図 44 糖鎖クラスターの相互作用

HeLa S3 細胞と A549 細胞に対して、α(2→3)シアロ糖鎖クラスター79 を終濃度 200 nM となるように添加し、24 時間、37 °C の条件でインキュベーションした後に Hoechst33342 で染色し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後に蛍光顕微鏡で観察した (ex/em=530 nm/580 nm)。

### 3.2.3. フローサイトメトリーによる糖鎖クラスターの相互作用の検証とその選択性

まず、 $\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖クラスター79 に金触媒を担持した **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** の HeLa 細胞への相互作用を田中、浦野、田原らと共同で確認した (図 45-47)。**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を HeLa 細胞に対して添加し、金触媒に結合したジエチルアミノクマリンの蛍光 (470 nm) をもとに **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と相互作用する HeLa 細胞数を蛍光活性化細胞ソーティング (フローサイトメトリー) でカウントした。その結果、コントロールとして HeLa 細胞のみをフローサイトメトリーで分析した場合は (図 45 左図)、ジエチルアミノクマリン由来の 470 nm の波長を有する蛍光は観測されなかったのに対し、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を HeLa 細胞に添加した場合で

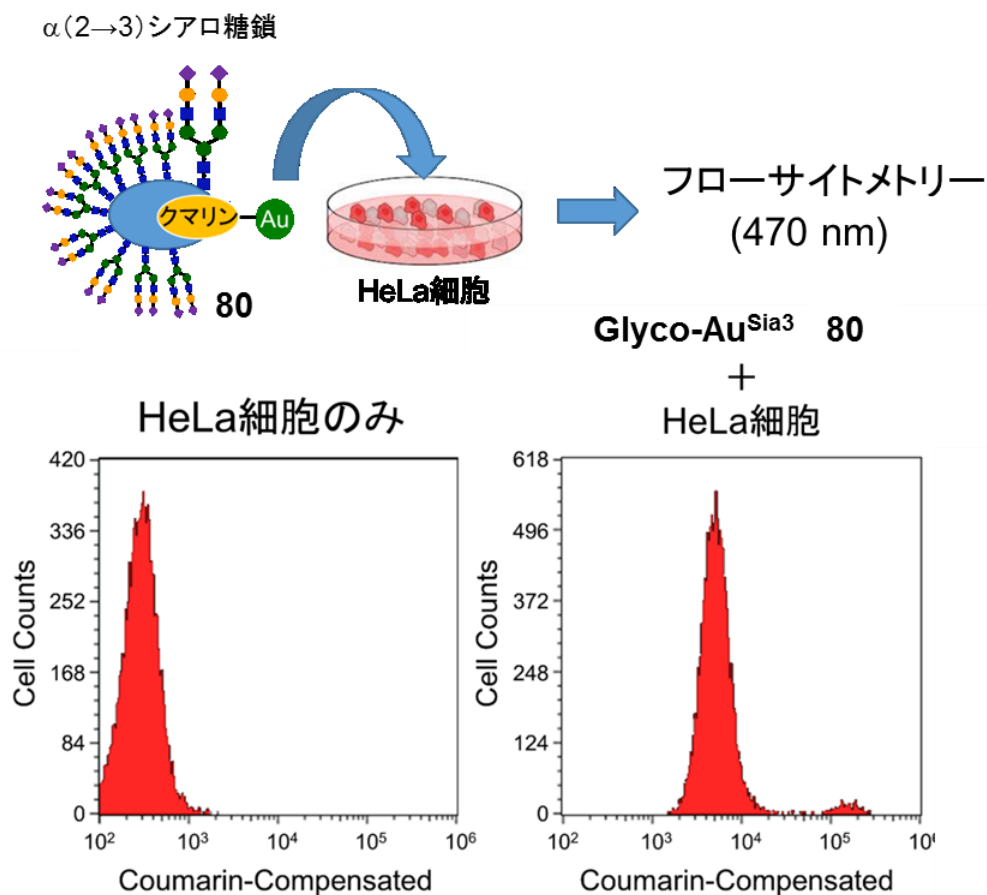


図 45 **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** の HeLa 細胞との相互作用  
触媒 80 (1 nmol) を HeLa 細胞 ( $1 \times 10^4$  cell) に 15 分間相互作用させ、フローサイトメトリーによりジエチルアミノクマリンの蛍光 (ex/em=405/470 nm) を分析した。左図 : HeLa 細胞のみ、右図 : **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を加えた HeLa 細胞

は (図 45 右図)、ジエチルアミノクマリンに由来する波長 470 nm の蛍光ポジティブな細胞群が観測された。この結果から **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** が HeLa 細胞と相互作用するということが確認された。

一方、マウスの腹腔内に存在しているすべてのマクロファージを取り出して **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を作用させたのちに、フローサイトメトリーを用いて同様の分析を行った (図 46)。その結果、ジエチルアミノクマリンの蛍光ポジティブの細胞はほとんど観測されなかった (図 46 右図)。この結果から、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** がマクロファージ存在下でも選択的に HeLa 細胞と相互作用することが示唆された。

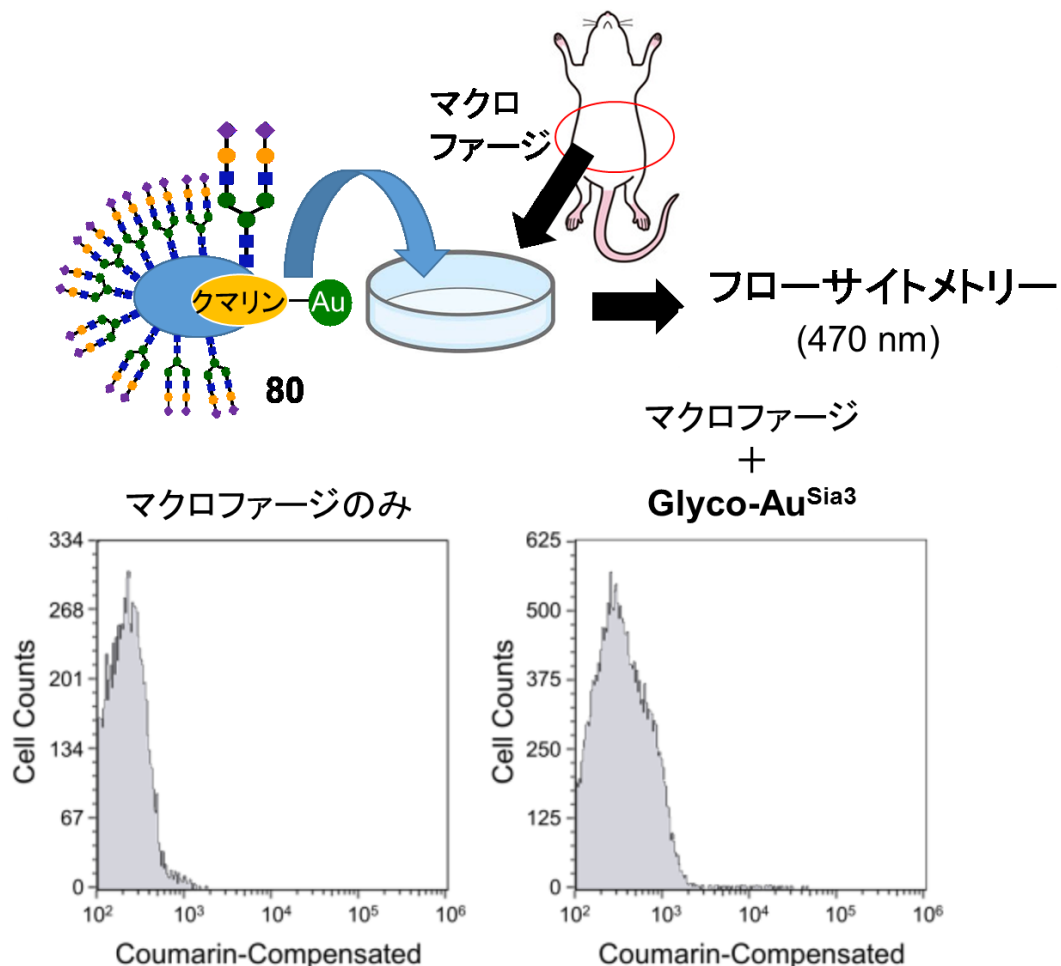


図 46 **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** とマクロファージの相互作用

触媒 80 (1 nmol) をマウス腹腔内に存在しているマクロファージに対して、15 分間相互作用させ、フローサイトメトリーによりジエチルアミノクマリンの蛍光 (ex/em=405/470 nm) を分析した。左図：マクロファージのみ、右図：**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を加えたマクロファージ

そこで、HeLa 細胞とマクロファージを共存させ、ここに投与した **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** が HeLa 細胞と選択的に相互作用するかを検証した。HeLa 細胞に黄色蛍光タンパク質である Venus を発現させ<sup>[59]</sup>、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を添加したものをフローサイトメトリーで解析した (図 47)。横軸に Venus の発光、縦軸にジエチルアミノクマリンの蛍光をプロットし、蛍光分析を行ったところ、コントロール (図 47 上左右図、下左図) と比較して、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を添加した条件 (図 47 下右図) では、HeLa 細胞のみジエチルアミノクマリン由来の蛍光が増大していることが確認された。以上の結果から、マクロファージが共存している環境でも、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** が HeLa 細胞と選択的に相互作用できることが確認されたため、この **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と HeLa 細胞を同時に腹腔内投与した場合には、系中に存在しているマクロファージと競合することなく、HeLa 細胞と選択的に相互作用する可能性が示された。

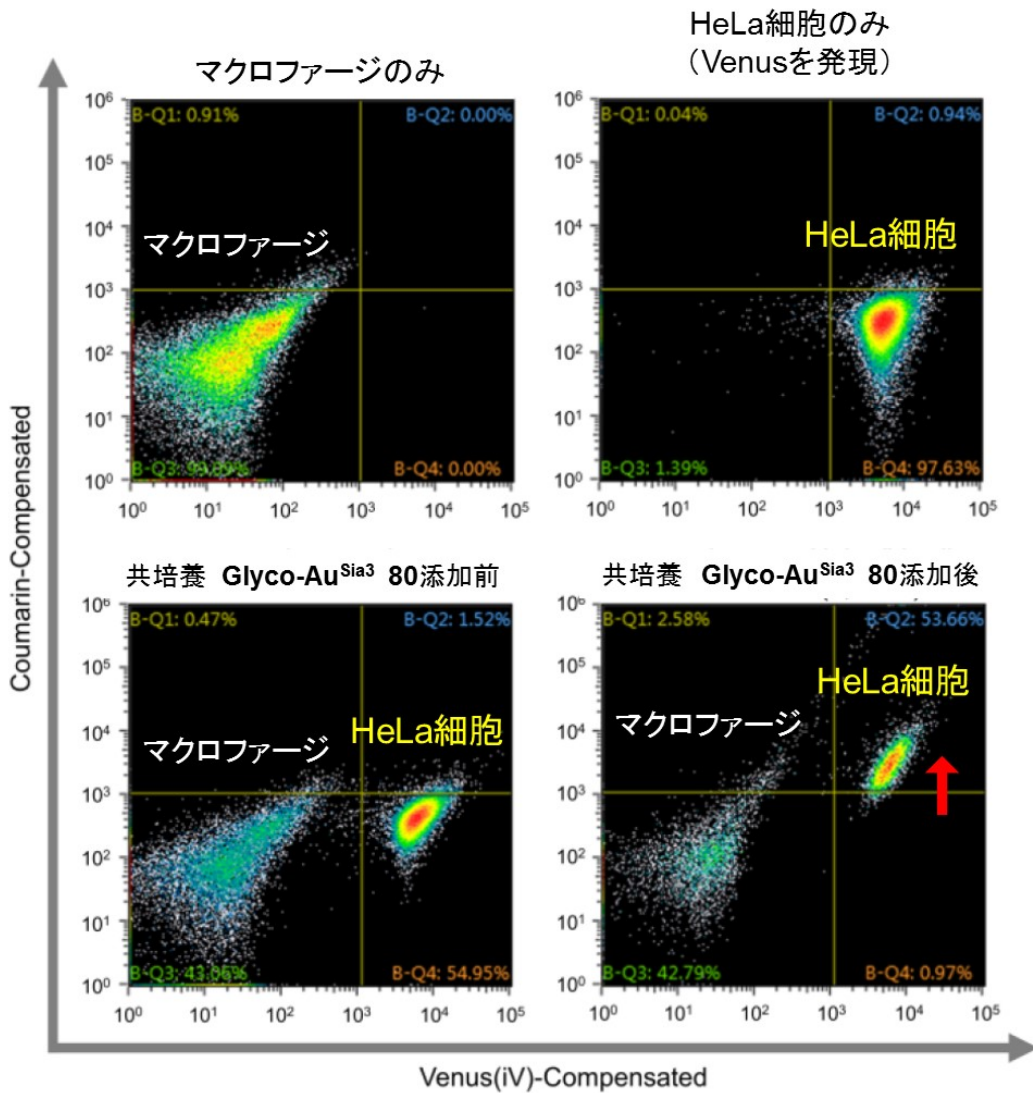


図 47 共培養条件下での相互作用の確認

触媒 80 (1 nmol) をマウス腹腔内に存在しているマクロファージと Venus (ex/em=515/528 nm) を発現させた HeLa 細胞の共培養系に対して、15 分間相互作用させ、フローサイトメトリーによりジエチルアミノクマリンの蛍光 (ex/em=405/470 nm) を分析した。

縦軸：ジエチルアミノクマリン由来の蛍光 (470 nm)、横軸：Venus の化学発光 (528 nm)

左上図：マウス腹腔内のマクロファージ、右上図：Venus が発現した HeLa 細胞、左右下図：マクロファージと HeLa 細胞の共培養系 (左図：触媒 80 なし、右図：触媒 80 添加)

### 3.2.4. 転移抑制ペプチドの複合化による治療戦略

#### 3.2.4.1. 細胞毒性の検討

以上の検討結果をもとに、本方法を田原、浦野、田中と共同で *in vivo* へ展開することとし、まずは各種試薬の毒性についての検討を行った (図 50)。ルシフェラーゼが発現した HeLa 細胞に対して、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** (1 nmol) と c(RGDyK)-Propargyl **90** (5 nmol) を添加し、経時的に細胞の生存を確認した。その結果、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と c(RGDyK)-Propargyl **90** を添加した HeLa 細胞の生存率は、どちらも投与しなかった HeLa 細胞 (コントロール) と比較して低下が認められなかったことから、この条件で有意な細胞毒性は確認されなかった。

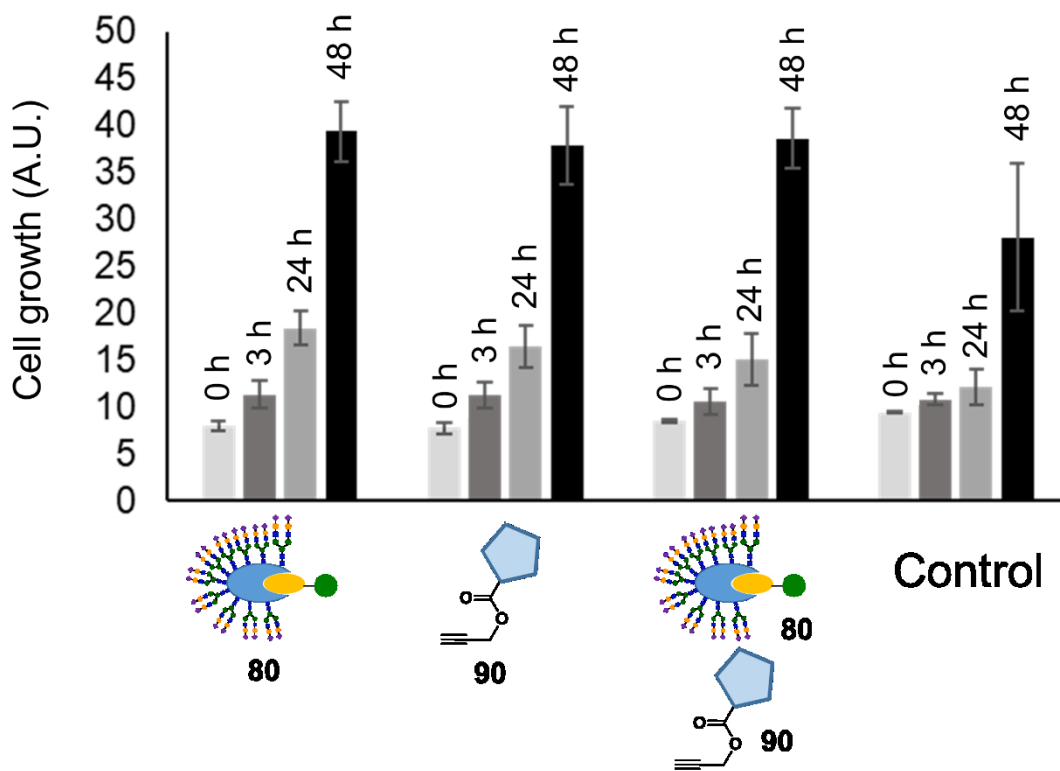
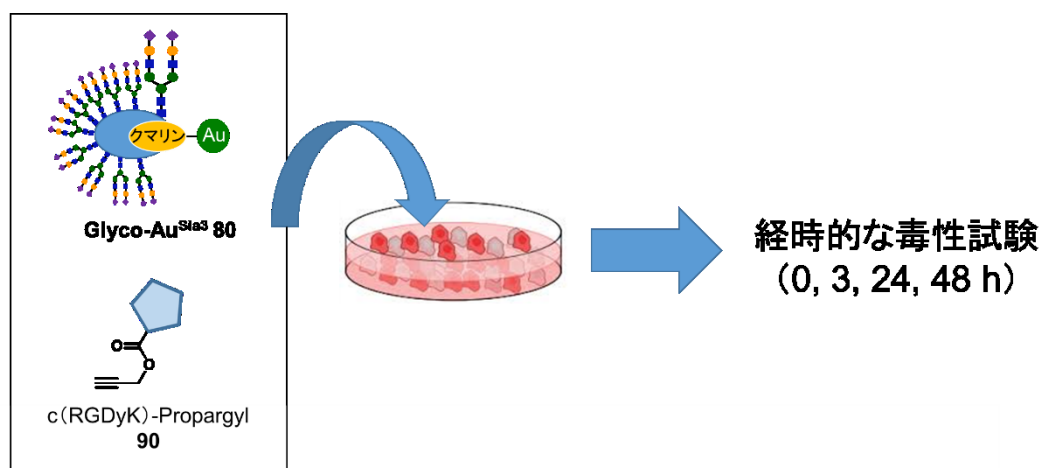


図 48 各種試薬の毒性試験 (n=3、Mean±SD)

Glyco-Au<sup>Sia</sup><sub>3</sub> 80 (1 nmol) と c(RGDyK)-Propargyl (5 nmol) 90 を HeLa 細胞に投与して CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay を行った。

### 3.2.4.2. がん転移モデルマウスの作成

続いて、田原、浦野、田中と共同でマウスがん転移モデルを作成した（図 49）。マウスに対して、ルシフェラーゼを発現させた HeLa 細胞 ( $1 \times 10^6$  cell) を腹腔内投与し、3 週間後にルシフェリンを腹腔内投与して HeLa 細胞の化学発光をイメージングにより追跡することで、転移を評価した（図 49a）。その結果、転移が体全体から確認され、特に横隔膜、腸管、リンパ節を中心に認められた。また解剖を行い、取り出した内臓の蛍光イメージングを行ったところ、胃や小腸では HeLa 細胞の生着は認められなかったが、腸管膜や大腸において HeLa 細胞が増殖していることが確認された。以上の結果から、ルシフェラーゼを発現させた HeLa 細胞の腹腔内投与は、がんの転移モデル作成として有効であることが確認できた。

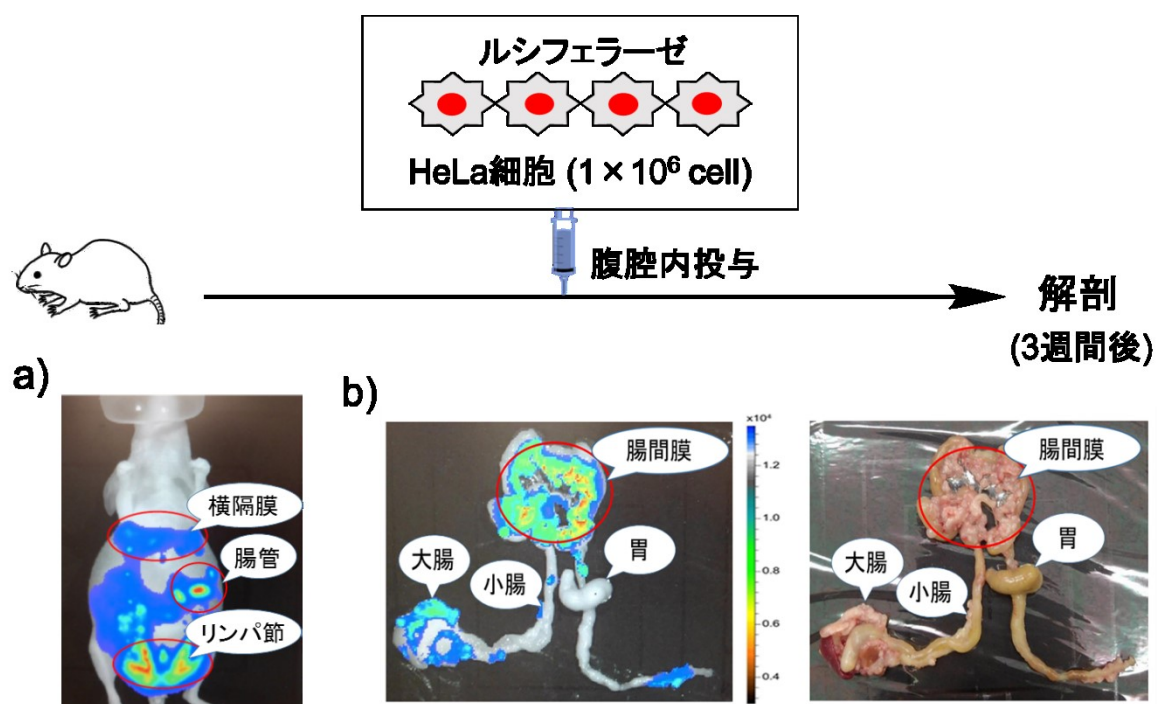


図 49 転移モデルマウス作成実験

ルシフェラーゼが発現した HeLa 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cell) を腹腔内投与して、3 週間マウスを飼育した。解剖直前の 5 分前にルシフェリン K 生理食塩水溶液  $15.7 \mu\text{mol}/200 \mu\text{L}$  を腹腔内投与して蛍光イメージングにより解析した。



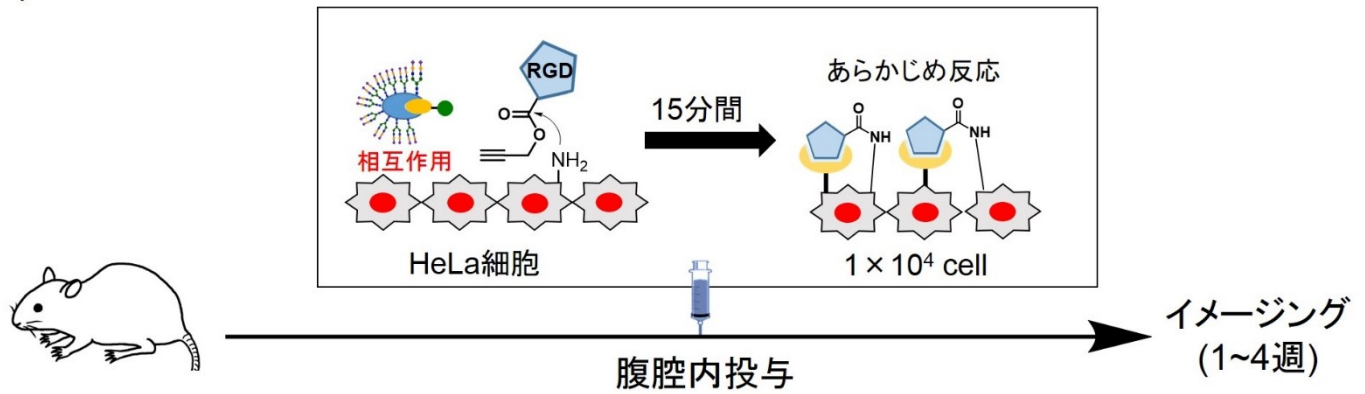
### 3. 2. 4. 3. c(RGDyK) ペプチドを複合化した HeLa 細胞の抗転移作用の評価

ここではまず、HeLa 細胞表層上に c(RGDyK)ペプチドを複合化することで転移が抑制されるか検討した (図 50a)。すなわち、ルシフェラーゼを発現させた HeLa 細胞 ( $1 \times 10^4$  cell) に対して、細胞毒性が認められない量の **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** (1 nmol) と c(RGDyK)-Propargyl **90** (5 nmol) を 15 分間、37 °C の条件で作用させることにより、あらかじめ細胞表層上に c(RGDyK)ペプチドの複合化を試みた。続いて、この HeLa 細胞をマウスに腹腔内投与し、0 ~4 週時にルシフェリン K を投与して化学発光イメージングを行った (図 50b)。その結果、コントロールの条件である①生理食塩水のみ、②c(RGDyK)-Propargyl **90** のみ、③**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** のみをあらかじめ作用させた HeLa 細胞では、1~4 週にかけてがん転移による発光が全身で認められた。このことから、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** または c(RGDyK)-Propargyl **90** そのものには、転移抑制効果がないことが確認された。一方で、④両者を投与したマウスでは発光強度の低下がされたことから、転移阻害活性を確認することができた。

また、HeLa 細胞由来のルシフェラーゼによって引き起こされる化学発光 (610 nm) の定量を行ったところ (図 50c)、コントロールの条件である①生理食塩水のみ、②c(RGDyK)-Propargyl **90** のみ、③**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** のみ作用させた HeLa 細胞を投与したマウスでは、1~4 週にかけて化学発光が増大しているということが観測されたため、転移の進行が認められた。一方、④**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と c(RGDyK)-Propargyl **90** の両方を作用させた HeLa 細胞は、2~4 週目 (図 50c : 緑、赤、灰色) において発光強度が有意に低下したことから、HeLa 細胞の転移抑制が認められた。同時に生存率について測定した結果 (n=8)、コントロール 3 種類のマウスでは 30~40 日程度で 20%程度に低下してしまうのに対して (図 50d : 灰、橙、青)、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と c(RGDyK)-Propargyl **90** を作用させた HeLa 細胞では、50 日以降でも 50%程度のマウスの生存が確認できた (図 50d : 黄)。以上の結果から転移抑制ペプチド

c(RGDyK)の HeLa 細胞への複合化により、がん転移が抑制されるといった治療効果を期待できる結果が得られた。

### a) プロトコール



### b) 蛍光イメージング

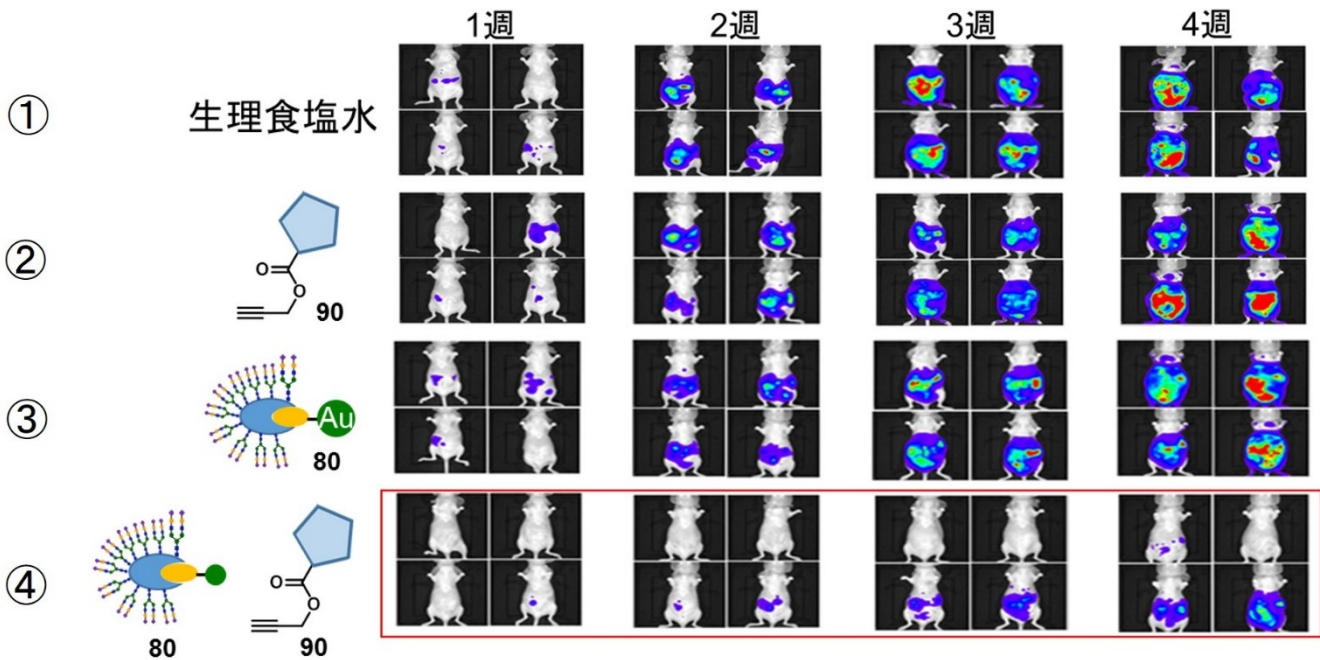
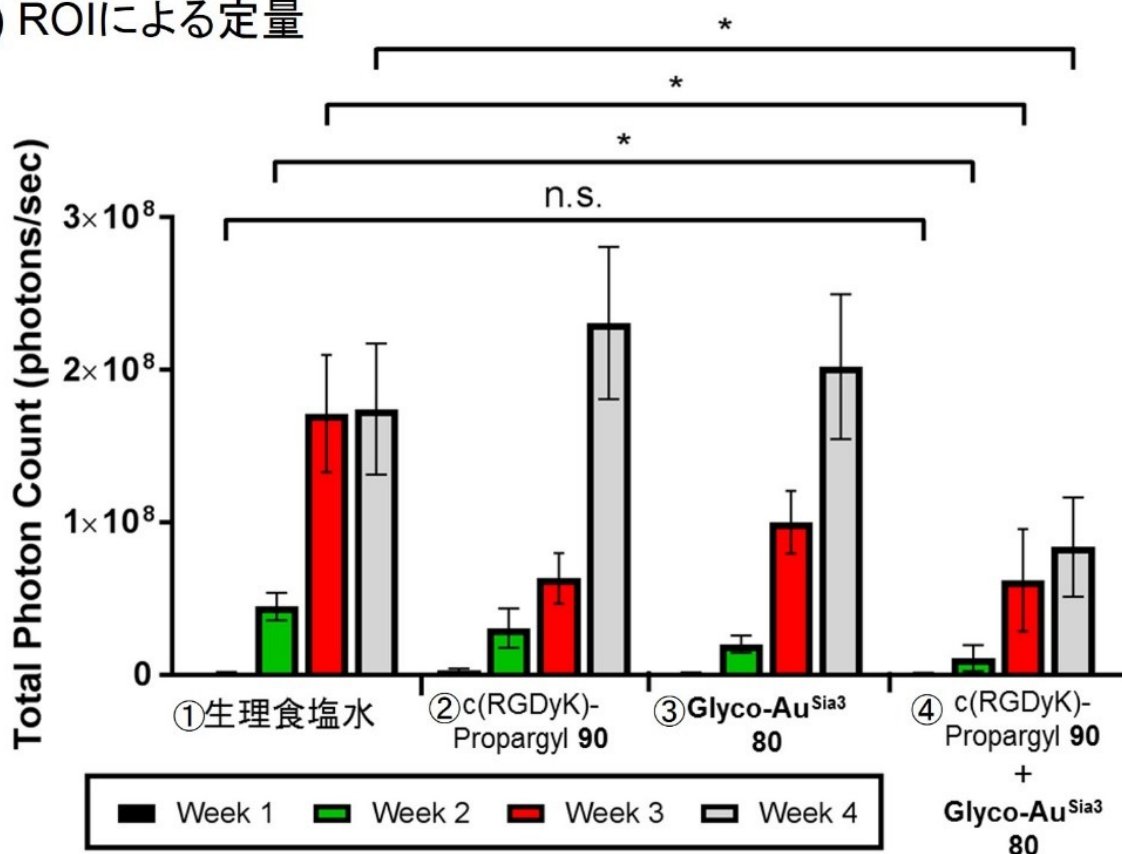


図 50 c(RGDyK)ペプチドを複合化した HeLa 細胞の転移挙動 (その 1)

ルシフェラーゼが発現した HeLa 細胞/HBSS 培地 ( $1 \times 10^4$  cell/ $100 \mu\text{L}$ ) に対して、Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80 (1 nmol) と c(RGDyK)-Propargyl 90 (5 nmol) を加え 15 分間、37 °C の条件でインキュベーションした。その後、細胞を反応溶液と共に BALB/c ヌードマウスに対して腹腔内投与した。; b) HeLa 細胞に対して、b-① : 生理食塩水のみ、b-② : c(RGDyK)-Propargyl 90 のみ、b-③ : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80 のみ、b-④ : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80+c(RGDyK)-Propargyl 90 を加えてインキュベーションを行った。また、イメージングを行う 5 分前にルシフェリン K 生理食塩水溶液  $15.7 \mu\text{mol}/200 \mu\text{L}$  の濃度で投与した。

### c) ROIによる定量



### d) マウス生存率

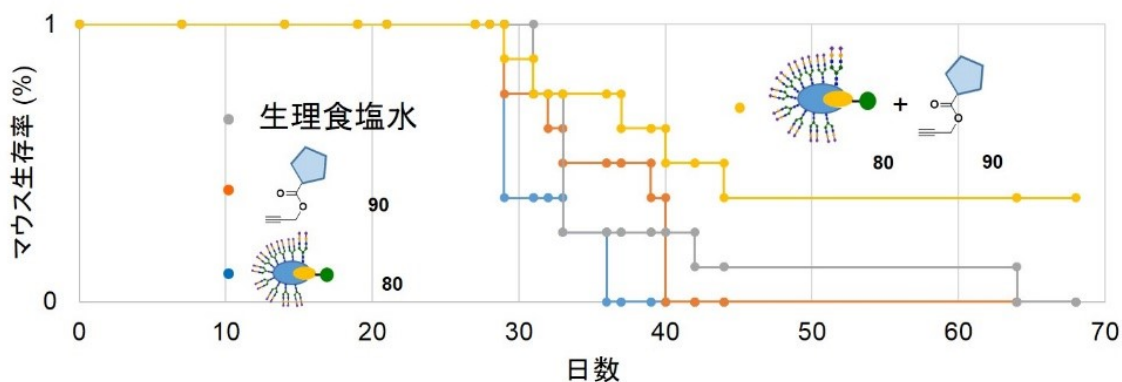


図 50 c(RGDyK)ペプチドを複合化した HeLa 細胞の転移挙動 (その 2)

c-黒 : 1 週目、c-緑 : 2 週目、c-赤 : 3 週目、c-灰 : 4 週目における化学発光強度の定量結果 (n=8、Mean±SD)。\*は  $0.01 < p \leq 0.05$  であり、Fisher's exact test により算出した。; d-灰 : 生理食塩水、d-橙 : c(RGDyK)-Propargyl 90、d-青 : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80、d-黄 : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80+c(RGDyK)-Propargyl 90

### 3.2.3.4. 生体内反応による抗転移作用の評価

最後に **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と **c(RGDyK)-Propargyl 90** をマウスに投与して生体内で **c(RGDyK)**ペプチドを HeLa 細胞上に複合化させ、それによってがんの転移が抑制されるかを検討した (図 51a)。すなわち、先ほど同様のルシフェラーゼを発現させた HeLa 細胞 ( $1 \times 10^4$  cell) をマウスに対して腹腔内投与し、その 15 分後に **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** (3 nmol) を腹腔内投与して、生体内で浮遊している HeLa 細胞上に **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を担持した。続いて HeLa 細胞投与から 35 分後に **c(RGDyK)-Propargyl 90** (15 nmol) を腹腔内投与することで、生体内で **c(RGDyK)**ペプチドを細胞表層上に複合化した。その後、0~4 週の各個で、HeLa 細胞由来のルシフェラーゼによる化学発光イメージングを行った (図 51b)。その結果、コントロール条件 (①生理食塩水のみ、②**c(RGDyK)-Propargyl 90**のみ、③**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80**のみ) では、2 週目から転移が観測されはじめ 4 週目ではマウスの死亡または体全体への転移が観測され、各試薬 **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と **c(RGDyK)-Propargyl 90** にがんの転移抑制効果が存在しないことが確認された。一方で、④両者を投与したマウスについては、いくつかのマウスにおいて、4 週目でも転移が体全体から観測されていなかったため、本戦略における転移の抑制効果を示すことができた。先ほどと同様に、HeLa 細胞由来の化学発光の定量を行ったところ①生理食塩水、②**c(RGDyK)-Propargyl 90**、③**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** のみを投与したマウスは、1~3 週目にかけて発光強度が増加したため、転移が進行したという結果が得られた。一方で、④**c(RGDyK)-Propargyl 90** と **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** どちらも投与したマウスでは、3 週目において発光強度が有意に低下した (図 51c : 赤)。また、生存率についても測定を行った (n=7) ところ、対照実験マウスでは生存率が 30~40 日と 0~30%と低く (図 51d : 灰、橙、青)、また両者を投与したマウスでは生存率が 60%程度と高いことが確認できた (図 51d : 黄)。以上のように生体内での金属触媒アミド化反応を利用した細胞表層上への **c(RGDyK)**ペプチドの複合化

法を用いることで、がんの転移抑制効果が認められた。

### a) プロトコール



### b) 蛍光イメージング

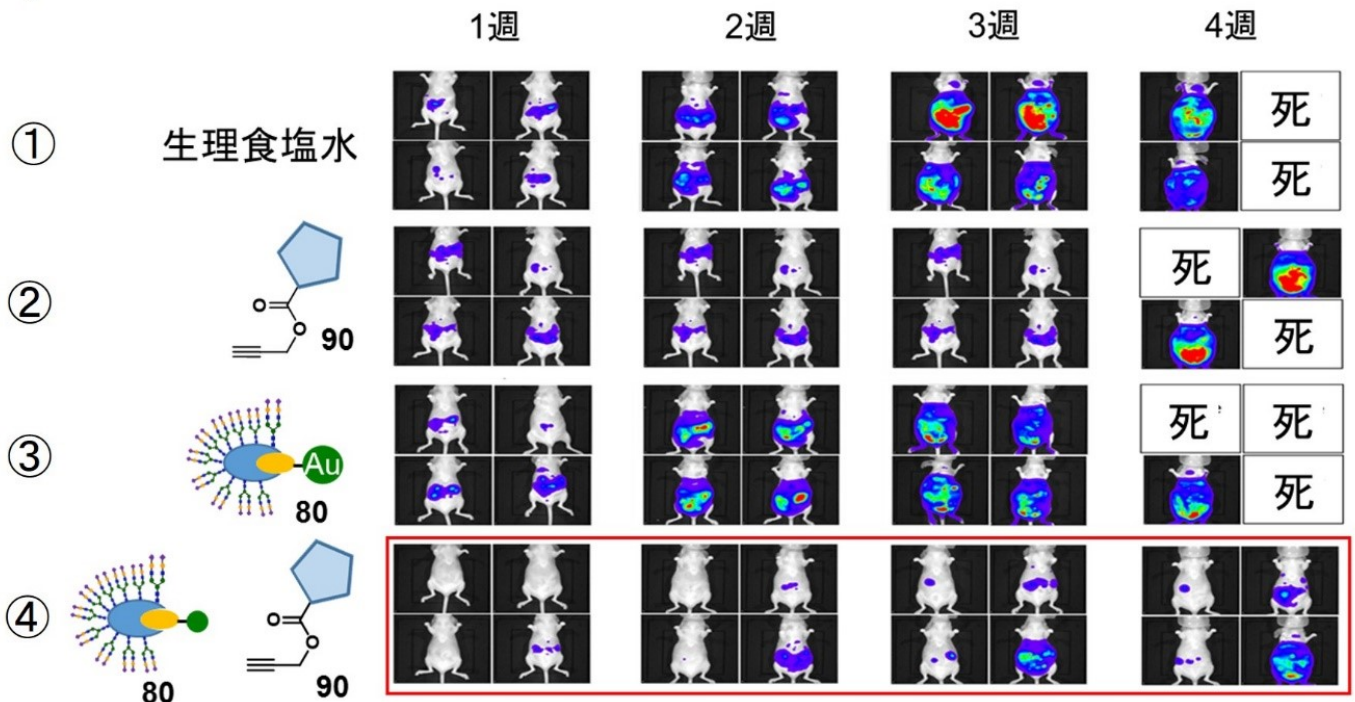
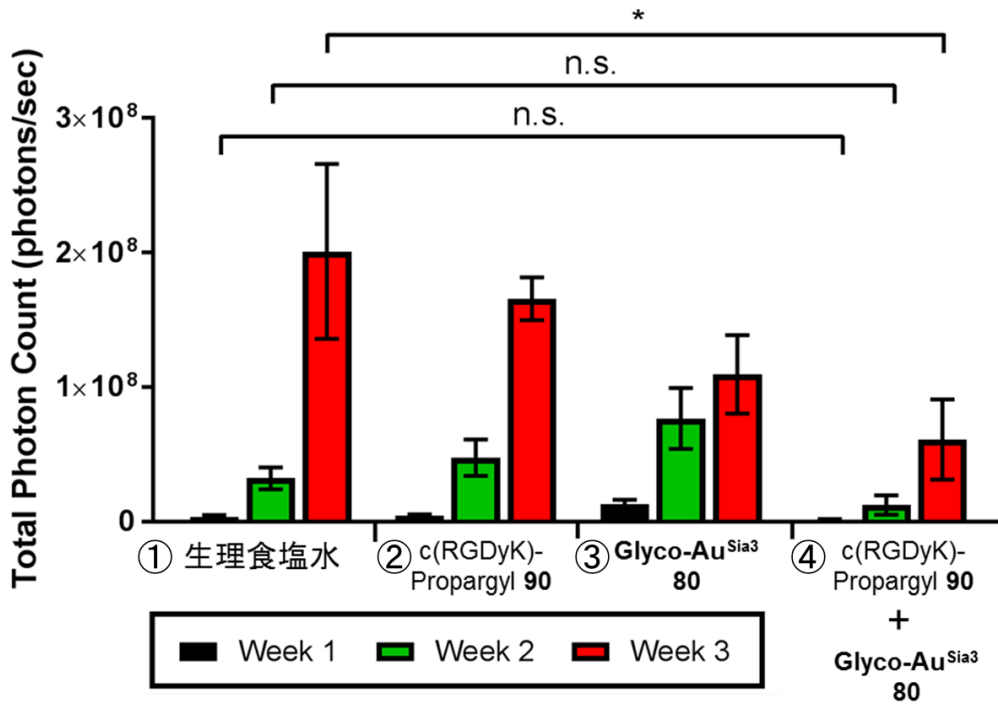


図 51 *in vivo* でのアミド化反応を利用した治療戦略 (その 1)

ルシフェラーゼが発現した HeLa 細胞/HBSS 培地 ( $1 \times 10^4$  cell/100  $\mu$ L) を BALB/c ノードマウスに対して腹腔内投与し (投与時を 0 分として表記)、Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80 の生理食塩水溶液を 3 nmol/100  $\mu$ L 腹腔内投与し (15 分)、c(RGDyK)-Propargyl 90 の生理食塩水溶液を 15 nmol/100  $\mu$ L の濃度でマウスに腹腔内投与した (35 分)。; b) BALB/c ノードマウスに対して、b-① : 100  $\mu$ L 生理食塩水 (15、35 分)、b-② : 100  $\mu$ L 生理食塩水 (15 分)+c(RGDyK)-Propargyl 90 (35 分)、b-③ : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80 (15 分)+100  $\mu$ L 生理食塩水 (35 分)、b-④ : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80 (15 分)+c(RGDyK)-Propargyl 90 (35 分) の条件で腹腔内投与し、イメージング 5 分前にルシフェリン K 生理食塩水溶液を 15.7  $\mu$ mol/200  $\mu$ L の濃度で投与した。

### c) ROIによる定量



### d) マウス生存率

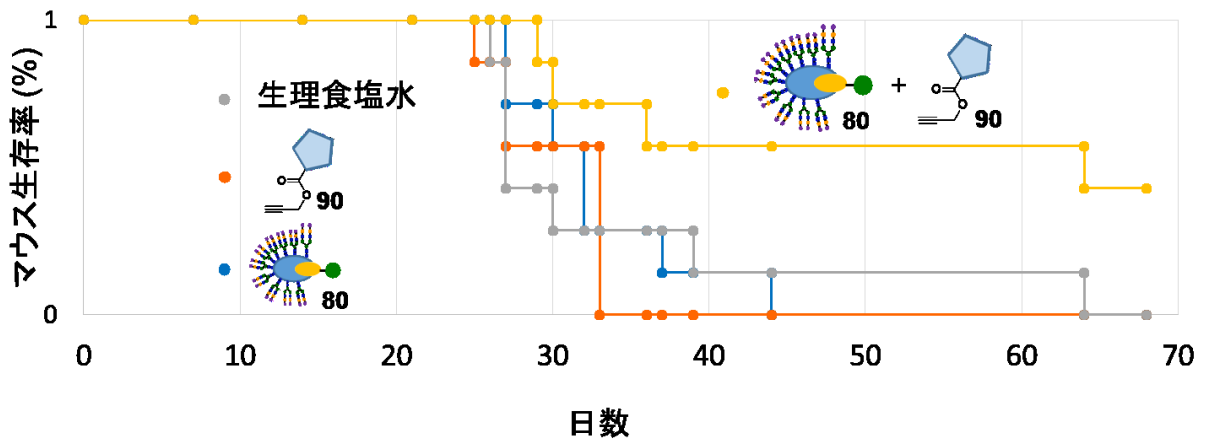


図 51 *in vivo* でのアミド化反応を利用した治療戦略 (その 2)

c : 1~3 週における転移の定量 (n=7, Mean±SD)、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$  であり、Fisher's exact test により算出した。また、マウスの死亡数が多く 4 週目においては定量を行わなかった。; d-灰 : 生理食塩水、橙 : c(RGDyK)-Propargyl 90、青 : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80、黄 : Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80+c(RGDyK)-Propargyl 90

### 3.3. 結論

がん細胞に対する金触媒による生体内アミド化反応を利用して、がん細胞上に環状 RGD ペプチドを複合化することで、がん転移抑制を試みた。ここでは、c(RGDyK)-Propargyl 90 を合成し、HeLa 細胞選択的に相互作用する **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** を用いることで、がん細胞表層上に c(RGDyK)ペプチドを結合させることに成功した。

これにより、c(RGDyK)ペプチドを細胞表層上に結合させることで、通常の投与方法では難しかったインテグリンとの効率的な相互作用を達成でき、がん転移抑制につながると考えた。ルシフェラーゼを発現させた HeLa 細胞を腹腔内投与し、がん転移モデルマウスと化学発光イメージング法を用いて、がんの転移抑制効果を検討したところ、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** と c(RGDyK)-Propargyl 90 を投与したマウスは、顕著な転移阻害と高い生存率となることが確認できた。

以上の結果から、生体内でアミド化反応を行うことで腹腔内投与したような浮遊しているがん細胞に RGD ペプチドを結合させることでがんの転移を抑制するといった新しい発想の治療アプローチの可能性を示すことができた。



## 第四章 ペプチドの複合化によるがんの増殖抑制と治療戦略

### 4.1. 序論

ここでは、生体内反応によって細胞毒性ペプチドを導入することによりがんを縮小させることを目指した。ペプチド医薬品は、優れた膜透過性や製造コストの低さなどの利点から近年多くの製薬企業が注目しており、低分子薬剤とタンパク質などの高分子薬剤の間の中分子薬剤の領域を担っている<sup>[60]</sup>。しかしながら、従来通りの投与方法は、正常組織への副作用の問題や生体内に存在するペプチダーゼ類による酵素分解の問題があった。

このような問題を解決するため、一般的に直鎖ペプチドよりも活性や選択性、安定性で優れた環状ペプチドに注目した研究開発が行われている。例えば、インテグリンのサブタイプの一つとして知られている $\alpha_v\beta_6$ は、RGD 配列と $\alpha$ -ヘリックスの2つの構造を認識するという特殊な性質が知られている。このような RGD ペプチドの中で、 $\alpha_v\beta_6$  と相互作用するペプチドの一つとして Arg-Gly-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg-Thr **91** が報告されている<sup>[61]</sup>。このペプチドは溶液中で Asp<sup>3</sup>-Leu-Asp<sup>5</sup>-Ser の部位で $\alpha$ -ヘリックス構造を形成し、5 残基目のアスパラギン酸と N末端のアルギニン間で相互作用して環状ペプチドのような構造が確認されてい

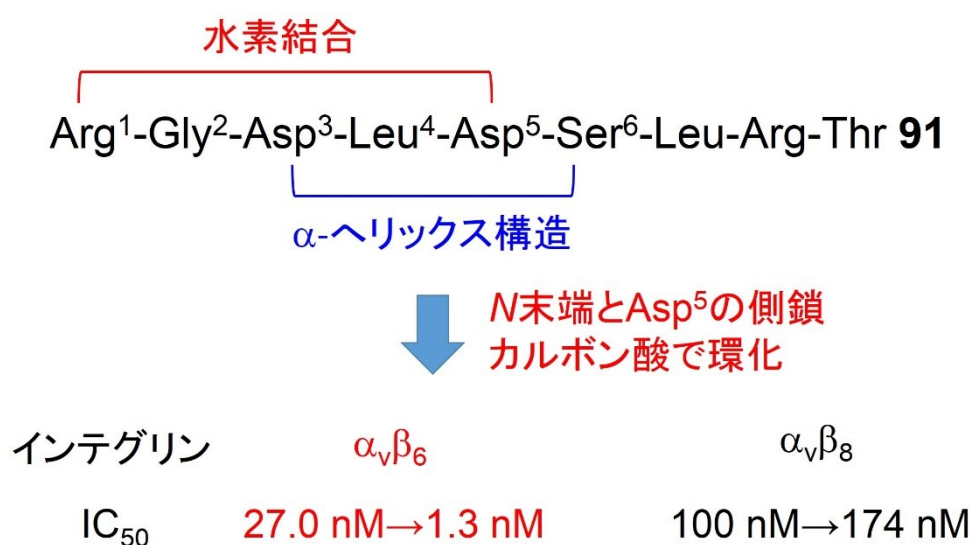


図 52 環化による活性と選択性の向上



た。そこで、Leva らは本ペプチドの 5 残基目のアスパラギン酸由来のカルボン酸と *N*末端の主鎖のアミンをアミド化により環状ペプチドとし、構造最適化を行った。これにより、通常の直鎖ペプチド ( $IC_{50} = 27 \text{ nM}$ ) よりもその活性が向上すること ( $IC_{50} = 1.3 \text{ nM}$ ) が報告された。加えて、他のインテグリンサブタイプである  $\alpha_v\beta_8$  ( $IC_{50} = 174 \text{ nM}$ ) への相互作用を抑制し、 $\alpha_v\beta_6$  への選択性を発現させることに成功した (図 52)。

そこで著者は、まずがんで生体内アミド化反応を利用することにより、細胞上で活性のない直鎖ペプチドを活性が他の環状ペプチドへと変換することを試みた。すなわち、あらかじめ金触媒を糖鎖クラスターなどの DDS 担体により、がん細胞上へと輸送し、続いてプロパルギルエステルとアミンを有するペプチド試薬をマウスに投与することで、がん細胞上で分子内環化反応が進行すると考えた (図 53)。

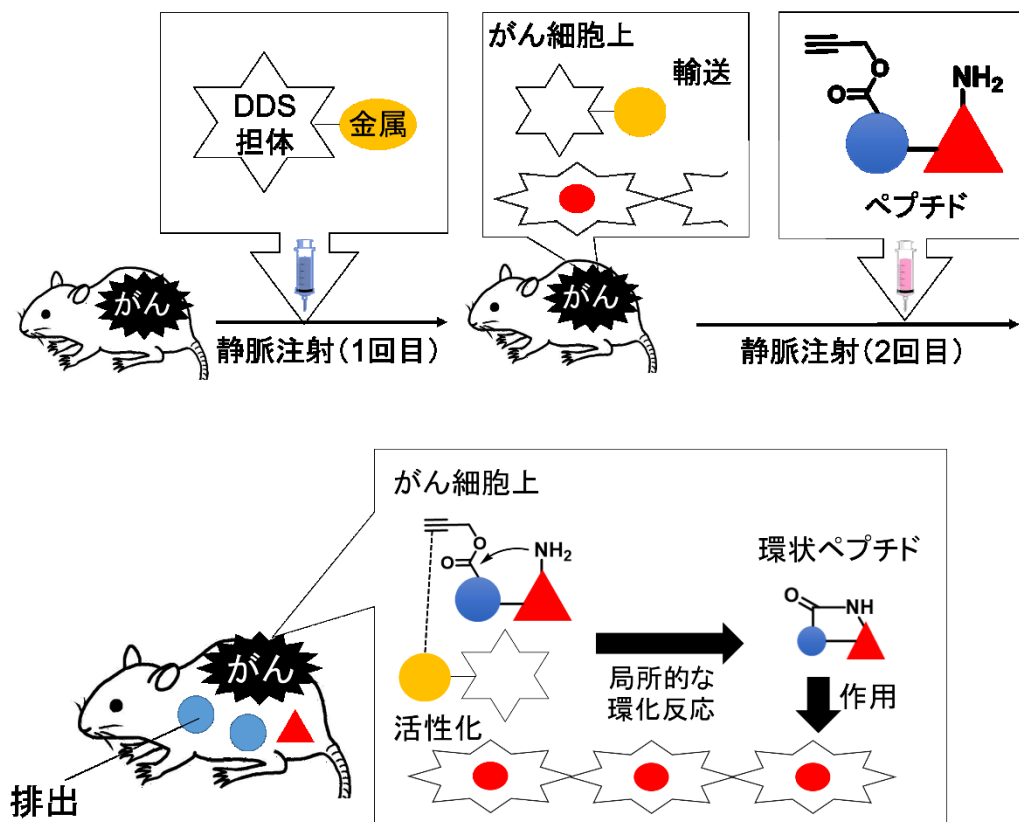


図 53 アミド結合形成反応による局所的な環状ペプチドの合成

## 4.2. 結果

### 4.2.1. ペプチドの環化反応の検討

#### 4.2.1.1. N末端のアミンを用いた環化反応

まず環状ペプチドの局所的な合成を行うための反応検討を行った。この際、著者は反応検討のモデル基質としてバレイショ科の植物 *Annona cherimola* の種子から単離された c(Phe-Tyr-Pro-Gly-Leu-Gly) の配列からなる抗腫瘍活性環状ヘキサペプチド cherimolacyclopeptide E に着目した (図 54)<sup>[62]</sup>。このペプチドは KB 細胞に対して、 $IC_{50} = 17 \text{ nM}$  という活性を有したペプチドで、このペプチドの N末端のフェニルアラニンをより求核性の高いグリシンが置換された直鎖ヘキサペプチドを環化反応のモデル基質として選択した。

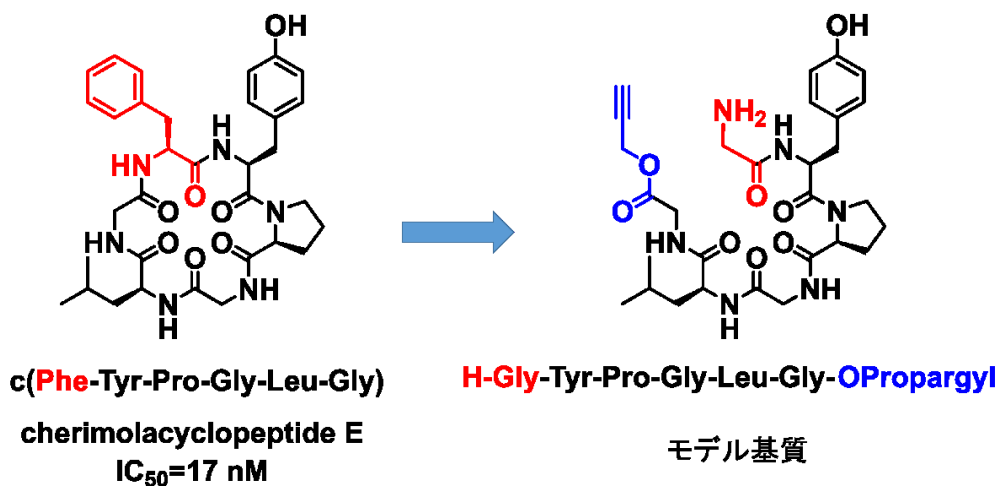


図 54 天然物 cherimolacyclopeptide E と直鎖モデルペプチド

前章で述べた固相合成にて H-Gly-Trt(2-Cl)樹脂 71 から伸長を行い、Boc-Gly-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Pro-Gly-Leu-Gly-OH 92 を合成した (図 55)。続いて、C末端のグリシンに対して、これまでと同様に炭酸カリウム存在下、プロパルギルブロミドを DMF 中で作用させ、プロパルギルエステル化を行った。最後に TFA を 2 分間作用させ、脱保護を行ってモデル基質のペプチド 93 を合成した。

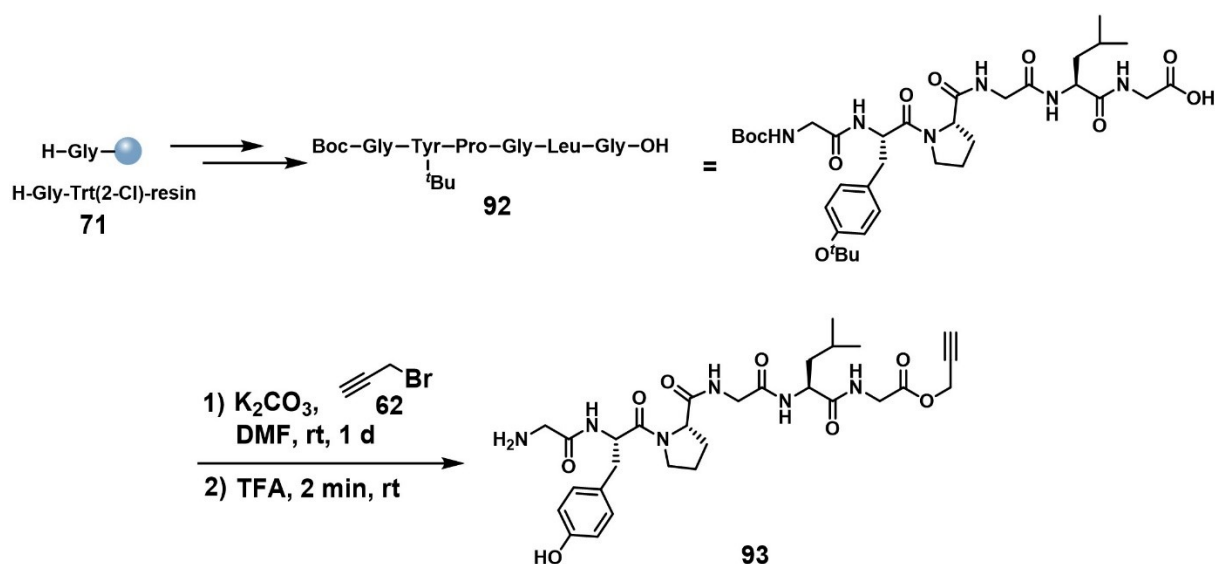
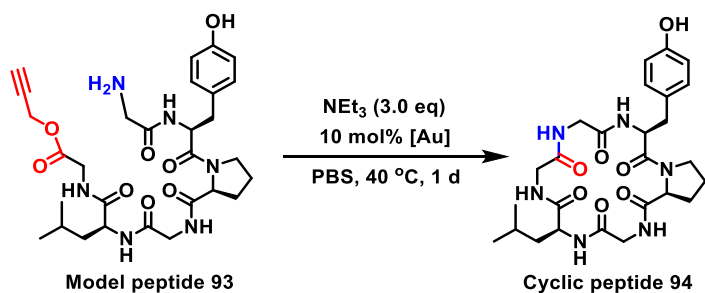
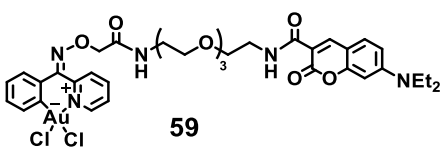
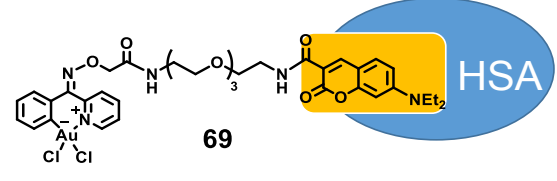
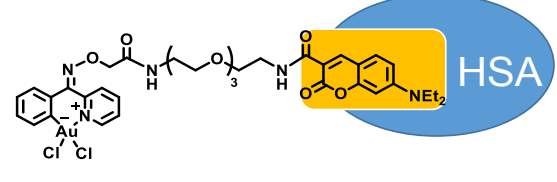


図 55 ペプチドの合成とプロパルギルエステル化

合成したペプチド **93** に対して、種々の金触媒を作用させ、その反応性を確認した (表 7)。ペプチドを PBS 中、10 mol% の金触媒、 $NEt_3$  存在下で環化反応を実施した。その結果、 $NaAuCl_4$  (Entry 2)、 $AuI$  (Entry 3) では、全く反応性を示さなかった。また、第二章で合成したジエチルルクマリリンが結合した金触媒 **59** でも全く反応性を示さなかった (Entry 4)。いずれの場合においても原料とその加水分解体と原料が回収されていたこと、および金ナノ粒子が検出されていたことから、金触媒の安定性に問題があると考えられた。そこで、Entry 5 では触媒をより安定的に存在させることを目的として、先ほどの金触媒 **59** に HSA を相互作用させた金触媒 **69** を検討した。その結果、反応は 30% 程度進行することが確認された。しかし、 $NEt_3$  を系中から除いた場合、反応が進行しないことが分かった。

表 7 環化反応における金触媒の検討

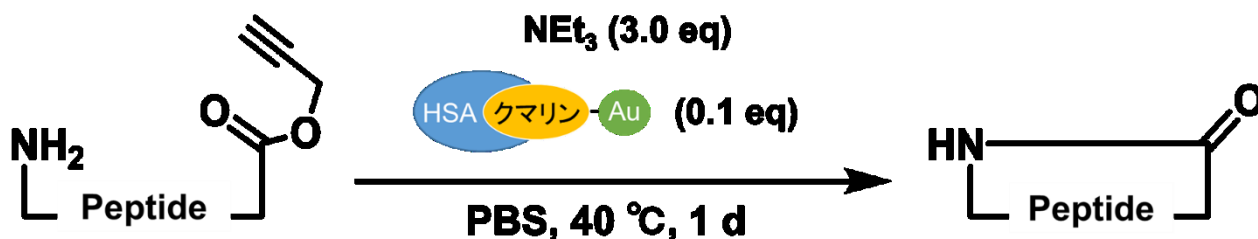


Entry	Au catalyst	Yield (HPLC)
1	None	N.R.
2	NaAuCl <sub>4</sub>	N.R.
3	AuI	N.R.
4		N.R.
5		30%
6	 (Without NEt <sub>3</sub> )	N.R.

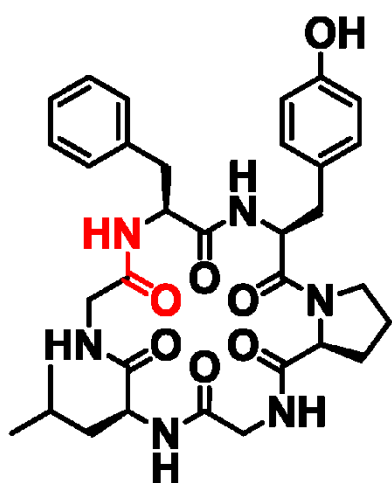
さらに、*C*末端にプロパルギルエステルを有する種々の OPropargyl 直鎖ペプチドを合成し、反応を検討した (表 8)。その結果、モデルペプチドの 2 残基目をチロシンからスレオニンへと変更したペプチド **95 (Entry 2)** では 21%、*N*、*C*末端のグリシン以外の配列を変更したペプチド **96 (Entry 3)** では 30%という結果が得られた。また、*N*末端がアラニンとなったペプチド **97 (Entry 4)** は、グリシンとは異なり 5%と収率の低下が見られた。また、後のがん細胞への毒性検討を考慮し、Entry 5 では図 54 で述べた抗がん活性天然物有機化合物<sup>[62-63]</sup>cherimolacyclopeptide E のプロパルギルエステル誘導体 **98** で反応を試みたが、目的の化合物を得ることはできなかった (表 8 下部-赤強調部分で環化)。

そこで、Entry 6 ではグリシン-グリシンの配列を持つ 8 残基のペプチドについて環化反応を実施した。すなわち、ナデシコ科の *Pseudostellaria heteropylla* から単離され、チロシナーゼ阻害剤として報告されている天然物 pseudostellarin B<sup>[64]</sup> (表 8-下部) を本アミド化反応により誘導体 **99** から合成を試みたところ 5%という低い収率ではあるが、pseudostellarin B の生成を確認した。また、親水性の高いアミノ酸を有するペプチドに対しても反応検討を行った。Entry 7、8 で抗がん活性が期待できる RGD の配列を有するペプチド **100** および **101** に対して検討を行ったが、反応は全く進行しなかった。これは、HSA-金触媒 **69** が HSA の疎水性部位に結合しているため、親水性ペプチドと金触媒が相互作用できずに反応が進行しなかったものと考えられた。

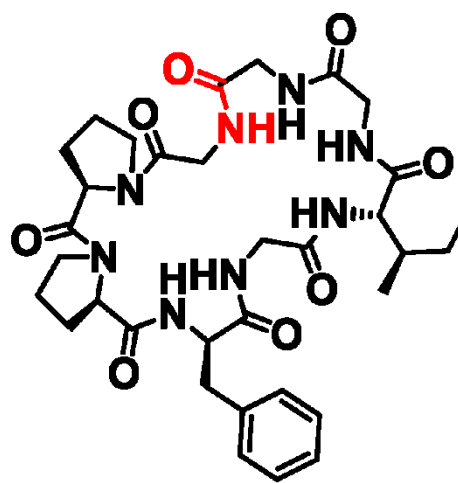
表 8 触媒反応の基質検討



Entry	Peptide	Yield (HPLC)
1	<b>GYPGLG 93</b>	<b>30%</b>
2	<b>GTPGLG 95</b>	<b>21%</b>
3	<b>GSYPFG 96</b>	<b>30%</b>
4	<b>AYPALG 97</b>	<b>5%</b>
5	<b>FYPGLG 98</b>	<b>N.D.</b>
6	<b>GPPFGIGG 99</b>	<b>5%</b>
7	<b>GRGDyG 100</b>	<b>N.R.</b>
8	<b>GRGDG 101</b>	<b>N.R.</b>



**cherimolacyclopeptide E**  
(Entry 5)



**pseudostellarin B**  
(Entry 6)

#### 4.2.1.2. リシン残基側鎖のアミンを用いた環化反応

より求核性が高く、さらにリシン残基側鎖アミンを利用して環化させた生物活性環状ペプチドが報告されているため、リシン残基側鎖のアミンを用いた反応検討を行った (表 9)。まず、アミノ酸配列中のグリシンとリシンの側鎖のアミンがアミド結合により結合した生物活性環状ペプチドの報告のうち、2つのアミノ酸配列に着目した。1つ目が、 $\mu$ -オピオイド受容体に対して結合することで血管新生阻害活性を有する $\beta$ -casomorphine-5 の部分骨格である c(D-Lys-Phe-D-Pro-Gly)<sup>[65]</sup>、2つ目がサイクリン A-サイクリン依存キナーゼ複合体のチロシンリン酸化を阻害する配列である c(Lys-Leu-Phe-Gly)<sup>[66]</sup>である (図 56)。

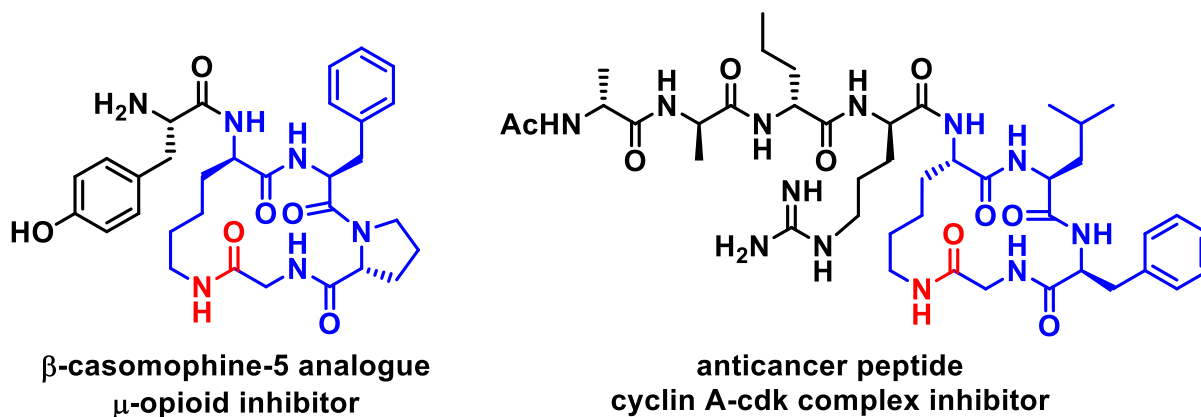
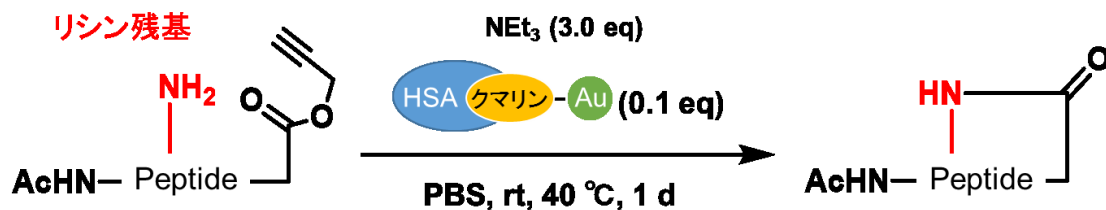


図 56 リシン残基側鎖での環状ペプチド

青色：活性に強く寄与している構造、赤色：アミド化反応により形成する結合

そこで、これらの配列を有した誘導体を種々合成し、反応検討を行った。Entry 1-5 では、 $\beta$ -casomorphine-5 の部分骨格 (図 56 青色部分) を有するペプチド **102a-e** で検討を行った。しかしながら、これらの基質では全く反応性を示さなかった。これは、*C* 末端から 2 残基目に存在しているプロリンが構造を制限してしまっているものと考え、Entry 6 からはサイクリン A-サイクリン依存キナーゼ複合体を阻害することで、細胞分裂の G1 期から S 期への移行を阻害し、増殖抑制効果が期待される c(Lys-Leu-Phe-Gly) の配列 (図 56 右図青色部分) を有したペプチドを **103a-e** の基質を用いて合成することとした。その結果、*N* 末端が Ac-Phe-Tyr **103a** の場合 11% (Entry 6)、Ac-Gly-Tyr **103b** の場合 15% (Entry 7)、Ac-Gly-Ser **103c** の場合 20% (Entry 8) の収率で環状ペプチドを与えた。しかし、側鎖を持たない Ac-Gly-Gly **103d** の配列では反応は進行しなかった (Entry 9)。

表 9 生物活性分子の合成を志向した基質検討



Entry	Peptide	Yield
1	Ac-FY <b>k</b> FpG <b>102a</b>	0%
2	Ac-AY <b>k</b> FpG <b>102b</b>	0%
3	Ac-AG <b>k</b> FpG <b>102c</b>	0%
4	Ac-GF <b>k</b> FpG <b>102d</b>	~Trace
5	Ac-LG <b>k</b> FpG <b>102e</b>	5%
6	Ac-FY <b>K</b> LFG <b>103a</b>	11%
7	Ac-GY <b>K</b> LFG <b>103b</b>	15%
8	Ac-GS <b>K</b> LFG <b>103c</b>	20%
9	Ac-GG <b>K</b> LFG <b>103d</b>	0%



以上のように本触媒反応の検討を行ったが、先ほどと同様にトリエチルアミンの非存在下では、反応が進行しなかった。加えて、他の塩基や生体内での塩基性条件でも代用することはできず、環化の収率も低いといった問題点から本方法を *in vivo* で利用することは困難であると結論付けた (図 57)。

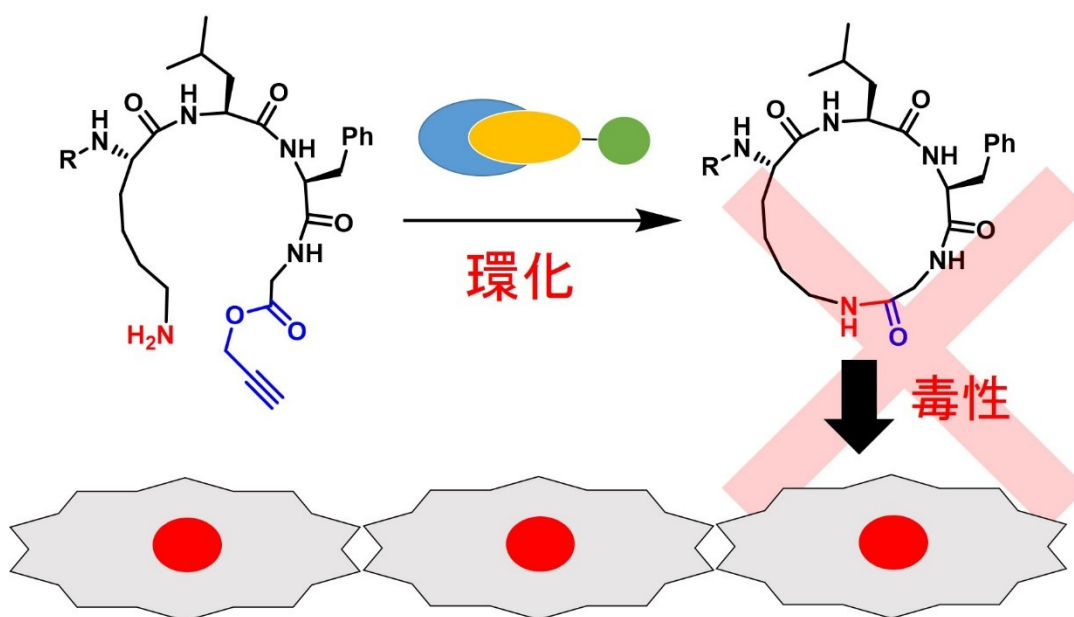


図 57 環化反応による局所的な毒性発現の研究計画の変更の必要性  
表 7-9 の検討で、環化には NEt<sub>3</sub> が必要であり、また収率がおおよそ 10~20%と低いため、毒性を発現させる充分量の環状ペプチドが生成させることは困難である。そのため、研究方針の変更が必要とされる。

## 4.2.2. ペプチドの複合化による毒性検討

### 4.2.2.1. 金触媒の合成

前章の結論を受けて、ペプチドの環化反応ではなく細胞毒性ペプチドの細胞上への複合化反応を検討することとした。ここでは、直鎖ペプチドを細胞表層上のリシン残基へと結合させることにより、がん細胞に対する毒性を発現させることを目的とした (図 58)。

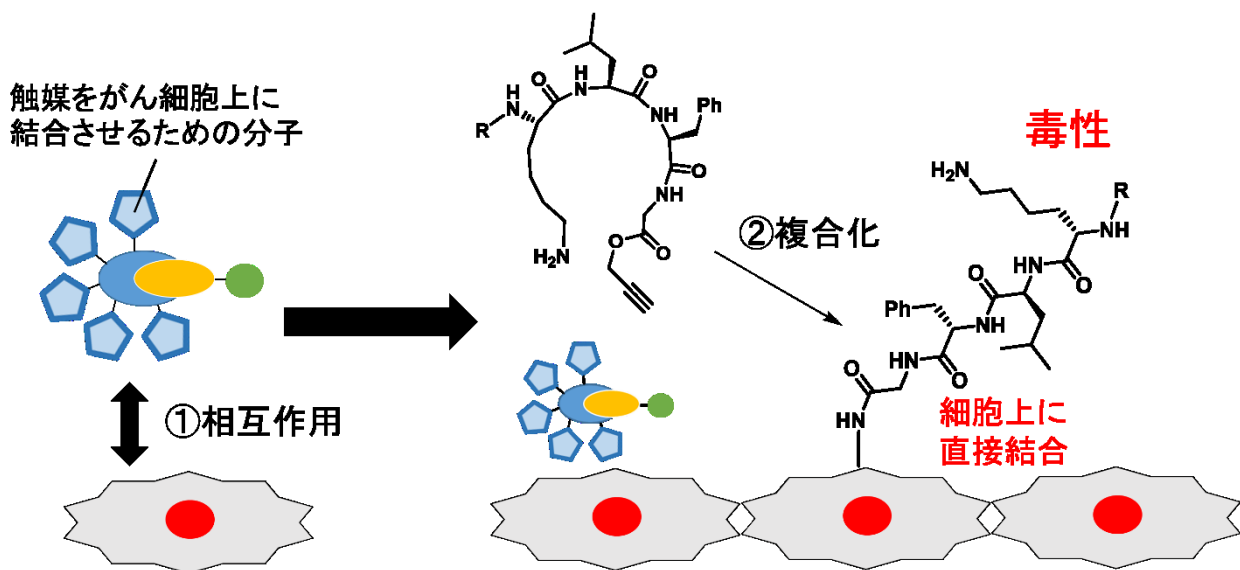


図 58 細胞表層上へのペプチドの複合化による細胞毒性発現の研究計画

①HSA-金触媒 69 に対して、がん細胞と相互作用する分子を修飾し、がん細胞上に金触媒を担持する。②第三章と同様に細胞上に存在しているアミンとの反応を行う「複合化」を利用して、毒性を発現させる。

そこで、細胞表面へのペプチドの複合化反応を行うための金触媒を合成することとした。これまでに、触媒のターゲティングに糖鎖クラスターを利用してきたが、本章ではペプチド複合化の汎用性を検証するために、ターゲティングの方法をインテグリン-環状 RGD ペプチド間の相互作用を利用することとした。まず、c(RGDyK)-スクシンイミジルエステル 89 を DIEA 存在下、PBS 中で HSA と作用させ、環状 RGDyK ペプチドを 5 分子結合させた RGD クラスター104 を調製し、金触媒 59 と結合するか確認した (図 59)。ジエチルアミノクマリ

ンが結合した金触媒 **59** と RGD クラスタ **104** を作用させ、ジエチルアミノクマリンの蛍光を測定したところ、触媒 **59** と RGD クラスタ **104** を相互作用させた場合に、触媒 **59** 単体よりも 7 倍程度強いジエチルアミノクマリンの蛍光が観測された。以上の結果から RGD クラスタに触媒を担持した RGD クラスタ金触媒 (**RGD-Au**) **105** を調製できた。

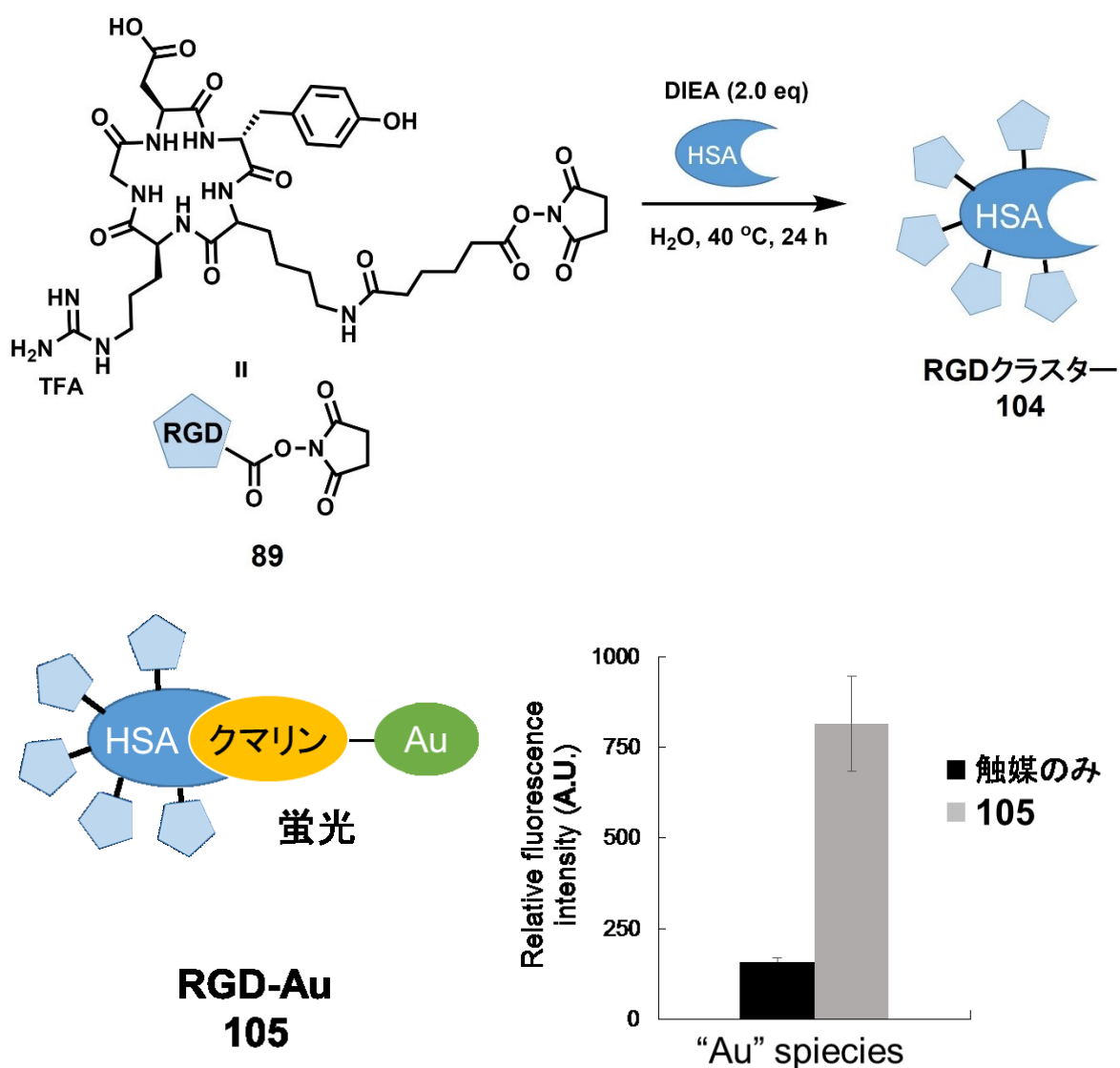


図 59 RGD クラスタ触媒 (**RGD-Au**) **105** の合成  
(ex/em=420 nm/466 nm、n=3、Mean±SD)

また、**RGD-Au 105** の触媒能についても検討を行った (図 60)。調製した **RGD-Au 105** (10 nmol) に対して蛍光基 TAMRA を有するプロパルギルエステル **68** を 100 nmol 作用させ、0、60、120、240、1200 分での蛍光の経時変化を測定したところ、TAMRA の蛍光が上昇したことから、**RGD-Au 105** は触媒能を有することが示せた。

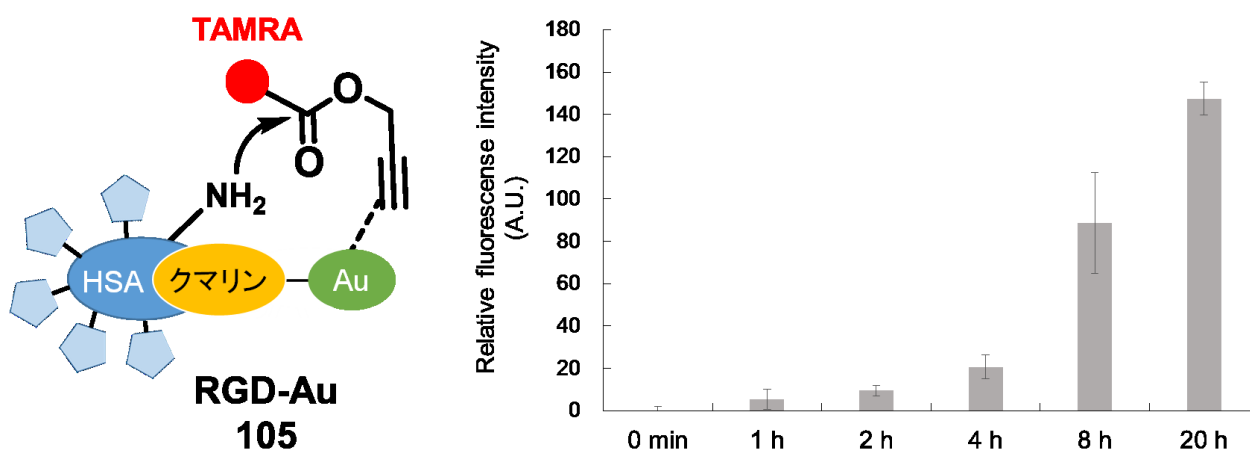


図 60 **RGD-Au 105** の触媒能  
(ex/em=555 nm/585 nm、n=3、Mean±SD)

#### 4.2.2. がん細胞に対するペプチドの複合化による増殖抑制試験

RGD ペプチドと強く相互作用するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ が発現していることが知られている。ヒト結腸線がん細胞 SW620 に対して、表 9 (Entry 6-9) で検討した Lys-Leu-Phe-Gly の配列を有するペプチドプロパルギルエステル体 **103a-d** (リシン側鎖への反応性についての考察は付録に記載) と **RGD-Au 105** を添加してペプチドを細胞に複合化することで、毒性を発現するか検討を行った (図 61)。なお、細胞毒性は生細胞による ATP の産生量を定量することにより評価した。

まず、著者は **RGD-Au 105** 単体について、終濃度 100  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  の 3 点の濃度で検討を行い、20  $\mu\text{M}$  の濃度で細胞毒性が発現しないことを確認した (図 61a)。次にペプチド **103a-d** 単体についても、600  $\mu\text{M}$  で細胞毒性がないことを確認した (図 61b-e : 青)。そこで、細胞に対して **RGD-Au 105** 20  $\mu\text{M}$ 、プロパルギルエステル化ペプチド 600  $\mu\text{M}$  を添加して細胞毒性の評価を行った (図 61b-e : 赤)。ペプチド **103a-c** と **RGD-Au 105** を共に添加した場合にはほとんど毒性が認められなかった (図 61b-d : 赤)。一方、Ac-Gly-Gly-Lys-Leu-Phe-Gly の配列を有するペプチド **103d** を **RGD-Au 105** とともに添加した際には、活性の発現メカニズムについては未だ明らかとなっていないが、顕著な細胞毒性が確認された (図 61e : 赤)。また、本ペプチド **103d** の細胞毒性を同様に HeLa 細胞と A549 細胞に対して評価したところ、いずれの細胞についても顕著な活性は認められなかった (図 61f, g : 赤)。

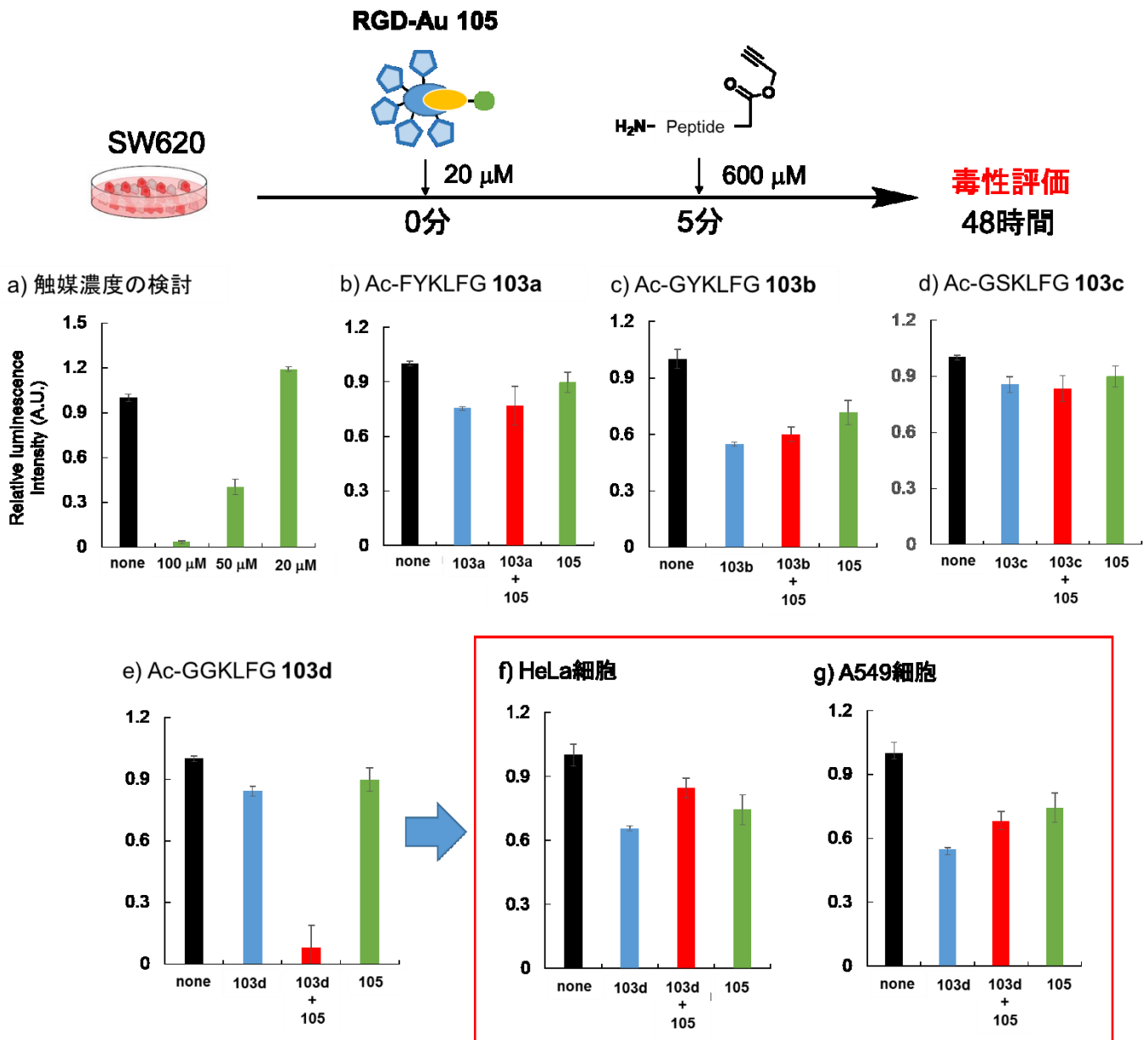


図 61 ペプチドの複合化による毒性検討 (n=3、Mean±SD)

毒性は Perkin Elmer 社の ATPlite を利用し、生細胞の ATP の産生量を測定することで定量した。黒：SW620 細胞のみ、青：プロパルギルエステル化ペプチドのみ、赤：プロパルギルエステル化ペプチド+RGD-Au 105、緑：RGD-Au 105 のみ；a：触媒の濃度検討（終濃度 100 μM、50 μM、20 μM）；b-e：プロパルギルエステル化ペプチド 103a-d と RGD-Au を用いた際の SW620 細胞への毒性検討；f-g：毒性の発現した 103d を用いた他の細胞種（HeLa 細胞、A549 細胞）への毒性検討

#### 4.2.3. *In vivo*でのペプチドの複合化によるがん増殖抑制

ペプチドプロパルギルエステル **103d** と **RGD-Au 105** を投与した場合、*in vitro* の系で毒性を発現させることが明らかとなった。そこで、本反応を理化学研究所 Ahmadi、田中らとともに *in vivo* におけるがん増殖抑制効果を調べた (図 62)。SW620 細胞 ( $10 \times 10^5$  cell) をヌードマウスの肩に皮下投与し、腫瘍サイズ直径を 1 cm 以上に成長させた。これらのマウスに対して、まず **RGD-Au 105** を 10 nmol 静脈注射し、30 分後ペプチド **103d** を 120 nmol 静脈注射した。投与スケジュールは 1 日 1 回とし、8 日間連続投与を行い、腫瘍サイズを測定した。その結果、①生理食塩水のみ、②ペプチド **103d** のみ、③**RGD-Au 105** のみを投与した対照実験マウスでは、腫瘍が 1~8 日間で 300%程度増大することが確認された。一方で、④**103d** および **RGD-Au 105** の両者を投与したマウスについては、投与期間中は腫瘍の増大が阻害され、投与終了後に腫瘍が急速に増大した。以上の結果から、**RGD-Au 105** を用いて、ペプチド **103d** を生体内でのアミド化反応によって複合化することにより、腫瘍の増大を抑制することができることを見出した。

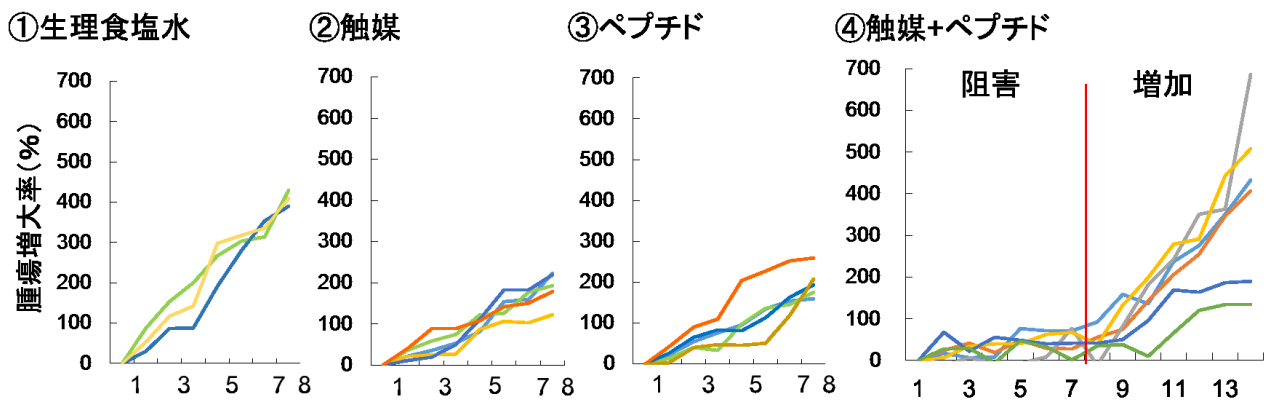
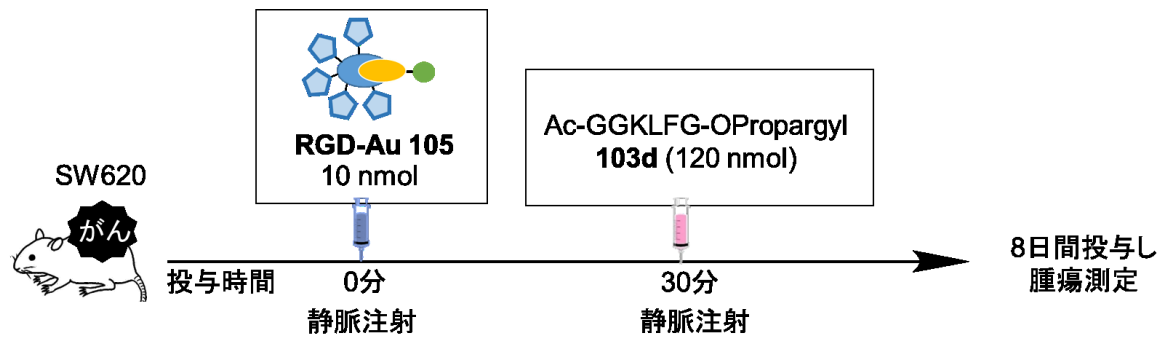


図 62 担がんマウスを利用した生体内でのペプチドの複合化

SW620 細胞を皮下投与し、腫瘍サイズ 1 cm 以上となった担がん BALB/c ノードマウスに対して RGD-Au 105 の生理食塩水溶液を 10 nmol/100  $\mu$ L の濃度で静脈注射し (0 分として表記)、30 分後にペプチド 103d 生理食塩水溶液を 120 nmol/100  $\mu$ L で静脈注射した。担がん BALB/c ノードマウス (SW620 細胞) に対して①: 100  $\mu$ L 生理食塩水 (0、30 分)、②: RGD-Au 105 (0 分)+生理食塩水 100  $\mu$ L (30 分)、③: 生理食塩水 100  $\mu$ L (0 分)+ペプチド 103d (30 分)、④: RGD-Au 105 (0 分)+ペプチド 103d (30 分) の条件で静脈注射した (赤線: 投与打ち切り日である 8 日目)。



### 4.3. 結論

本章では、金触媒によるプロパルギルエステルとアミンのアミド化反応を用いて、細胞上にペプチドを結合させる「複合化」によって、がんの増殖抑制戦略を試みた。

触媒として **RGD-Au 105**、基質として C末端にプロパルギルエステルを有するペプチドを利用して細胞毒性試験を行ったところ、**Ac-Gly-Gly-Lys-Leu-Phe-Gly-OPropargyl 103d** を試薬として用いた場合に増殖抑制効果が認められた。

この **RGD-Au 105** とペプチド **103d** を、がん移植マウスに投与することで、*in vivo* でのがんの増殖抑制効果の検討を行った。その結果、**RGD-Au 105** とペプチド **103d** を投与したマウスについては、投与中がんの成長が阻害され、投与終了後は、腫瘍の成長が確認された。この結果から、金触媒によるアミド化をがんの増殖抑制へと応用できた。

## 第五章 総括

これまでの抗がん剤による化学療法は、腫瘍組織以外の正常組織へも毒性を発現し、結果として副作用を引き起こしてしまうといった問題点があった。そこで、がん細胞表面を選択的な反応場として有機化学反応を行い、薬剤の活性を引き出すことができれば、副作用を低減した新たながんの治療法につながる可能性があると考えた。これまでに生体内での有機化学反応の例は多いが、その中でも金属触媒を用いた反応は、その幅広い反応多様性から新しいがんの治療戦略に展開できると考えた。

これまでに理化学研究所 田中生体機能合成化学研究室では糖鎖クラスターと呼ばれる DDS 担体を開発していた。この糖鎖クラスターを用いれば、抗体と比較して目的とする臓器や組織への移行が 30 分程度と早いこと、複数の糖鎖とレクチンの相互作用による高い選択性が特徴となるドラッグデリバリーが可能となる。そこで、この糖鎖クラスターに金属触媒を担持し、あらかじめ目的の臓器に輸送しておけば、触媒が局在する場所選択的に局所的に試薬が活性化されて反応が進行すると考えた。

理化学研究所 田中生体機能合成化学研究室と共同で実験を行い、第二章ではプロパルギルエステルが金触媒により活性化されることに着目し、アミンと反応させることで、アミド化が進行することを見出した。次に、ジエチルアミノクマリンが結合した金触媒を合成し、糖鎖クラスターと作用させることで、生体内で利用可能な金触媒 **Glyco-Au** を調製した。この触媒を利用して、*in vivo* 活性評価を行った。蛍光基を有するプロパルギルエステルと肝臓に移行する **Glyco-Au<sup>Sia6</sup>** または腸管に移行する **Glyco-Au<sup>Gal</sup>** をマウスに静脈注射し、肝細胞表層または腸管細胞表層のアミンを標的にして検討を行った。蛍光イメージングを行ったところ、触媒の標的とした臓器で強い蛍光が観測された。この結果から、糖鎖クラスターにより、狙った臓器で生体内反応を行える金属触媒反応を見出した。

細胞表面のアミンに化合物を結合させる「複合化」を行う方法を見出したので、続く第三章では本方法を利用したがん転移抑制戦略を試みた。すなわち、開発した **Glyco-Au** を用いて、環状 RGD ペプチドをがん細胞表面のアミンに複合化し、転移の重要なメカニズムの一つである細胞接着を阻害することで、がん転移の抑制を試みた。

プロパルギルエステルを有する環状 RGD ペプチドと HeLa 細胞と相互作用する $\alpha(2\rightarrow3)$ シアロ糖鎖が結合した **Glyco-Au<sup>Sia3</sup>** をマウスに腹腔内投与し、HeLa 細胞表面のアミンに **c(RGDyK)** 結合させる生体内反応を行った。その結果、がん転移の抑制とマウス生存率の向上が認められ、治療的アプローチへの可能性が示された。

第四章では本アミド化反応を分子内反応に応用し、生体内で局所的に環化反応を実施する方法の開発に着手した。この実験では、HSA に **c(RGDyK)** ペプチドが 5 個結合した RGD クラスタに金触媒を担持した RGD クラスタ金触媒 (**RGD-Au**) を利用することとした。反応検討とがん細胞 (SW620) への毒性試験を行ったところ、**Ac-Gly-Gly-Lys-Leu-Phe-Gly-OPropargyl** の配列を有するペプチドと **RGD-Au** を添加した場合に SW620 細胞への増殖抑制効果が認められた。そのため、本ペプチドはがん細胞と複合化されることにより毒性が発現されることが *in vitro* の毒性試験の結果から示唆された。続いて、本ペプチドと細胞の複合化により抗がん活性が発現することが確認できたので、実際に本方法を *in vivo* へと展開した。SW620 細胞をマウスに皮下投与し、腫瘍が成長したマウスに対して本ペプチドと **RGD-Au** を静脈注射し、がん細胞上にペプチドを複合化した。その結果、コントロールと比較して、本ペプチドと触媒の投与中は腫瘍の増大が抑制された。以上の結果から、生体内で触媒反応を行い、本ペプチドをがん細胞へと複合化することで、腫瘍の増大を抑制するといった新しい治療アプローチの実現の可能性を示すことができた。

以上のように著者は、本博士論文において **Glyco-Au** または **RGD-Au** といった金属触媒による生体内反応を開発し、それを活用することで新しいがん治療法へと展開できる可能性を見出した。

## EXPERIMENTAL SECTION

General reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA), TCI Chemicals (Tokyo, Japan), or Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) without further purification. Human serum albumin was purchased from Aldrich. Cyanine7.5 NHS ester was purchased from Lumiprobe Life Science Solutions. 5-(and-6)-Carboxytetramethylrhodamine NHS ester was purchased from Molecular Probes™. Microcon® centrifugal filters (10 kDa) were purchased from Merck Millipore Ltd. Amicon® Ultra Centrifugal Filters (30 kDa) and Durapore PVDF 0.45 µm® filters were purchased from MilliporeSigma (Massachusetts, United States).

For peptide synthesis, Fmoc-amino acids, Boc-amino acids, HCTU, HOBt(6-Cl), and the H-Gly-Trt(2-Cl) resin were all purchased from Watanabe Chemical Industries (Hiroshima, Japan). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate-buffered saline (PBS), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Leibovitz's L-15 Medium (L-15) were all purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). TLC analyses (F-254) were performed with 60 Å silica gel from Merck Millipore (Massachusetts, United States).

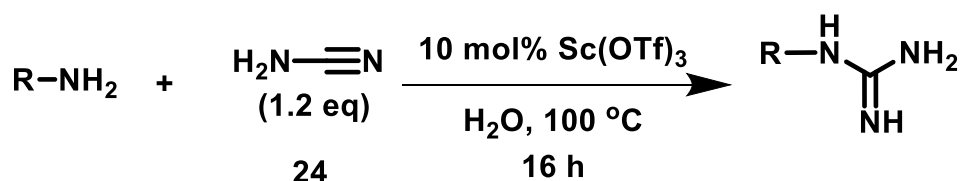
Preparative reverse-phase HPLC employed a Shimadzu Prominence system equipped with a Nacalai tesque column (5C<sub>18</sub>-AR300, 10×300 mm). Two solvent systems, A: H<sub>2</sub>O containing 0.1% TFA and B: MeCN containing 0.1% TFA, were applied.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a JEOL ECA500 NMR spectrometer and JEOL AL400 NMR spectrometer. Chemical shifts of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were referenced to the solvent peaks:  $\delta_{\text{H}}$  7.26 and  $\delta_{\text{C}}$  77.2 for CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{H}}$  3.30 and  $\delta_{\text{C}}$  49.0 for CD<sub>3</sub>OD and  $\delta_{\text{H}}$  2.50 and  $\delta_{\text{C}}$  39.5 for DMSO-*d*<sub>6</sub>. ESI-mass spectra including high resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a microTOF-QIII. Fluorescence data was recorded on a JASCO FP-6500 spectrofluorometer with a JASCO FMP-963 microplate reader. *In vivo* kinetics and biodistribution analysis data was recorded on an IVIS kinetics fluorescence imager® (Caliper Life Science, Inc.).

## Compound Information

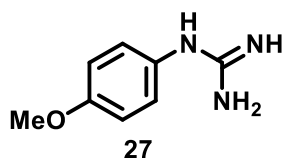
### Chapter 2

#### Guanylation of amino group by Sc(OTf)<sub>3</sub>



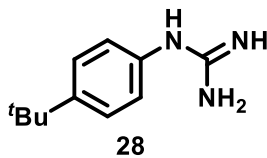
To the solution of cyanamide (27.5 mg, 0.6 mmol) and Sc(OTf)<sub>3</sub> (24.6 mg, 0.05 mmol) in H<sub>2</sub>O 2.5 mL were added various amines (0.5 mmol) and the resulting mixture was stirred at 100 °C for 1 day. After reaction, the solution was washed with CHCl<sub>3</sub> (10 mL×2) and aqueous layer was concentrated *in vacuo*. The crude was purified with silica gel column chromatography applying by CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1.

#### *N*-(*p*-Methoxyphenyl)guanidine 27<sup>[67]</sup>



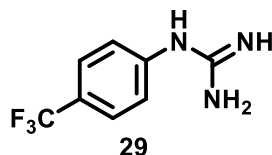
A purple solid (80%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.10 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 2H), 6.91 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  164.8, 160.9, 128.9, 128.1, 116.2, 56.0; ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): 166.1; found: 166.1.

#### *N*-(*p*-*tert*-Butylphenyl)guanidine 28<sup>[68]</sup>



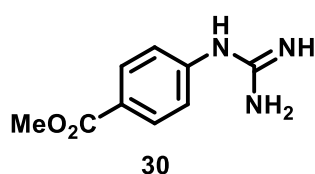
A white solid (67%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.48 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 7.16 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 1.29 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  158.1, 152.2, 133.1, 128.0, 126.3, 35.5, 31.6; ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 192.1, found 192.1.

#### *N*-(*p*-Trifluoromethylphenyl)guanidine 29<sup>[69]</sup>



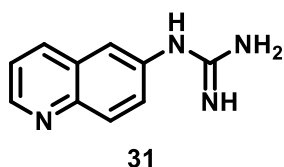
A brown solid (88%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.67 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  157.8, 140.2, 129.8 (q,  $J$  = 32.7 Hz), 128.1 (q,  $J$  = 3.3 Hz), 126.0, 125.3 (q,  $J$  = 270.9 Hz); ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 204.1, found 204.1.

### *N*-(*p*-Methoxycarbonylphenyl)guanidine **30**<sup>[70]</sup>



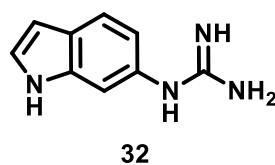
A yellow solid (47%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 167.6, 157.7, 142.1, 132.3, 129.6, 120.1, 52.8; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 194.1, found 194.1.

### 6-Guanidino quinoline **31**<sup>[71]</sup>



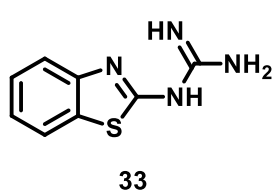
Reaction was performed in a mixed solvent of water and 1,4-dioxane (1:1): A brown solid (57%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.87 (dd, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 1H), 8.40 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 8.3, 4.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 151.9, 147.4, 138.3, 134.7, 131.3, 130.3, 128.5, 124.6, 123.5, 123.4; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 187.1, found 187.1.

### 6-Guanidino indole **32**



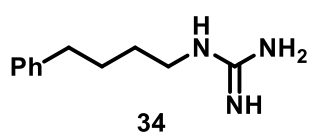
A brown solid (quantitative yield): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.59 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.26 (m, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 2.8, 1.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 161.4, 138.5, 126.1, 125.1, 121.6, 119.9, 117.9, 107.2, 102.1; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 175.1, found 175.1; ESI-HRMS *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 175.0984, found 175.0986.

### 2-Guanidino benzo[*a*]thiazole **33**<sup>[72]</sup>



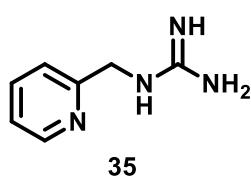
Reaction was performed in a mixed solvent of water and 1,4-dioxane (1:1). The product was purified by the reverse phase HPLC (10–70 % of B over 60 min): A white solid (31%): <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 162.3, 157.1, 149.9, 132.8, 127.2, 124.5, 122.2, 120.8; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>) 193.1, found 193.1.

### *N*-(4-Phenylbutyl)guanidine **34**<sup>[67]</sup>



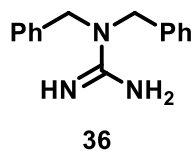
Reaction was performed in a mixed solvent of water and 1,4-dioxane (1:1): A white solid (68%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.27-7.15 (m, 5H), 3.17 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.71-1.59 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 164.9, 143.2, 129.4 (2C), 126.9, 42.3, 36.3, 29.7, 29.4; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 192.1, found 192.1.

### ***N*-(2-Picolyl)guanidine 35<sup>[73]</sup>**



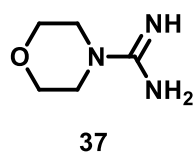
The product was purified by the reverse phase HPLC (0–100 % of B over 60 min): A white solid (56%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.53 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 8.1, 8.1 Hz, 1H), 7.82 (m, 2H), 4.57 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 164.9, 158.3, 145.1 (2C), 125.7, 125.5, 43.8; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 151.1, found 151.1.

### ***N,N'*-Dibenzyl guanidine 36<sup>[74]</sup>**



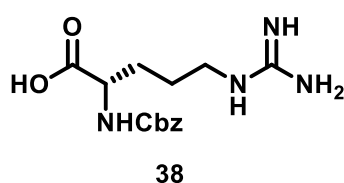
Reaction was performed in a mixed solvent of water and 1,4-dioxane (1:1): A white solid (46%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.35 (m, 4H), 7.32 (m, 2H), 7.20 (m, 4H), 4.55 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 159.0, 135.9, 130.1, 129.2, 128.2, 52.3; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 240.1, found 240.1.

### **Morpholine-4-carboximidamide 37<sup>[74]</sup>**



A white solid (83%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.63 (dd, *J* = 4.7, 4.7 Hz, 4H), 3.36 (dd, *J* = 4.7 Hz, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 161.4, 67.6, 45.2; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>) 130.1, found 130.0.

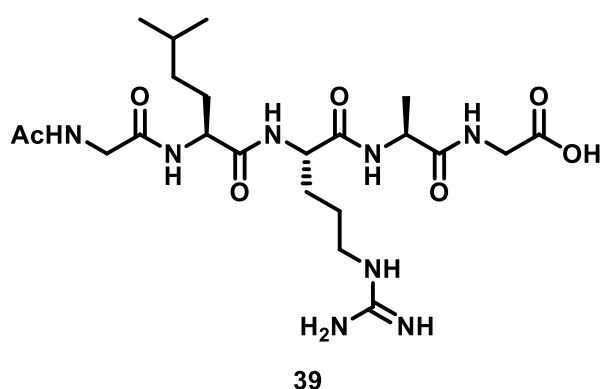
### **Cbz-Arg-OH 38<sup>[74]</sup>**



The product was purified by the reverse phase HPLC (20–100% of B over 30 min): A white solid (68%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.35-7.26 (m, 5H), 5.01 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.17 (brs, 2H), 1.97 (m, 1H), 1.78-1.67 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 172.3, 162.0, 158.7, 138.3, 129.4 (2C), 129.0, 128.9 (2C), 67.6, 52.4, 42.8, 29.1, 22.4; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 309.2, found 309.2.



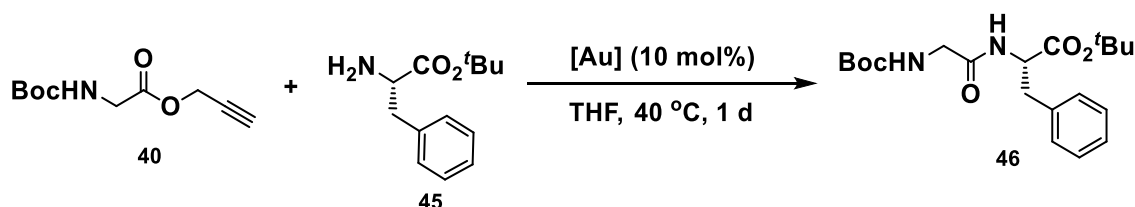
### Ac-Gly-Leu-Arg-Ala-Gly-OH **39**



The product was purified by the reverse phase HPLC (0–60 % B over 60 min): A white solid (56%):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  4.35–4.22 (m, 3H), 4.00–3.74 (m, 4H), 3.16–3.08 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.75–1.54 (m, 6H), 1.38 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 0.94 (dd,  $J = 16.6, 6.3$  Hz, 6H); ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_7$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 537.3, found 537.3; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_7$

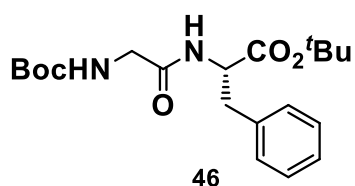
( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 537.2756, found 537.2756

### Reaction optimization of gold-catalyzed amide bond formation



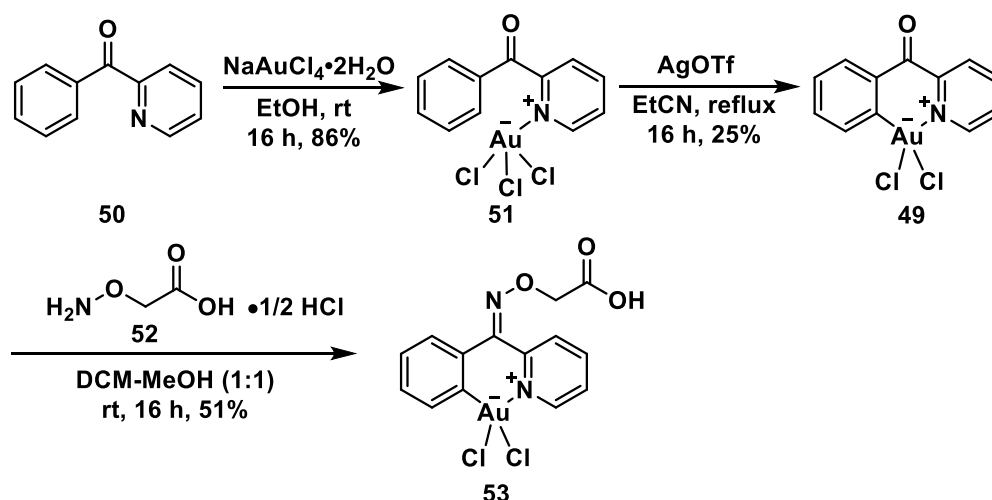
To a stirred solution of **40** (200 mg, 0.94 mmol) in THF 2.8 mL was added [Au] catalyst (0.031 mmol). After stirring for 10 min, **45** (70.0 mg, 0.31 mmol) was added and stirred at 40 °C for overnight. The solution was extracted with  $\text{CHCl}_3$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate = 10:1).

### Boc-Gly-Phe-O<sup>t</sup>Bu **46**<sup>[75]</sup>



Colorless oil:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.31–7.20 (m, 3H), 7.17–7.13 (m, 2H), 6.47 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 5.05 (brs, 1H), 4.76 (dd,  $J = 13.5, 6.0$  Hz, 1H), 3.87 (dd,  $J = 16.8, 6.0$  Hz, 1H), 3.74 (dd,  $J = 16.8, 6.0$  Hz, 1H), 3.09 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.40 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.1, 156.0, 137.2, 130.1, 129.0, 127.4, 83.1, 81.1, 54.3, 44.3, 38.2, 28.5, 28.1; ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$  Na ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) 401.21, found 401.21.

## Preparation of 53

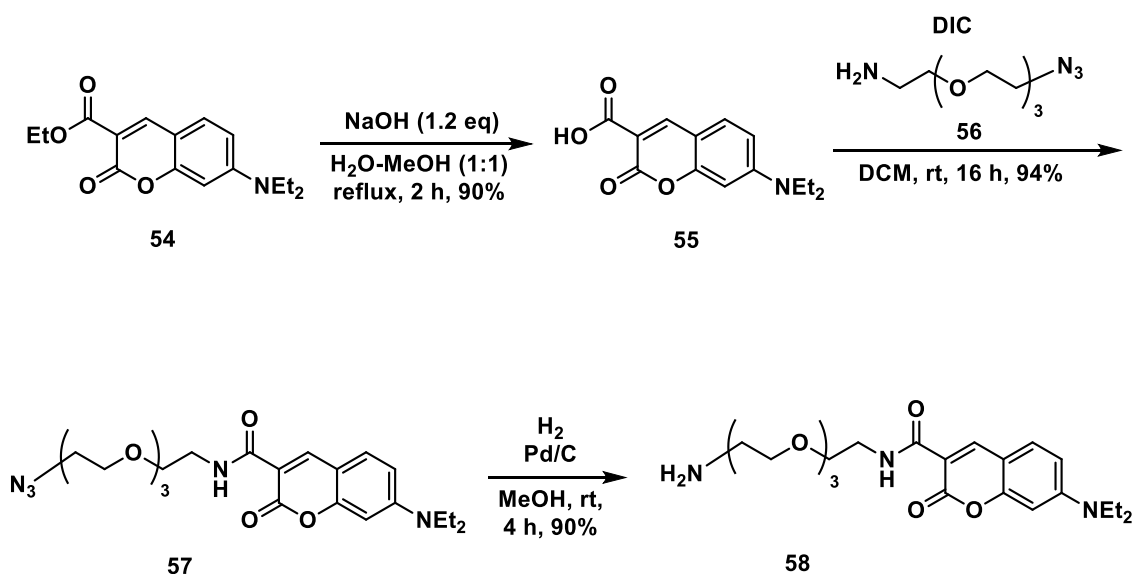


**Preparation of 51**<sup>[40]</sup>: To a stirred solution of  $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (398 mg, 1.0 mmol) in EtOH 10 mL was added 2-benzoylpyridine **50** (366 mg, 2.0 mmol) in EtOH 10 mL. After the solution was stirred at room temperature for 16 hours, yellow precipitate was filtered off and washed with diethyl ether to give **51** as yellow solid (419 mg, 86%):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.73 (dd,  $J = 4.8, 0.7$  Hz, 1H), 8.09 (td,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 8.01-7.95 (m, 3H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.55 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  193.4, 154.4, 148.5, 137.9, 136.0, 133.1, 130.6, 128.3, 126.8, 124.3. ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{AuCl}_3\text{NO}$  ( $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ ) 484.9415, found 484.9425.

**Preparation of 49**<sup>[40]</sup>: To the stirred solution of **51** (370 mg, 0.76 mmol) in EtCN 14 mL was added AgOTf (512 mg, 1.52 mmol). After being refluxed for 16 hours, the resulting mixture was filtered while hot. The pale white filtrate was washed with diethyl ether 20 mL to give **49** as white solid (54.9 mg, 25%):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.47 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 8.56 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 8.37 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 8.09 (td,  $J = 6.8, 1.5$  Hz, 1H), 7.76 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J = 6.5, 2.8$  Hz, 1H), 7.50-7.44 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  188.7, 152.8, 145.1, 144.4, 134.0, 133.2, 129.9, 129.6, 128.6, 127.8, 127.1; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{AuClNO}$  ( $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ ) 413.9954, found 413.9973.

**Preparation of 53**: To the solution of **49** (162 mg, 0.36 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) 6 mL was added carboxymethylamine hemihydrochloride **52** (42.2 mg, 0.38 mmol). After the solution was stirred at room temperature for 16 hours, white precipitate was filtered and washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to give **53** as white solid (97.0 mg, 51%):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.34 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.50 (d,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 7.96 (td,  $J = 5.7, 3.7$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 7.31 (dd,  $J = 8.0, 4.5$  Hz, 1H), 4.92 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  171.2, 153.7, 153.3, 143.9, 138.1, 134.1, 130.6, 130.4, 129.4, 129.3, 128.9, 128.4, 72.4, ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{AuClN}_2\text{O}_3$  ( $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ ) 487.0118, found 487.0136.

## Preparation of Coumarin 58

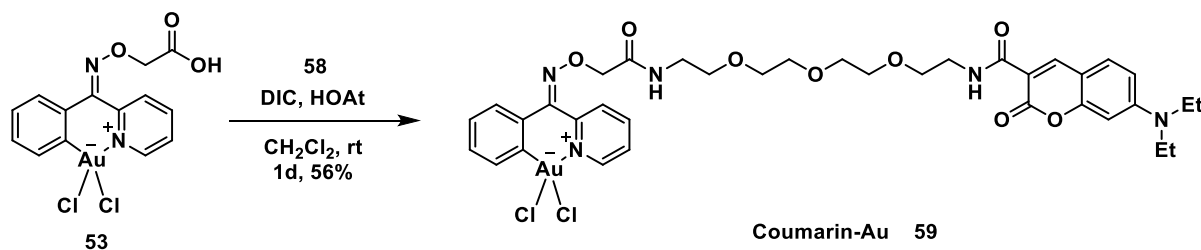


**Preparation of 55**<sup>[42]</sup>: A solution of ethyl 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylate **54** (1.0 g, 3.5 mmol) and NaOH (180 mg, 4.5 mmol) in MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) 20 mL was refluxed for 2 h. The resulting mixture was then cooled to room temperature and acidified to pH 2 by 3 M HCl. The resulting crude was then filtrated and washed by H<sub>2</sub>O and small amount of cold MeOH to give **55** as orange solid (891 mg, 90%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.34 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.71 (dd, *J* = 9.1, 2.4 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.7, 164.6, 158.2, 153.9, 150.4, 132.1, 111.0 (2C), 108.7, 97.0, 45.5 (2C), 12.5 (2C); ESI-HRMS *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>4</sub> ([M+Na]<sup>+</sup>) 284.0893, found 284.0893.

**Preparation of 57**: To a solution of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid **55** (117 mg, 0.45 mmol), DIC (85.1 μL, 0.54 mmol), DIEA (228 μL, 1.34 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4.5 mL was added 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine **56** (89.0 μL, 0.45 mmol). The solution was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere. After the solution was stirred for overnight at room temperature, DMF was removed *in vacuo*. The residue was extracted with CHCl<sub>3</sub> and washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo* to give **57** as yellow oil (192 mg, 94%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.01 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.71-3.66 (m, 14H), 3.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.39 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.4, 162.7, 157.8, 152.6, 148.2, 131.2, 110.6, 110.0, 108.5, 96.8, 70.9, 70.9, 70.8, 70.8, 70.2, 70.0, 50.9, 45.2 (2C), 39.6, 12.6 (2C); ESI-HRMS *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 462.2347, found 462.2347.

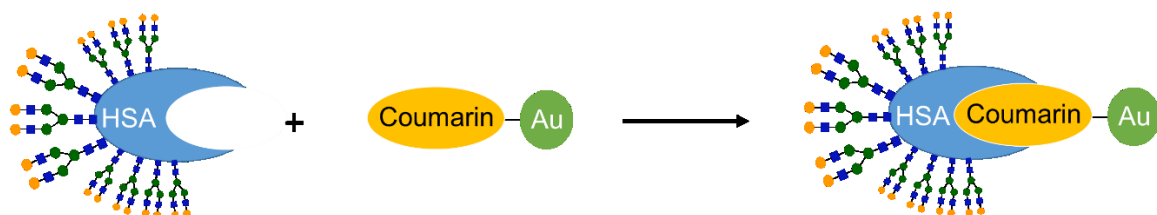
**Preparation of 58:** A solution of **57** (184 mg, 0.40 mmol) and Pd/C (94 mg) in MeOH 4 mL was stirred for 4 hours under H<sub>2</sub> atmosphere (balloon) at room temperature. The catalyst was removed through Celite and washed with MeOH. The filtrate was concentrated *in vacuo* and taken up with CHCl<sub>3</sub> 10 mL and extracted with H<sub>2</sub>O 10 mL. The aqueous layer was concentrated *in vacuo* to give **58** as yellow oil (162 mg, 90%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.10 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.65 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.94 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.76 (dd, *J* = 5.4, 3.2 Hz, 2H), 3.71-3.64 (m, 10H), 3.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.25 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  163.6, 162.8, 157.6, 152.7, 148.4, 131.3, 110.1, 109.5, 108.3, 96.6, 70.4, 70.3, 70.3, 70.2, 70.0, 66.9, 45.1 (2C), 40.0, 39.5, 12.5 (2C); ESI-HRMS *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 436.2442, found 436.2445.

### Preparation of Coumarin 59

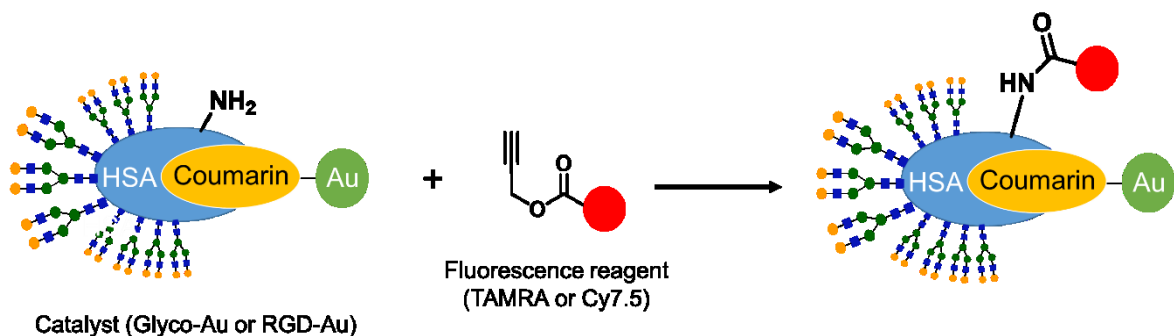


**Preparation of Coumarin-Au 59:** To a solution of **53** (80.3 mg, 0.15 mmol), HOAt (23.0 mg, 0.17 mmol) and **58** (67.0 mg, 0.15 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 mL was added DIC (27.0  $\mu$ L, 0.17 mmol). After the solution was stirred overnight under N<sub>2</sub> atmosphere at room temperature, the solution was washed with H<sub>2</sub>O and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by silica gel column chromatography, using CHCl<sub>3</sub>-MeOH (25:1) to give **59** as yellow oil (89.3 mg, 56%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.47 (dd, *J* = 5.8, 0.7 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.25 (td, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.68 (td, *J* = 7.2, 1.8 Hz, 2H), 7.42 (dd, *J* = 7.2, 1.7 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.24-7.22 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.97 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 3.64-3.62 (m, 16H), 3.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168.4, 163.4, 162.9, 157.8, 153.8, 152.8, 152.0, 148.3, 145.3, 142.2, 138.5, 133.6, 131.3, 130.4, 129.6, 128.84, 128.75, 127.5, 127.1, 110.3, 110.0, 108.4, 96.6, 74.3, 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.0, 69.7, 45.2 (2C), 39.6, 39.3, 12.6 (2C); ESI-HRMS *m/z* calcd for C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>AuClN<sub>5</sub>O<sub>8</sub> ([M-Cl]<sup>+</sup>) 904.2382, found 904.2386.

**Preparation of Glyco-Au complexes: Conjugation of coumarin-Au with corresponding glyocluster to form the Glyco-Au, RGD-Au, HSA-Au complexes**

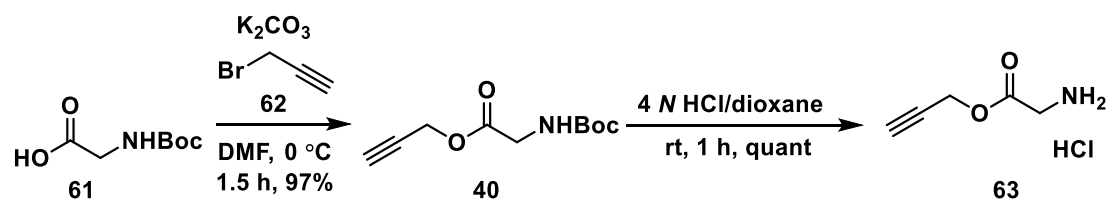


To a solution of Glyocluster (20 nmol) in H<sub>2</sub>O 200  $\mu$ L was added coumarin-Au **59** (20 nmol) in acetonitrile 2.0  $\mu$ L. The solution was mildly mixed and incubated for 24 hours. The solution was then concentrated and washed with H<sub>2</sub>O using Microcon® centrifugal filters (10 kDa). Generation of the **Glyco-Au** complex was detected by fluorescence analysis (ex/em=420 nm/460 nm).



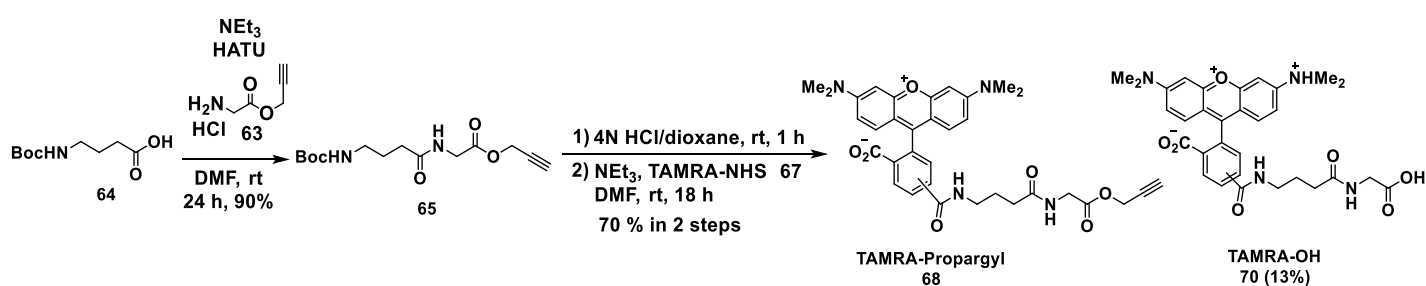
To a solution of **Glyco-Au<sup>Gal</sup> 60**, **RGD-Au 105** (10 nmol) in PBS-DMSO (4:1) 0.5 mL was added TAMRA-Propargyl **68** (1:10 ratio uses 61.1  $\mu$ g, 100 nmol), or Cy7.5-Propargyl **75** (107  $\mu$ g, 100 nmol). The solution was slowly shaken at 37 °C. Following specific time points (10, 60, 120, 330, 1440 min), 10  $\mu$ L of resulting solution was washed with PBS-DMSO (4:1) for six times using Microcon® centrifugal filters. The fluorescence intensity of residue was measured with spectrofluorometer (ex/em=560 nm/585 nm or 780 nm/830 nm).

## Preparation of TAMRA-Propargyl



**Preparation of 40**<sup>[44]</sup>: To a solution of Boc-Gly-OH **61** (500 mg, 2.9 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (394 mg, 2.9 mmol) in dry DMF 5.7 mL was added propargyl bromide **62** (216 μL, 2.9 mmol). The solution was stirred for 1.5 hours under N<sub>2</sub> atmosphere at 0 °C. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was extracted with CHCl<sub>3</sub> and washed with brine. The organic layer was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography using hexane:EtOAc (10:1) to give **40** as white solid (589 mg, 97%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.19 (s, 1H), 4.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.7, 155.6, 80.0 (2C) 75.4, 52.5, 42.2, 28.2; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 214.11, found 214.11.

**Preparation of 63**<sup>[35]</sup>: A solution of **40** (213 mg, 1.0 mmol) in 4N HCl/dioxane 5 mL was stirred for 1 hour at room temperature. The white precipitate was filtered and washed with EtOAc to give **63** as white solid (148 mg, quant): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.62 (s, 3H), 4.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.68 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.1, 78.67, 77.65, 53.1; ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 114.06, found 114.06.



**Preparation of 65**: To a solution of **63** (50.0 mg, 0.33 mmol), HATU (125 mg, 0.33 mmol) and *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-aminobutyric acid **64** (64.4 mg, 0.32 mmol) in DMF 1.6 mL was added triethylamine (87.9 μL, 0.64 mmol). The solution was stirred for 24 hours at room temperature. The resulting mixture was extracted with EtOAc and washed with brine. The organic layer was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography using hexane:EtOAc (1:1) to give compound **65** (88.5 mg, 90%) as a white

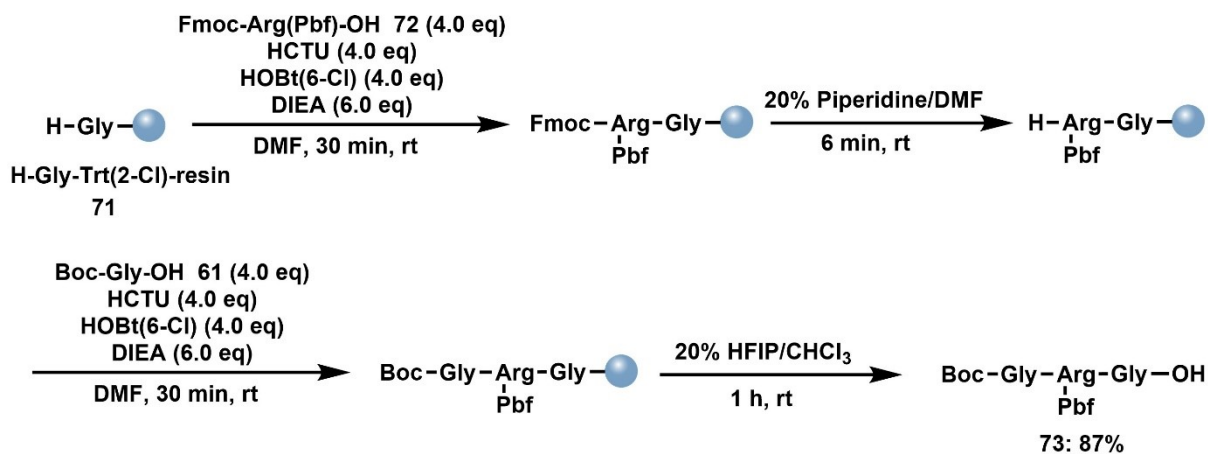
solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.84 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.75 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 4.07 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.96 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.20 (m, 2H), 2.54 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 2.31 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.82 (quin,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.44 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.4, 169.3, 156.5, 79.2, 75.4, 52.6, 41.1, 39.4, 38.5, 33.0, 28.3, 26.3; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 299.1601, found 299.1605.

**Preparation of TAMRA-Propargyl 68:** A solution of **65** (3.0 mg, 10.0  $\mu\text{mol}$ ) in 4N HCl/dioxane 1 mL was stirred for 1 hour at room temperature. The white precipitate was filtered and washed with EtOAc to give the amine, which was used without further purification.

To a solution of amine and TAMRA-NHS **67** (5.0 mg, 9.3  $\mu\text{mol}$ ) in dry DMF 200  $\mu\text{L}$  was added triethylamine (5.3  $\mu\text{L}$ , 38  $\mu\text{mol}$ ). The solution was stirred for 18 hours under  $\text{N}_2$  atmosphere at room temperature. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse phase HPLC (10-90% of B over 40 min) to give TAMRA-Propargyl **68** (4.1 mg, 70%, in 2 steps) as red solid:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.82 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 8.45 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 8.36 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 8.23 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.53-6.47 (m, 5H), 4.73 (d,  $J = 3.0$  Hz, 2H), 3.88 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.57 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 3.34 (m, 2H), 2.94 (s, 12H), 2.24 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 1.80 (quin,  $J = 7.5$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ , observed)  $\delta$  172.4, 169.4, 168.4, 164.7, 154.8, 152.1, 152.0, 136.2, 134.5, 128.4, 126.8, 124.1, 123.1, 109.0, 105.6, 98.0, 86.7, 78.2, 77.9, 52.1, 40.4, 32.6, 25.1; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 611.2500, found 611.2547.

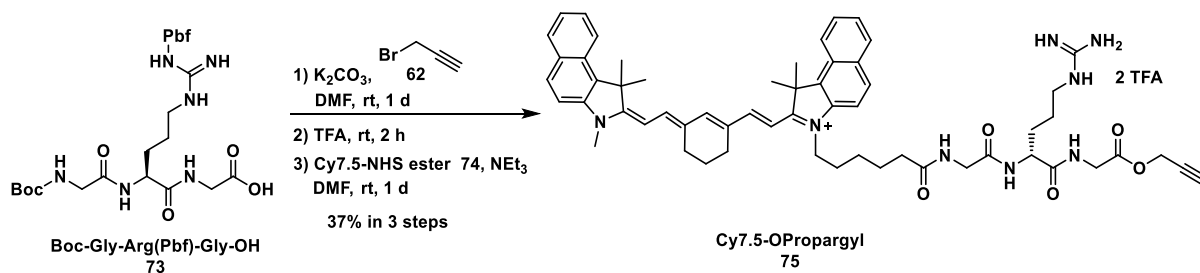
**TAMRA-OH 70:** Red solid (13%):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.79 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 8.43 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 8.38 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 8.23 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.51-6.47 (m, 5H), 3.87 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.28 (m, 2H), 2.94 (s, 12H), 2.24 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 1.80 (quin,  $J = 7.5$  Hz, 2H); ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 573.2344, found 573.2366.

## Preparation of Cy7.5-Propargyl



H-Gly-Trt(2-Cl) resin **71** (218 mg, 0.2 mmol) was swollen with DMF for 30 min. To the resin **71** was added Fmoc-Arg(Pbf)-OH · 0.1 acetone **72** (532 mg, 0.8 mmol), HCTU (331 mg, 0.8 mmol) HOBt(6-Cl) (136 mg, 0.8 mmol) in DMF 2 mL and DIEA (204  $\mu$ L, 1.2 mmol) and the suspension was shaken for 30 min. The coupling reaction was monitored by KISER test reagent (purchased from Watanabe Chemical Co., Ltd.) for detection of amino group. The resin was washed with DMF (1 min $\times$ 3). Fmoc deprotection was performed by the use of 20% piperidine in DMF (2 min $\times$ 3) and washed with DMF (1 min $\times$ 3). Peptide elongation was carried out manually with **61** (140 mg, 0.8 mmol) by using Fmoc-amino acid/HCTU/HOBt(6-Cl)/DIEA (4/4/4/6 eq) in DMF for 30 min. The protected peptide was treated with 20% 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) for 1 hour. The crude peptide was precipitated with cold diethyl ether, and the precipitate was dried *in vacuo* to obtain Boc-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH **73** as white solid (111 mg, 87%):  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  4.43 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.25-3.10 (m, 2H), 2.98 (s, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.95-1.80 (m, 1H), 1.71-1.49 (m, 3H), 1.44 (s, 6H), 1.42 (s, 9H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.2, 173.1, 172.5, 159.8, 158.6, 158.1, 139.4, 134.3, 133.5, 126.0, 118.4, 87.7 (2C), 80.8, 53.9, 44.7, 43.9, 42.0, 30.3, 28.7 (6C), 19.6, 18.4, 12.5; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 641.2963, found 641.2977.



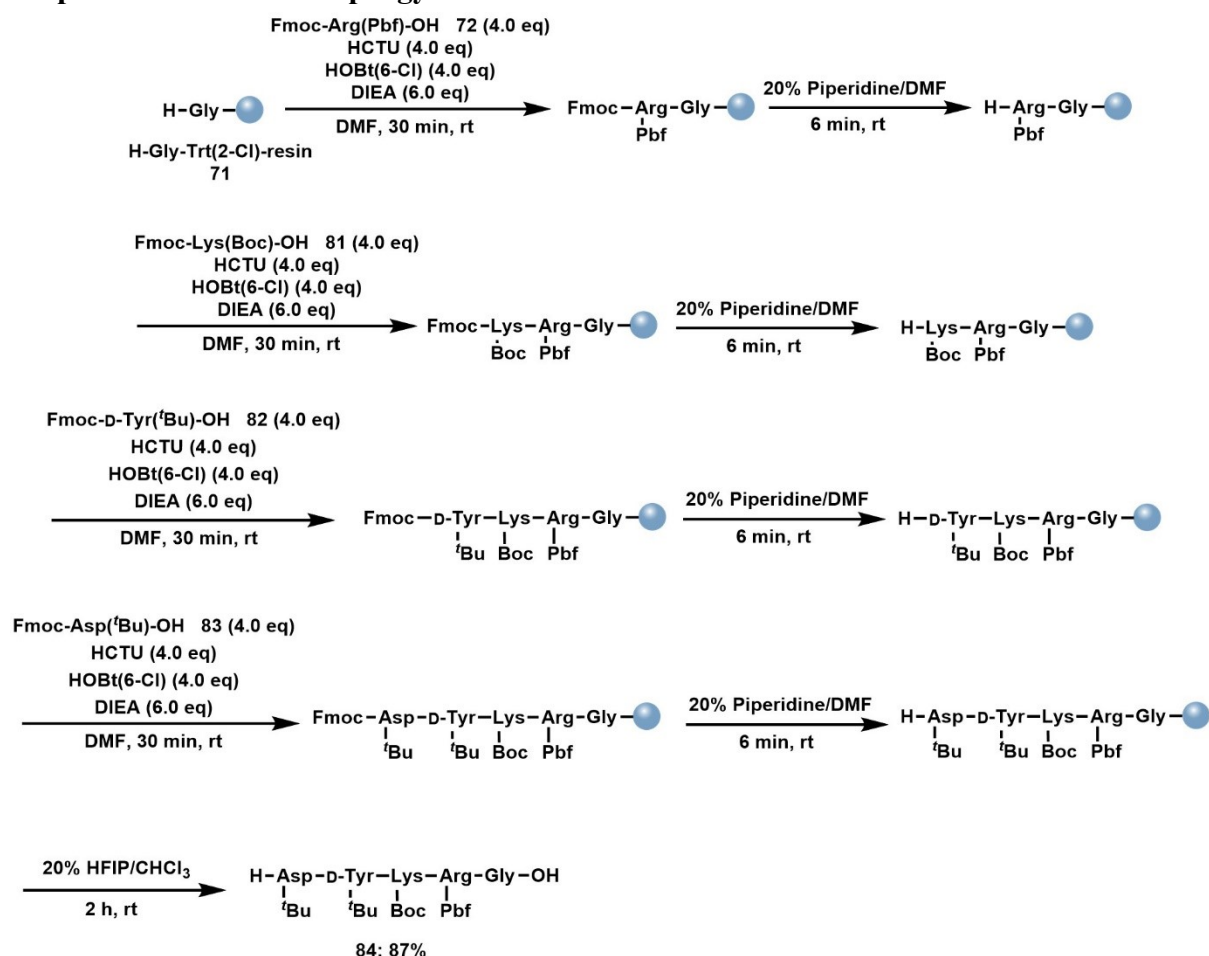


**Preparation of Cy7.5-Propargyl 75:** To a solution of Boc-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH **73** (3.0 mg, 4.7  $\mu\text{mol}$ ) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.64 mg, 4.7  $\mu\text{mol}$ ) in dry DMF 10  $\mu\text{L}$  was added propargyl bromide **62** (0.37  $\mu\text{L}$ , 4.7  $\mu\text{mol}$ ) in dry DMF 10  $\mu\text{L}$ . The solution was stirred for overnight under  $\text{N}_2$  atmosphere at room temperature. The resulting mixture was concentrated *in vacuo* and extracted with EtOAc and washed with brine. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated *in vacuo* to give propargyl ester, which was used without further purification. A solution of propargyl ester in TFA 0.5 mL was stirred for 2 hours at room temperature. TFA was removed *in vacuo* and washed with EtOAc to give the amine which was used without further purification.

To the solution of amine and Cy7.5-NHS ester **74** (3.5 mg, 4.7  $\mu\text{mol}$ ) in DMF 50  $\mu\text{L}$  was added triethylamine (3.1  $\mu\text{L}$ , 32  $\mu\text{mol}$ ). After the solution was stirred for overnight under  $\text{N}_2$  atmosphere at room temperature, DMF was removed *in vacuo*. The residue was purified by the reverse-phase HPLC (40-90% of B over 40 min) to give Cy7.5-Propargyl **75** as a dark blue solid (2.1 mg, 37%, in 3 steps):  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , observed)  $\delta$  8.47 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 8.26-8.23 (m, 2H), 8.09-8.03 (m, 6H), 7.81 (t,  $J = 14.5$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 7.70-7.67 (m, 2H), 7.66 (td,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, 2H), 7.53-7.46 (m, 3H), 6.23-6.15 (m, 2H), 4.71 (d,  $J = 1.5$  Hz, 2H), 4.33 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.24 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 3.90-3.86 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.72 ( $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.56 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 3.11-3.01 (m, 2H), 2.63 (d,  $J = 1.5$  Hz, 2H), 2.36 (d,  $J = 2.0$  Hz, 2H), 2.14 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.94 (s, 12H), 1.89-1.81 (m, 1H), 1.79-1.72 (m, 3H), 1.74-1.66 (m, 1H), 1.58 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.52-1.38 (m, 5H); ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{58}\text{H}_{70}\text{N}_8\text{O}_5$  ( $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ ) 479.2729, found 479.2748.

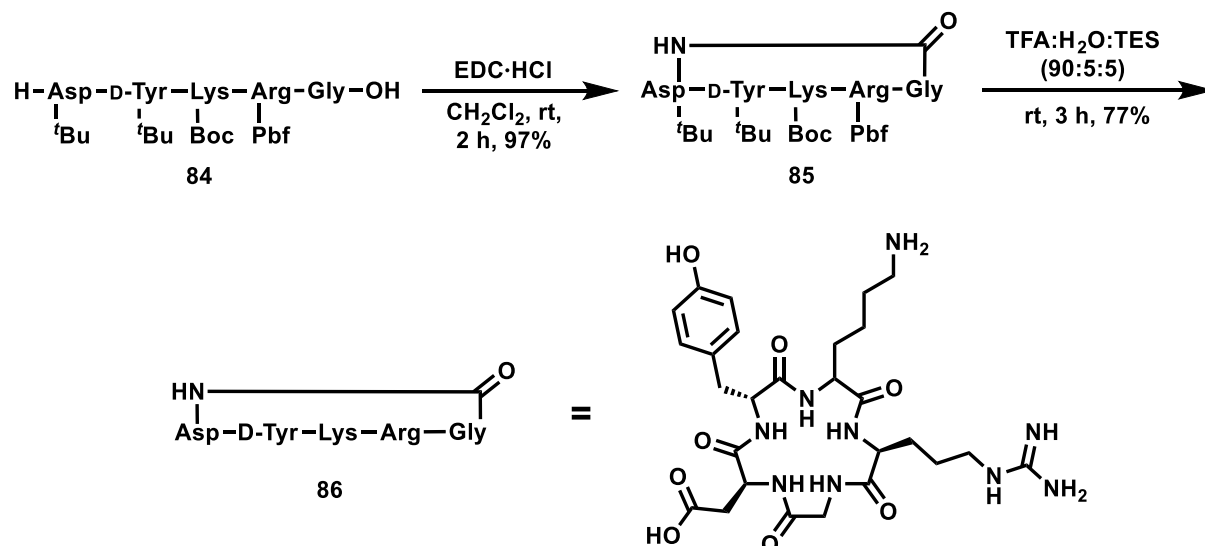
## Chapter 3

### Preparation of RGD-Propargyl



H-Gly-Trt(2-Cl) resin **71** (218 mg, 0.2 mmol) was swollen with DMF for 30 min. To the resin **71** was added Fmoc-Arg(Pbf)-OH · 0.1 acetone **72** (532 mg, 0.8 mmol), HCTU (331 mg, 0.8 mmol) HOBT(6-Cl) (136 mg, 0.8 mmol) in DMF 2 mL and DIEA (204  $\mu$ L, 1.2 mmol), then the suspension was shaken for 30 min. The coupling reaction was monitored by KISER test reagent for detection of amino group. The resin was washed with DMF (1 min $\times$ 3). Fmoc deprotection was performed by the use of 20% piperidine in DMF (2 min $\times$ 3) and washed with DMF (1 min $\times$ 3). Peptide elongation and Fmoc deprotection was carried out manually by using Fmoc-amino acid/HCTU/HOBT(6-Cl)/DIEA (4/4/4/6 eq) in DMF for 30 min and by the use of 20% piperidine in DMF (2 min $\times$ 3). After peptide elongation of 3 amino acids, the protected peptide was treated with 20% HFIP/CHCl<sub>3</sub> for 1 hour. The crude peptide was precipitated with cold diethyl ether, and the precipitate was dried *in vacuo* to obtain H-Asp(<sup>t</sup>Bu)-D-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly-OH **84** as white solid (111 mg, 87%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.46-4.38 (m, 1H), 4.21 (dd, *J* = 8.4, 5.2 Hz, 1H), 4.06-3.96 (m, 1H), 3.94 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 3.82 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 3.22-3.11 (m, 1H), 3.01-2.92 (m, 6H), 2.82-2.69 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 1.95-1.82

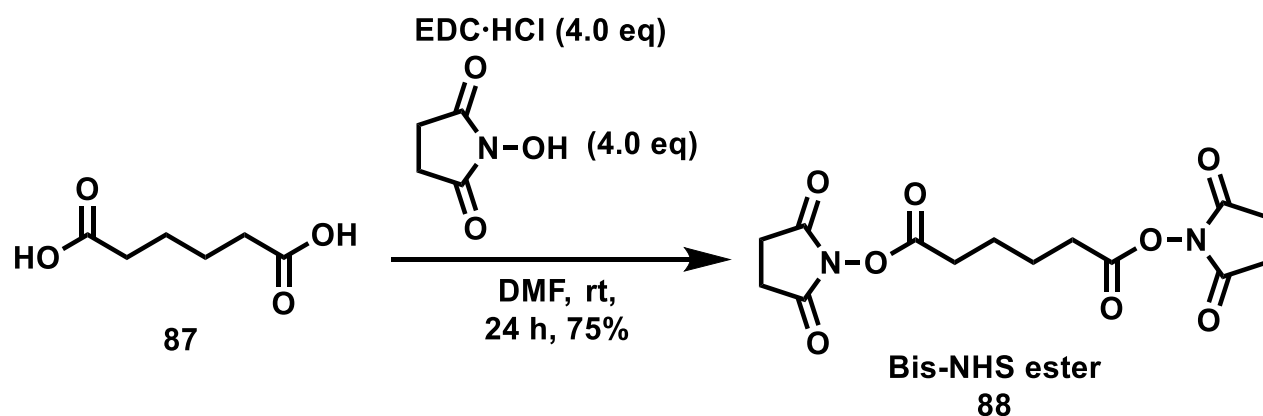
(m, 1H), 1.81-1.66 (m, 2H), 1.66-1.52 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.43 (s, 6H), 1.40 (s, 9H), 1.37-1.31 (m, 2H), 1.30 (s, 9H), 1.29-1.25 (m, 2H), 1.02-0.91 (m, 2H); ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{53}H_{84}N_9O_{14}S$  ( $[M+H]^+$ ) 1102.5853, found 1102.5880.



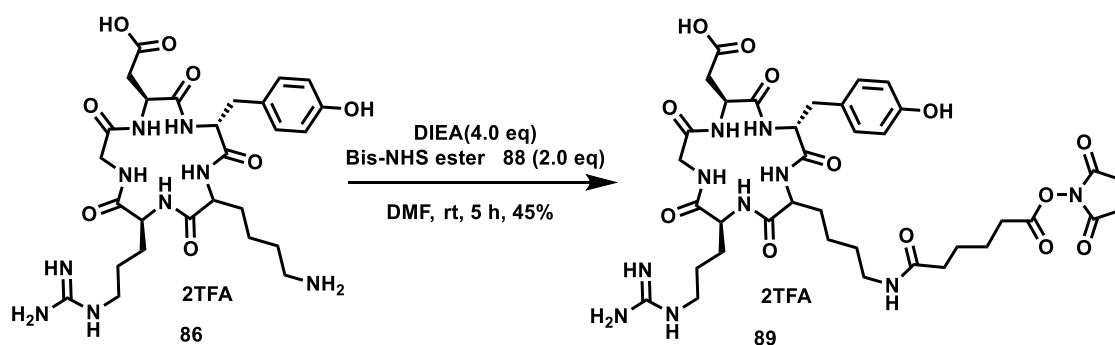
**Preparation of 85:** To the stirred solution of H-Asp(<sup>t</sup>Bu)-D-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly-OH **84** (500 mg, 0.45 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  10 mL was added EDC·HCl (95.0 mg, 0.50 mmol) and HOBT (67.5 mg, 0.50 mmol). The solution was stirred for 20 min at room temperature and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 mL. The organic layer was concentrated *in vacuo* to obtain c(Asp(<sup>t</sup>Bu)-D-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly) **85** (477 mg, 97%) as white solid.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.11 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.72 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 4.48 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.22-4.10 (m, 2H), 4.92-3.82 (m, 1H), 3.39 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 3.20-3.08 (m, 2H), 3.02-2.88 (m, 6H), 2.78-2.66 (m, 1H), 2.54 (d,  $J = 4.8$  Hz, 3H), 2.48 (d,  $J = 5.2$  Hz, 3H), 2.05 (d,  $J = 4.8$  Hz, 3H), 1.85-1.72 (m, 1H), 1.69-1.52 (m, 2H), 1.49-1.31 (m, 6H), 1.44 (s, 9H), 1.42 (s, 6H), 1.29 (s, 9H), 0.99 (m, 2H); ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{53}H_{82}N_9O_{13}S$  ( $[M+H]^+$ ) 1084.5747, found 1084.5788.

**Preparation of c(RGDyK) 86:** c(Asp(<sup>t</sup>Bu)-D-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly) **85** (50.0 mg, 0.042 mmol) was added TFA-TES- $\text{H}_2\text{O}$  (90:5:5) 2 mL and stirred for 2 hours at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo* and purified with RP-HPLC using a preparative column at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of MeCN/0.1%TFA (1-80% for 40 min) to obtain c(RGDyK) **86** (27.4 mg, 77%) as white solid:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.68 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.74 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.41 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.28 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.22 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H), 3.91 (dd,  $J = 11.6, 3.6$  Hz, 1H), 3.31 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H), 3.25-3.05 (m, 2H), 2.94-2.72 (m, 5H), 2.56 (dd,  $J = 16.0, 6.8$  Hz, 1H), 1.90-1.78 (m, 1H), 1.74-1.35 (m, 7H), 0.95 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,

CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  173.4, 172.8, 172.4, 172.1, 171.4, 170.9, 157.3, 156.0, 130.2, 127.3, 116.9, 115.1, 56.0, 54.6, 52.4, 49.6, 43.6, 40.6, 39.1, 36.2, 34.9, 30.4, 28.1, 26.6, 25.0, 22.8; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 620.3151, found 620.3146.

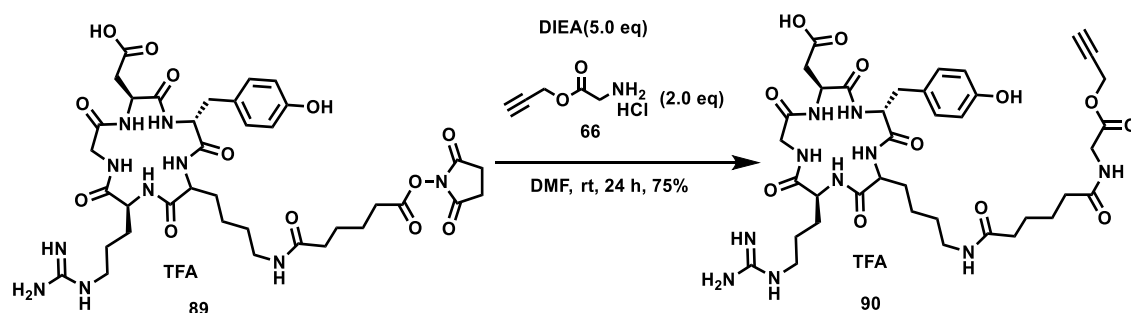


**Preparation of 88**<sup>[57]</sup>: To a stirred solution of adipic acid **87** (1.0 g, 6.84 mmol) in DMF 20 mL was added *N*-hydroxysuccinimide (3.0 g, 27.4 mmol) and EDC·HCl (5.14 g, 27.4 mmol). After the solution was stirred at room temperature for 24 hours, the reaction mixture was evaporated *in vacuo*, and the crude was dissolved into acetone 200 mL and poured into 1 M HCl aq 250 mL. After 2 h, white precipitate was filtered and washed with water and acetone to give Bis-NHS compound **88** as white solid (1.75 g, 75%): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.84 (s, 4H), 2.83 (s, 4H), 2.67 (t,  $J = 3.5$  Hz, 4H), 1.89 (t,  $J = 3.5$  Hz, 4H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.4, 168.4, 30.7, 25.9, 23.9; ESI-HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 341.0979, found 341.0973.



**Preparation of 89**: To the stirred solution of c(RGDyK) **86** (28.8 mg, 0.034 mmol) and Bis-NHS compound **88** (23.2 mg, 0.068 mmol) in DMF 680  $\mu$ L was added DIEA (16.8  $\mu$ L, 0.10 mmol). After the solution was stirred at room temperature for 24 hours, the resulting residue was purified by RP-HPLC using a preparative column at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of MeCN/0.1%TFA (1-80% for 40 min) to obtain c(RGDyK) NHS ester **89** (14.0 mg, 45%): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.00 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 6.68 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 4.74

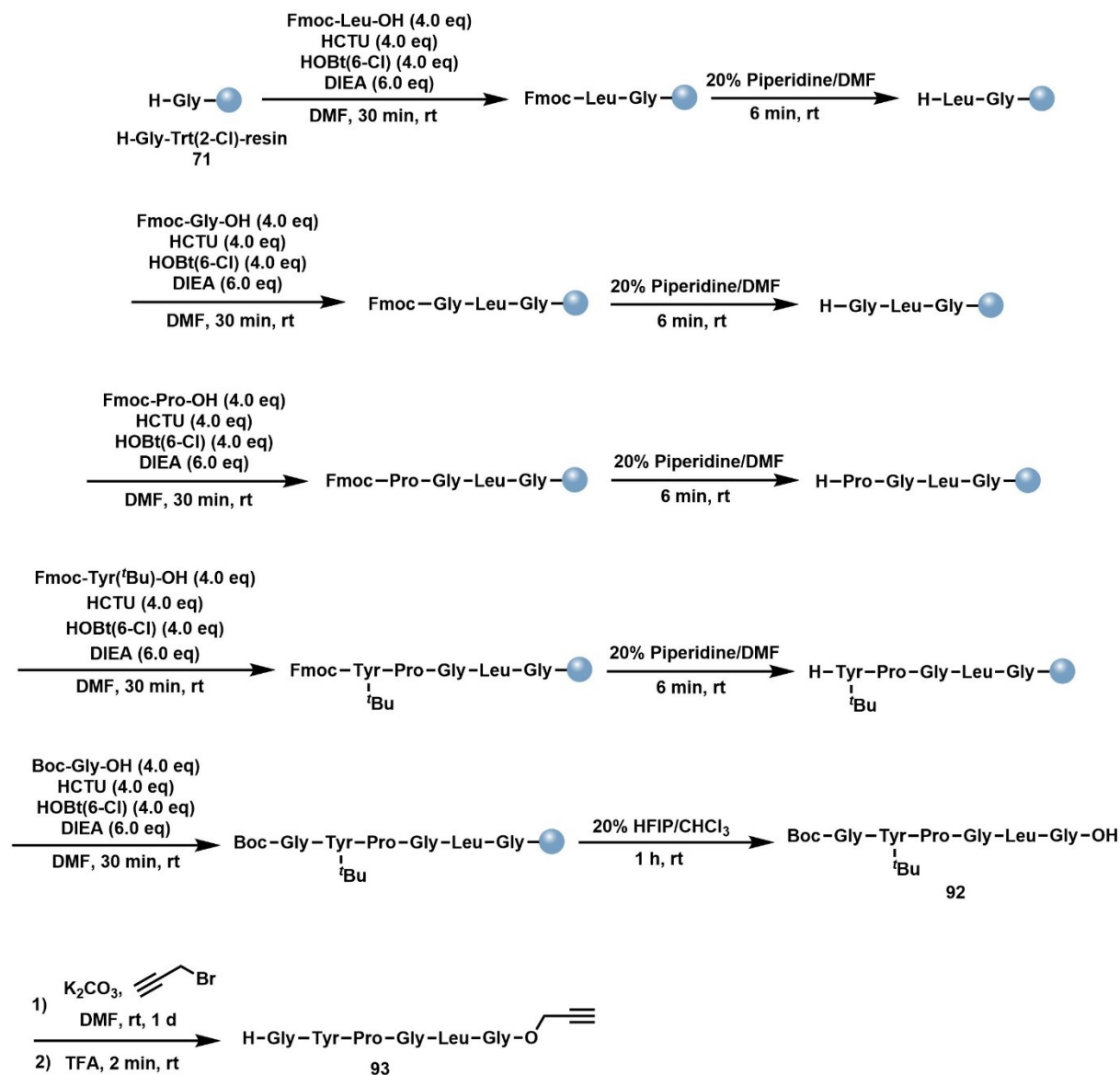
(t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.41 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.26-4.30 (m, 2H), 3.91-3.86 (m, 1H), 3.22-3.18 (m, 1H), 3.14-3.10 (m, 1H), 3.09 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.91-2.85 (m, 2H), 2.84-2.78 (m, 5H), 2.59 (t,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 2.64-2.60 (m, 1H), 2.58 (dd,  $J = 16.5, 9.0$  Hz, 1H), 2.19 (t,  $J = 7.0$  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.



**Preparation of 90:** To the stirred solution of c(RGDyK)-OSu **89** (4.2 mg, 3.9  $\mu$ mol) and H-Gly-OProp·HCl (1.1 mg, 7.8  $\mu$ mol) in DMF 200  $\mu$ L was added DIEA (3.3  $\mu$ L, 19.6  $\mu$ mol). After the solution was stirred at room temperature for 24 hours, the resulting residue was purified by RP-HPLC using a preparative column at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of MeCN/0.1%TFA (1-80% for 40 min) to obtain c(RGDyK)-Propargyl **90** (3.2 mg, 75%):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  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-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{38}H_{55}N_{10}O_{12}$  ( $[M+H]^+$ ) 843.3995, found 843.4006.

## Chapter 4

### General procedure for synthesis of 95-103.



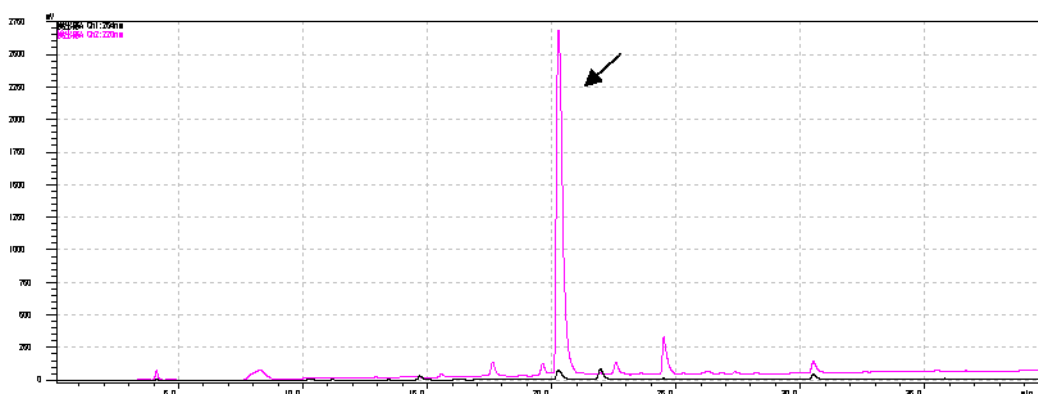
H-Gly-Trt(2-Cl) resin **71** was swollen with DMF for 30 min. To the resin **71** was added Fmoc-Leu-OH, HCTU, HOBt(6-Cl) in DMF and DIEA, and the suspension was shaken for 30 min. The coupling reaction was monitored by KISER test reagent for detection of amino group. The resin was washed with DMF (1 min×3). Fmoc deprotection was performed by the use of 20% piperidine in DMF (2 min×3) and washed with DMF (1 min×3). Peptide elongation and Fmoc deprotection was carried out manually by using Fmoc amino acid/HCTU/HOBt(6-Cl)/DIEA (4/4/4/6 eq) in DMF for 30 min and by the use of 20% piperidine in DMF (2 min×3). After peptide elongation of 3 amino acids, Boc-Gly-OH was elongated as *N*-terminus residue. The

protected peptide was treated with 20% HFIP/CHCl<sub>3</sub> for 1 hour. The crude peptide was precipitated with cold diethyl ether, and the precipitate was dried *in vacuo* to obtain Boc-Gly-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Pro-Gly-Leu-Gly-OH **92** as a crude.

To a stirred solution of **92** in DMF was added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and propargyl bromide at room temperature. After stirring for 1 d, DMF was removed *in vacuo* and the crude was extracted with CHCl<sub>3</sub> and washed with brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give propargyl ester, which was used without further purification.

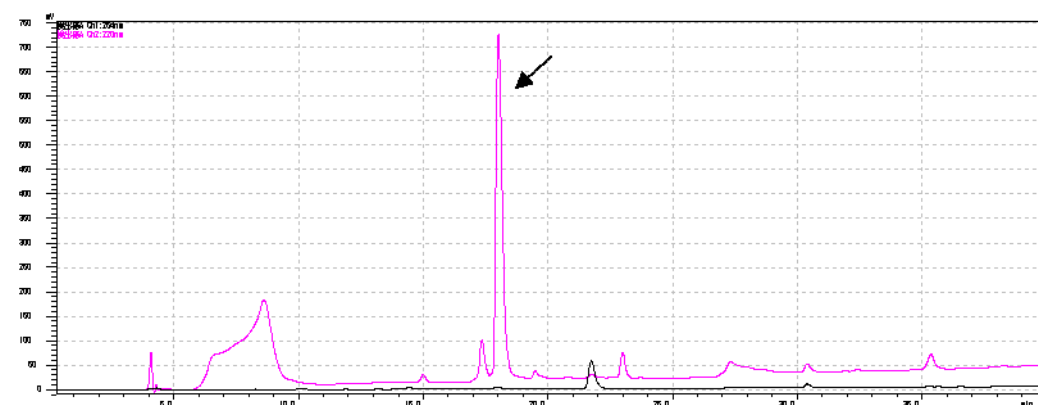
A solution of propargyl ester in TFA 0.2 mL was stirred for 2 min at room temperature. TFA was removed *in vacuo* and by RP-HPLC using a preparative column at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of MeCN/0.1%TFA (1-80% for 40 min) to obtain H-Gly-Tyr-Pro-Gly-Leu-Gly-OPropargyl **93**.

#### H-GYPGLG-OPropargyl **93**



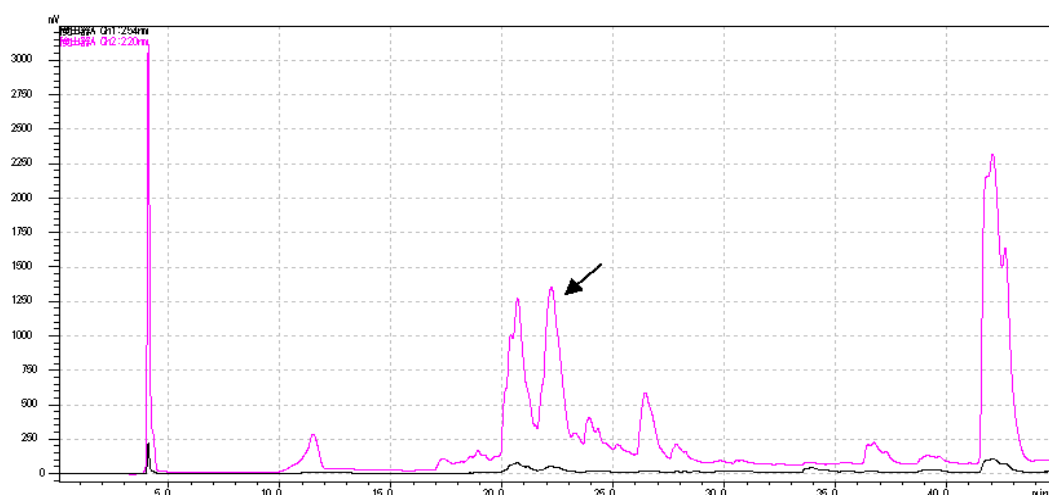
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 601.2980, found 601.2985.

#### H-GTPGLG-OPropargyl **95**



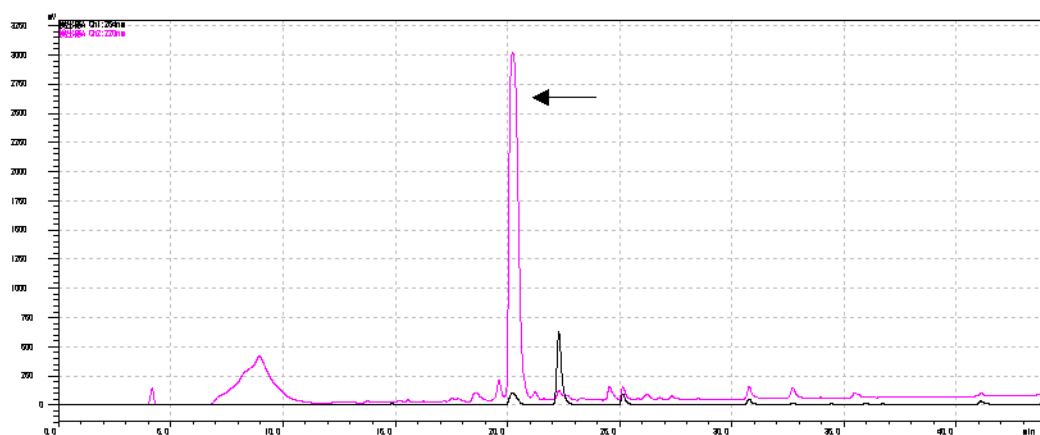
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 539.2824, found 539.2835.

### H-GSYPLG-OPropargyl **96**



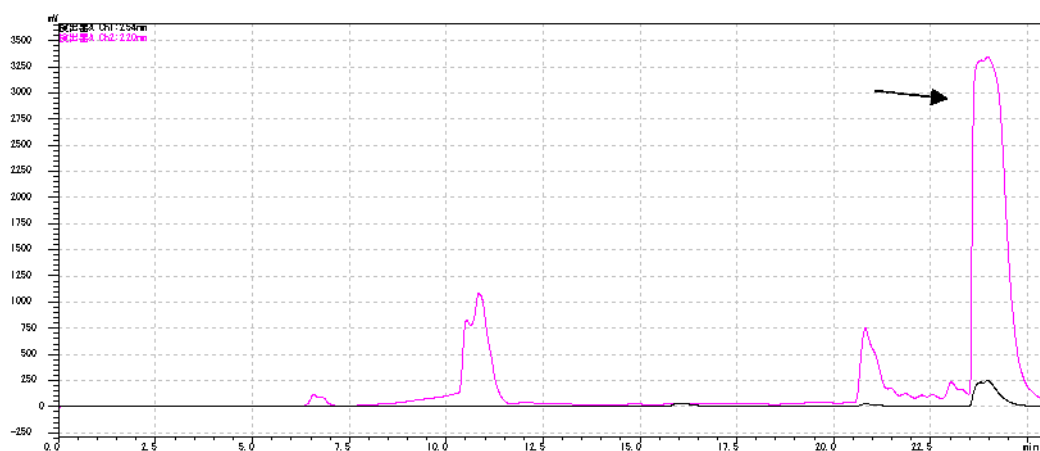
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{33}H_{41}N_6O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 665.2930, found 665.2943.

### H-AYPALG-OPropargyl **97**



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{30}H_{43}N_6O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 615.3137, found 615.3147.

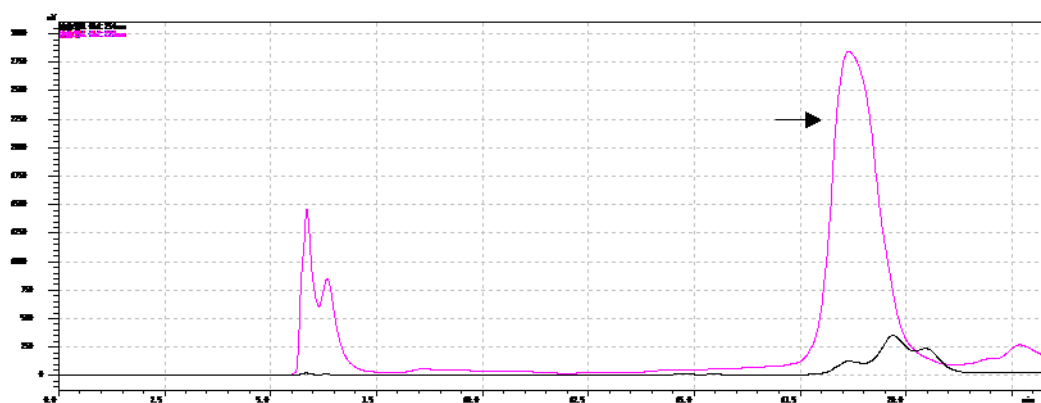
### H-FYPGLG-OPropargyl **98**



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{35}H_{45}N_6O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 677.3293, found 677.3300.

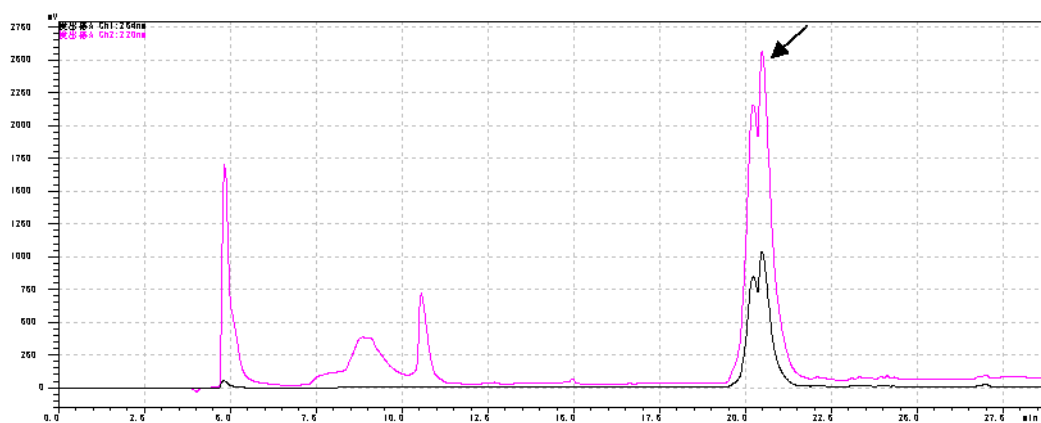


### H-GPPFGIGG-OPropargyl **99**



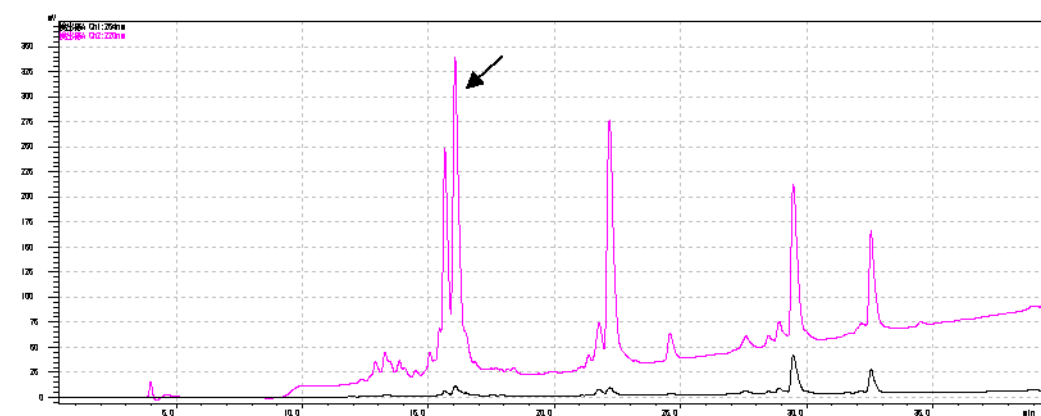
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{36}H_{51}N_8O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 739.3774, found 739.3788.

### H-GRGDG-OPropargyl **100**



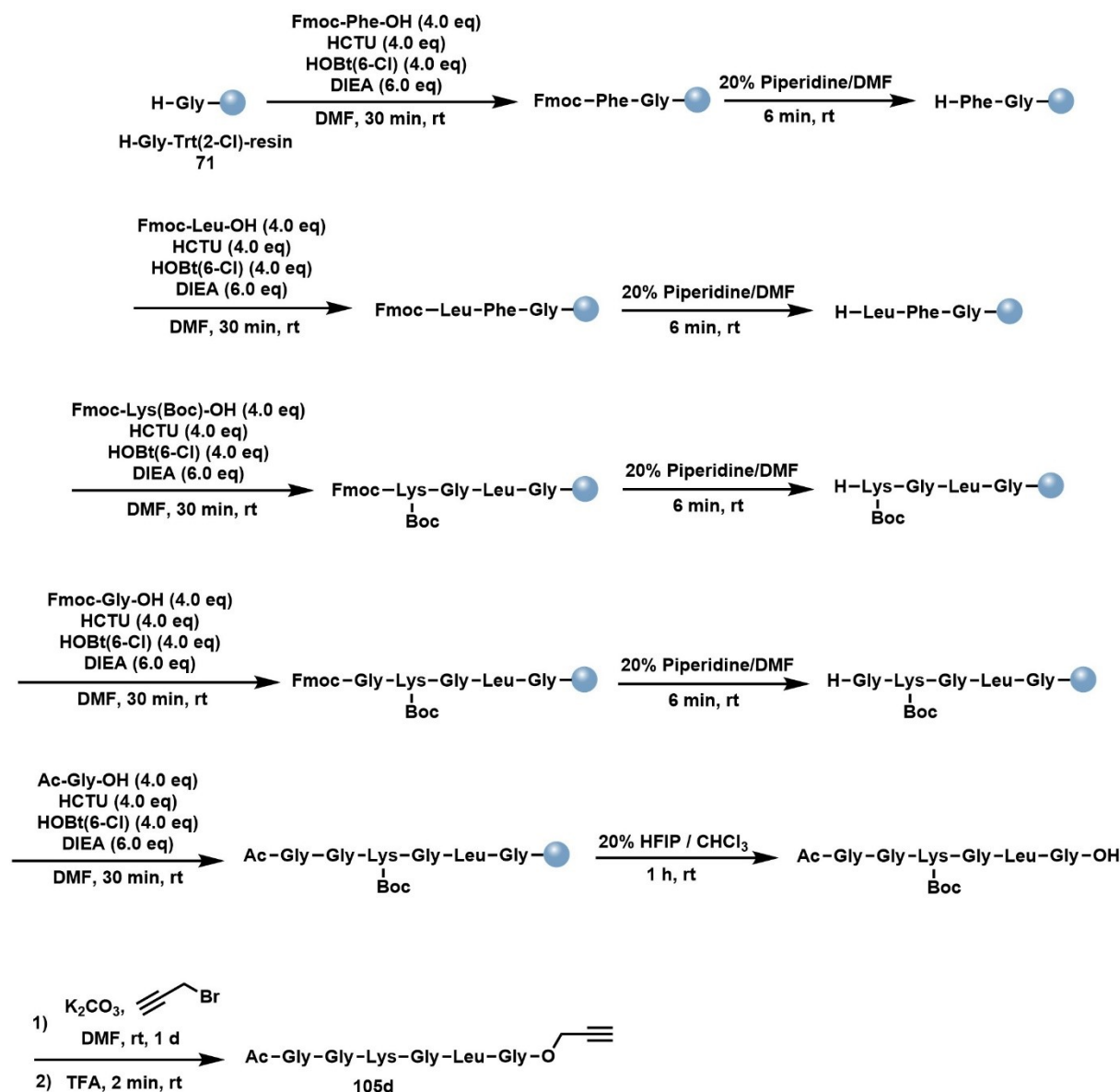
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{19}H_{31}N_8O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 499.2259, found 499.2273.

### H-GRGDyG-OPropargyl **101**



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{28}H_{40}N_9O_{10}$  ( $[M+H]^+$ ) 662.2893, found 662.2899.

## General procedure for synthesis of 102-103



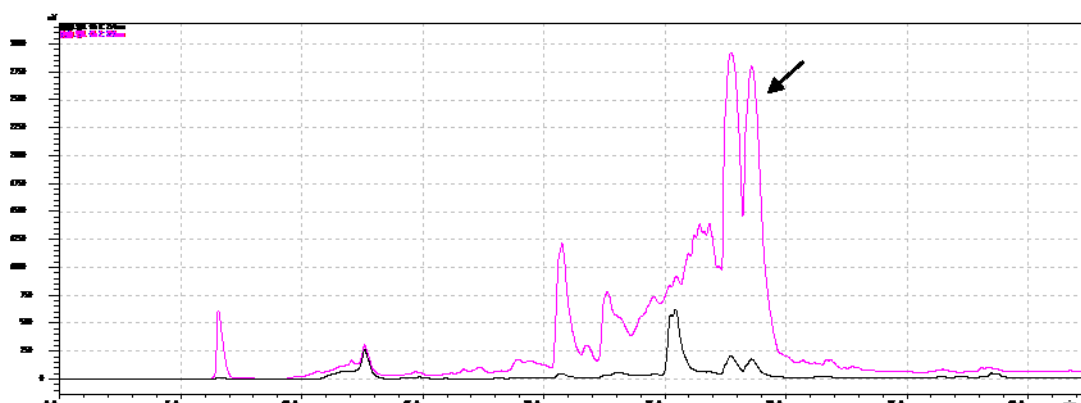
H-Gly-Trt(2-Cl) resin **71** was swollen with DMF for 30 min. To the resin **71** was added Fmoc-Phe-OH, HCTU, HOBt(6-Cl) in DMF and DIEA, and the suspension was shaken for 30 min. The coupling reaction was monitored by KISER test reagent for detection of amino group. The resin was washed with DMF (1 min×3). Fmoc deprotection was performed by the use of 20% piperidine in DMF (2 min x 3) and washed with DMF (1 min x 3). Peptide elongation and Fmoc deprotection was carried out manually by using Fmoc amino acid/HCTU/HOBt(6-Cl)/DIEA (4/4/4/6 eq) in DMF for 30 min and by the use of 20% piperidine in DMF (2 min×3). After peptide elongation of 3 amino acids, *N*-Acetyl amino acid was elongated as *N*-terminus residue of peptide. The protected peptide was treated with 20% HFIP/CHCl<sub>3</sub> for 1 hour. The crude

peptide was precipitated with cold diethyl ether, and the precipitate was dried *in vacuo* to obtain Ac-Gly-Gly-Lys(Boc)-Leu-Phe-Gly-OH as a crude.

To a stirred solution of the crude in DMF was added  $K_2CO_3$  and propargyl bromide at room temperature. After stirring for 1 d, DMF was removed *in vacuo* and the crude was extracted with  $CHCl_3$  and washed with brine. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated *in vacuo* to give propargyl ester, which was used without further purification.

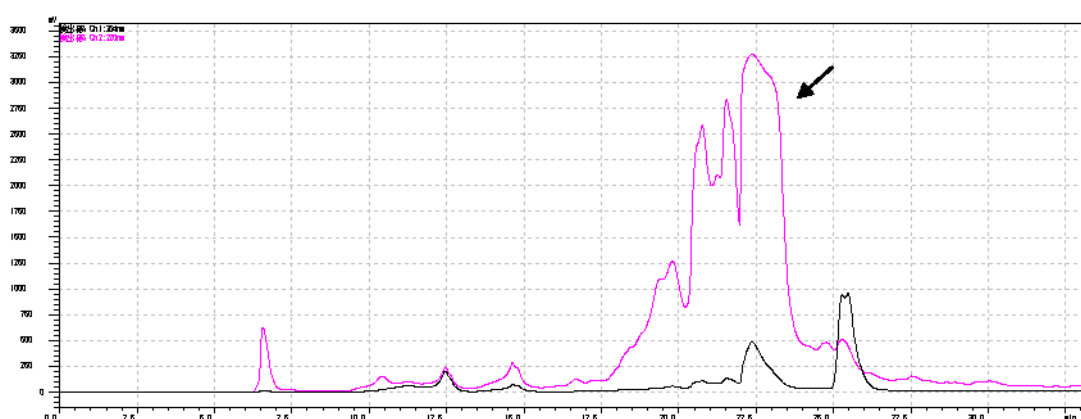
A solution of propargyl ester in TFA 0.2 mL was stirred for 2 min at room temperature. TFA was removed *in vacuo* and by RP-HPLC using a preparative column at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of MeCN/0.1%TFA (1-80% for 40 min) to obtain H-Gly-Gly-Lys-Leu-Phe-Gly-OPropargyl **103d**.

#### Ac-FYkFpG-OPropargyl **102a**



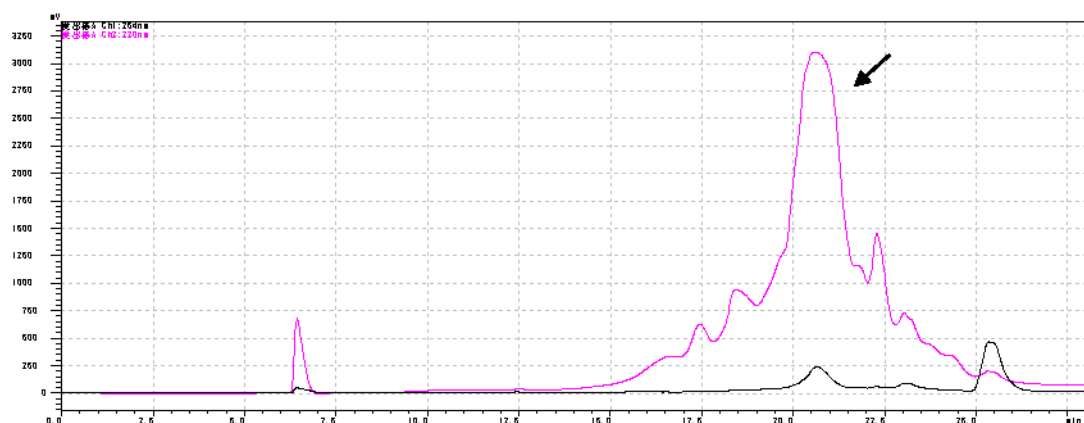
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{45}H_{56}N_7O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 838.4134, found 838.4149.

#### Ac-AYkFpG-OPropargyl **102b**



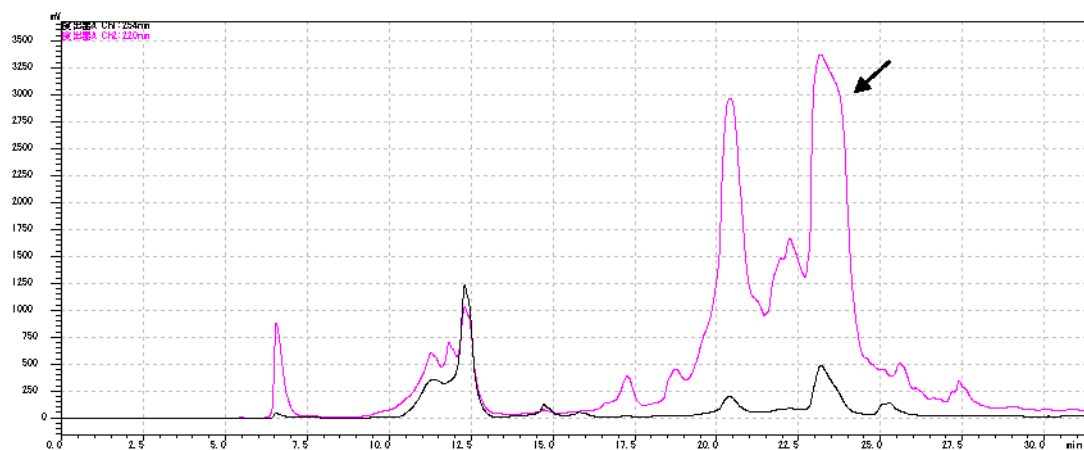
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{39}H_{52}N_7O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 762.3821, found 762.3844.

### Ac-AGkFpG-OPropargyl **102c**



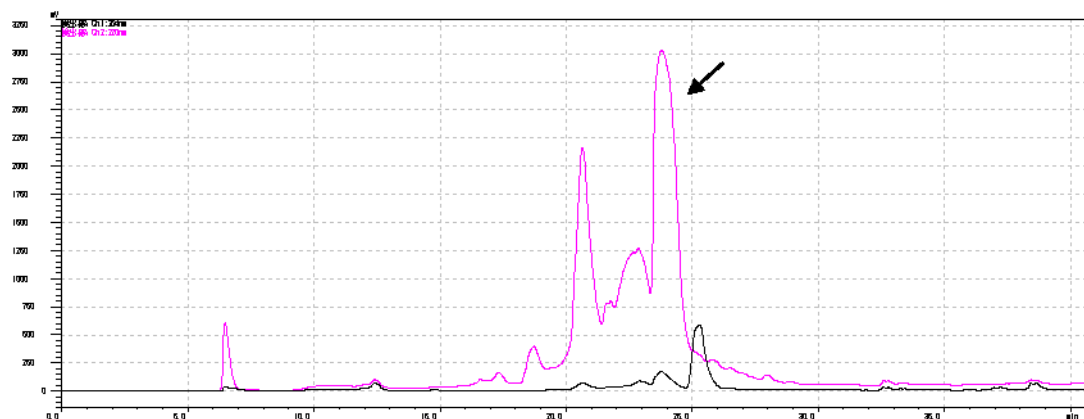
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{32}H_{46}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 656.3402, found 656.3422.

### Ac-GFkFpG-OPropargyl **102d**



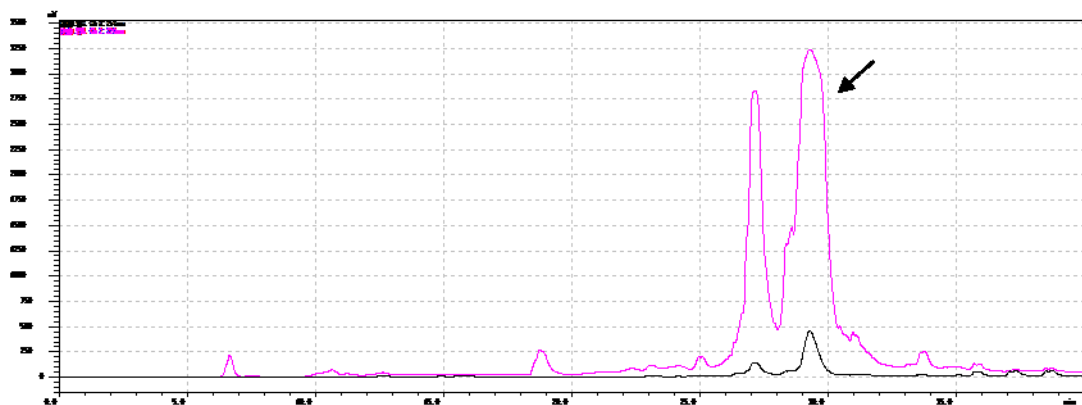
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{38}H_{50}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 732.3715, found 732.3726.

### Ac-LGkFpG-OPropargyl **102e**



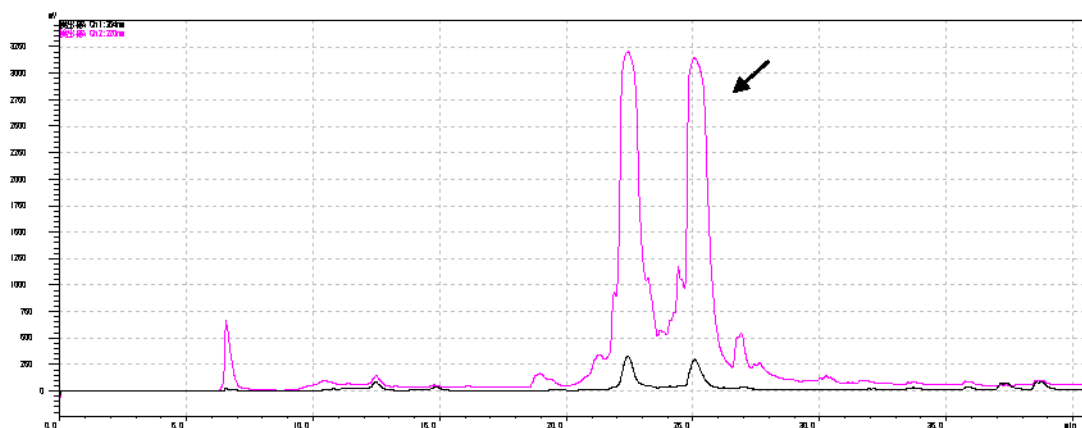
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{35}H_{52}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 698.3872, found 698.3890.

Ac-FYKLFG-OPropargyl **103a**



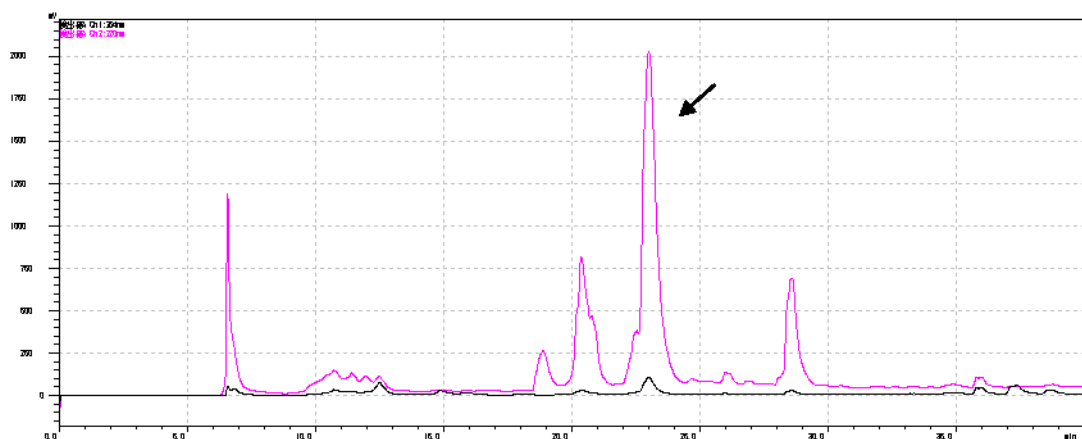
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{46}H_{60}N_7O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 854.4447, found 854.4451.

Ac-GYKLFG-OPropargyl **103b**



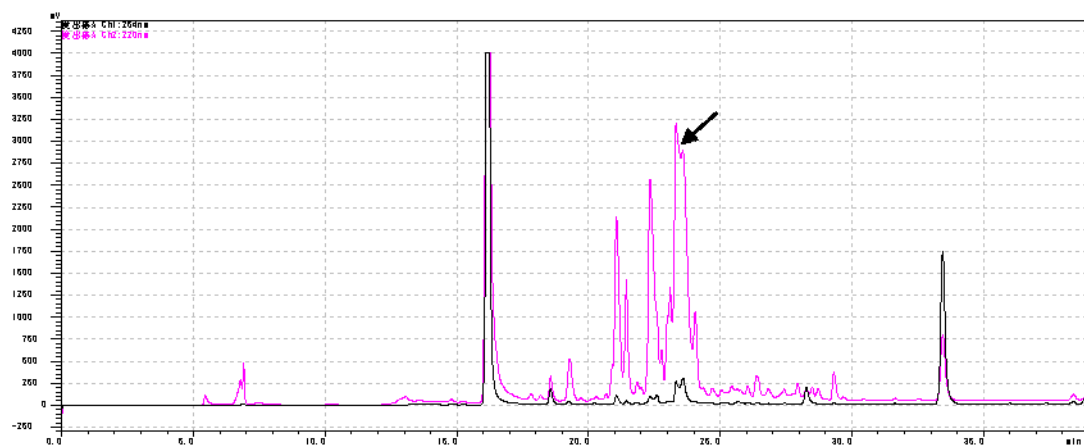
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{39}H_{54}N_7O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 764.3978, found 764.4001.

Ac-GSKLFG-OPropargyl **103c**



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{33}H_{50}N_7O_9$  ( $[M+H]^+$ ) 688.3665, found 688.3670.

# Ac-GGKLFG-OPropargyl **103d**

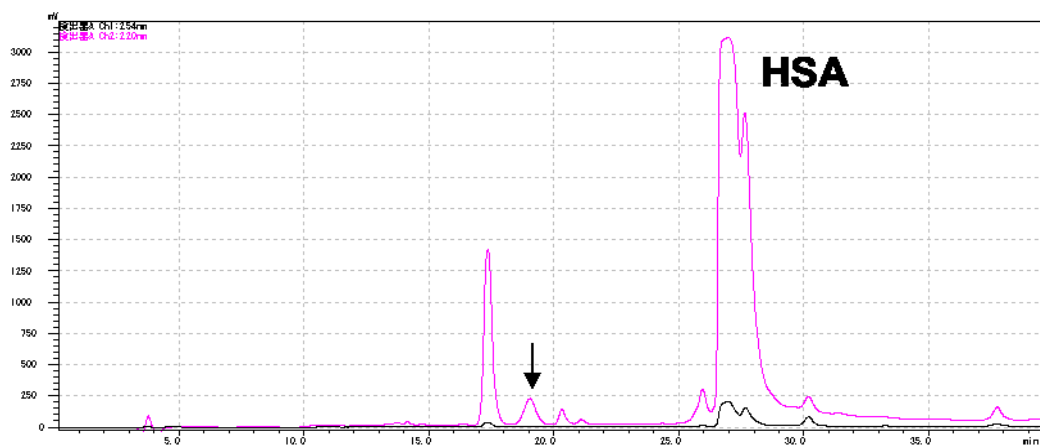


ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{32}H_{48}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 658.3559, found 658.3570.

## Peptide cyclization

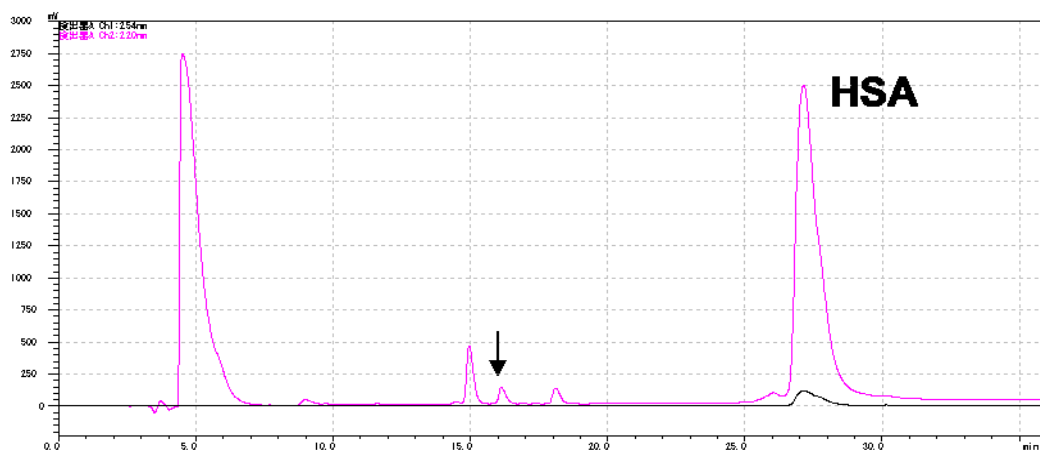
To a solution of HSA-Au catalyst 5.4 mg (80 nmol) in PBS 70  $\mu$ L was added peptide-OPropargyl substrate **95-103** (0.8  $\mu$ mol) and NEt<sub>3</sub> 0.32  $\mu$ L (2.4  $\mu$ mol). The reaction was monitored by RP-HPLC and the yield was calculated from HPLC peak.

### c(GYPGLG) **95**<sup>[62]</sup>



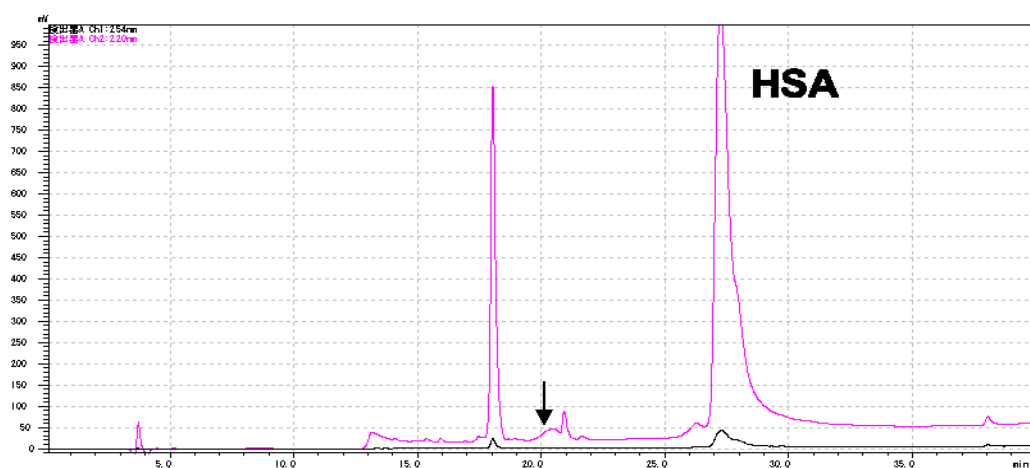
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 545.2718, found 545.2740.

### c(GTPGLG)



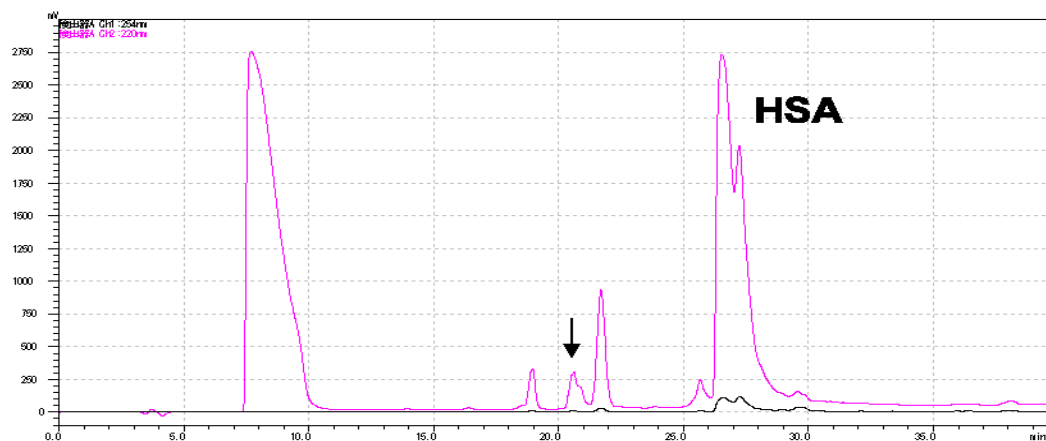
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 483.2562, found 483.2576.

c(AYPALG)



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{27}H_{39}N_6O_7$  ( $[M+H]^+$ ) 559.2875, found 559.2888.

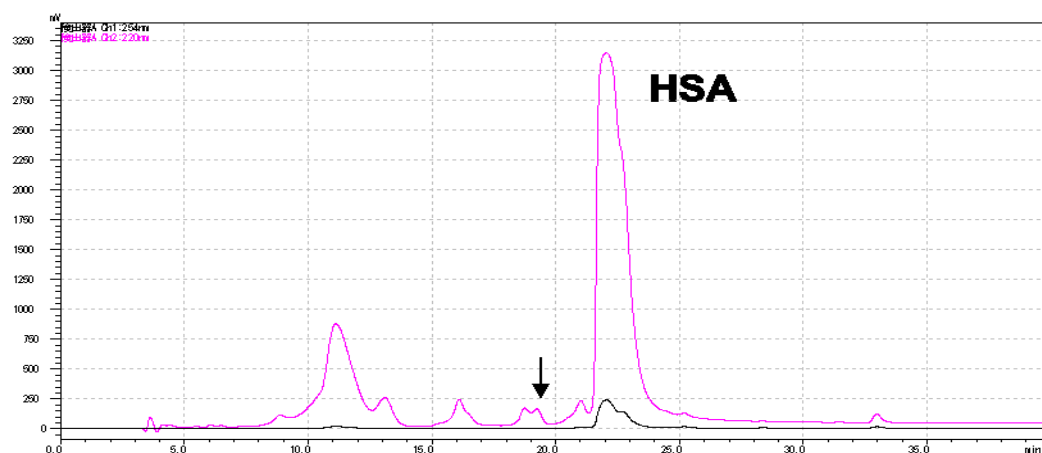
c(GSYPLG)



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{26}H_{37}N_6O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 561.2667, found 561.2677.

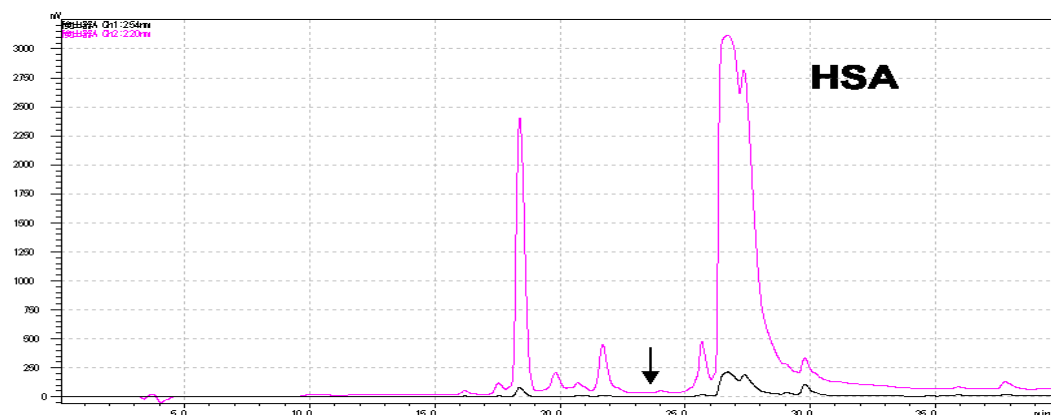


c(GPPFGIGG)



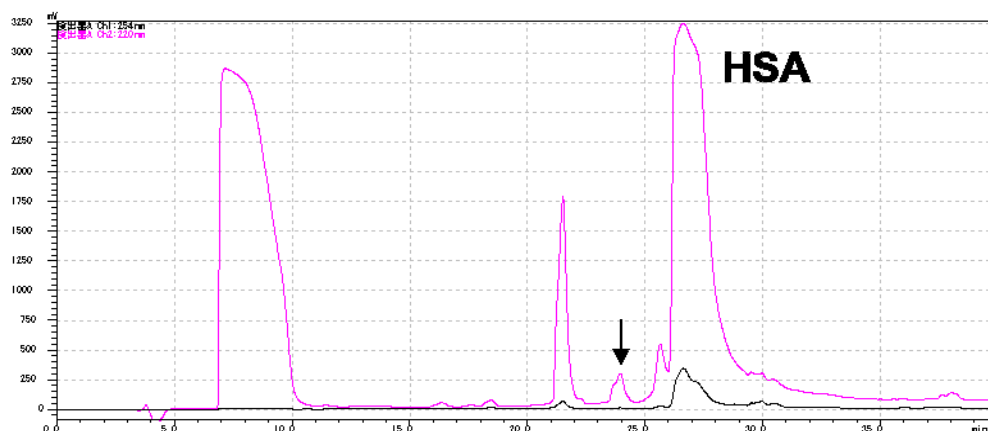
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{33}H_{47}N_8O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 683.3511, found 683.3511.

Ac-LGc(kFpG)



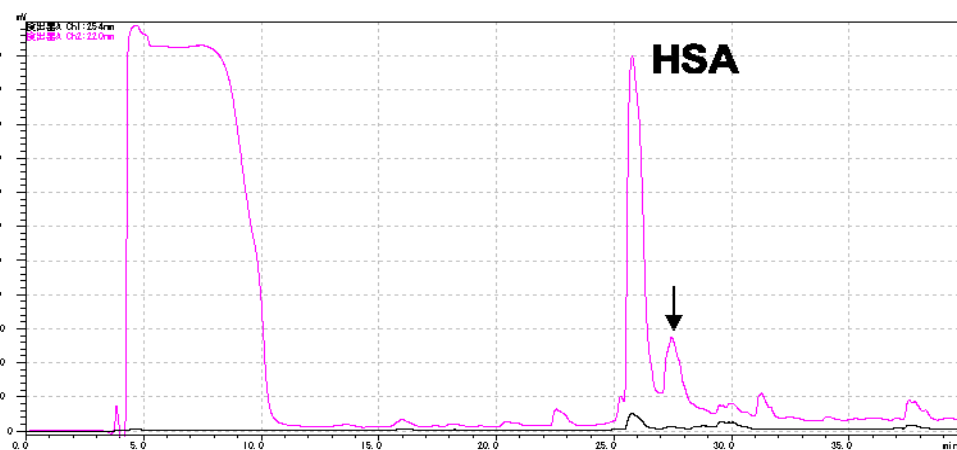
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{32}H_{48}N_7O_7$  ( $[M+H]^+$ ) 642.3610, found 642.3623.

Ac-GYc(KLFG)



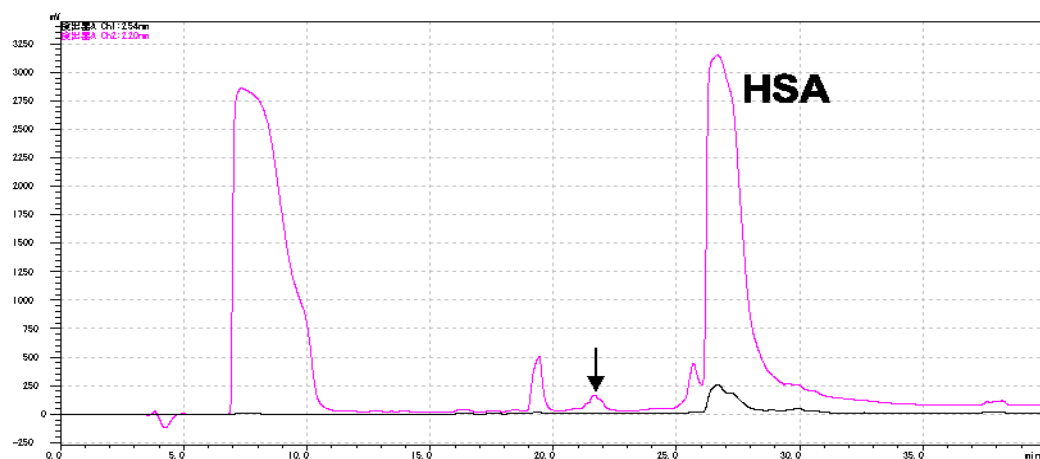
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{36}H_{50}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 708.3715, found 708.3743.

Ac-FYc(KLFG)



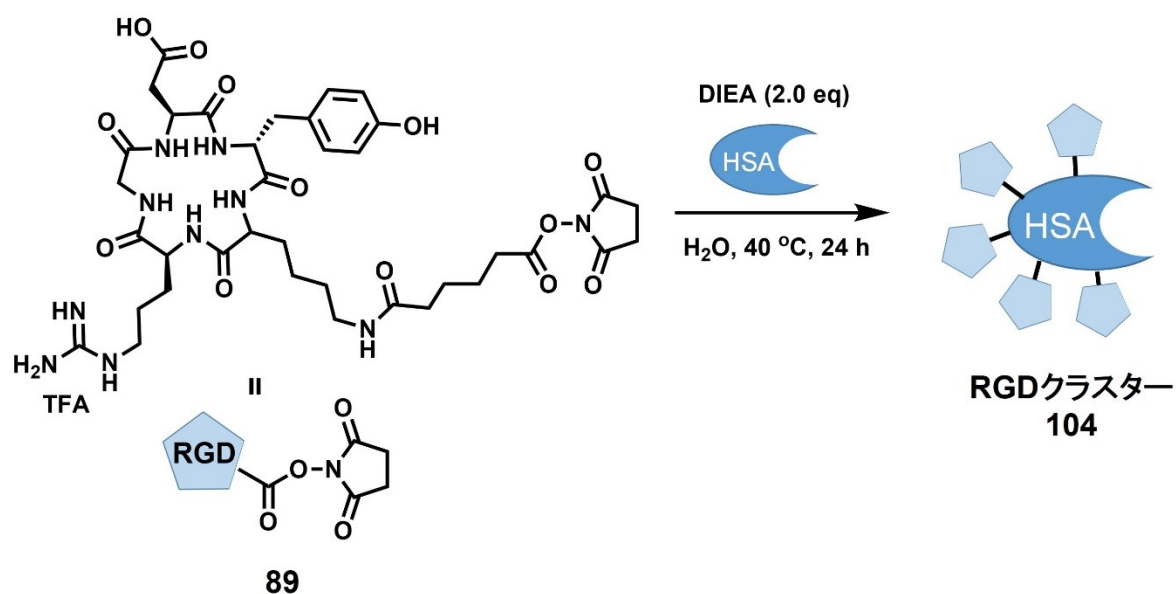
ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{43}H_{56}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 798.4185, found 798.4197.

Ac-GSc(KLFG)



ESI-HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{30}H_{46}N_7O_8$  ( $[M+H]^+$ ) 632.3402, found 632.3411.

## Synthesis of RGD Cluster



To the solution of HSA (66.5 mg, 1  $\mu$ mol) in H<sub>2</sub>O 1 mL was added compound **89** (9.6 mg, 10  $\mu$ mol) in H<sub>2</sub>O 500  $\mu$ L and mildly shaken for 24 hours. The solution was washed with H<sub>2</sub>O 3 times using Microcon® centrifugal filters. MALDI-TOF-MS (positive mode) detected the molecular weight of RGD-cluster at 70.0 kDa, which contains an average number of 5 c(RGDyK) molecules per albumin.

## **Biological experiment**

### **General cell culture protocol**

The three cell lines used in this study were obtained from either RIKEN Cell Bank or JCRB Cell Bank. Specific growth media used for each individual cell lines are indicated as follows.

A549 cell (human adenocarcinomic alveolar basal epithelial cells)

Medium: DMEM, FBS: 10%, PenicillinStreptomycin: 1%.

HeLa cell (human cervical cancer cells)

Medium: DMEM, FBS: 10%, PenicillinStreptomycin: 1%.

SW620 (human colon cancer cells)

Medium: L-15, FBS: 10%, PenicillinStreptomycin: 1%.

### **Gold-catalyzed amide bond formation (*in vitro*)**

HeLa cell under study were plated onto 96-well Falcon® microplates at a density of  $7.5 \times 10^3$  cells per 100  $\mu\text{L}$  of media. Cells were then grown for approximately a day at  $37^\circ\text{C}$ . The solution of HSA-Au **69** in  $\text{H}_2\text{O}$  (1.0 mM) 5  $\mu\text{L}$  and TAMRA-Propargyl **68** (2.0 mM) 5  $\mu\text{L}$  was added to the 96 well plate. After 45 min incubation, media in each well was removed by suction and 100  $\mu\text{L}$  of hoechst33342 solution in PBS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added. After 10 min incubation, the solution was removed by suction and added 100  $\mu\text{L}$  of 4% PFA solution to fix the cell. Fluorescence analysis was performed with Keyence BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope® and observed at appropriate wavelength.

### ***In vivo* kinetics analysis**

All procedures involving experiment animals were approved by the Ethics Committee of RIKEN (MAH21-19-17). The experiments were performed in accordance with institutional and national guidelines. **Glyco-Au 60, 76** (4.0 nmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  30  $\mu\text{L}$  was diluted in saline 70  $\mu\text{L}$  and injected into 8 to 10-week-old BALB/cAJcl-nu/nu mice (CLEA Japan, Inc.) via the tail vein ( $n=4$ ). After 30 min, Cy7.5-Propargyl **75** (5.0 nmol) in  $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$  (200:1) 30  $\mu\text{L}$  was diluted in saline 70  $\mu\text{L}$  and injected into the mouse via the tail vein. The mice were then anesthetized with Nembutal® or isoflurane and placed into an IVIS kinetics fluorescence imager® (Caliper Life Sciences, Inc.). Abdominal side and back images were taken at 30-minute intervals. To evaluate the rate of fluorescent signal increased in the urinary bladder, the fluorescence around the urinary bladder was calculated within an arbitrarily defined region of interest (ROI). After 3 hours of observation, the mice were sacrificed and perfused with 4% paraformaldehyde solution, and fluorescence intensities in the liver and intestine were measured within an arbitrarily defined ROI.

### **Microscopy observation of TAMRA fluorescence in the liver**

**Glyco-Au<sup>Sia6</sup> 76** (4 nmol) in H<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L was diluted in saline 70  $\mu$ L and injected into 8 to 10-week-old BALB/cAJcl-nu/nu mice (CLEA Japan, Inc.) via the tail vein (n=3). After 30 min, TAMRA-Propargyl **68** (100 nmol) in H<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L were diluted in saline 70  $\mu$ L and injected into the mouse via the tail vein. After 3 hours, the mice were sacrificed and perfused with 4% paraformaldehyde solution. Livers were further postfixed with 4% PFA at 4 °C for 24 hours, transferred to 15% sucrose in PBS, and kept at 4 °C for 24 hours, then to 30% sucrose in PBS likewise. The tissues were frozen in OCT compound® at -78 °C. The tissue blocks were cut into 6-8 mm sections. After the slices were labelled with DAPI, the sample were mounted in CC/Mount and imaged using an FV1000-D laser scanning confocal microscope (Olympus).

### **Detection of intracellular fluorescent signal by SDS-PAGE**

For sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), mouse livers were homogenized in 2 volumes of 25 mM Tris-HCl (pH7.4), 2.5 mM EDTA and 1% Triton X-100 with protease inhibitor cocktail (Roche) by polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged at 10,000 x g at 4 °C for 10 min. The supernatants were used in SDS-PAGE. Protein concentrations were determined by Protein Assay Rapid Kit (Wako) using bovine serum albumin as the standard. The samples (500  $\mu$ g each) were loaded onto 10% polyacrylamide gels with size marker (Protein Ladder One, Triple-color, Nacalai tesque). After electrophoresis, the fluorescent images were acquired with 532 nm exciting Laser by Typhoon FLA7000 (GE healthcare).

### **Interaction of glycocluster to the cancer cells**

HeLa, A549 cell were plated onto 96-well Falcon® microplates at a density of  $7.5 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^4$  cells per 100  $\mu$ L of media. Cells were then grown for approximately a day at 37 °C. 20 pmol of glycocluster **79** in 2  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O was added to the well and incubated for overnight. After incubation, media in each well were removed by suction and the cells were washed with PBS 2 times. After washing, 100  $\mu$ L of hoechst solution in PBS (1  $\mu$ g/mL) was added. After 10 min incubation, the solution was removed by suction and added 100  $\mu$ L of 4% PFA solution to fix the cell. Fluorescence analysis was performed with Keyence BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope® and observed at appropriate wavelength.

### **Cell viability assay of RGD-Propargyl 90**

Cell viability was determined using a WST-8 Cell Proliferation Assay, which is a colorimetric method to monitor the reduction of the water-soluble tetrazolium salt, WST-8 to its formazan derivative via mitochondrial dehydrogenase of metabolically active cells. The commercial kit used in this study was the Cell Count Reagent SF Kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Approximately  $1 \times 10^4$  cells/well of HeLa-Luc cells in 10  $\mu$ L HBSS media were first incubated

with **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** (1 nmol in 1  $\mu$ L of saline) for 15 min, followed by the addition of cRGD-propargyl ester **90** (5 nmol of 1  $\mu$ L saline), and then subsequently incubated for 15 min. Under control conditions, reagents were replaced with a 0.9% saline solution (Otsuka Pharmaceuticals, Japan) when necessary. Cells were then plated onto 96-well Falcon® microplates along with the addition of DMEM media 90  $\mu$ L, and grown for various time points (0, 3, 24, and 48 hours). To initialize quantification of cell viability, Cell Count reagent 10  $\mu$ L was added. Following incubation at 37 °C for 1 hour, end-point absorbance was acquired at 450 nm.

#### **Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) assay**

Flow cytometry and cell sorting were performed using standard procedures with a Sony SH800 Cell Sorter (Sony Corporation, Japan). The flow cytometer was equipped with 405, 488, 561 and 638 nm lasers, where cells were gated at the excitation/emission wavelengths of ex/em=405 nm/470 nm for **Glyco-Au<sup>Sia3</sup> 80** detection, and ex/em=515 nm/528 nm for Venus (iV) detection. Results were analyzed using Sony SH800 software.

#### **Peptide bioconjugation assay**

SW620 cell under study were plated onto 96-well Falcon® microplates at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells per 100  $\mu$ L of media. 5  $\mu$ L of **RGD-Au 105** (0.4 mM in PBS) and 10  $\mu$ L peptides **103a-d** (6.0 mM in PBS) 10  $\mu$ L was added to the medium and incubated for 2 days. Cytotoxicity assay was performed with ATPlite assay kit (Perkin Elmer Co., Ltd.).

#### **Peptide bioconjugation assay *in vivo***

SW620 tissue were implanted to the 10-week-old BALB/cAJcl-nu/nu mice. **RGD-Au 105** in PBS 10  $\mu$ L was diluted in saline 90  $\mu$ L and injected into SW620 implanted mice via tail vein. After 30 min, 10  $\mu$ L of Ac-GGKLFQ-OPropargyl **103d** (12 mM) was diluted in saline 90  $\mu$ L and injected into the mice via tail vein. These protocols were repeated in each 8 days and the size of tumor tissues were measured in each day.

## 参考文献

- [1] a) 尾上雅英, 高柳和伸, 國正淳一, 岡野友信, 橋田亨, 二見高弘, 山崎誠二, 今村正之, 乾賢一, *医療薬学* **2002**, *28*, 321-326; b) 木村美智男, 宇佐美英績, 安田忠司, 亀井桂太郎, 磯谷正敏, *医療薬学* **2007**, *33*, 863-868; c) 赤澤麻衣子, 橋田亨, 矢野育子, 桂敏也, 高島幸恵, 手良向聡, 松本繁巳, 柳原一広, 福島雅典, 乾賢一, *医療薬学* **2008**, *34*, 742-747; d) 光井綾子, 山内栄子, 陶山啓子, *日本がん看護学会誌* **2009**, *23*, 13-22.
- [2] M. Malet-Martino, R. Martino, *The Oncologist* **2002**, *7*, 288-323.
- [3] a) N. Christophidis, F. J. E. Vajda, I. Lucas, W. J. Louis, *Australian and New Zealand Journal of Medicine* **1979**, *9*, 143-144; b) R. N. Weinreb, *Ophthalmology* **1987**, *94*, 564-570; c) J. Sitzia, L. Huggins, *Cancer Practice* **2002**, *6*, 13-21.
- [4] a) 矢田登, *有機合成化学協会誌* **1980**, *38*, 275-287; b) 金子久美子, 水島裕, *炎症* **1981**, *1*, 316-316.
- [5] A. Hoshi, M. Iigo, A. Nakamura, M. Inomata, K. Kuretani, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1978**, *26*, 161-165.
- [6] M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Pharmacological Reviews* **2004**, *56*, 53.
- [7] a) R. P. Alexander, N. R. A. Beeley, M. O'Driscoll, F. P. O'Neill, T. A. Millican, A. J. Pratt, F. W. Willenbrock, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 3269-3272; b) G. M. Anlezark, R. G. Melton, R. F. Sherwood, B. Coles, F. Friedlos, R. J. Knox, *Biochemical Pharmacology* **1992**, *44*, 2289-2295; c) M. P. Hay, W. R. Wilson, W. A. Denny, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, *5*, 2829-2834; d) H. P. Svensson, V. M. Vrudhula, J. E. Emswiler, J. F. MacMaster, W. L. Cosand, P. D. Senter, P. M. Wallace, *Cancer Research* **1995**, *55*, 2357; e) M. J. Sagnou, P. W. Howard, S. J. Gregson, E. Eno-Amooquaye, P. J. Burke, D. E. Thurston, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10*, 2083-2086; f) T. P. Smyth, M. E. O'Donnell, M. J. O'Connor, J. O. St Ledger, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5699-5707; g) F. A. Harding, A. D. Liu, M. Stickler, O. J. Razo, R. Chin, N. Faravashi, W. Viola, T. Graycar, V. P. Yeung, W. Aehle, D. Meijer, S. Wong, M. H. Rashid, A. M. Valdes, V. Schellenberger, *Molecular Cancer Therapeutics* **2005**, *4*, 1791; h) R. F. Alderson, B. E. Toki, M. Roberge, W. Geng, J. Basler, R. Chin, A. Liu, R. Ueda, D. Hodges, E. Escandon, T. Chen, T. Kanavarioti, L. Babé, P. D. Senter, J. A. Fox, V. Schellenberger, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 410-418.
- [8] a) K. D. Bagshawe, C. J. Springer, F. Searle, P. Antoniw, S. K. Sharma, R. G. Melton, R. F. Sherwood, *British Journal of Cancer* **1988**, *58*, 700-703; b) K. D. Bagshawe, S. K. Sharma, C. J. Springer, G. T. Rogers, *Annals of Oncology* **1994**, *5*, 879-891; c) K. D. Bagshawe, *Drug Development Research* **1995**, *34*, 220-230; d) I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *26*, 151-172; e) K. N. Syrigos, A. A. Epenetos, *Anticancer Res* **1999**, *19*, 605-613; f) M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Pharmacological Reviews* **2004**, *56*, 53-102.
- [9] S. K. Sharma, K. D. Bagshawe, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, *118*, 2-7.

- [10] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 13.
- [11] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 565-598.
- [12] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 2708-2711; c) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [13] a) J. Clavadetscher, S. Hoffmann, A. Lilienkamp, L. Mackay, R. M. Yusop, S. A. Rider, J. J. Mullins, M. Bradley, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 15662-15666; b) J. G. Rebelein, T. R. Ward, *Current Opinion in Biotechnology* **2018**, *53*, 106-114.
- [14] a) P. F. van Swieten, M. A. Leeuwenburgh, B. M. Kessler, H. S. Overkleeft, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 20-27; b) J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26*, 1211-1219; c) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [15] a) M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13518-13519; b) N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297-2299; c) R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vuldere, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 3375-3378; d) J. M. Mejia Oneto, I. Khan, L. Seebald, M. Royzen, *ACS Central Science* **2016**, *2*, 476-482.
- [16] R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 1697-1706.
- [17] J. Clavadetscher, E. Indrigo, S. V. Chankeshwara, A. Lilienkamp, M. Bradley, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 6864-6868.
- [18] a) J. T. Weiss, J. C. Dawson, K. G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. E. Patton, M. Bradley, N. O. Carragher, A. Unciti-Broceta, *Nature Communications* **2014**, *5*, 3277; b) M. A. Miller, B. Askevold, H. Mikula, R. H. Kohler, D. Pirovich, R. Weissleder, *Nature Communications* **2017**, *8*, 15906; c) A. M. Pérez-López, B. Rubio-Ruiz, V. Sebastián, L. Hamilton, C. Adam, T. L. Bray, S. Irusta, P. M. Brennan, G. C. Lloyd-Jones, D. Sieger, J. Santamaría, A. Unciti-Broceta, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 12548-12552.
- [19] a) K. Miyata, R. J. Christie, K. Kataoka, *Reactive and Functional Polymers* **2011**, *71*, 227-234; b) A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, H. Car, *Pharmacological Reports* **2012**, *64*, 1020-1037; c) C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Current Opinion in Biotechnology* **2013**, *24*, 1167-1173.
- [20] a) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Research* **1986**, *46*, 6387; b) V. Torchilin, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 131-135; c) H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 71-79; d) 異島優, 丸山徹, 石田竜弘, 小田切優樹, *Drug Delivery System* **2018**, *33*, 130-138.



- [21] a) J. W. Nichols, Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 451-464; b) A. Z. Wang, *Science Translational Medicine* **2015**, *7*, 294ec112; c) 横山昌幸, *Drug Delivery System* **2018**, *33*, 89-97.
- [22] a) M. Jeschek, R. Reuter, T. Heinisch, C. Trindler, J. Klehr, S. Panke, T. R. Ward, *Nature* **2016**, *537*, 661; b) T. Heinisch, F. Schwizer, B. Garabedian, E. Csibra, M. Jeschek, J. Vallapurackal, V. B. Pinheiro, P. Marlière, S. Panke, T. R. Ward, *Chemical Science* **2018**, *9*, 5383-5388.
- [23] J. V. Frangioni, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 626-634.
- [24] K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *47*, 102-105.
- [25] a) A. Ogura, T. Tahara, S. Nozaki, K. Morimoto, Y. Kizuka, S. Kitazume, M. Hara, S. Kojima, H. Onoe, A. Kurbangalieva, N. Taniguchi, Y. Watanabe, K. Tanaka, *Scientific Reports* **2016**, *6*, 21797; b) K. Fujiki, K. Tanaka, in *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, Vol. "RIKEN Click Reagent for Protein Labeling"*, **2018**.
- [26] H. Yu, X. Chen, in *Carbohydrate Recognition*, **2011**.
- [27] M. A. Meledeo, V. D. P. Paruchuri, J. Du, Z. Wang, K. J. Yarema, in *Carbohydrate Recognition*, **2011**.
- [28] S. Roseman, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 41527-41542.
- [29] E. I. Park, Y. Mi, C. Unverzagt, H.-J. Gabius, J. U. Baenziger, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 17125.
- [30] a) F. Saczewski, Ł. Balewski, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2009**, *19*, 1417-1448; b) A. Al-Mourabit, M. A. Zancanella, S. Tilvi, D. Romo, *Natural Product Reports* **2011**, *28*, 1229-1260; c) Ale, ula, K. Danijel, I. Janez, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2013**, *13*, 1921-1943; d) R. G. S. Berlinck, A. F. Bertonha, M. Takaki, J. P. G. Rodriguez, *Natural Product Reports* **2017**, *34*, 1264-1301.
- [31] a) D. Schade, J. Kotthaus, L. Riebling, J. Kotthaus, H. Müller-Fielitz, W. Raasch, O. Koch, N. Seidel, M. Schmidtke, B. Clement, *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 759-769; b) T. Incecayir, J. Sun, Y. Tsume, H. Xu, T. Gose, T. Nakanishi, I. Tamai, J. Hilfinger, E. Lipka, G. L. Amidon, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105*, 925-934; c) R. Sibgatullina, K. Fujiki, T. Murase, T. Yamamoto, T. Shimoda, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, *Tetrahedron Letters* **2017**, *58*, 1929-1933.
- [32] a) T. L. Davis, *Organic Syntheses*. **1927**, *7*, 46; b) M. Dukat, A. Abdel-Rahman, A. Ismaiel, S. Ingher, M. Teitler, L. Gyermek, R. Glennon, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 4017.
- [33] Q. Li, S. Wang, S. Zhou, G. Yang, X. Zhu, Y. Liu, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 6763-6767.
- [34] K. K. H. Vong, S. Maeda, K. Tanaka, *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 18865-18872.

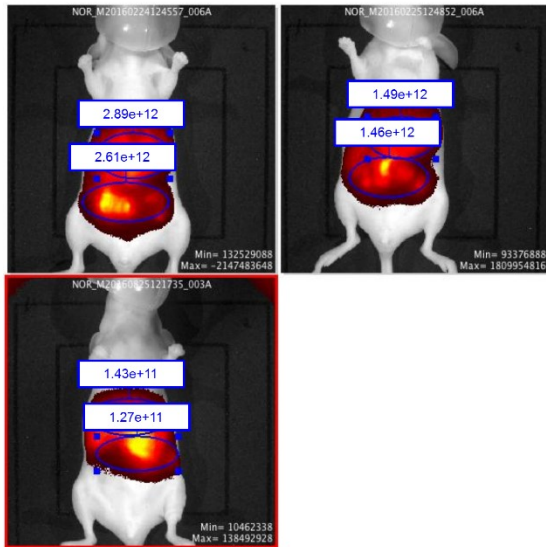
- [35] N. Ghosh, S. Nayak, A. K. Sahoo, *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 500-511.
- [36] T. Chen, C. Cai, *Catalysis Communications* **2015**, *65*, 102-104.
- [37] C.-Y. Zhou, P. W. H. Chan, C.-M. Che, *Organic Letters* **2006**, *8*, 325-328.
- [38] *Advanced Synthesis & Catalysis* **2013**, *355*, 2055-2070.
- [39] a) A. M. L. Zatón, J. M. Ferrer, J. C. R. de Gordo, M. A. Marquinez, *Chemico-Biological Interactions* **1995**, *97*, 169-174; b) J. Shobini, A. K. Mishra, K. Sandhya, N. Chandra, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2001**, *57*, 1133-1147.
- [40] Y. Fuchita, H. Ieda, Y. Tsunemune, J. Kinoshita-Nagaoka, H. Kawano, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1998**, 791-796.
- [41] K. K.-Y. Kung, V. K.-Y. Lo, H.-M. Ko, G.-L. Li, P.-Y. Chan, K.-C. Leung, Z. Zhou, M.-Z. Wang, C.-M. Che, M.-K. Wong, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2013**, *355*, 2055-2070.
- [42] B. Wang, Z. Liu, Z. Ma, M. Li, L. Du, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *7*, 245-249.
- [43] G. Jones, W. R. Jackson, C. Y. Choi, W. R. Bergmark, *The Journal of Physical Chemistry* **1985**, *89*, 294-300.
- [44] R. Ramapanicker, R. Gupta, R. Megha, S. Chandrasekaran, *International Journal of Peptides* **2011**, *2011*, 10.
- [45] F. F. Jobsis, *Science* **1977**, *198*, 1264.
- [46] a) H. Ise, T. Nikaido, N. Negishi, N. Sugihara, F. Suzuki, T. Akaike, U. Ikeda, *The American Journal of Pathology* **2004**, *165*, 501-510; b) B. Shi, M. Abrams, L. Sepp-Lorenzino, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2013**, *61*, 901-909.
- [47] K. Tsubokura, K. K. H. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, A. Kurbangalieva, Y. Watanabe, K. Tanaka, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 3579-3584.
- [48] X. Guan, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, *5*, 402-418.
- [49] a) K. W. Hunter, N. P. S. Crawford, J. Alsarraj, *Breast Cancer Research : BCR* **2008**, *10*, S2-S2; b) 明渡均, 向井睦子, *化学と生物* **1998**, *36*, 565-571.
- [50] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nature reviews. Cancer* **2010**, *10*, 9-22.
- [51] S. K. Akiyama, K. Olden, K. M. Yamada, *Cancer and Metastasis Reviews* **1995**, *14*, 173-189.
- [52] a) S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, *Trends in Biochemical Sciences* **1991**, *16*, 246-250; b) K. M. Yamada, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 12809-12812.
- [53] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y.-K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D.-H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. B. Taphoorn, C.-C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R.-D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegel, C.-Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivskyy, M. Picard, M. Weller, *The Lancet Oncology* **2014**, *15*, 1100-1108.
- [54] M. Tucci, S. Stucci, F. Silvestris, *The Lancet Oncology* **2014**, *15*, e584-e585.
- [55] A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, R. Sibgatullina, K. Vong, T. Suzuki, N. Dohmae,

- A. Kurbangalieva, Y. Watanabe, K. Tanaka, *Chemical Communications* **2018**, *54*, 8693-8696.
- [56] M. Schottelius, H.-J. Wester, *Methods* **2009**, *48*, 161-177.
- [57] N. K. Mishra, R. N. V. Krishna Deepak, R. Sankararamakrishnan, S. Verma, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 15395-15406.
- [58] R. Lotan, A. Raz, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1988**, *551*, 385-398.
- [59] T. Nagai, K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, A. Miyawaki, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 87.
- [60] a) 長野正展, 吉富徹, 菅裕明, *ファルマシア* **2014**, *50*, 751-755; b) 舛屋圭一, *日本薬理学雑誌* **2016**, *148*, 322-328.
- [61] F. S. DiLeva, S. Tomassi, S. DiMaro, F. Reichart, J. Notni, A. Dangi, U. K. Marelli, D. Brancaccio, F. Merlino, H.-J. Wester, E. Novellino, H. Kessler, L. Marinelli, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 14645-14649.
- [62] F. Shaheen, T. S. Rizvi, S. G. Musharraf, A. Ganesan, K. Xiao, J. B. Townsend, K. S. Lam, M. I. Choudhary, *Journal of Natural Products* **2012**, *75*, 1882-1887.
- [63] A. Wélé, Y. Zhang, J.-P. Brouard, J.-L. Pousset, B. Bodo, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2376-2380.
- [64] C. Han, J. Chen, J. Liu, F. S.-C. Lee, X. Wang, *Talanta* **2007**, *71*, 801-805.
- [65] a) R. Schmidt, K. Neubert, A. Barth, C. Liebmann, M. Schnittler, N. N. Chung, P. W. Schiller, *Peptides* **1991**, *12*, 1175-1180; b) P. A. Singleton, J. Moss, D. D. Karp, J. T. Atkins, F. Janku, *Cancer* **2015**, *121*, 2681-2688.
- [66] M. J. I. Andrews, C. McInnes, G. Kontopidis, L. Innes, A. Cowan, A. Plater, P. M. Fischer, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 2735-2741.
- [67] M. Fujita, Y. Furusho, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 4339-4342.
- [68] G. Wenz, C. Strassnig, C. Thiele, A. Engelke, B. Morgenstern, K. Hegetschweiler, *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 7202-7211.
- [69] A. H. Bingham, R. J. Davenport, L. Gowers, R. L. Knight, C. Lowe, D. A. Owen, D. M. Parry, W. R. Pitt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 409-412.
- [70] A. P. T. Easson, F. L. Pyman, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1931**, 2991-3001.
- [71] J. M. Gulland, P. E. Macey, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1949**, 1257-1259.
- [72] M. Karle, W. Knecht, Y. Xue, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 4839-4843.
- [73] H. Matthews, M. Ranson, J. D. A. Tyndall, M. J. Kelso, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 6760-6766.
- [74] K. J. M. Andrews, N. Anand, A. R. Todd, A. Topham, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1949**, 2490-2497.
- [75] L. Pérez-Picaso, J. Escalante, F. H. Olivo, M. Y. Rios, *Molecules* **2009**, *14*.

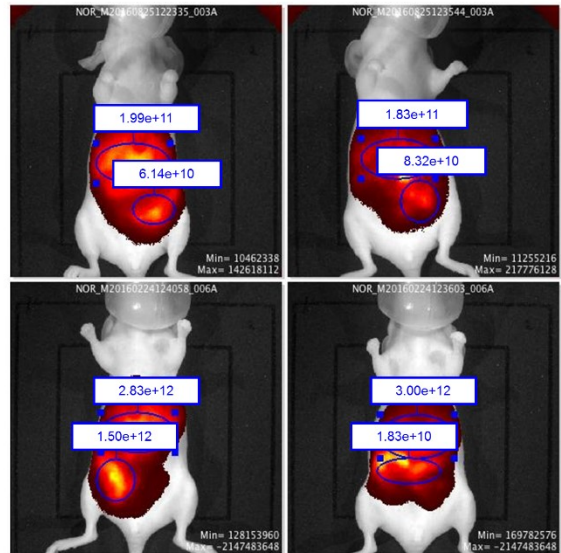
# 付録

## 第二章

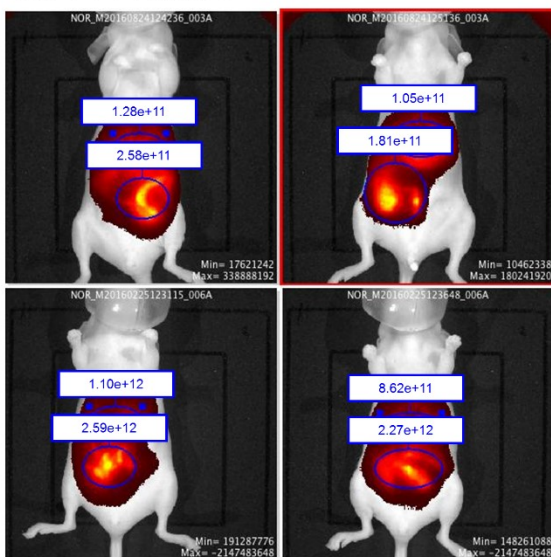
### 触媒なし



### 肝臓を標的

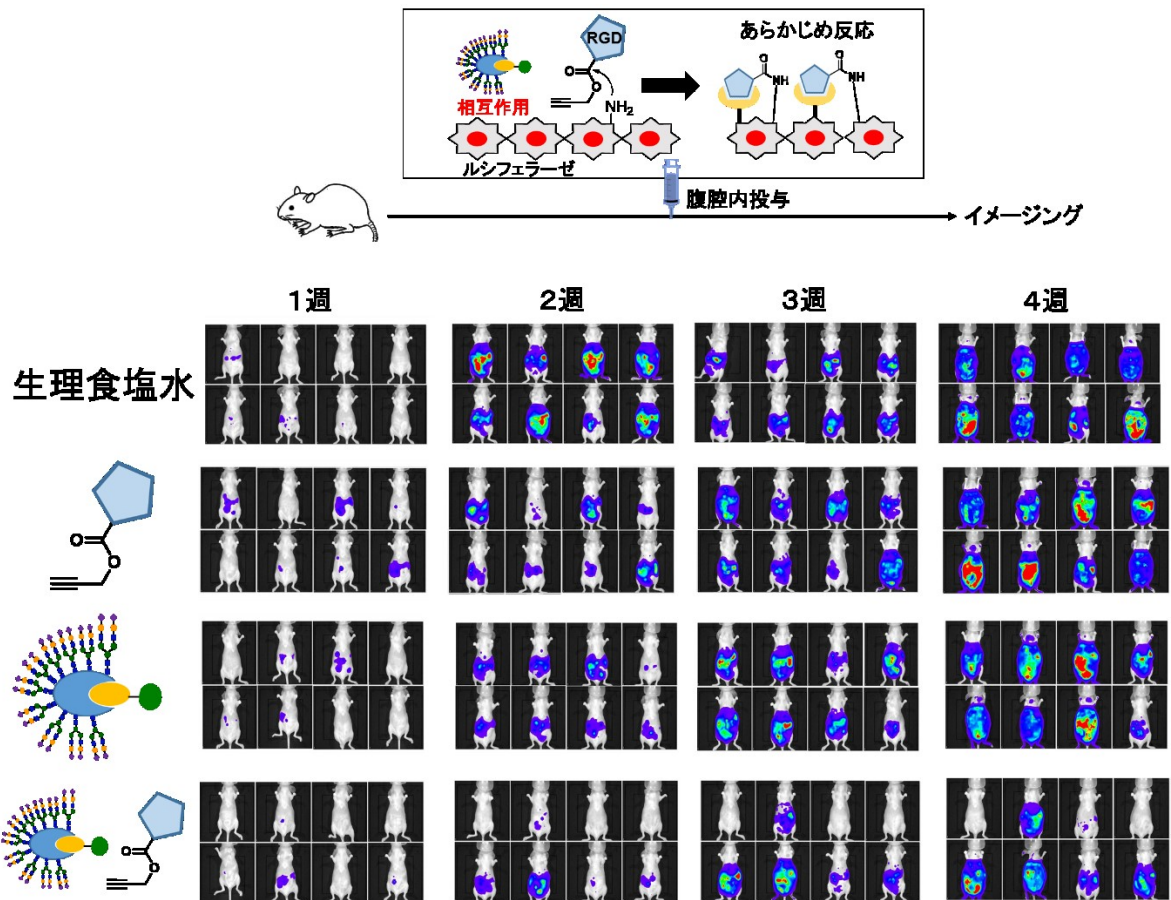


### 腸管を標的

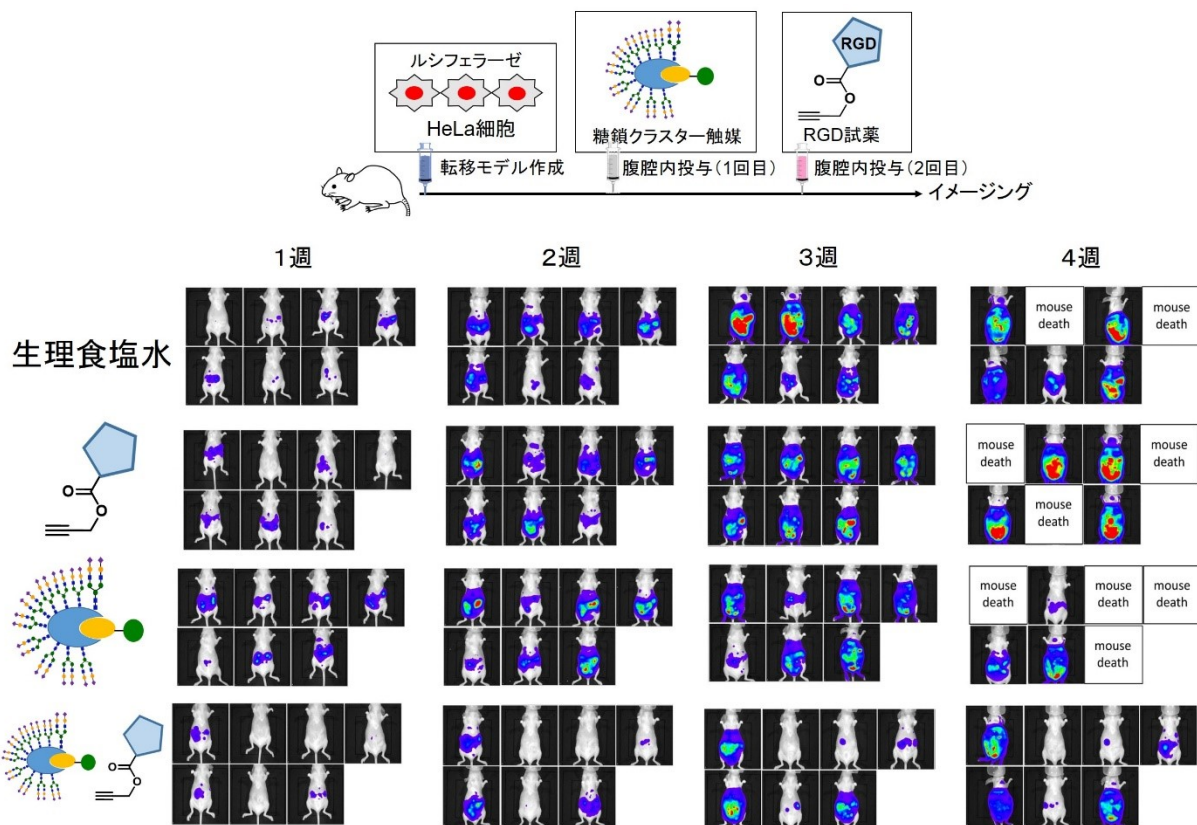


イメージング実験を行ったマウスの ROI の測定図を示した。Glyco-Au を投与後に Cy7.5-Propargyl を投与し、二時間後に ROI を測定した。この測定値をもとに肝臓と腸管の蛍光強度の差を測定した。これにより、本反応の臓器の選択性を確認した。

### 第三章



ルシフェラーゼの発現した HeLa 細胞に対して、**Glyco-Au<sup>Sia3</sup>** と **RGD-Propargyl** を作用させた。これにより、細胞表層上に RGD ペプチドを結合させた HeLa 細胞の転移挙動を確認した全 8 匹のマウスを示す。



ルシフェラーゼを発現させた HeLa 細胞をマウスに腹腔内投与し、続いて **Glyco-Au<sup>Sia3</sup>** と **RGD-Propargyl** を腹腔内投与した。これにより、HeLa 細胞表層のアミンに対するアミド化反応をマウス体内で行い、その転移挙動を蛍光イメージングにより確認した全 8 匹のマウスを示す。

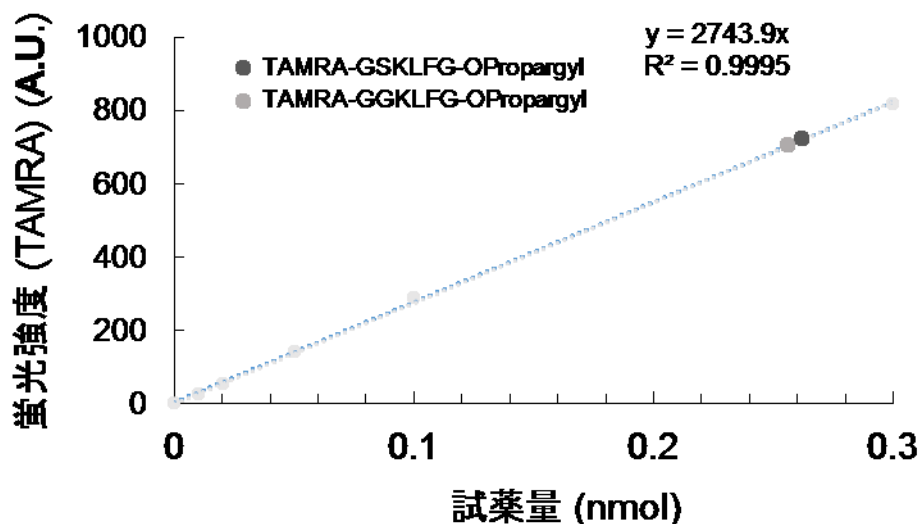


## 第四章

### 各ペプチドの反応性に関する考察

*N* 末端に蛍光基 (TAMRA) を導入したペプチドプロパルギルエステル化合物に対して、HSA-金触媒を作用させ、HSA 中に存在しているリシン側鎖アミンに対して、アミド化反応を実施することで、ペプチドプロパルギルエステルの反応性の評価を行った。*N* 末端の配列が異なる TAMRA-GGKLFG-OPropargyl、TAMRA-GSKLFG-OPropargyl ペプチドを HSA-金触媒に対して 10 当量加え、20 時間、37 °C の条件で反応を行った。

まず、TAMRA-NHS エステルの各物質質量 (0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.3 nmol) における蛍光量を測定することで検量線を作成した。その後、反応溶液の蛍光量を測定し、作成した検量線から TAMRA-GGKLFG-OPropargyl、TAMRA-GSKLFG-OPropargyl の反応量を計算した。その結果、どちらのペプチドについても 0.26 nmol 程度反応が進行することが確認された。これにより、本反応は *N* 末端のアミノ酸残基による影響を受けないといった結果が示唆された。



HSA-Au (3.1 nmol) に対して、10 当量の蛍光基有するペプチド (31 nmol) を加え、20 時間反応を行った。白：TAMRA NHS ester の各濃度 (0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.3 nmol) における蛍光強度、灰：TAMRA-GGKLFG-OPropargyl+HSA-Au、黒：TAMRA-GSKLFG-OPropargyl+HSA-Au

## 謝辞

本研究を行うにあたり、熱意ある研究指導をしていただきました早稲田大学 中尾洋一教授、優れた合成を行うための設備や的確な指導をしていただきました理化学研究所 (理研) 田中生体機能合成化学研究室 田中克典主任研究員に心より感謝申し上げます。

本学位論文の作成にあたり、多くのご助言とご指導をいただいた早稲田大学 先進理工学研究科 化学・生命化学専攻 小出隆規教授、寺田泰比古教授、鹿又宣弘教授に感謝いたします。

がん転移抑制実験においてフローサイトメトリー、動物実験でご助力をいただきました理研生体機能動態イメージング研究ユニット 田原強研究員、理研健康・病態科学研究チーム 野崎聡研究員、理研田中生体機能合成化学研究室 浦野清香氏に感謝申し上げます。

がん移植マウスの腫瘍増殖阻害実験において、ご助力をいただきました理研糖鎖ターゲットング研究チーム Peni Ahmadi 研究員、理研田中生体機能合成化学研究室 江河泰子氏に感謝申し上げます。

また、貴重な糖鎖クラスターをご供与いただきました、小椋章弘元研究員 (現慶応大学理工学部応用化学科助教)、理研田中生体機能合成化学研究室 Igor Nasibullin 研究員、カザン大学アレクサンドルブトレロフ研究所 Regina Sibgatullina 氏に感謝申し上げます。

本研究を支えていただきました理化学研究所の研究員の方々や中尾研究室の学生の皆様や既に卒業されました方を含めた先輩皆様に感謝いたします。

最後に研究生生活を生活面、経済面、健康面で支えていただきました母 弘美、父 英に感謝いたします。

平成 31 年 2 月

坪倉 一輝





種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
国際学会 （口頭発表）	“In vivo metal-catalyzed reaction and new prodrug strategy”, 3rd RIKEN - KFU Workshop, 2016年9月, Kazuki Tsubokura, Katsunori Tanaka
国内学会 （口頭発表）	<p>「ルイス酸触媒によるアミノ基の水中での直接的グアニジン化反応」、日本化学会第94春季年会、2014年3月、坪倉 一輝、岩田 隆幸、中尾 洋一、田中 克典</p> <p>「アルギニンの翻訳後修飾に学ぶ血管新生阻害剤 ageladine A のワンポット全合成と活性リモデリング分子の創製」、第56回天然有機化合物討論会、2014年10月、岩田隆幸、大塚悟史、坪倉一輝、新井大祐、深瀬浩一、中尾洋一、田中克典</p> <p>「生体内合成化学治療への戦略：酸化ストレス条件下での還元反応の開発」、日本化学会第95春季年会、2015年3月、坪倉 一輝、中尾 洋一、田中 克典</p>
	<p>“Therapeutic <i>in vivo</i> synthetic chemistry: Synthetic studies of bioactive compounds in live mouse”, 日本化学会第95春季年会、2015年3月, Pradipta Ambara, Kazuki Tsubokura, Akihiro Ogura, Katsunori Tanaka</p> <p>「金を活性化剤とする水中でのアミド結合形成反応の開発」、日本化学会第96春季年会、2016年3月、坪倉 一輝、Kenward Vong、中尾 洋一、田中 克典</p> <p>「生体内合成化学治療：糖鎖クラスター触媒を利用した生体内触媒反応の開発」、「分子システム研究」第5回春季研究会、2016年5月、坪倉一輝、中尾洋一、田中克典</p> <p>「糖鎖クラスターを触媒キャリアとした生体内触媒反応」、第35回日本糖質学会年会、2016年9月、坪倉一輝、Kenward Vong、中尾洋一、田中克典</p> <p>「生体内での臓器選択的な金属触媒反応の開発」、日本化学会第97春季年会、2017年3月、坪倉 一輝、Kenward Vong、中尾 洋一、田中 克典</p> <p>「生きているマウス内での臓器選択的な遷移金属触媒反応の実現」、ケミカルバイオロジー学会 第12回年会、2017年6月、坪倉一輝、Kenward Vong、田中克典</p> <p>「金-アルブミン触媒によるアミド結合形成反応の開発」、日本化学会第98回春季年会、2018年3月、坪倉 一輝、Kenward Vong、中尾 洋一、田中 克典</p> <p>「生体内合成化学治療生理活性天然物のルネッサンス」、第60回天然有機化合物討論会、2018年9月、坪倉一輝、Kenward Vong、Ambara Pradipta、中尾洋一、田中克典</p>
国内学会 （ポスター発表）	<p>「動物内での触媒反応による合成研究」、「分子システム研究」第4回春季研究会、2015年5月、坪倉一輝、中尾洋一、田中克典</p> <p>「2-アミノイミダゾールの選択的な構築法を用いたアゲラジン A 誘導体のワンポット・カスケード合成」、第5回CSJ化学フェスタ2015、2015年10月、坪倉一輝、岩田隆幸、中尾洋一、田中克典</p>