

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3836888号  
(P3836888)

(45) 発行日 平成18年10月25日(2006.10.25)

(24) 登録日 平成18年8月4日(2006.8.4)

(51) Int. Cl.	F I
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 A B A A
<b>C 0 7 K 1/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 1/00

請求項の数 49 (全 84 頁)

(21) 出願番号	特願平5-298747	(73) 特許権者	593216099
(22) 出願日	平成5年11月29日(1993.11.29)		ラ ホヤ ファーマシューティカル カン
(65) 公開番号	特開平7-126186		パニー
(43) 公開日	平成7年5月16日(1995.5.16)		La Jolla Pharmaceut
審査請求日	平成8年6月28日(1996.6.28)		ical Company
審査番号	不服2003-4980(P2003-4980/J1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
審査請求日	平成15年3月27日(2003.3.27)		21, サンディエゴ, ナンシー リッジ
(31) 優先権主張番号	08/118,055		ドライブ 6455
(32) 優先日	平成5年9月8日(1993.9.8)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	08/142,598	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成5年10月22日(1993.10.22)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100122389
(31) 優先権主張番号	08/152,506		弁理士 新井 栄一
(32) 優先日	平成5年11月15日(1993.11.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学的に定義された非ポリマー性結合手プラットフォーム分子およびその複合体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a)(i) 2, 2' - エチレンジオキシジエチルアミン、  
(ii) トリエチレングリコール、および  
(iii) 約 200 ~ 約 8,000 の分子量を有するポリエチレングリコール  
からなる群から選択される部分を含む化学的に定義された結合手プラットフォーム分子であって、前記部分は分枝基で誘導体化されており、但し、前記化学的に定義された結合手プラットフォーム分子が約 200 ~ 約 8,000 の分子量を有するポリエチレングリコールからなる場合、前記分枝基はジアミノ酸、トリアミン、およびアミノ二酸基からなる群から選択される官能性部分から誘導され、前記プラットフォーム分子の結合手は、結合手プラットフォーム分子の末端に位置する 4 以上の結合部位をもっており、前記結合手プラットフォーム分子は、生物学的に活性な分子のための結合部位の数が分枝基の数によって予め定められるように化学的に定義されている、前記結合手プラットフォーム分子と、  
(b) 複数の生物学的に活性な分子  
との結合によって形成され得る結合体であって、前記複数の生物学的に活性な分子が前記結合部位で結合手プラットフォーム分子と結合している、前記結合体。

## 【請求項2】

結合手プラットフォーム分子が 2, 2' - エチレンジオキシジエチルアミンを含んでいる、請求項1に記載の結合体。

## 【請求項3】

10

20

結合手プラットフォーム分子がトリエチレングリコールを含んでいる、請求項 1 に記載の結合体。

【請求項 4】

結合手プラットフォーム分子がポリエチレングリコールを含んでいる、請求項 1 に記載の結合体。

【請求項 5】

分枝基が、ジアミノ酸、トリアミン、およびアミノ二酸基からなる群から選択される官能性部分から誘導される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 6】

結合体が 2 つの分枝基を含んでいて、全部で 4 つの生物学的に活性な分子のための結合部位を提供する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合体。 10

【請求項 7】

個々の結合部位に、前記生物学的に活性な分子の 1 つが結合している、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 8】

生物学的に活性な分子の数が 4 である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 9】

4 つの生物学的に活性な分子が各々同一である、請求項 8 に記載の結合体。

【請求項 10】

生物学的に活性な分子が、ポリヌクレオチド、並びに炭水化物、脂質、リポポリサッカライド、タンパク質、ペプチド、リポプロテインおよびグリコプロテインからなる群から選択される免疫原のアナログからなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合体。 20

【請求項 11】

生物学的に活性な分子が一本鎖または二本鎖のポリヌクレオチドである、請求項 10 に記載の結合体。

【請求項 12】

ポリヌクレオチドが少なくとも約 20 b p の長さを有する二本鎖である、請求項 11 に記載の結合体。

【請求項 13】

二本鎖が、ヒト全身性紅斑性狼瘡の抗-dsDNA自己抗体に対して顕著な結合活性を有する、請求項 12 に記載の結合体。 30

【請求項 14】

二本鎖がリンカー分子を介して結合手プラットフォーム分子と結合している、請求項 13 に記載の結合体。

【請求項 15】

リンカー分子がHADおよびHAD<sub>p</sub>Sからなる群から選択される、請求項 14 に記載の結合体。

【請求項 16】

二本鎖の長さが実質的に均一である、請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載の結合体。 40

【請求項 17】

二本鎖のヌクレオチド組成が実質的に均一である、請求項 13 ~ 16 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 18】

二本鎖の長さが約20から約50塩基対である、請求項 13 ~ 17 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 19】

二本鎖が結合手プラットフォーム分子の一方の端部またはその近傍に結合している、請求項 14 に記載の結合体。

【請求項 20】

ポリヌクレオチド二本鎖が(CA)<sub>10</sub>:(TG)<sub>10</sub>であり、結合手プラットフォーム分子が誘導体化されたトリエチレングリコールである、請求項 1 4 に記載の結合体。

【請求項 2 1】

二本鎖と結合手プラットフォーム分子のモル比が2:1から8:1の範囲である、請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 2 2】

二本鎖と結合手プラットフォーム分子のモル比が4:1から6:1である、請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 2 3】

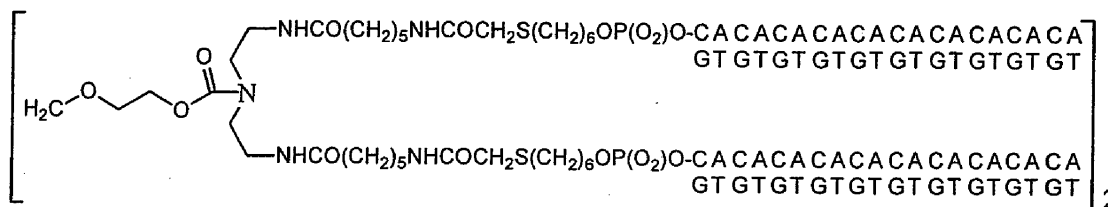
結合体が、ヒト全身性紅斑性狼瘡の免疫寛容原である、請求項 1 9 に記載の結合体。

10

【請求項 2 4】

次式を有する、請求項 2 0 に記載の結合体。

【化 1】



20

【請求項 2 5】

二本鎖と結合手プラットフォーム分子との結合が、一本鎖ポリヌクレオチドを結合手プラットフォーム分子に共有結合させる工程、および相補的な一本鎖を前記結合した一本鎖とアニールして二本鎖を形成する工程を含む、請求項 1 9、2 3 および 2 4 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 2 6】

生物学的に活性な分子が免疫原のアナログであり、前記アナログが前記免疫原の B 細胞エピトープを有し、前記免疫原の T 細胞エピトープをもたない、請求項 1 0 に記載の結合体。

30

【請求項 2 7】

免疫原のアナログがポリペプチドである、請求項 2 6 に記載の結合体。

【請求項 2 8】

免疫原が外来免疫原である、請求項 2 6 に記載の結合体。

【請求項 2 9】

外来免疫原が、生物学的薬剤、アレルギー、Rh溶血性疾患に関連するRh/D免疫原、男性不妊症に関連する -精子、またはリウマチ熱に関連する炭水化物複合体である、請求項 2 8 に記載の結合体。

【請求項 3 0】

免疫原が自己免疫原である、請求項 2 6 に記載の結合体。

40

【請求項 3 1】

自己免疫原が甲状腺炎、卒中または重症筋無力症に関連する、請求項 3 0 に記載の結合体。

【請求項 3 2】

免疫原およびアナログが同じ化学種のものである、請求項 2 6 ~ 3 1 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 3 3】

免疫原およびアナログが異なる化学種のものである、請求項 2 6 ~ 3 1 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 3 4】

50

生物学的に活性な分子がリンカー分子を介して結合手プラットフォーム分子と結合している、請求項 10 に記載の結合体。

【請求項 35】

リンカーがスルフヒドリル部分を含んでおり、結合部位がチオフィリック基を含んでいる、請求項 34 に記載の結合体。

【請求項 36】

結合部位がチオフィリック基である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合体。

【請求項 37】

チオフィリック基が、ハロアセチル、アルキルハライド、アルキルスルホネート、マレイミド、  
、  
- 不飽和カルボニル、アルキル水銀、スルフヒドリル、および  
、  
- 不飽和スルホンからなる群から選択される、請求項 36 に記載の結合体。 10

【請求項 38】

結合部位が、マレイミド、  
-ハロアセチル基、またはその他のMichael付加受容体から選択される、請求項 36 に記載の結合体。

【請求項 39】

結合部位が  
-ハロアセチル基である、請求項 38 に記載の結合体。

【請求項 40】

-ハロアセチル基がプロモアセチルである、請求項 39 に記載の結合体。

【請求項 41】

生物学的に活性な分子を結合手プラットフォーム分子に共有結合させることにより結合体を形成することを含んでなる、請求項 1 ~ 40 のいずれかに記載の結合体の製造方法。 20

【請求項 42】

(a)少なくとも約20塩基の一本鎖ポリヌクレオチドをリンカー分子に共有結合させる工程、

(b)リンカー分子に結合した複数の前記一本鎖ポリヌクレオチドを結合手プラットフォームに共有結合させる工程、および

(c)少なくとも20塩基の相補的な一本鎖ポリヌクレオチドを、前記結合手プラットフォーム分子に結合した前記一本鎖ポリヌクレオチドにアニールさせて二本鎖を形成する工程を含んでなる、請求項 19、23 および 24 のいずれかに記載の結合体を製造する方法。

【請求項 43】 30

請求項 26 ~ 33 のいずれかに記載の結合体を含む、抗体が媒介する疾患を治療するための薬剤組成物であって、注射による投与用に処方されている、前記薬剤組成物。

【請求項 44】

該組成物が抗体レベルを低下させるのに適している、請求項 43 に記載の薬剤組成物。

【請求項 45】

該組成物が抗体産生を抑制するのに適している、請求項 43 に記載の薬剤組成物。

【請求項 46】

ヒト全身性紅斑性狼瘡を治療するための薬剤組成物であって、請求項 11 ~ 25 のいずれかに記載の結合体を含んでおり、該組成物が注射による投与用に処方されている、前記薬剤組成物。 40

【請求項 47】

治療に有効な量の請求項 11 ~ 25 のいずれかに記載の結合体が薬学的に許容可能なキャリアーと共に処方されている、ヒト全身性紅斑性狼瘡を治療するための薬剤組成物。

【請求項 48】

請求項 1 ~ 40 のいずれかに記載の結合体を含んでおり、さらに薬学的に許容可能なキャリアーを含む薬剤組成物。

【請求項 49】

薬学的に許容可能なキャリアーと共に処方された請求項 26 ~ 33 のいずれかに記載の結合体を治療に有効な量含んでなる、抗体が媒介する疾患を治療するための薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【産業上の利用分野】

本発明は、自己免疫疾患である全身性紅斑性狼瘡(SLE、本明細書では単に「狼瘡」とも呼ぶ)などの病気を治療するために用いる、ポリヌクレオチドなどの生物学的あるいは化学的分子とカップリングさせた、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子を包含する複合体に関する。本発明はまた化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子自身にも関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

多くの化合物が、生物学的に有用な分子の担体として、免疫寛容性であるとされる複合体の調製に用いられてきた。例えば、Benacerraf、Katzおよび彼等の協同研究者達は、初期の研究で「D-GL」と呼ばれ、本明細書では「D-EK」と呼ぶD-グルタミン酸/D-リジンのランダムな共重合体と、ハプテンおよび種々の抗原との複合体を使用し、特定の免疫寛容の誘起を研究および発表している。米国特許第4,191,668号、および米国特許第4,220,565号参照。

10

## 【0003】

他の研究者は、ヌクレオチドあるいはDNAと、他の担体との複合体を研究している。Borelら(*Science* (1973) 182:76)は、NZB株の若いマウス中で、同系のマウスのIgG-ヌクレオチド複合体が、変性DNAに対する抗体応答を減少させる能力を評価している。別の独立した研究で、Parkerら(*J. Immunol.* (1974) 113:292)は、ポリ-D-リジンおよび/あるいはシクロホスファミドと複合させた変性DNAの、NZBマウス中での上記の症候の進行に対する影響を評価した。

20

## 【0004】

後の報文でBorelら(*Ann. NY Acad. Sci.* (1986) 475:296-306)は、オリゴヌクレオチド-免疫グロブリンの複合体に関して記載している。Borelら(*J. Clin. Invest.* (1988) 82:1901-1907、および米国特許第4,650,675号)は、DNAに結合させたヒト免疫グロブリンの複合体を用いた*in vitro*での研究を記載している。Dintzisらの米国特許第5,126,131号もまた、担体と免疫応答に関与する分子とを含む複合体に関する。

## 【0005】

他の参考文献は、非免疫性のポリマーと、免疫原との複合体を記載している。(Saikiら、*Scand. J. Immun.* (1982) 16:191-200; Sehonの、*Prog. Allergy* (1982) 32:161-202; Wilkinsonらの、*J. Immunol.* (1987) 139:326-331; Borelらの、*J. Immunol. Methods* (1990) 126:159-168を参照。)

30

本発明者らの、米国特許出願番号第07/914,869号、米国特許第5,162,515号、および米国特許出願番号第07/652,658号には、D-EK、ポリエチレングリコール、ポリ-D-リジン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、等のポリマー性の担体と、免疫グロブリンとからなる複合体が記載されている。

## 【0006】

上記の従来技術を要約すると、定義の不明確な化合物、あるいは、多くの非特異な結合部位を有する化合物が、複合体の結合手プラットフォーム分子として使用されているに過ぎないと、本発明者らは考える。この様な化合物の結合手、結合部位の位置、および、結合部位の数が、予想できず、そして大きく変動するために、この様な化合物からなる従来技術の複合体は、再現性良く製造し得ず、そしてその報告された活性は広い変動範囲を示している。

40

## 【0007】

## 【発明の要旨】

上述の従来技術とは対照的に、本発明者らは、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子を含む複合体を開発した。プラットフォーム分子の価数は予め定められ、各結合部位は生物学的あるいは化学的分子の結合のために用い得る。本発明の結合手プラットフォーム分子は、化学構造、価数、均一性が定義され、適切な生物学的および

50

/あるいは化学的分子と効率的に結合させるための、定義された官能基を有している。

【0008】

従って、本発明は1つの局面では、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子、および、生物学的および/あるいは化学的分子を含む複合体に関する。化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子と結合させ、本発明の複合体を形成するのに適した、生物学的および/あるいは化学的分子の例は、炭水化物、薬剤、脂質、リポポリサッカライド、ペプチド、タンパク質、グリコプロテイン、一本鎖あるいは二本鎖のオリゴヌクレオチドおよびそれらの化学的アナログ、免疫原のアナログ、ハプテン、ミモトープ、アプタマー等である。本発明に用いるのに適した、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子には、これらにのみ限定はされないが、以下の式の生体適合性で非抗原性の炭素ベースの化合物の誘導体が含まれる。

10

【0009】

【化8】



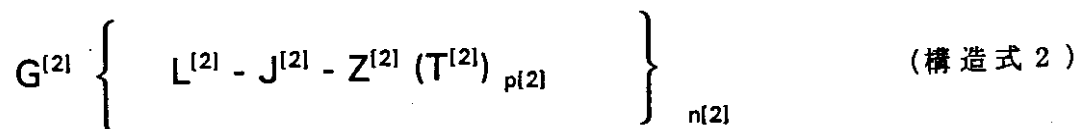
【0010】

あるいは、

20

【0011】

【化9】



【0012】

但し、存在する場合、 $G^{[1]}$ および $G^{[2]}$ は各々独立して、C、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-2000の、さらに好ましくは1-1000の鎖状原子を含む、直鎖、分枝あるいは複数に分枝した鎖である。

30

【0013】

さらに好ましくは、存在する場合、 $G^{[2]}$ は、ポリアルコール、ポリアミン、あるいはポリグリコールから誘導される基であり、最も好ましくは $G^{[2]}$ は、 $q$ が0から20の $-(CH_2)_q-$ 、 $r$ が0から300の $-CH_2(CH_2OCH_2)_rCH_2-$ 、および、 $s$ が1から4、さらに好ましくは $s$ が3から4の $C(CH_2OCH_2CH_2)_s(OH)_{4-s}$ からなる群から選択される。

【0014】

$T^{[1]}$ として示された $n^{[1]}$ 個の部分、および、 $T^{[2]}$ として示された $p^{[2]} \times n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $-NHR^{SUB}$  (アミン)、 $-C(=O)NHNHR^{SUB}$  (ヒドラジド)、 $-NHNHR^{SUB}$  (ヒドラジン)、 $-C(=O)OH$  (カルボン酸)、 $-C(=O)OR^{ESTER}$  (活性エステル)、 $-C(=O)OC(=O)R^B$  (無水物)、 $-C(=O)X$  (酸ハライド)、 $-S(=O)_2X$  (スルホニルハライド)、 $-C(=NR^{SUB})OR^{SUB}$  (イミデートエステル)、 $-NCO$  (イソシアネート)、 $-NCS$  (イソチオシアネート)、 $-OC(=O)X$  (ハロホルメート)、 $-C(=O)OC(=NR^{SUB})NHR^{SUB}$  (カルボジイミド付加体)、 $-C(=O)H$  (アルデヒド)、 $-C(=O)R^B$  (ケトン)、 $-SH$  (スルフヒドリル、あるいはチオール)、 $-OH$  (アルコール)、 $-C(=O)CH_2X$  (ハロアセチル)、 $-R^{ALK}X$  (アルキルハライド)、 $-S(=O)_2OR^{ALK}X$  (アルキルスルホネート)、 $R^1R^2$ が、 $-C(=O)CH=CHC(=O)-$ である $-NR^1R^2$  (マレイミド)、 $-C(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和カルボニル)、 $-R^{ALK}-Hg-X$  (アルキル水銀)、および $-S(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和スルホン)からなる群から選択される。

40

【0015】

さらに好ましくは、 $T^{[1]}$ として示された $n^{[1]}$ 個の部分、および、 $T^{[2]}$ として示された $p^{[2]}$

50

$\times n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $-\text{NHR}^{\text{SUB}}$  (アミン)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{X}$  (ハロアセチル)、 $-\text{R}^{\text{ALK}}\text{X}$  (アルキルハライド)、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OR}^{\text{ALK}}\text{X}$  (アルキルスルホネート)、 $\text{R}^1\text{R}^2$ が $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CHC}(=\text{O})-$ である $-\text{NR}^1\text{R}^2$  (マレイミド)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CR}^{\text{B}}=\text{CR}^{\text{B}}_2$  ( , -不飽和カルボニル)、 $-\text{R}^{\text{ALK}}-\text{Hg}-\text{X}$  (アルキル水銀)、および $-\text{S}(=\text{O})\text{CR}^{\text{B}}=\text{CR}^{\text{B}}_2$  ( , -不飽和スルホン)からなる群から選択される。

【0016】

さらにより好ましくは、 $\text{T}^{[1]}$ として示された $n^{[1]}$ 個の部分、および、 $\text{T}^{[2]}$ として示された $p^{[2]} \times n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $-\text{NHR}^{\text{SUB}}$  (アミン)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{X}$  (ハロアセチル)、 $\text{R}^1\text{R}^2$ が $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CHC}(=\text{O})-$ である $-\text{NR}^1\text{R}^2$  (マレイミド)、および、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CR}^{\text{B}}=\text{CR}^{\text{B}}_2$  ( , -不飽和カルボニル)からなる群から選択される。

10

【0017】

最も好ましくは、 $\text{T}^{[1]}$ として示された $n^{[1]}$ 個の部分の全て、および、 $\text{T}^{[2]}$ として示された $p^{[2]} \times n^{[2]}$ 個の部分の全ては、同じである。

【0018】

式中の、

各Xは独立して、原子番号が16より大きく54未満のハロゲン(Cl=17, Br=35, I=53)、あるいは他の良好な脱離基(すなわち、この状況でハロゲンと同様に振舞う、アルキルあるいはアルキル置換のスルホネートあるいはスルフェート等、アリアルあるいはアリアル置換のスルホネートあるいはスルフェート等、の弱い塩基)である。

【0019】

各 $\text{R}^{\text{ALK}}$ は独立して直鎖、分枝、あるいは環状の(1-20C)のアルキル基である。

20

【0020】

各 $\text{R}^{\text{SUB}}$ は独立して、H、直鎖、分枝、あるいは環状の(1-20C)のアルキル、(6-20C)のアリアル、あるいは(7-30C)のアルキリアルである。

【0021】

各 $\text{R}^{\text{ESTER}}$ は独立して、N-スクシンイミジル、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、テトラフルオロフェニル、ペンタクロロフェニル、2,4,5-トリクロロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、シアノメチル等、あるいは、5-クロロ-8-キノロン-1-イル、1-ピペリジル、N-ベンゾトリアゾリル等、の様なその他の活性化基である。

【0022】

各 $\text{R}^{\text{B}}$ は独立して、C、H、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-50の原子を含む基である。

30

【0023】

存在する場合、 $\text{L}^{[2]}$ で示される $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、O、 $\text{NR}^{\text{SUB}}$ およびSからなる群から選択される。

【0024】

存在する場合、 $\text{J}^{[2]}$ で示される $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $\text{C}(=\text{O})$ および $\text{C}(=\text{S})$ からなる群から選択される。

【0025】

$n^{[1]}$ は、1から32であり、より好ましくは $n^{[1]}$ は2から16であり、さらに好ましくは $n^{[1]}$ は2から8であり、最も好ましくは $n^{[1]}$ は2から4である。

40

【0026】

$n^{[2]} \times p^{[2]}$ の積が、1より大きくかつ33未満という条件で、

$n^{[2]}$ は、1から32であり、より好ましくは $n^{[2]}$ は1から16であり、さらに好ましくは $n^{[2]}$ は1から8であり、さらにより好ましくは $n^{[2]}$ は1から4であり、最も好ましくは $n^{[2]}$ は1から2である；

$p^{[2]}$ は、1から8であり、より好ましくは $p^{[2]}$ は1から4であり、最も好ましくは $p^{[2]}$ は1から2である。

【0027】

$\text{Z}^{[2]}$ で示される $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、少なくとも $p^{[2]}$ 個の官能基のための結合部

50

位をアルキル炭素原子、アルケニル炭素原子、あるいは芳香族炭素原子上に含む、C、H、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-200の原子を含む基である。

【0028】

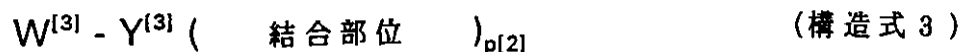
より好ましくは、 $Z^{[2]}$ として示された $n^{[2]}$ 個の部分の全ては、同じである。

【0029】

さらに好ましくは、 $Z^{[2]}$ として示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して以下の群から選択される式で記述される。

【0030】

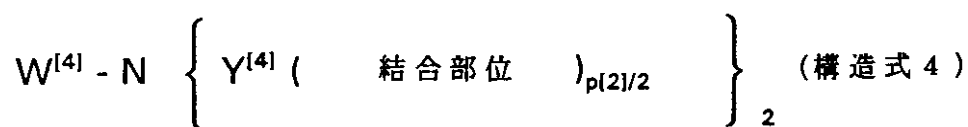
【化10】



10

【0031】

【化11】



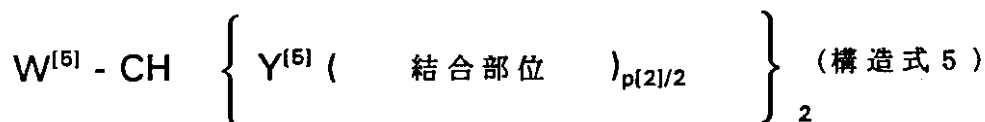
20

【0032】

あるいは、

【0033】

【化12】



【0034】

但し式中、存在する場合、 $W^{[3]}$ 、 $W^{[4]}$ 、あるいは $W^{[5]}$ として示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、C、H、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-100の原子を含む基である。

30

【0035】

$Y^{[3]}$ として示された $n^{[2]}$ 個の部分、 $Y^{[4]}$ として示された $2 \times n^{[2]}$ 個の部分、および $Y^{[5]}$ として示された $2 \times n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、少なくとも $p^{[2]}$ 個の官能基( $Y^{[3]}$ の場合)、あるいは、 $p^{[2]}/2$ 個の官能基( $Y^{[4]}$ および $Y^{[5]}$ の場合、但し $p^{[2]}/2$ は整数である)のための結合部位をアルキル炭素原子、アルケニル炭素原子、あるいは芳香族炭素原子上に含む、C、H、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-100の原子を含む基である。

【0036】

より好ましくは、存在する場合、 $W^{[3]}$ として示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10である、 $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $NR^{SUB}(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2$ 、および $NR^{SUB}(CH_2)_rNR^{SUB}C(=O)$ である。

40

【0037】

さらに好ましくは、 $Y^{[3]}$ で示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、直鎖、分枝、あるいは環状の(1-20C)のアルキル、(6-20C)のアリール、あるいは(7-30C)のアルキルアリールである。

【0038】

最も好ましくは、 $Y^{[3]}$ で示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $C_6H_4$ (1,4-二置換フェニル)、 $C_6H_3$ (1,3,5,-三置換フェニル)、および $r$ が1から10である $(CH_2)_r$ からなる群から選択

50

される。

【0039】

より好ましくは、存在する場合、 $W^{[4]}$ として示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10である、 $(CH_2)_r C(=O)$ 、および $(CH_2)_r NR^{SUB}C(=O)$ からなる群から選択される。

【0040】

より好ましくは、 $Y^{[4]}$ として示された $2 \times n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10、より好ましくは $r$ が2から6で、 $q$ が1から10、より好ましくは $q$ が1から3である、 $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2)_r NR^{SUB}C(=O)(CH_2)_q$ 、 $(CH_2)_r C(=O)NR^{SUB}(CH_2)_q$ 、 $(CH_2)_r NR^{SUB}C(=O)(CH_2)_q NR^{SUB}C(=O)(CH_2)_r$ 、 $(CH_2)_r C(=O)NR^{SUB}(CH_2)_q NR^{SUB}C(=O)(CH_2)_r$ 、 $(CH_2)_r NR^{SUB}C(=O)(CH_2CH_2O)_q CH_2CH_2$ 、および、 $(CH_2)_r C(=O)NR^{SUB}(CH_2CH_2O)_q CH_2CH_2$ からなる群から選択される。

10

【0041】

より好ましくは、存在する場合、 $W^{[5]}$ で示された $n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10である、 $(CH_2)_r C(=O)NR^{SUB}$ 、および $(CH_2)_r NR^{SUB}C(=O)NR^{SUB}$ からなる群から選択される。

【0042】

より好ましくは、 $Y^{[5]}$ で示された $2 \times n^{[2]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10で $q$ が1から10である、 $(CH_2)_r$ 、および $(CH_2)_r C(=O)NR^{SUB}(CH_2)_q$ からなる群から選択される。

【0043】

狼瘡を治療するための、別の好ましい実施態様では、複合体は、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子、および、該プラットフォーム分子に各々結合し、そして、ヒトSLEの抗dsDNA自己抗体に対して顕著な結合活性を有する、複数の少なくとも約20塩基対のポリヌクレオチド二本鎖を含む。これらの好ましい実施態様では、ポリヌクレオチド二本鎖は、実質的に長さが均一で、そして、二本鎖の一方の一本鎖が、直接に、あるいはリンカー分子を介して、の何れかで結合手プラットフォーム分子と結合されている。一般に、合成ポリヌクレオチドをリンカー分子と結合させ、次いで結合手プラットフォーム分子と結合させる。一般に、鎖中のリンカー分子が結合した位置から、少なくとも約20塩基対のペンダント鎖が各鎖に形成される様に、二本鎖の内のリンカーを含む鎖を、その一端で、あるいは一端の近傍(即ち、約5塩基対以内)で結合させる。次いで、第2の鎖を該第1の鎖にアニールし、二本鎖を形成する。従って、本発明の複合体は、以下の式で一般的に記述し得る：

20

$[(PN)_n\text{-リンカー}]_m\text{-結合手プラットフォーム分子}$

但し式中、 $n$ は少なくとも約20で、 $m$ は2-8であり、 $PN$ は $n$ 個のヌクレオチドを有する二本鎖ポリヌクレオチドである。

30

【0044】

本発明に適したリンカー分子の例は、チオ-6炭素鎖ホスフェートであるHADの様な6個の炭素のチオール、およびチオ-6炭素鎖ホスホロチオエートであるHAD<sub>p</sub>Sである。本発明の化学的に定義された結合手プラットフォーム分子は、例えば、アミノ修飾したPEGと、3,5-ビス-(ヨードアセトアミド)ベンゾイルクロライド(本明細書では以降「IA-DABAクロライド」と呼ぶ)；3-カルボキシプロピオンアミド-N,N-ビス-[(6'-N'-カルボベンジルオキシアミノヘキシル)アセトアミド] 4"-ニトロフェニルエステル(本明細書では以降「BAHA」と呼ぶ)；3-カルボキシプロピオンアミド-N,N-ビス-[(8'-N'-カルボベンジルオキシアミノ-3',6',-ジオキサオクチル)アセトアミド] 4"-ニトロフェニルエステル(本明細書では以降「BAHA<sub>0x</sub>」と呼ぶ)とを反応させ；あるいは、PEG-ビス-クロロホルメートと、N,N-ジ[2-(6'-N'-カルボベンジルオキシアミノヘキサノアミド)エチル]アミン(本明細書では以降「AHAB」と呼ぶ)とを反応させることにより形成される。

40

【0045】

本発明の複合体の二本鎖のヌクレオチド組成は、実質的に均一であり得る。本発明の複合体の二本鎖の長さは、20から50塩基対であり得る。本発明の複合体の二本鎖は、その端部あるいはその近傍で、結合手プラットフォーム分子に結合し得る。本発明の複合体のポリヌクレオチド二本鎖は、異なる塩基の2マーから4マーの、相補的な繰り返し単位から構成

50

され得る。本発明の複合体のポリヌクレオチド二本鎖は：ポリ(CG):ポリ(CG)；ポリ(TA):ポリ(TA)；ポリ(CI):ポリ(CI)；ポリ(CA):ポリ(TG)；あるいは、ポリ(GA):ポリ(TC)；であり得る。

【0046】

本発明の複合体においては、ポリヌクレオチド二本鎖は、 $(CA)_{10}:(TG)_{10}$ であり得、上記結合手プラットフォーム分子は、誘導体化されたトリエチレングリコールであり得る。この複合体においては、上記二本鎖と、上記結合手プラットフォーム分子との、モル比は、好ましくは2:1から8:1であり、さらに好ましくは4:1である。

【0047】

本発明の複合体においては、ポリヌクレオチド二本鎖は、 $(CA)_{10}:(TG)_{10}$ であり得、上記結合手プラットフォーム分子は、誘導体化された1,2-ビス-(2'-アミノエトキシ)エタンであり得る。この複合体においては、上記二本鎖と、1,2-ビス-(2'-アミノエトキシ)エタンとの、モル比は、好ましくは2:1から8:1であり、さらに好ましくは4:1である。

【0048】

本発明の複合体は、ヒトSLE(全身性紅斑性狼瘡)の免疫寛容原であり得る。

【0049】

本発明の複合体のポリヌクレオチド二本鎖は、B-DNAタイプの螺旋構造を有し得、そして、ヒトSLE(全身性紅斑性狼瘡)の抗dsDNA自己抗体に対して顕著な結合活性を有し得る。

【0050】

本発明によれば、狼瘡の治療のための薬学的組成物は、薬学的に許容可能で注射可能な賦形剤と共に処方された、本発明の複合体を含み得る。狼瘡を患った個体を治療する方法は、治療を必要とする個体に、治療に有効な量のこの組成物を投与する工程を含み得る。

【0051】

本発明の複合体を製造するための方法は：(a)各々が少なくとも約20塩基対の複数の一本鎖ポリヌクレオチドを、上記結合手プラットフォーム分子上に結合させる工程；および(b)相補的な一本鎖ポリヌクレオチドを、結合手プラットフォーム分子に結合したこの一本鎖ポリヌクレオチドとアニールさせ、上記二本鎖を形成する工程、を含み得る。この方法は、先ず、上記ポリヌクレオチド二本鎖をリンカー分子に結合し、そして次に、このリンカー分子を上記結合手プラットフォーム分子に結合する工程をさらに含み得る。

【0052】

本発明の複合体の生物学的あるいは化学的分子は、免疫原のアナログであり得、ここで、(a)このアナログは、免疫原が特異的に結合するB細胞に、特異的に結合し、そして(b)この複合体はT細胞のエピトープを欠いているものであり得る。ここで、上記免疫原は、生物学的薬剤、アレルゲン、Rh溶血性疾患に関連したRh/D免疫原、男性不妊症に関連した-精子、あるいは、リウマチ熱に関連した炭水化物複合体のような外来免疫原であり得る。あるいは、上記免疫原は、甲状腺炎、糖尿病、卒中、あるいは重症筋無力症に関連しているような自己免疫原であり得る。上記免疫原および上記アナログは、同じ化学種、例えば、ポリペプチドであり得る。あるいは、上記免疫原および上記アナログは、異なる化学種であり得る。

【0053】

本発明によれば、抗体が媒介する疾患の治療のための薬学的組成物は、薬学的に許容可能なキャリアーと組み合わせられた、治療に有効な量の本発明の複合体を含み得る。

【0054】

本発明によれば、免疫原に対して特異的なB細胞アネルギーを、個体中に誘起する方法は、有効な量の本発明の複合体を、例えば、上記の薬学的組成物の形態で、個体に投与する工程を含み得る。

【0055】

本発明によれば、免疫原に対する応答で望ましくない抗体が産生される、抗体が媒介する疾患を有する個体を治療する方法は、治療に有効な量の本発明の複合体を、例えば上記の薬学的組成物の形態で、個体に投与する工程を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0056】

本発明の複合体を製造する方法は：(a)T細胞のエピトープを欠いている上記の免疫原のアナログを、化学的に定義された上記結合手プラットフォーム分子と共有結合させ、複合体を形成する工程；および(b)この複合体を反応混合物中から回収する工程、を含み得る。ここで、上記免疫原は、生物学的薬剤、アレルゲン、男性不妊症に関連した -精子、あるいは、Rh溶血性疾患に関連したRh/D免疫原のような外来免疫原であり得る。あるいは、上記免疫原は、甲状腺炎、糖尿病、卒中、重症筋無力症、あるいは、リウマチ熱に関連しているような自己免疫原であり得る。上記免疫原およびアナログは、同じ化学種であり得る。

## 【0057】

驚くべきことに、本発明の化学的に定義された、非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子と、生物学的あるいは化学的な分子(非ハプテン)とからなる複合体を用いると、従来技術に記載されているポリマー性の担体に比べ、少なくとも約10倍から数100倍以上の免疫抑制という、予期されなかった結果が達成された。例えば、本明細書に記載したように、化学的に定義された、非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子を含む本発明の複合体を用いると、従来技術に記載されている定義の不明確な担体に比べ、少なくとも100倍の抗-dsDNA自己抗体の免疫抑制が達成された。

## 【0058】

本発明のさらに別の局面は、(a)化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子と、(b)二本鎖の一方の鎖の一端あるいは一端の近傍に位置する官能基により、該結合手プラットフォーム分子に、各々全てが結合された、複数のポリヌクレオチド二本鎖とからなり、ヒトSLEの免疫寛容原である、複合体である。

## 【0059】

上記の複体の薬学的組成物、および、薬学的に許容可能な製薬媒体は、本発明のさらに別の局面である。

## 【0060】

本発明の別の局面は、治療を必要とする個体に、有効な量の上記の複合体を投与する工程を含む、SLEを治療する方法である。

## 【0061】

本発明のさらに別の局面は、有効な量の上記の複合体を、個体に投与する工程を含む、個体中に、免疫原に対する特異的なB細胞アネルギーを誘起する方法である。

## 【0062】

本発明の別の局面は、有効な量の上記の複合体を個体に投与する工程を含む、免疫原に回答して望ましくない抗体が産生される、抗体が媒介する疾患を治療する方法である。

## 【0063】

本発明の別の局面は、生物学的あるいは化学的な分子を、化学的に定義された結合手プラットフォーム分子に結合させて、複合体を形成する工程を含む、上記の複合体を製造するための方法である。

## 【0064】

本発明の別の局面は、各々が少なくとも約20ヌクレオチドの長さで、そして、化学的に定義された結合手プラットフォーム分子上の官能基と反応する官能基をその一端あるいは一端の近傍に有する、複数の一本鎖ポリヌクレオチドを、反応させて複合体を形成する工程、および、化学的に定義された結合手プラットフォーム分子に結合された一本鎖ポリヌクレオチドと、相補的な一本鎖ポリヌクレオチドとをアニールして、二本鎖DNAのペンダント鎖を形成する工程を含む、上記のSLEを治療するための複合体の製造方法である。

## 【0065】

本発明のさらに別の局面は、以下の式の新規な、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子である：

## 【0066】

## 【化13】

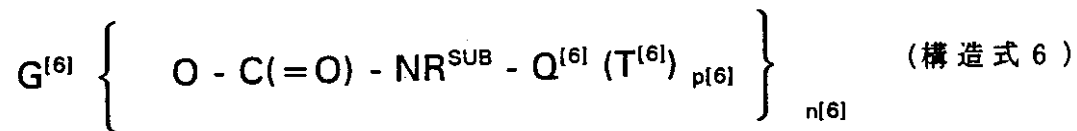
10

20

30

40

50



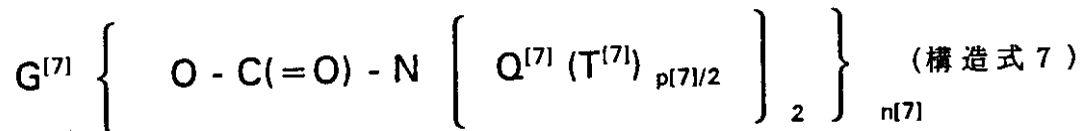
【 0 0 6 7 】

あるいは、

【 0 0 6 8 】

【 化 1 4 】

10



【 0 0 6 9 】

但し、存在する場合、 $G^{[6]}$ および $G^{[7]}$ は各々独立して、C、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-2000の、より好ましくは1-1000の、鎖状原子を含む、直鎖、分枝あるいは複数に分枝した鎖である。

【 0 0 7 0 】

20

さらに好ましくは、 $G^{[6]}$ および $G^{[7]}$ は各々、ポリアルコール、ポリアミン、あるいはポリグリコールから誘導される基である。

【 0 0 7 1 】

最も好ましくは、 $G^{[6]}$ および $G^{[7]}$ は各々、 $q$ が0から20の $-(CH_2)_q-$ 、 $r$ が0から300の $-CH_2(CH_2OCH_2)_rCH_2-$ 、および $s$ が1から4の、より好ましくは $s$ が3から4の、 $C(CH_2OCH_2CH_2)_s(OH)_4-$ からなる群から選択される。

【 0 0 7 2 】

$T^{[6]}$ として示された $n^{[6]} \times p^{[6]}$ 個の部分、および、 $T^{[7]}$ として示された $p^{[7]} \times n^{[7]}$ 個の部分は各々独立して、 $-NHR^{SUB}$  (アミン)、 $-C(=O)NHNHR^{SUB}$  (ヒドラジド)、 $NHNHR^{SUB}$  (ヒドラジン)、 $-C(=O)OH$  (カルボン酸)、 $-C(=O)OR^{ESTER}$  (活性エステル)、 $-C(=O)OC(=O)R^B$  (無水物)、 $-C(=O)X$  (酸ハライド)、 $-S(=O)_2X$  (スルホニルハライド)、 $-C(=NR^{SUB})OR^{SUB}$  (イミデートエステル)、 $-NCO$  (イソシアネート)、 $-NCS$  (イソチオシアネート)、 $-OC(=O)X$  (ハロホルメート)、 $-C(=O)OC(=NR^{SUB})NHR^{SUB}$  (カルボジイミド付加体)、 $-C(=O)H$  (アルデヒド)、 $-C(=O)R^B$  (ケトン)、 $-SH$  (スルフヒドリル、あるいはチオール)、 $-OH$  (アルコール)、 $-C(=O)CH_2X$  (ハロアセチル)、 $-R^{ALK}X$  (アルキルハライド)、 $-S(=O)_2OR^{ALK}X$  (アルキルスルホネート)、 $R^1R^2$ が $-C(=O)CH=CHC(=O)-$ である $-NR^1R^2$  (マレイミド)、 $-C(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和カルボニル)、 $-R^{ALK}-Hg-X$  (アルキル水銀)、および $-S(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和スルホン)からなる群から選択される。

30

【 0 0 7 3 】

より好ましくは、 $T^{[6]}$ として示された $n^{[6]} \times p^{[6]}$ 個の部分、および、 $T^{[7]}$ として示された $n^{[7]} \times p^{[7]}$ 個の部分は各々独立して、 $-NHR^{SUB}$  (アミン)、 $-C(=O)CH_2X$  (ハロアセチル)、 $-R^{ALK}X$  (アルキルハライド)、 $-S(=O)_2OR^{ALK}X$  (アルキルスルホネート)、 $R^1R^2$ が $-C(=O)CH=CHC(=O)-$ である $-NR^1R^2$  (マレイミド)、 $-C(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和カルボニル)、 $-R^{ALK}-Hg-X$  (アルキル水銀)、および $-S(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和スルホン)からなる群から選択される。

40

【 0 0 7 4 】

さらに好ましくは、 $T^{[6]}$ として示された $n^{[6]} \times p^{[6]}$ 個の部分、および、 $T^{[7]}$ として示された $n^{[7]} \times p^{[7]}$ 個の部分は各々独立して、 $-NHR^{SUB}$  (アミン)、 $-C(=O)CH_2X$  (ハロアセチル)、 $R^1R^2$ が $-C(=O)CH=CHC(=O)-$ である $-NR^1R^2$  (マレイミド)、 $-C(=O)CR^B=CR^B_2$  ( , -不飽和カルボニル)からなる群から選択される。

50

## 【 0 0 7 5 】

最も好ましくは、 $T^{[6]}$ として示された $n^{[6]} \times p^{[6]}$ 個の部分の全て、および、 $T^{[7]}$ として示された $n^{[7]} \times p^{[7]}$ 個の部分の全ては、同じである。

## 【 0 0 7 6 】

ここで式中、

各 $X$ は、独立して、原子番号が16から54のハロゲン、あるいは良好な脱離基である。

## 【 0 0 7 7 】

各 $R^{ALK}$ は独立して、直鎖、分枝あるいは環状の(1-20C)のアルキル基である。

## 【 0 0 7 8 】

各 $R^{SUB}$ は独立して、H、直鎖、分枝、あるいは環状の(1-20C)のアルキル、(6-20C)のアリール、あるいは(7-30C)のアルキルアリールである。 10

## 【 0 0 7 9 】

各 $R^{ESTER}$ は独立して、N-スクシンイミジル、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、テトラフルオロフェニル、ペンタクロロフェニル、2,4,5-トリクロロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、シアノメチル等、あるいは、5-クロロ-8-キノロン-1-イル、1-ピペリジル、N-ベンゾトリアゾリル等、の様なその他の活性化基である。

## 【 0 0 8 0 】

各 $R^B$ は独立して、C、H、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-50の原子を含む基である。

## 【 0 0 8 1 】

$n^{[6]} \times p^{[6]}$ の積が、1より大きくかつ33未満という条件で、  
 $n^{[6]}$ は、1から32であり、より好ましくは $n^{[6]}$ は1から16であり、さらに好ましくは $n^{[6]}$ は1から8であり、さらに好ましくは $n^{[6]}$ は1から4であり、最も好ましくは $n^{[6]}$ は1から2である；

$p^{[6]}$ は、1から8であり、より好ましくは $p^{[6]}$ は1から4であり、最も好ましくは $p^{[6]}$ は1から2である。

## 【 0 0 8 2 】

$n^{[7]} \times p^{[7]}$ の積が、1より大きくかつ33未満という条件で、  
 $n^{[7]}$ は、1から32であり、より好ましくは $n^{[7]}$ は1から16であり、さらに好ましくは $n^{[7]}$ は1から8であり、さらに好ましくは $n^{[7]}$ は1から4であり、最も好ましくは $n^{[7]}$ は1から2である；

$p^{[7]}$ は、1から8であり、より好ましくは $p^{[7]}$ は1から4であり、最も好ましくは $p^{[7]}$ は1から2である。 30

## 【 0 0 8 3 】

$Q^{[6]}$ で示された $n^{[6]}$ 個の部分、および、 $Q^{[7]}$ で示された $2 \times n^{[7]}$ 個の部分は各々独立して、少なくとも $p^{[6]}$ 個の( $Q^{[6]}$ の場合)あるいは $p^{[7]}/2$ 個の( $Q^{[7]}$ の場合、例えば、だし $p^{[7]}/2$ は整数である)の官能基のための結合部位をアルキル炭素原子、アルケニル炭素原子、あるいは芳香族炭素原子上に含む、C、H、N、O、Si、PおよびSからなる群から選択される1-100の原子を含む基である。

## 【 0 0 8 4 】

より好ましくは、 $Q^{[6]}$ として示された $n^{[6]}$ 個の部分の全ては、同じである。 40

## 【 0 0 8 5 】

より好ましくは、 $Q^{[7]}$ として示された $2 \times n^{[7]}$ 個の部分の全ては同じである。

## 【 0 0 8 6 】

より好ましくは、 $Q^{[6]}$ として示された $n^{[6]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10で $q$ が1から10である、 $CH[(CH_2)_r(\text{結合部位})]_2$ 、および $CH[(CH_2)_rC(=O)NR^{SUB}(CH_2)_q(\text{結合部位})]_2$ からなる群から選択される。

## 【 0 0 8 7 】

より好ましくは、 $Q^{[7]}$ として示された $2 \times n^{[7]}$ 個の部分は各々独立して、 $r$ が1から10、より好ましくは $r$ が2から6であり、 $q$ が1から10、より好ましくは $q$ が1から3である、 $(CH_2)_r$ 、 50

$(\text{CH}_2)_r \text{NR}^{\text{S}^{\text{U}^{\text{B}}}} \text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_q$ 、 $(\text{CH}_2)_r \text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{S}^{\text{U}^{\text{B}}}} (\text{CH}_2)_q$ 、 $(\text{CH}_2)_r \text{NR}^{\text{S}^{\text{U}^{\text{B}}}} \text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_q \text{NR}^{\text{S}^{\text{U}^{\text{B}}}} \text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_r$ 、 $(\text{CH}_2)_r \text{NR}^{\text{S}^{\text{U}^{\text{B}}}} \text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q \text{CH}_2\text{CH}_2$ 、および、 $(\text{CH}_2)_r \text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{S}^{\text{U}^{\text{B}}}} (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q \text{CH}_2\text{CH}_2$  からなる群から選択される。

【0088】

【発明の構成】

本明細書で使用する用語「結合手プラットフォーム分子」は、別個の多くの生物学および/あるいは化学的な分子の結合を可能とする複数の部位を有する、化学的に定義された、非ポリマー性の、非免疫原性の分子を意味する。

【0089】

本明細書で使用する用語「非免疫原性」は、前記結合手プラットフォーム分子の形容詞に用いられ、そして、前記結合手プラットフォーム分子が、単独で個体に投与された時に、免疫応答を実質的に引き起こさないことを意味する。

【0090】

本明細書で使用する用語「個体」は、多くの哺乳類の種を意味し、ヒト、霊長類、マウス、および、ウシや羊の様な家畜、馬の様な競技用動物、および、犬や猫の様なペット等を含む。

【0091】

本明細書で使用する用語「免疫原 (immunogen)」は、動物に注入した時に、液性免疫応答を誘起する物質である。免疫原は、B細胞エピトープおよびT細胞エピトープの両方を有する。

【0092】

本明細書で使用する用語、免疫原の「アナログ」は、(a)免疫原が特異的に結合する抗体に特異的に結合し、そして(b)T細胞エピトープを欠く分子の意味である。通常は、アナログは免疫原の断片であるか誘導体であるため、免疫原と同じ化学種に属するが(例えば、免疫原がポリペプチドで、アナログがポリペプチド)、化学的類似性は重要では無い。従って、上記の(a)および(b)の機能的特性を有するという条件で、アナログは免疫原と異なった化学種(例えば、免疫原が炭化水素で、アナログがポリペプチド)であり得る。アナログは、タンパク質、炭水化物、脂質、リポプロテイン、グリコプロテイン、リポポリサッカライド、核酸、あるいは他の化学的あるいは生物学的物質であり得る。

【0093】

免疫原のアナログには、「ミモトープ」もまた含まれ得る。本明細書で使用する用語「ミモトープ」は、抗体が免疫原と結合するのを競合的に妨げる、合成分子を意味する。抗体と特異的に結合するので、ミモトープは、免疫原の抗原決定部位を模倣していると考えられている。免疫原のアナログと同様に、ミモトープは、(a)免疫原が特異的に結合する抗体に特異的に結合し、そして(b)T細胞エピトープを欠く。

【0094】

免疫原のアナログには「アプタマー」もまた含まれ得る。本明細書で使用する用語「アプタマー」は、抗体が免疫原と結合するのを競合的に妨げる合成オリゴヌクレオチドを意味する。免疫原のアナログと同様にアプタマーは、(a)免疫原が特異的に結合する抗体に特異的に結合し、そして(b)T細胞エピトープを欠く。

【0095】

本明細書で使用する用語「B細胞アネルギー」は、抗体の産生および分泌にT細胞の補助を受けることを必要とするB細胞の応答の欠如を意味し、そして、これらに限定されないが、成熟および/あるいは未成熟B細胞のクローン欠損、および/あるいは、B細胞が抗体を産生する能力を欠如すること、を含む。本明細書で使用する用語「応答の欠如」は、免疫原に対する液性応答の治療的に有効な減少を意味する。定量的表現では、(抗体産生の減少で測定される)該減少は、少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、そして最も好ましくは100%である。

【0096】

本明細書で使用する用語「抗体」は、その産生が、T細胞依存性の抗体を意味する。

10

20

30

40

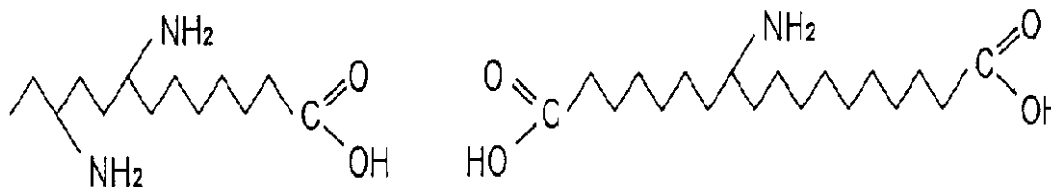
50

## 【0097】

本発明の化学的に定義された結合手プラットフォーム分子の価数は、該プラットフォーム分子に導入する分枝した基の数により、予め定め得る。適切な分枝した基は、一般に、ジアミノ酸、トリアミン、およびアミノ二酸から誘導される。ジアミノ酸およびアミノ二酸の例には、以下の式の化合物が含まれる：

## 【0098】

## 【化15】



10

## 【0099】

本発明の複合体は、生物学的に安定である；即ち、数時間、数日、あるいは数カ月のオーダーの *in vivo* での排泄半減期を示し、治療効果に寄与する。本発明の化学的に定義された結合手プラットフォーム分子はまた、実質的に非免疫原性であり（即ち、動物に投与した際に免疫原性を示さない、あるいは穏やかな免疫原性のみを示す）、与えた投与量で非毒性であり（即ち、治療薬として有用であるために十分な程度に非毒性）、そして好ましくは、定義された化学構造からなる。これらは、ポリヌクレオチド二本鎖の様な、複数の生物学的あるいは化学的分子が共有結合で結合し得る、非免疫原性で非毒性の多官能性基質を提供する。これらは通常、約200から約200,000の範囲の平均分子量を有し、一般には約200から約20,000である。これらは、分子量が大きく変動する化合物の混合物である従来技術のポリマーに比べ、均一である。特に好適で均一な本発明の結合手プラットフォーム分子の例は、約200から8,000の分子量を有する誘導体化した、2,2'-エチレンジオキシジエチルアミン(EDDA)、トリエチレングリコール(TEG)、およびポリエチレングリコール(PEG)である。

20

## 【0100】

生物学的あるいは化学的な分子の、化学的に定義されたプラットフォーム分子への結合は、多くの方法で行い得る。典型的には、生物学的あるいは化学的な分子、および、結合手プラットフォーム分子の官能基ならびに、1種類あるいはそれ以上の架橋剤を用いて行われる。

30

## 【0101】

結合手プラットフォーム分子にカップリングされる合成ポリヌクレオチド二本鎖は、少なくとも約20 bp、そして好ましくは20-50 bpからなる。本明細書に記載するポリヌクレオチドは、他にことわりが無い限りデオキシリボヌクレオチドであり、5'から3'方向に記載する。この二本鎖は、実質的に長さが均一であることが好ましい；即ち、母集団中の長さの変動が、塩基対の数で表した平均二本鎖長の約±20%、好ましくは±10%を超えない。ヌクレオチド組成もまた、実質的に均一であることが好ましい；即ち、塩基組成および塩基配列が、各二本鎖の間で約10%以上変動しない。ヌクレオチド組成は、各二本鎖で完全に均一であることが最も好ましい。

40

## 【0102】

円二色性(CD)スペクトルの解釈に基づくと、本発明の二本鎖は、B-DNAタイプの螺旋構造であると推測される。ただし、本発明がこの推測により限定されることは意図しない。より完全な分析に基づくならば、二本鎖は、Z-DNAおよび/あるいはA-DNAタイプの螺旋構造であるかも知れない。

## 【0103】

これらのポリヌクレオチド二本鎖は、天然のDNAから合成し得、あるいは化学的あるいは

50

組み換えの技法で合成し得る。天然あるいは組み換えで産生されたより長鎖のdsDNAは、消化(例えば、酵素的消化、化学的消化、あるいは機械的剪断)され、そして、(例えば、アガロースゲルあるいはSephadex(登録商標)カラムで)分画されて、目的の長さのポリヌクレオチドを与え得る。

【0104】

あるいは、長さが約70塩基迄の相補的な一本鎖ポリヌクレオチド鎖の対は、一般的な手順で、市販されているDNA合成装置を用いて容易に調製され、次いでアニールされて、二本鎖を形成する。より長鎖の合成dsDNAは、化学的に製造した複数の短い鎖の酵素伸張(5'-ホスホリル化し、次にライゲーションする)により入手し得る。

【0105】

ポリヌクレオチドは、分子クローニングによっても製造し得る。例えば、目的の長さと同配列のポリヌクレオチドは上述の様に合成される。これらのポリヌクレオチドは、消化され、特定の制限酵素部位へライゲーションで挿入するための適切な末端を有し得る。得られた構築物は、標準的なクローニングベクター中に挿入し、そして該ベクターを形質転換により、適切な微生物/細胞に導入する。形質転換体は、標準マーカーにより確認され、そしてDNA複製に適した条件下で増殖させる。ポリヌクレオチドは、制限酵素での処理、および(例えば、アガロースゲルあるいはSephadex(登録商標)カラムによる)一般的なサイズ分画法により、他の微生物/細胞のDNAから単離し得る。

【0106】

あるいは、ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)技術により、ポリヌクレオチドを複製し得る。Saiki, R.K.ら、Science (1985) 230:1350; Sackiら、Science (1988) 239:487; Sambrookら、In Molecular Cloning Techniques: A Laboratory Manual, Vol 12, p 14.1-14.35 Cold Spring Harbor Press (1989)などを参照。

【0107】

実施例に記載したアッセイにより、SLE抗血清に対する結合活性で、ポリヌクレオチドをスクリーニングし得る。結合活性を $I_{50}$ (ヌクレオチドのモル濃度で表した、最大の半分の阻害をもたらすポリヌクレオチド濃度)で表現し得る、改変したFarrアッセイは、好適なアッセイである。約500 nM以下、好ましくは50 nM以下の $I_{50}$ を有するポリヌクレオチド二本鎖は、顕著な結合活性を有するとみなされ、それゆえに、本発明の複合体の製造に有用である。

【0108】

ポリヌクレオチドは、その抗体結合活性が保持される様な様式で、化学的に定義された結合手プラットフォーム分子に結合される。これは、ポリヌクレオチドを、結合部位から鎖の自由(非結合)端までが少なくとも約20塩基対のペンダント鎖を形成する様に、ポリヌクレオチド鎖上の定められた位置で、結合手プラットフォーム分子と結合させることで行われる。

【0109】

特に好適な実施態様では、本発明の複合体のポリヌクレオチドは、その一端で、あるいは一端の近傍でリンカー分子とカップリングされる。このリンカー分子を、次に化学的に定義された結合手プラットフォーム分子とカップリングさせる。例えば以下の様にして、定義された二本鎖PNを結合手プラットフォーム分子と結合し得る。まず、シトシン(C)とアデノシン(A)が交互に存在する約20の長さのヌクレオチドからなる一本鎖を用意する。次に、トリエチレングリコールの様な誘導体化したプラットフォーム分子上の4つの反応部位に、HADの様なリンカーを介して4本のCA鎖を共有結合させ得る。この結合手プラットフォーム分子は、プロモアセチルの様な基を含む様に合成されている。この複合化の際、脱離基は硫黄で置換される。次に、チミジン(T)とグアノシン(G)が交互に存在する約20の長さのヌクレオチドからなる第二の一本鎖ヌクレオチド鎖を、前記のCA鎖とアニールさせ、構造式：

$[(PN)_{20}\text{-リンカー}]_4\text{-結合手プラットフォーム分子}$

の二本鎖鎖PN複合体を形成し得る。

10

20

30

40

50

## 【0110】

あるいは、他の好適な実施態様では、モルホリノブリッジを介して、ポリヌクレオチドの3'末端で、このポリヌクレオチドを結合手プラットフォーム分子にカップリングし得る。モルホリノ結合は、ポリヌクレオチドの一方の鎖の酸化された3'末端リボースを、誘導体化したプラットフォーム分子上のフリーのアミノ基と縮合させ、次に、この付加体を還元性の条件に曝すことにより、形成される。このカップリングには、誘導体化した結合手プラットフォーム分子が、少なくともこのプラットフォーム分子に結合させるポリヌクレオチド二本鎖の数と等しい数のアミノ基を有することが必要である。

## 【0111】

この様な複合体の合成は、二段階で行われる。第一の段階は、ポリヌクレオチド二本鎖の1つの鎖を、上記の縮合/還元反応を介して、誘導体化したプラットフォーム分子にカップリングする工程である。一本鎖ポリヌクレオチドを、過ヨウ素酸塩で処理し、3'末端のリボース基を酸化されたりボースに変換することで、酸化された3'末端リボースを形成する。この一本鎖ポリヌクレオチドを次に、pHが約6.0から8.0の誘導体化した結合手プラットフォーム分子の水溶液に、2-8 で徐々に加える。ポリヌクレオチドとプラットフォーム分子とのモル比は、全ての複合反応で一般に、約2:1から約30:1の範囲、通常は約2:1から約8:1、そして、好ましくは約4:1から6:1である。

10

## 【0112】

このことに関連して、複合体は、巨大分子の様な非常に大きな分子量を有さないのが好ましい。特に、分子量が200,000よりも大きな繰り返し単位を有する巨大分子は、T-細胞依存性の免疫原であり得る。Dintzisら、*J. Immun.* (1983) 131:2196; および *J. Immun.* (1989) 143:1239を参照。縮合反応の間(一般に24-48時間の反応時間)あるいは後に、ソジウムシアノボロハイドライドの様な強力な還元剤を加え、モルホリノ基を形成する。次に、二本鎖の相補鎖をこの複合体に加え、そして、混合物を加熱し、そして徐冷し、両鎖をアニールさせる。この複合体は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィーで精製し得る。

20

## 【0113】

上記のリボースを用いた方法に代わる1つの方法は、ポリヌクレオチドの上にアルデヒド基を形成し、そして、これらの基を、プラットフォーム分子の上の反応性官能基を介して、該ポリヌクレオチドとプラットフォーム分子とをカップリングさせるために用いることである。この反応は、ポリヌクレオチドの3'あるいは5'末端に結合させたgem-あるいはvicinal-ジオールは、過ヨウ素酸ナトリウムで酸化してアルデヒドとし得、これをプラットフォーム分子のアミノ官能基と縮合し得ることを利用している。環状部分、例えば5-員環、にジオールが存在する場合、得られる縮合生成物は、窒素を有するヘテロ環式化合物、例えば、6-員のモルホリノあるいはピペリジノ環である。このイミノ縮合生成物は、例えば、ソジウムボロハイドライドあるいはソジウムシアノボロハイドライド等の適切な還元剤で還元することで安定化し得る。ジオールが非環状化合物の場合、得られる酸化生成物は、唯1個のアルデヒド基を有し、そしてこの縮合生成物は第2アミンである。

30

## 【0114】

他の方法は、アルキルアミノあるいはアルキルスルフィドリル基を、適切なヌクレオチドの反応(例えば、ホスホアミダイト反応)を用いて、ポリヌクレオチドの3'あるいは5'の何れかの末端に導入する工程を含む。次に、この親核性基を使用して、例えば、アルキルアミン誘導体の場合、ジメチルスベリミデートの様な大過剰のホモ二官能性の架橋試薬と、あるいは、アルキルスルフィドリル誘導体の場合、例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)あるいはスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)等の、過剰のヘテロ二官能性の架橋試薬と反応させ得る。過剰の架橋試薬を除去した後に、このポリヌクレオチド誘導体をプラットフォーム分子上のアミノ基と反応させる。あるいは、スルフィドリル基は、マレイミド、あるいは -ハロアセチル基、あるいは他の適切なMichael付加受容体の様なプラットフォーム分子上の親電子センターと反応させ得る。

40

## 【0115】

50

さらに別の方法では、修飾したヌクレオチドを用いる。標準的なDNA合成反応を用いて、好ましくは5'あるいは3'末端であるポリヌクレオチドの所望の位置に、適切なデオキシヌクレオシド誘導体を組み込み得る。次に、これらのヌクレオシド誘導体を、プラットフォーム分子上のアルキルアミノ基と、特異的にかつ直接反応させ得る。あるいは、アミン触媒の $\beta$ -脱離の様な、上記のジアルデヒドの反応で起こる副反応は、結合される鎖の3'末端に適切なヌクレオシド誘導体を導入することで防ぎ得る。この例は、リボースの5'メチレン伸張である；即ち、5'ヒドロキシメチル基の代わりに5' (2-ヒドロキシエチル)基を導入する。別の方法では、ホスホネート結合あるいはホスフィネート結合を、プラットフォーム分子と結合されるポリヌクレオチドの3'末端のジヌクレオチドに用いる。

【0116】

<免疫原のアナログ>

抗体が媒介する疾患に關与する免疫原は、アレルギー、男性不妊症の $\beta$ -精子、リウマチ熱の炭水化物複合体、新生児の溶血性疾患の赤血球Rh/D抗原、(治療用のタンパク質、ペプチド、および抗体、の様な個体にとって異物である天然の生物学的物質を含む)生物学的薬剤等、の様な外来の(個体にとって異物である)免疫原、あるいは、甲状腺炎(サイログロブリン)、卒中(カルジオリピン)、および重症筋無力症(アセチルコリンレセプター)、の様な自己免疫原(自己抗原)であり得る。

【0117】

この様な免疫原のアナログは、候補分子をスクリーニングして、これらが(a)免疫原に対する血清抗体に特異的に結合するか否か、および(b)T細胞エピトープを欠いているか否か、を調べることで確認し得る。血清抗体への特異的結合は、従来のイムノアッセイを用いて調べることが出来、そして、T細胞エピトープの存在あるいは欠如は、従来のT細胞活性化試験により調べることが出来る。その意味で、免疫原に対する血清抗体に「特異的に結合する」アナログは、該抗体に対する十分なアフィニティーを有している。さらにその意味で、T細胞エピトープの試験は、治療を意図する個体からのT細胞、あるいは標的の個体集団を代表する種々の患者からのT細胞を用いて、個々の目的に応じて行われることも理解される。T細胞エピトープの存在あるいは欠如は、実施例に記載された $^3\text{H}$ (トリチル化)チミジン取り込みアッセイを用いて調べ得る。T細胞エピトープの存在はまた、当分野で周知の方法により、T細胞由来のリンホカインの分泌を測定することで調べ得る。バックグラウンド以上に、統計的に有意なチミジンの取り込みを誘起しなかったアナログは、T細胞エピトープを欠くとみなされる。チミジン取り込みの定量的な量は、免疫原毎に異なり得る。一般に、約2-3未満の、さらに一般には約1-2未満の刺激指数(stimulation index)は、T細胞エピトープの欠如を示す。

【0118】

有用なアナログを確認するための、通常の第一段階は、スクリーニングされるべき候補の、パネルあるいはライブラリーの調製である。例えば、タンパク質あるいはペプチドのアナログの場合は、Geysenらの、Synthetic Peptides as Antigens; Ciba Symposium (1986) 119:131-149; Devlin らのScience (1990) 249:404-406; Scottらの、Science (1990) 249:386-390; およびCwirlaら、PNAS USA (1990) 87:6378-6382等に記載された様な、合成技術あるいは組み換え法で製造し得る。1つの合成方法では、各ペプチドが隣のペプチドと重複する様に、そして全ての鎖状のエピトープが表現される様に、約5から30アミノ酸のペプチドが合成される。これは、B細胞エピトープに予測される長さよりも1残基少なく、カルボキシル末端およびアミノ末端の両方を重複させることで行われる。例えば、B細胞エピトープの最低要件が6-アミノ酸であると仮定されるならば、各ペプチドは、5-アミノ酸で隣のペプチドに重複しなければならない。この実施態様では、次に各ペプチドを、動物の免疫による、あるいは患者からの何れかの、天然の免疫原に対して製造された抗血清で、B細胞エピトープの存在に関してスクリーニングする。次に実施例に記載した様に、抗体結合活性を有する分子を、T細胞エピトープの存在に関してスクリーニングする。T細胞エピトープを欠く分子は、本発明のアナログとして有用である。

【0119】

10

20

30

40

50

免疫原の(単数あるいは複数の)T細胞エピトープが、既知であるか、あるいは同定され得るならば、候補アナログのランダムT細胞スクリーニングは不要である。その場合には、その(単数あるいは複数の)T細胞エピトープを、機能しない様に変化させ得る(例えば、そのエピトープの1あるいはそれ以上の成分を化学的に誘導化するかもしくは除去すること)、あるいは、例えばペプチドの場合の様に、合成法あるいは組み換え法等で、完全に除去し得る。

【0120】

ミモトープあるいはアプタマーは、従来の方法で合成し得、そして、他の免疫原のアナログと同じ方法でスクリーニングし得る。

【0121】

これらのアナログを、非免疫原性の結合手プラットフォーム分子とカップリングし、本発明の複合体を調製する。結合手プラットフォーム分子と、炭水化物、脂質、リボポリサッカライド、タンパク質、グリコプロテイン、薬剤、および目的物のアナログの様な、生物学的に活性な分子とからなる複合体は、本明細書で例示する化学反応を利用して合成される。好ましい合成法は、リンカー分子を生物学的分子上に、適切に選択された周知の方法で、組み込む方法である。

【0122】

アドリアマイシン(ドキシソルピシン)の様な薬剤を結合手プラットフォーム分子に結合させる場合、糖のリング上のアミノ基が、活性エステルを含むプラットフォーム分子と反応し得る。アドリアマイシンはまた、ハロアセチル化したプラットフォームと結合させるために、チオール基を含む様に修飾し得る(Kaneko, T.ら、*Bioconjugate Chemistry*, 2:133 (1991))。

【0123】

オリゴサッカライドの様な炭水化物は、スルフヒドリルを含むリンカーを含む様に修飾し得る(Wood, S.J. and Wetzel, R., *Bioconjugate Chemistry*, 3:391 (1992))。スルフヒドリル基はハロアセチル化プラットフォームに結合させるために用いられる。あるいは、炭水化物を酸化して、アルデヒドを生成し、これをNaCNBH<sub>3</sub>の存在下に、アミノ化プラットフォームと反応させ得る。

【0124】

エタノールアミン基を含むグリコール脂質の様な脂質は、プラットフォーム分子上の活性カルボキシレートと反応させる。糖ユニットを含むリボポリサッカライドは、酸化してアルデヒドを生成し、これをNaCNBH<sub>3</sub>の存在下にアミノ化プラットフォームと反応させて、還元アミノ化により複合体を形成する。

【0125】

Fab'抗体断片の様な別のタンパク質の場合には、タンパク質(Fab')上のスルフヒドリル基は、ハロアセチル基を介して、プラットフォームに結合する。グリコプロテインは、イミノチオレートを用いたチオールリンカーで修飾する。このチオールは、ハロアセチル基を含むプラットフォームと反応する。

【0126】

複合体が免疫寛容原として機能する能力、および、抗体の産生を特異的に抑制する能力は、実施例に記載したマウスのモデルで評価し得る。

【0127】

この複合体は通常、(例えば、腹腔内、筋肉内、静脈内等)注射で投与する様に処方される。従って、これらは典型的には、生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖溶液等の様な薬学的に許容可能な水性キャリアーと組み合わせられる。複合体は通常、処方の約0.01重量%から10重量%を構成する。複合体は、SLEを引き起こす自己抗原に対する免疫寛容を少なくとも部分的に再確立するために十分な量で、個体に投与される。この様な量は、本明細書では、時に「治療に有効な」量とも呼ぶ。特定の場合の投与管理、即ち投与量、タイミング、および投与回数は、特定の個体、およびその個体の病歴により変化する。通常は、約1から1000 μg複合体/Kg体重で投与される。免疫寛容の状態を達成および/あるいは維持す

10

20

30

40

50

るためには、繰り返し投与が必要であり得る。

【0128】

以下の実施例は、本発明、および本発明の従来技術に対する予期されない効果をさらに説明するものである。これらの実施例は、本発明の範囲を制限するものではない。

【0129】

【実施例】

(実施例1)

以下の反応式は、本発明の誘導体化した化学的に定義された結合手プラットフォーム分子を合成する方法を説明している。この実施例では以下の略号を使用する：

DMTr = 4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル；Tr = トリチル；Bz = ベンゾイル；Cp =  
デオキシシチジンモノホスフェート；CE = シアノエチル；CPG = 制御された有孔ガラス  
；DMF = ジメチルホルムアミド；DCC = ジシクロヘキシルカルボジイミド；TFA = トリフ  
ルオロ酢酸；CDI = カルボニルジイミダゾール；Ts = トシル(p-トルエンシルホニル)；D  
IPAT = ジイソプロピルアンモニウムテトラアゾリド；TBDMSCI = tert-ブチルジメチルシ  
リルクロライド；TBAF = テトラブチルアンモニウムフルオライド；NMMO = N-メチルモル  
ホリンオキサイド。

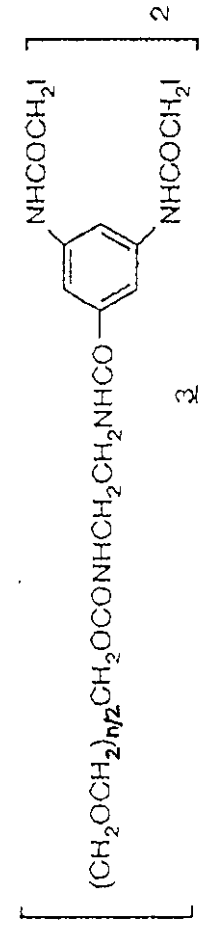
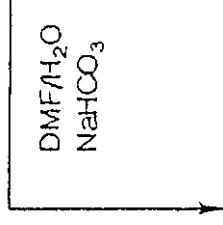
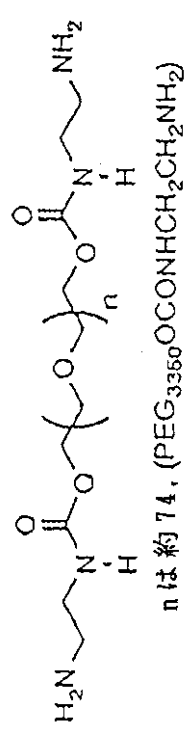
【0130】

【化16】

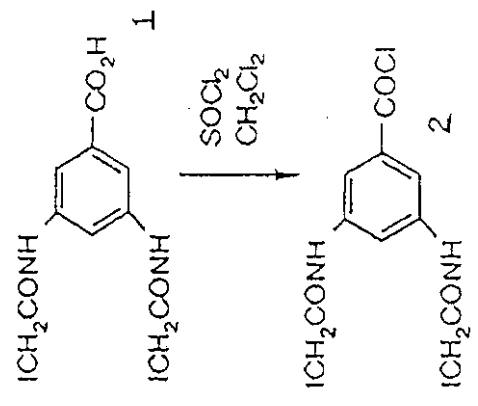
【 0 1 3 1 】  
 【 化 1 7 】

反応スキーム 1

3,5-ジアミノ安息香酸  
 ヨード酢酸無水物

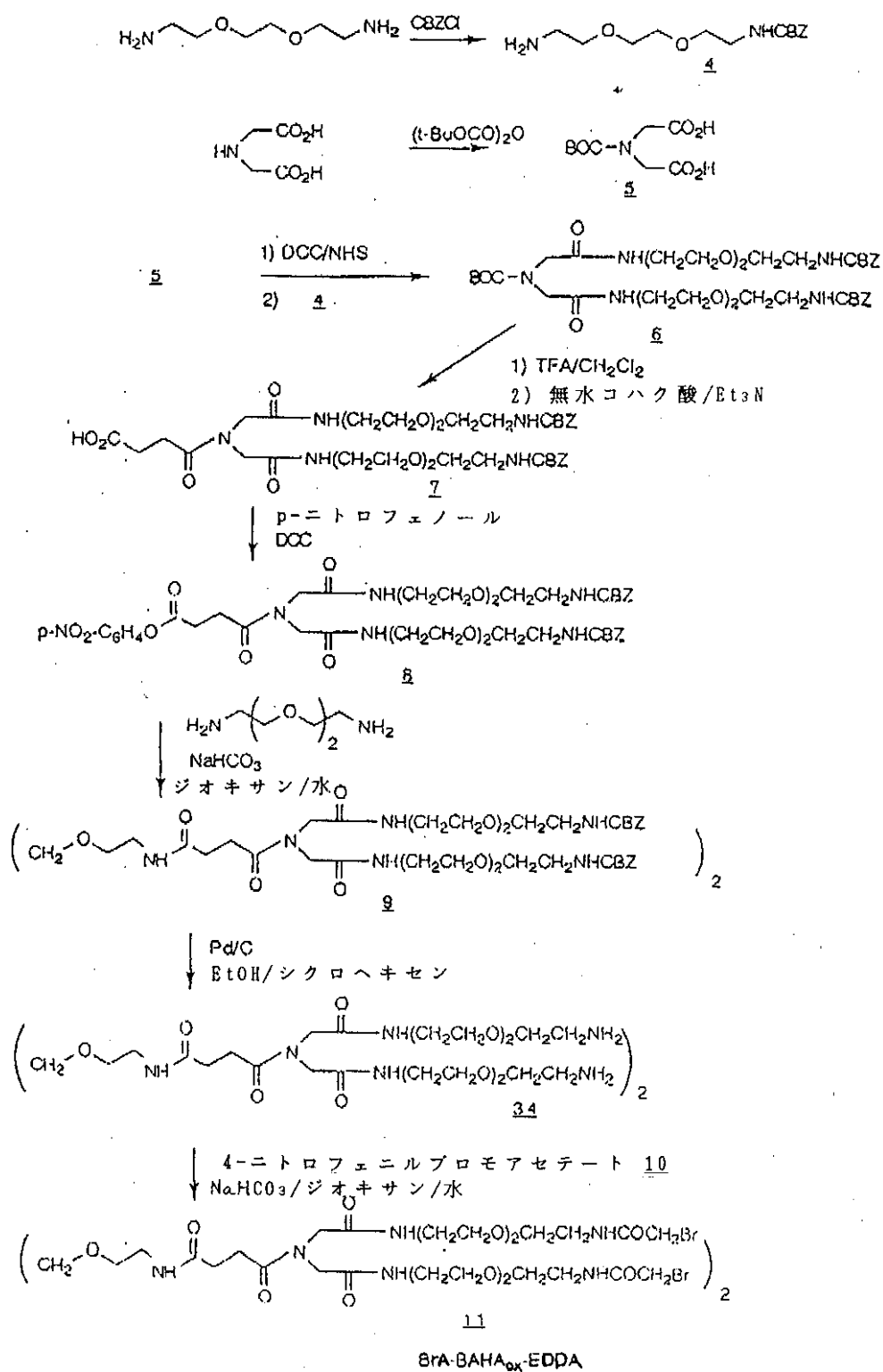


IA-DABA-PEG



(21)

## 反応スキーム 2



10

20

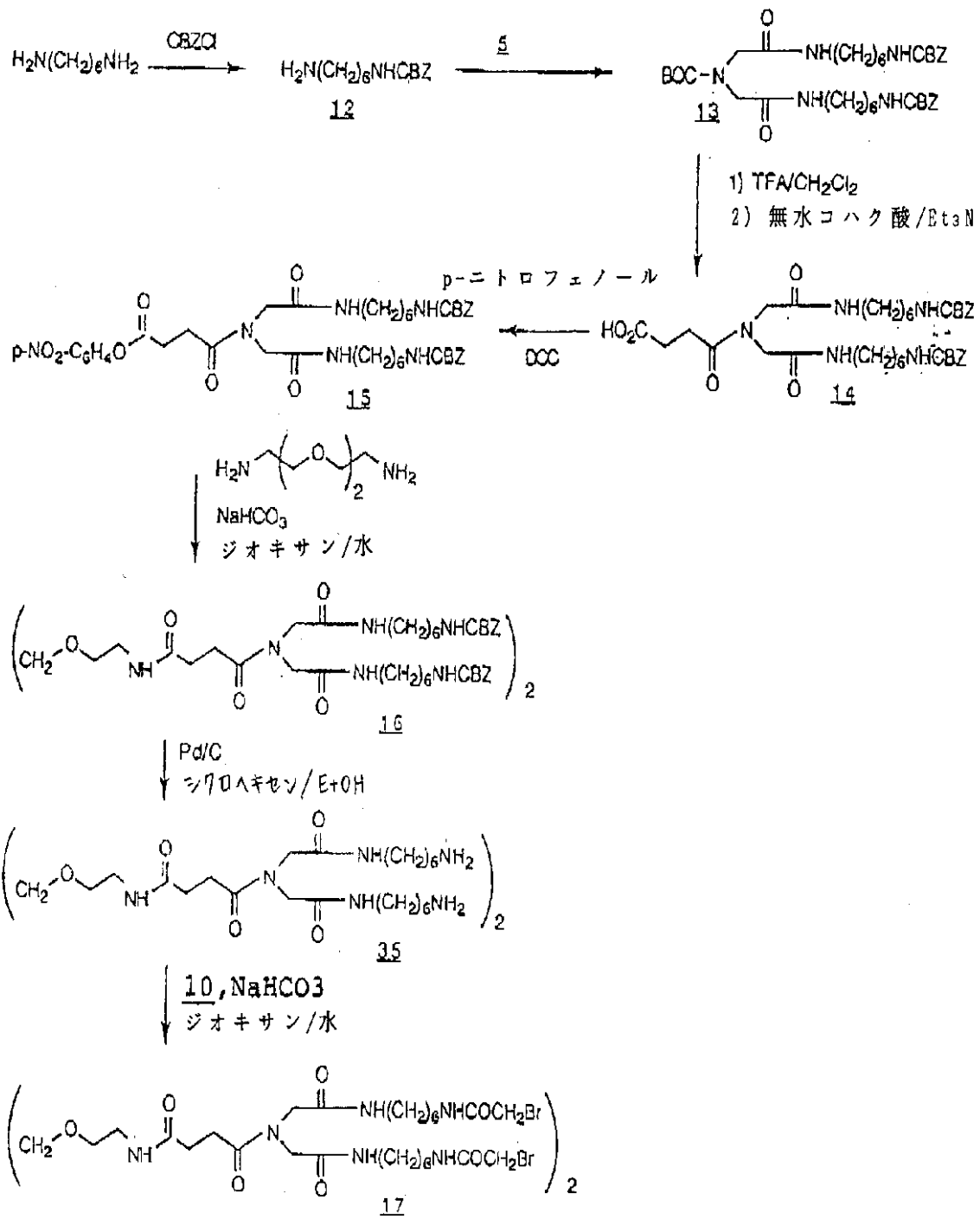
30

40

【 0 1 3 2 】

【 化 1 8 】

## 反応スキーム 3



BrA-BAHA-EDDA

【 0 1 3 3 】

【 化 1 9 】

10

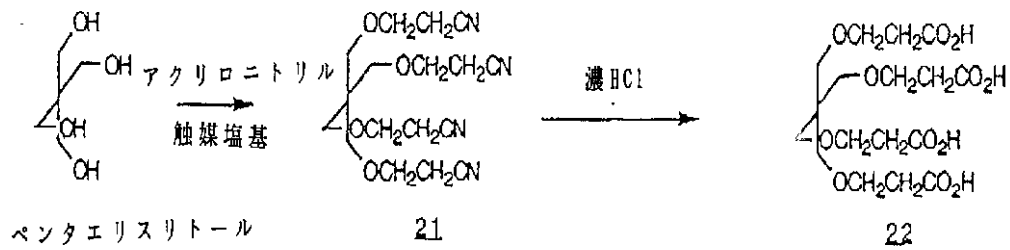
20

30

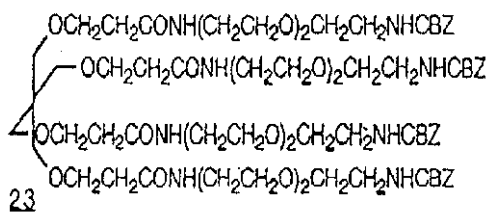
40



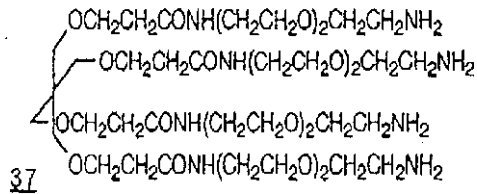
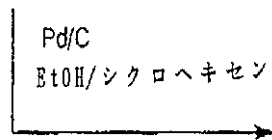
反応スキーム 5



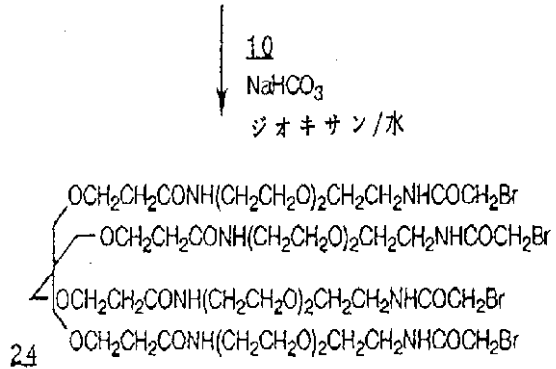
10



1) SOCl<sub>2</sub>/THF  
2) 4, Et<sub>3</sub>N/THF



20



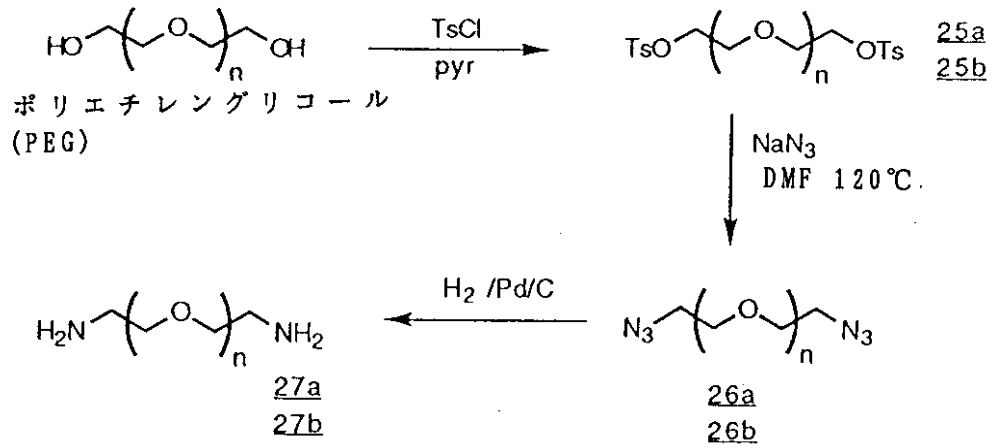
30

BrA-EDDA-PEG

【 0 1 3 5 】

【 化 2 1 】

40

反応スキーム 6

10

nは約74 (PEGの平均分子量は約3350)

nは約200 (PEGの平均分子量は約8000)

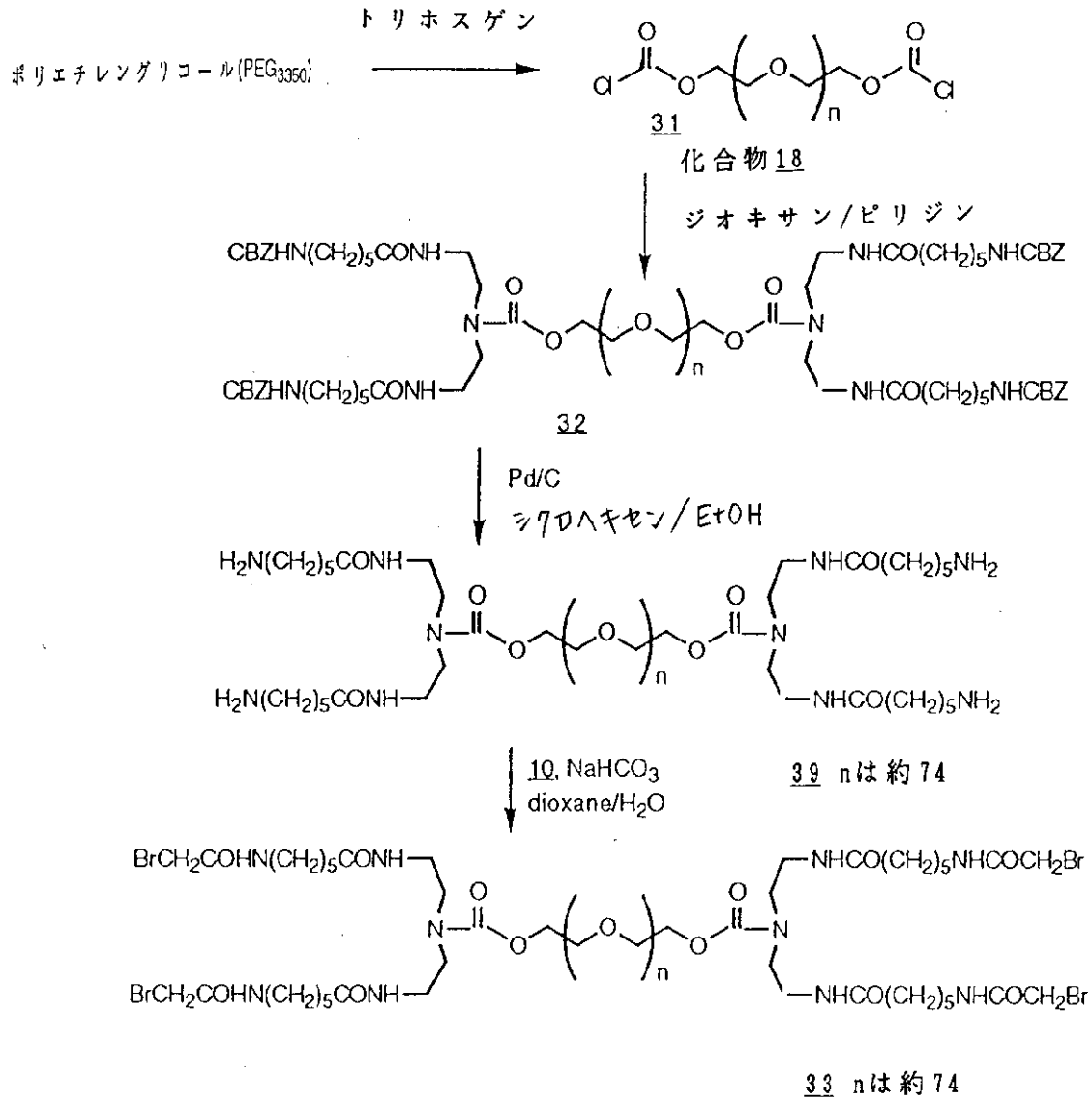
20

【 0 1 3 6 】

【 化 2 2 】



反応スキーム 8



10

20

30

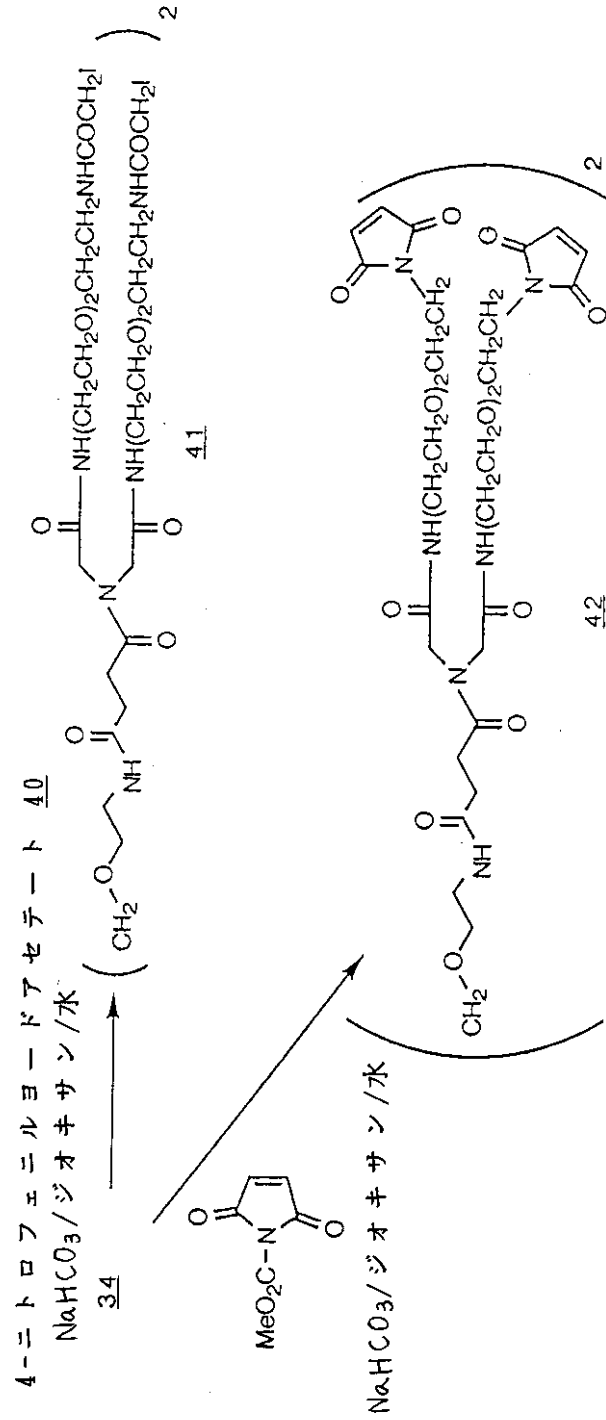
BrA-AHAB-PEG

【 0 1 3 8 】

【 化 2 4 】

40

反応スキーム 9



10

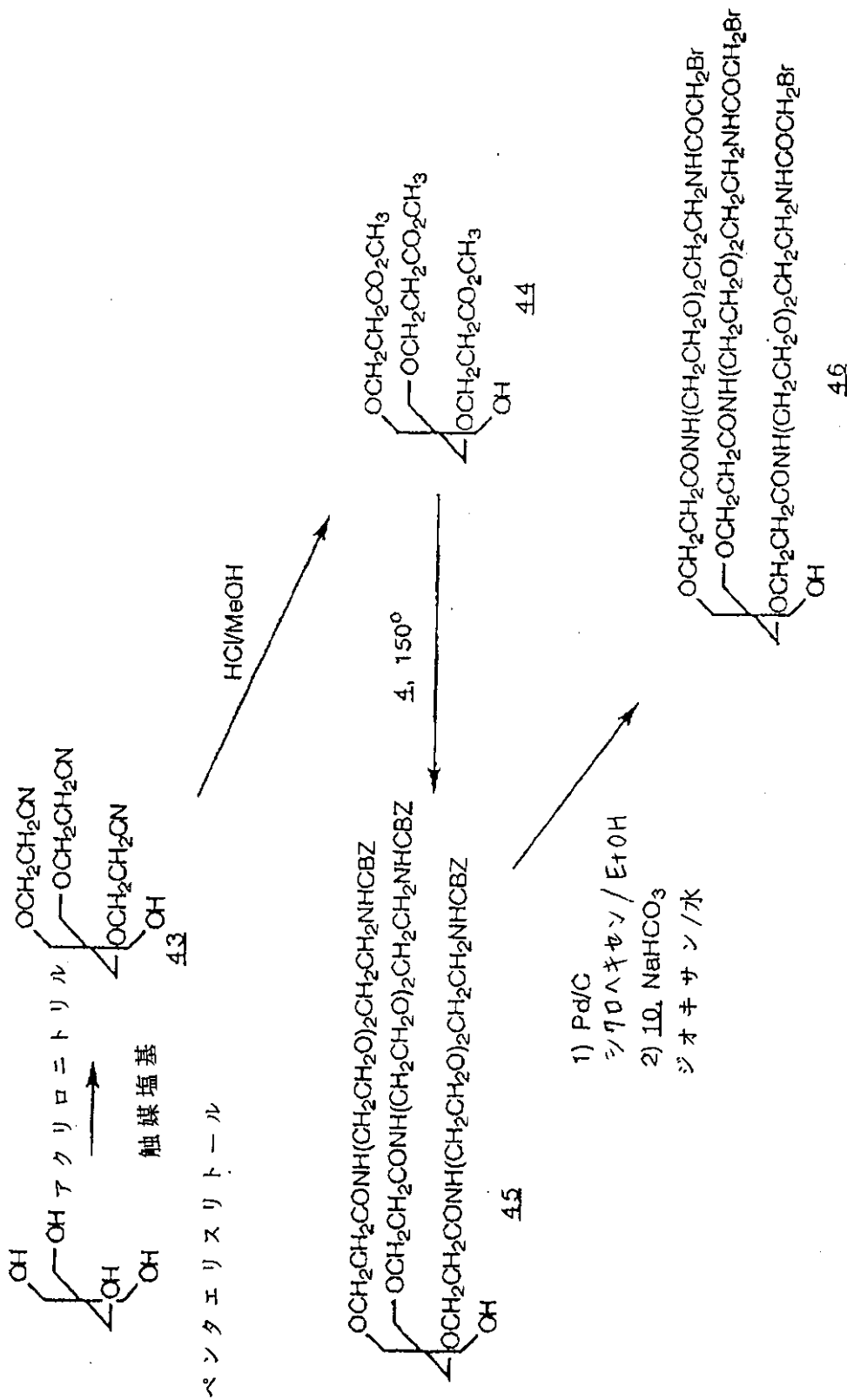
20

30

40

【 0 1 3 9 】  
【 化 2 5 】

反応スキーム10



10

20

30

40

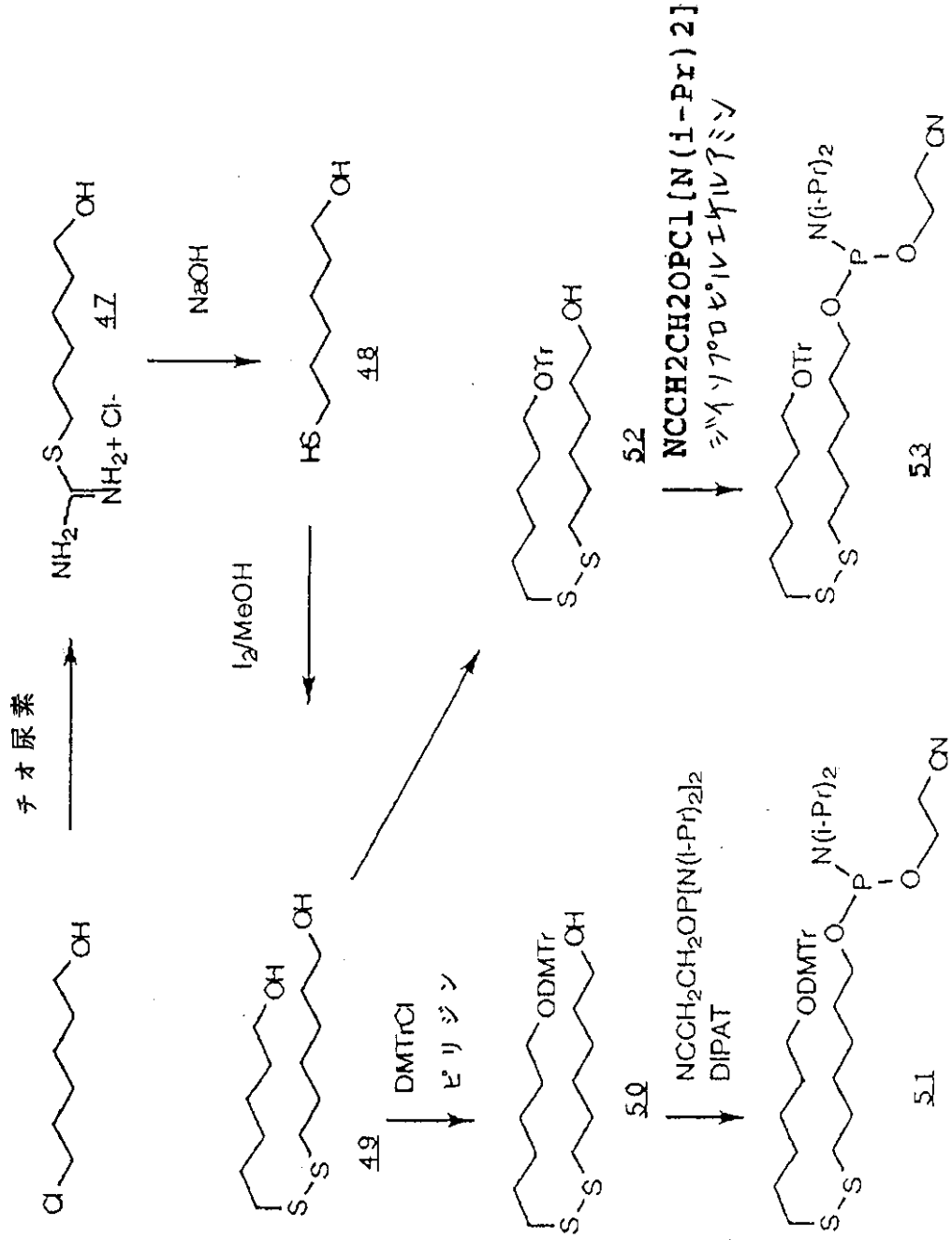
【0140】

(CA)<sub>8</sub>、(CA)<sub>10</sub>、(CA)<sub>12</sub>および(CA)<sub>16</sub>を、ジスルフィドリンカーで修飾するために用いられる試薬の合成を、次の反応式11に記載する。

【0141】

【化26】

反応スキーム 11



10

20

30

【0142】

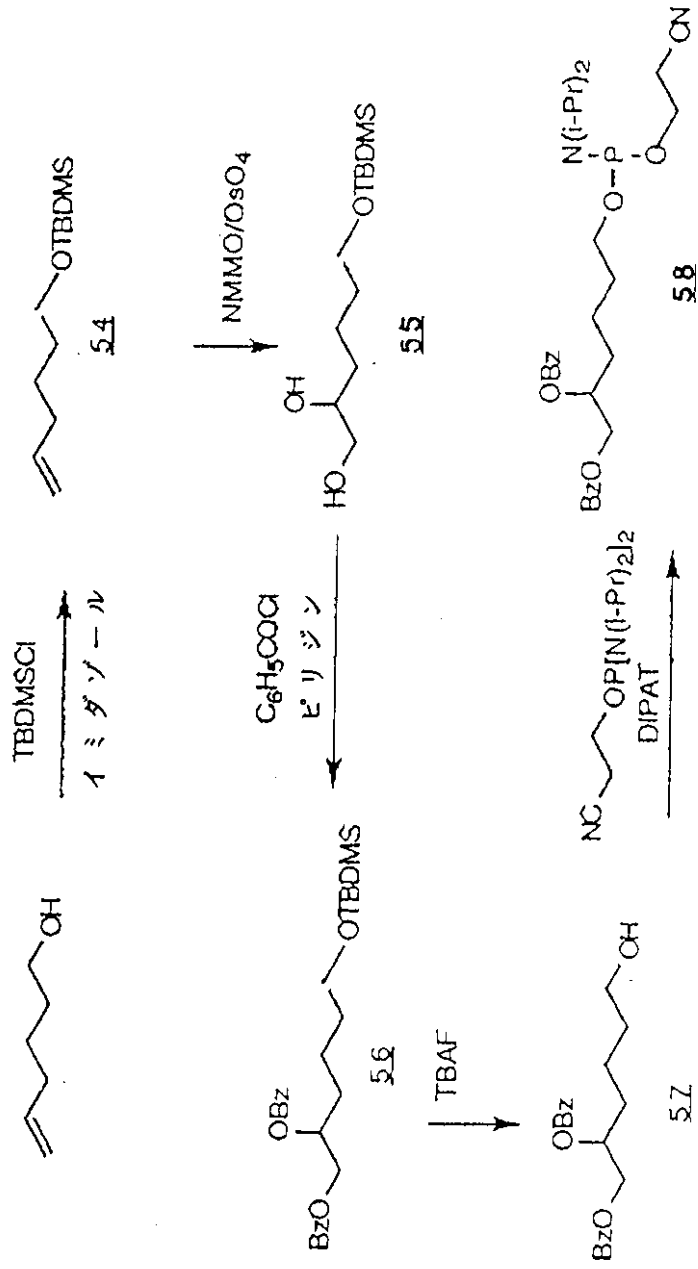
(CA)<sub>25</sub>を、vicinal-ジオールリンカーで修飾するために用いられる試薬の合成を、次の反応式12に記載する。

【0143】

【化27】

40

反応スキーム 12



10

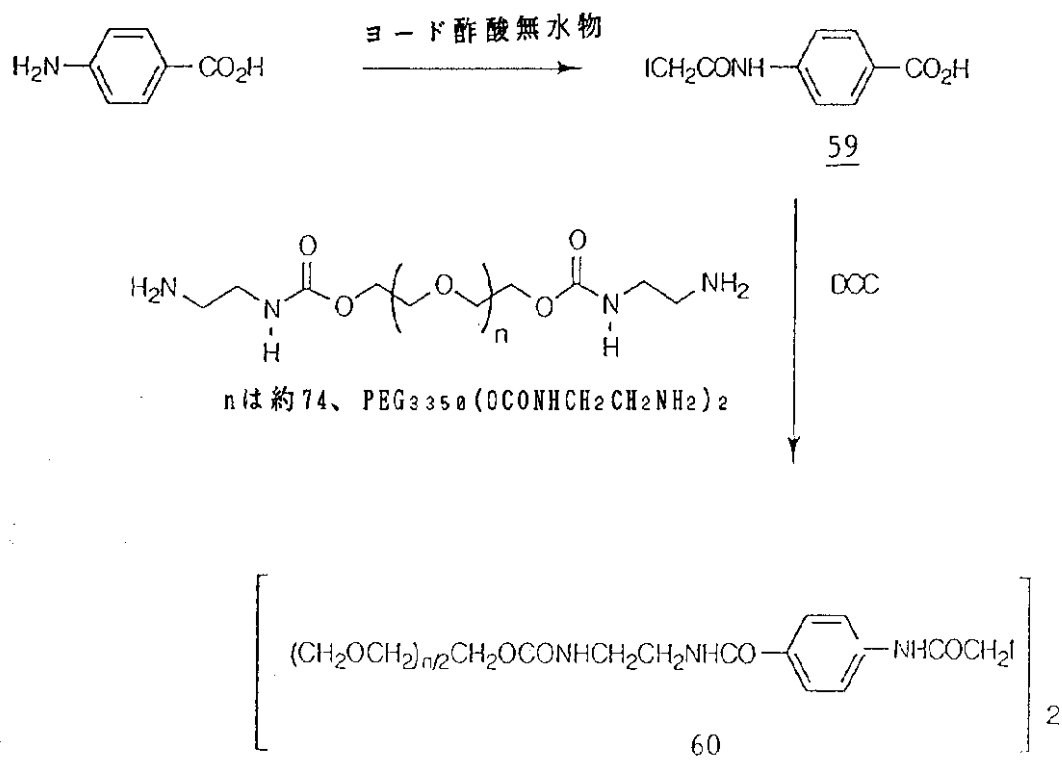
20

30

【 0 1 4 4 】

【 化 2 8 】

## 反応スキーム 13



10

20

## 【0145】

(実施例2：化学的に定義された結合手プラットフォーム分子)

<化合物1 - [3,5-ビス-(ヨードアセトアミド)安息香酸]>

ヨード酢酸無水物2.93g(8.28mmol, 2.2当量)をN<sub>2</sub>雰囲気下で室温にて3,5-ジアミノ安息香酸572mg(3.76mmol)の攪拌されたジオキサン(19mL)懸濁液に加えた。この混合物を攪拌し、20時間ホイルで覆い、そしてEtOAc(50mL)と1N HCl溶液(50mL)とで分けた。EtOAc層をブラインで洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、そしてロータリーエバポレーターで濃縮して、褐色の固形物3.3gを得た。この物質をシリカゲルクロマトグラフィー(94/5/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc)によって精製して、992mg(54%)の化合物1を白色の固形物として得た：NMR (DM SO) 3.84 (s, 4H), 7.91 (s, 2H), 8.14 (s, 1H), 10.56 (s, 2H)。

## 【0146】

<化合物2 - [3,5-ビス-(ヨードアセトアミド)ベンゾイルクロライド]>

SOCl<sub>2</sub> 117 μL(1.6mmol, 190mg)を390mg(0.8mmol)の1のTHF(34mL)溶液に加えた。この混合物を、全ての固形物が溶解するまで(およそ30分間)N<sub>2</sub>雰囲気下で還流し、透明な赤褐色の溶液を得た。この混合物をロータリーエバポレーターで濃縮し、減圧下で静置して粗製の化合物2を泡状固形物として得た。この泡状固形物を次の工程に直接用いた。

## 【0147】

<化合物3 - [ , -ビス-(N-2-アミノエチルカルバモイル)ポリエチレングリコールのN, N'-ビス-(3,5-ビス-(ヨードアセトアミド)ベンゾイル)誘導体]>

, -ビス-(N-2-アミノエチルカルバモイル)ポリエチレングリコール(0.16mmol, 3350g/mol, Sigma)570mgを風袋を量ったフラスコに入れた。トルエン(20mL)を加え、そして共沸蒸留によって水を除去した。残留物を減圧下で乾燥して、固形物549mgを得、そしてジイ

30

40

50

ソプロピルエチルアミン89 $\mu$ L(0.64mmol)と共にTHF 4mLに溶解した。粗製の酸クロライドを無水THF 4mL中に溶解し、そしてN<sub>2</sub>下で30秒間かけて混合物に加えた。混合物を室温で16時間攪拌し、そして0.1N HCl(25mL)とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)とで分けた。水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で再び抽出し、そして有機層を合わせて、H<sub>2</sub>O 25mL、次いでNaHCO<sub>3</sub>溶液50mLで洗浄した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、そして濃縮して、橙色のオイル784mgを得た。シリカゲルクロマトグラフィ(9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)により、無色のオイル190mgを得た。このオイルを熱EtOH/Et<sub>2</sub>Oから結晶化し、N<sub>2</sub>圧力下で焼結ガラスフィルター上で集め、そして減圧下で乾燥して、177mgの化合物3を白色の固形物として得た：NMR (CDCl<sub>3</sub>) 3.40 (bd m, 8H), 3.59 (bd s, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, 他の積分値に比べ極端に大きい積分値), 3.91 (s, 8H), 4.21 (m, 4H), 6.04 (bd m, 2H), 7.55 (bd m, 2H), 7.78 (bd s, 4H), 8.10 (bd s, 2H), 9.30 (bd m, 4H)：ヨードアセチル測定法(*European Journal of Biochemistry* (1984) 140:63-71)：計算値：0.92mmol/g；実測値：0.96mmol/g。

## 【0148】

<化合物4 - [モノ-N-カルボベンジルオキシ-3,6-ジオキサ-1,8-ジアミノオクタン]>  
ベンジルクロロホルメート14.3mL(17.1g, 100mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(200mL)溶液を、1,2-ビス-(2'-アミノエトキシ)エタン(Fluka)29.0mL(29.6g, 200mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)溶液に、0 で1時間かけて滴下した。この混合物を室温で24時間攪拌し、そして1N HClを水層が酸性(pH 2未満)に留まるまで加えた。水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mLずつ)で3回洗浄し、そして1N NaOHでpHが13を越えるまで中和した。この塩基性の水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(75mLずつ)で5回抽出した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、12.7g(45%)の化合物4を濃厚なオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.82 (bd s, 2H), 3.30-3.60 (m, 12H), 5.10 (s, 2H), 5.75 (bd s, 1H), 7.20-7.40 (m, 5H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 41.1, 41.8, 66.5, 70.0, 70.2, 70.4, 73.5, 127.9, 128.0, 128.4, 136.9, 156.4。

## 【0149】

<化合物5 - [N-tert-ブチルオキシカルボニルイミノジ酢酸]>  
Garrigues, B.およびLazraq, E.M.*Tetrahedron Letters* (1986) 27, 1685-1686による報告と同様の手順で、この化合物を調製した。Et<sub>3</sub>N 47mL(34.2g, 338mmol)を、イミノジ酢酸22.0g(169mmol)とジ-tert-ブチルジカルボネート36.8g(169mmol)との攪拌された50/50ジオキササン/H<sub>2</sub>O(169mL)溶液に、室温にて加えた。この混合物を24時間攪拌し、そして大部分のジオキササンをロータリーエバポレータで除去した。この混合物を1N HCl(350mL)と5つのEtOAc(100mLずつ)とで分けた。このEtOAc層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、白色の固形物を得た。ヘキササン/EtOAcで再結晶して、35.3g(90%)の化合物5を結晶として得た：m.p. 131-132 融解(fused)；<sup>1</sup>H NMR (DMSO) d 1.35 (s, 9H), 3.87 (s, 2H), 3.91 (s, 2H), 12.6 (bd s, 2H)；<sup>13</sup>C NMR (DMSO) d 27.9, 49.6, 79.6, 154.8, 171.2。

## 【0150】

<化合物6>  
ジシクロヘキシルカルボジイミド9.99g(48.5mmol)を、4.52g(19.4mmol)の化合物5とN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)4.46g(38.8mmol)とのTHF(100mL)溶液に0 で加えた。この混合物を0 で3時間攪拌し、そしてEt<sub>3</sub>N 5.39mL(3.92g, 38.8mmol)と10.9g(38.7mmol)の化合物4とのTHF(83mL)溶液を加え、そしてこの混合物を5 で17時間攪拌した。混合物を濾過して固形物を除去し、そして濾液を濃縮してオイルを得た。このオイルをEtOAc(400mL)と2つの1N HCl(100mLずつ)とで分けた。このEtOAc層を1N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100mLずつで3回、およびブライン100mLで1回洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、14.2g(96%)の化合物6を濃厚なオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.41 (s, 9H), 3.30-3.70 (m, 24H), 3.70-3.90 (m, 4H), 5.10 (s, 4H), 5.50 (bd s, 2H), 7.12 (bd s, 1H), 7.30-7.40 (m, 10H), 8.24 (bd s, 1H)。

## 【0151】

<化合物7>  
トリフルオロ酢酸26.3mL(38.9g, 156mmol)を、14.2g(18.6mmol)の化合物6のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(111mL) 50

L)溶液に加え、そしてこの混合物を室温で3時間攪拌した。混合物をロータリーエバポレーターで濃縮して粘稠なオイルを得、そしてこのオイルをTHF 93mLに溶解した。溶液を0まで冷却し、そして無水コハク酸3.72g(37.2mmol)を加え、次いでEt<sub>3</sub>N 5.18mL(3.76g, 37.2mmol)を加えた。冷却浴を除去し、そして混合物を室温で18時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、そして得られたオイルをCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300mL)と3つのH<sub>2</sub>O(100mLずつ)とで分けた。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。このオイルを、シリカゲルのクロマトグラフィー(9/1/0.1 EtOAc/MeOH/酢酸)で精製して、10.5g(74%)の化合物7を粘稠なオイルとして得た；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.50-2.60 (m, 4H), 3.30-3.60 (m, 24H), 3.88 (s, 2H), 4.03 (s, 2H), 5.07 (s, 4H), 5.77 (bd s, 2H), 7.20-7.30 (m, 10H), 7.91 (bd s, 2H), 8.88 (bd s, 1H); <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) d 27.7, 29.0, 39.4, 41.0, 52.9, 53.8, 66.5, 69.3, 69.8, 70.0, 70.1, 127.8, 128.1, 128.3, 136.7, 156.6, 169.1, 169.6, 173.3, 174.5。

## 【 0 1 5 2 】

< 化合物 8 - [化合物 7 の4-ニトロフェニルエステル] >

ジシクロヘキシルカルボジイミド1.61g(7.83mmol)を、3.98g(5.22mmol)の7と800mg(5.75mmol)の4-ニトロフェノールとのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (26mL)溶液に0で加えた。この混合物をN<sub>2</sub>下で室温にて64時間攪拌した。混合物を0まで冷却し、HOAc 1mLを加え、そしてこの混合物を0で2時間保った。この固形物を濾過により除去し、そして濾液を濃縮した。この残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(グラジエント、91/8/1~84/15/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/IPA/HOAc)で精製して、2.58g(56%)の化合物8を粘稠なオイルとして得た；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.66 (t, 2H), 2.84 (t, 2H), 3.32-3.68 (m, 24H), 3.90 (bd s, 2H), 4.01 (bd s, 2H), 5.06 (s, 4H), 5.58 (bd m, 2H), 6.91 (bd m, 1H), 7.27 (d, 2H), 7.33 (s, 10H), 8.23 (d, 2H), 9.01 (bd m, 1H)。

< 化合物 10 - [4-ニトロフェニルプロモアセテート] >

ジシクロヘキシルカルボジイミド9.28g(45mmol)を、プロモ酢酸5.0g(35.9mmol)と4-ニトロフェノール8.50g(61.1mmol)との攪拌されたEtOAc(180mL)溶液に0で加えた。この混合物を5で16時間攪拌し、そして酢酸1mLを加えた。この混合物を室温で20分間攪拌し、次いで20分間冷凍機中に置いた。この固形物質を濾過によって除去し、そしてこの濾液を濃縮して、粘稠なオイルを得、そしてEt<sub>2</sub>O/ヘキサンから結晶化して、7.73g(83%)の化合物10を薄片として得た；m.p. 86-87；TLC R<sub>f</sub>=0.63 (50/50/1 ヘキサン/EtOAc/HOAc)；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 4.13 (s, 2H), 7.36 (d, J=12Hz, 2H), 8.32 (d, J=12Hz, 2H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 24.9, 122.1, 125.3, 155.5, 164.9；分析値：C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>4</sub>に対する計算値：C, 36.95；H, 2.33；N, 5.39。実測値：C, 37.24；H, 2.33；N, 5.42。

## 【 0 1 5 3 】

< 化合物 9 >

NaHCO<sub>3</sub> 300mg(3.57mmol)、次いで1,2-ビス-(2'-アミノエトキシ)エタン(Fluka)162mg(1.09mmol)を、2.37g(2.68mmol)の化合物8のジオキサン(15mL)とH<sub>2</sub>O(8mL)との溶液に加えた。この混合物を室温で24時間攪拌し、そして減圧下で濃縮して、元の容量のおよそ1/2とした。濃縮物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40mL)と飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(40mL)とで分けた。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を次に0.5N HClずつで2回洗浄した。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を飽和NaCl溶液で洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、2.8gのオイルを得た。この粗製の生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(3/6/1/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF/MeOH)で精製して、940mg(59%)の化合物9をオイルとして得た；TLC R<sub>f</sub>=0.21 (3/6/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF/MeOH)；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.45 (m, 4H), 2.59 (m, 4H), 3.25-3.55 (m, 60H), 3.87 (s, 4H), 4.05 (s, 4H), 5.07 (s, 8H), 5.62 (bd s, 4H), 6.78 (bd s, 2H), 7.34 (bd s, 20H), 8.56 (bd s, 2H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 28.1, 30.3, 31.1, 39.4, 41.1, 52.9, 53.9, 66.5, 69.4, 69.7, 69.9, 70.2, 125.3, 127.8, 128.3, 136.8, 156.5, 168.8, 169.4, 172.1, 173.5。

## 【 0 1 5 4 】

< 化合物 34 >

10% Pdカーボン 110mgを、281mg(0.175mmol)の化合物9のEtOH(5mL)とシクロヘキセン(2m

10

20

30

40

50

L)との溶液に窒素下で加え、そして得られる混合物を窒素下で2時間還流した。冷却時、この混合物をケイソウ土を通して濾過し、そして減圧下で濃縮して、170mg(92%)の化合物 3 4 をオイルとして得た。このオイルは、精製せずに次の工程で直接用いた；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.45 (m, 4H), 2.53 (m, 4H), 2.62 (m, 4H), 2.86 (m, 8H), 3.42-3.60 (m, 52H), 4.00 (s, 4H), 4.14 (s, 4H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 28.2, 30.3, 31.1, 39.4, 41.1, 46.5, 48.6, 52.9, 53.8, 69.4, 69.7, 70.2, 72.4, 168.9, 169.5, 172.3, 173.8。

## 【 0 1 5 5 】

## &lt; 化合物 1 1 &gt;

NaHCO<sub>3</sub> 128mg(1.4mmol)および200mg(0.85mmol)の化合物 1 0 を165mg(0.155mmol)の化合物 3 4 のジオキサン(6mL)とH<sub>2</sub>O(3mL)との溶液に加えた。得られた混合物を室温で24時間攪拌し、そして減圧下で濃縮した。この濃縮物をSephadex (登録商標) G-10(MeOH)のクロマトグラフィーで精製して、114mg(46%)の化合物 1 1 を粘稠なオイルとして得た。分析試料を分取用HPLC(C<sub>18</sub>; グラジエント 15/85/0.1~30/70/0.1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 50分, 225nm)で調製した；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.58 (m, 4H), 2.65 (m, 4H), 3.43-3.62 (m, 60H), 3.92 (s, 8H), 4.03 (s, 4H), 4.16 (s, 4H)；MS (FAB) m/e (相対強度) MNa+ 1605 (100), MH+ 1579 (1), 1581 (5), 1583 (7), 1585 (6), 1587 (2)。

10

## 【 0 1 5 6 】

## &lt; 化合物 1 2 - [モノ-N-カルボベンジルオキシ-1,6-ジアミノヘキサン]&gt;

ベンジルクロロホルメート21mL(25.7g, 150mmol)のジオキサン(200mL)溶液を、1,6-ヘキサジアミン17.49g(150mmol)とKHCO<sub>3</sub> 19.58g(196mmol)とのジオキサン(100mL)とH<sub>2</sub>O(300mL)との攪拌された溶液に0 で滴下した。この混合物を室温で18時間攪拌し、次いで0まで冷却した。この混合物を12N HClで酸性化し、そしてEt<sub>2</sub>O 100mLずつで2回抽出した。水層を10N NaOHで中和し、そしてEt<sub>2</sub>O 100mLずつで8回抽出した。この塩基性の抽出物を合わせて、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、そして濃縮して、5.03g(13%)の粗製の化合物 1 2 を半固形の残留物として得た；<sup>1</sup>H NMR (DMSO) d 1.22-1.51 (m, 8H), 2.54 (t, 2H), 3.02 (d of t, 2H), 5.05 (s, 2H), 7.30-7.48 (m, 5H)。

20

## 【 0 1 5 7 】

## &lt; 化合物 1 3 &gt;

ジシクロヘキシルカルボジイミド918mg(4.45mmol)を、417mg(1.78mmol)の化合物 5 とNHS 409mg(3.56mmol)とのTHF(15mL)溶液に0 で加えた。この混合物を0 で4.5時間攪拌し、そして1.02g(4.08mmol)の化合物 1 2 のTHF(4mL)溶液を加えた。この混合物をN<sub>2</sub>下で5にて18時間攪拌した。この濃縮物をEtOAc(30mL)と2つの1N HCl(30mLずつ)とで分けた。EtOAc層を合わせて、H<sub>2</sub>O(30mL)および飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(30mL)で連続して洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、粘稠な残留物1.48gを得た。シリカゲルのクロマトグラフィー(5/95 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)で精製することにより、1.04g(84%)の化合物 1 3 を粘着性の固形物として得た；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.33 (m, 8H), 1.43 (s, 9H), 1.51 (m, 8H), 3.18 (m, 4H), 3.26 (m, 4H), 3.81 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 4.90 (bd s, 2H), 5.10 (s, 4H), 6.81 (bd s, 1H), 7.28-7.40 (m, 10H), 8.05 (bd s, 1H)。

30

## 【 0 1 5 8 】

## &lt; 化合物 1 4 &gt;

トリフルオロ酢酸14.9mLを、5.16g(7.45mmol)の化合物 1 3 のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(14.9mL)溶液に加え、そして得られた混合物を室温で3時間攪拌した。この混合物を減圧下で濃縮し、そしてTHF 57mLに再び溶解した。この混合物にEt<sub>3</sub>N 2.07mL(1.51g, 14.9mmol)を加えた。この混合物に無水コハク酸1.5g(14.9mmol)を加え、次いでこの混合物を18時間攪拌した。混合物を1N HCl(75mL)と4つのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(75mLずつ)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、固形物を得た。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/ヘキサンから結晶化して、3.84g(74%)の化合物 1 4 を白色の固形物として得た；m.p. 122 ; <sup>1</sup>H NMR (MeOH) d 1.32 (m, 8H), 1.48 (m, 8H), 2.56 (m, 4H), 3.10 (t, 4H), 3.23 (m, 4H), 4.00 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 5.05 (s, 4H), 7.33 (m, 10H)。

40

## 【 0 1 5 9 】

50

<化合物 1 5 - [化合物 1 4 の4-ニトロフェニルエステル]>

ジシクロヘキシルカルボジイミド887mg(4.30mmol)を、2.0g(2.87mmol)の化合物 1 4 と4-ニトロフェノール438mg(3.15mmol)とのTHF(15mL)溶液に0 で加えた。この混合物を室温にして、18時間攪拌し、次いで0 まで冷却した。次いで、酢酸200 $\mu$ Lを加え、そしてこの混合物を0 で1時間攪拌した。この固形物を濾過によって除去し、そして濾液を濃縮してオイルを得た。シリカゲルのクロマトグラフィー(92/8 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/IPA)によって精製し、そして得られた固形物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ヘキサンから再結晶して、1.52g(64%)の化合物 1 5 を白色の固形物として得た：m.p. 65-68 ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.30 (m, 8H), 1.47 (m, 8H), 2.71 (t, 2H), 2.90 (t, 2H), 3.17 (m, 4H), 3.25 (m, 4H), 3.92 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 4.86 (bd t, 1H), 4.95 (bd t, 1H), 5.09 (s, 4H), 6.28 (bd t, 1H), 7.23 (d, J=9Hz, 2H), 7.32 (m, 10H), 8.22 (d, J=9Hz, 2H), 8.95 (bd t, 1H)。

【 0 1 6 0 】

<化合物 1 6 >

830mg(0.99mmol)の化合物 1 5 のジオキサン(7.5mL)溶液を、1,2-ビス-(2'-アミノエトキシ)エタン(Fluka)58 $\mu$ L(59mg, 0.40mmol)とNaHCO<sub>3</sub> 111mg(1.31mmol)とのH<sub>2</sub>O(7.5mL)溶液に加えた。この混合物を室温で18時間攪拌した。混合物を1N HCl(50mL)とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mL)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、粘稠なオイル1.28gを得た。シリカゲルクロマトグラフィー(84/15/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc)によって精製することにより、670mgの化合物 1 6 をロウ質の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.32 (m, 16H), 1.49 (m, 16H), 2.46 (m, 4H), 2.58 (m, 4H), 3.10-3.23 (m, 16H), 3.34 (m, 4H), 3.48 (m, 4H), 3.53 (s, 4H), 3.85 (s, 4H), 4.02 (s, 4H), 5.05 (s, 8H), 5.07 (重複する bd t, 2H), 5.15 (bd t, 2H), 7.30 (m, 20H), 7.40 (bd t, 2H), 8.60 (bd t, 2H)。

【 0 1 6 1 】

<化合物 3 5 >

613mg(0.41mmol)の化合物 1 6 のEtOH(20.3mL)とシクロヘキセン(10.1mL)との溶液を攪拌し、そして窒素でパージした。10% Pdカーボン(Aldrich) 20mgを加え、そしてこの混合物を85 の油浴で1.5時間加熱した。冷却時、この混合物を50/50 H<sub>2</sub>O/アセトンを用いてケイソウ土を通して濾過して、フラスコおよびフィルターをリンスした。この濾液を減圧下で濃縮して、448mg(114%)の化合物 3 5 をロウ質の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) d 1.39 (m, 16H), 1.59 (m, 16H), 2.57 (t, 4H), 2.65 (t, 4H), 2.88 (t, 8H), 3.23 (t, 4H), 3.29 (t, 4H), 3.42 (t, 4H), 3.65 (t, 4H), 3.71 (s, 4H), 4.06 (s, 4H), 4.30 (s, 4H)。

【 0 1 6 2 】

<化合物 1 7 >

NaHCO<sub>3</sub> 546mg(6.50mmol)を、445mg(0.406mmol)の化合物 3 5 のH<sub>2</sub>O(9.5mL)溶液に加えた。得られた混合物に、838mg(3.25mmol)の化合物 1 0 のジオキサン(14.4mL)溶液を加えた。この混合物を室温で7時間攪拌し、そして0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(50mL)とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mL)とで分けた。C H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を廃棄し、そして水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50mLずつで2回、9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50mLずつで2回、4/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50mLで1回、および3/2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50mLで1回抽出した。抽出物を合わせて、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、固形物282mgを得た。EtOH/EtOAc/Et<sub>2</sub>Oから結晶化することにより、143mg(24%)の化合物 1 7 を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/MeOH) d 1.33 (m, 16H), 1.55 (m, 16H), 2.55 (m, 8H), 3.21 (m, 16H), 3.39 (m, 4H), 3.55 (m, 4H), 3.81 (s, 8H), 3.95 (s, 4H), 4.12 (s, 4H)。分析値：C<sub>54</sub>H<sub>94</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>Br<sub>4</sub>に対する計算値：C, 44.57; H, 6.51; N, 11.55; Br, 21.97。実測値：C, 45.85; H, 6.49; N, 11.37; Br, 19.90。

【 0 1 6 3 】

<化合物 1 8 - [1,5-ビス(N-カルボベンジルオキシ-6-アミノヘキサノアミド)-3-アザペンタン]>

カルボニルジイミダゾール3.09g(19.0mmol)を、N-カルボベンジルオキシ-6-アミノヘキサノ

ン酸5.05g(19.0mmol)のEtOAc(25mL)溶液に室温で加えた。この混合物を15時間攪拌し、次いでジエチレントリアミン1.02mL(982mg, 9.52mmol)を加え、次いでEt<sub>3</sub>N 2.65mL(1.93g, 19.0mmol)を加えた。得られた混合物を4時間攪拌し、そして固形の生成物を濾過により集めた。再結晶(MeOH/EtOAc)により、4.27g(75%)の化合物 1 8 を微細粒固形物として得た：m.p. 132-133 ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.33 (m, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.64 (m, 4H), 2.18 (t, 4H), 2.73 (t, 4H), 3.16 (m, 4H), 3.35 (m, 4H), 4.96 (bd s, 2H), 5.09 (s, 4H), 6.13 (bd s, 2H), 7.33 (s, 10H); 分析値：C<sub>32</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>に対する計算値：C, 64.29; H, 7.50; N, 11.72. 実測値：C, 63.54; H, 7.75; N, 11.91。

## 【 0 1 6 4 】

&lt; 化合物 1 9 &gt;

トリエチレングリコール-ビス-クロロホルメート(Aldrich)657μL(880mg, 3.2mmol)を、4.86g(8.1mmol)の化合物 1 8 のピリジン(162mL)溶液に20 の水浴中で加えた。この混合物は直ちに沈澱物を形成した。この混合物を16時間攪拌し、そして得られた濁った黄色の溶液を減圧下で濃縮した。濃縮物をEtOAc(150mL)と2つの1N HCl(150mLずつ)とで分けた(水層が確実に酸性となるようにした)。水層を合わせて、2番目のEtOAc(150mL)で抽出した。EtOAc層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮した。得られた残留物を結晶化して(EtOAc/ヘキサン/CHCl<sub>3</sub>)、1.92g(43%)の化合物 1 9 を微黄色の微細な結晶として得た：m.p. 86-91 ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.31 (m, 8H), 1.52 (m, 8H), 1.62 (m, 8H), 2.20 (m, 8H), 3.20 (m, 8H), 3.39 (s, 16H), 3.62 (s, 4H), 3.68 (m, 4H), 4.26 (m, 4H), 5.08 (s, 8H), 5.32 (bd s, 4H), 7.31 (bd s, 4H), 7.37 (s, 20H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 25.1, 26.2, 26.4, 29.6, 36.0, 36.2, 38.5, 38.8, 40.8, 64.5, 66.4, 69.1, 70.3, 128.0, 128.4, 136.7, 156.5, 156.9, 173.6; 分析値：C<sub>72</sub>H<sub>104</sub>N<sub>10</sub>O<sub>18</sub>に対する計算値：C, 61.87; H, 7.50; N, 10.02. 実測値：C, 61.68; H, 7.63; N, 9.95。

## 【 0 1 6 5 】

&lt; 化合物 3 6 &gt;

シクロヘキセン3.5mLを、800mg(0.57mmol)の化合物 1 9 の無水EtOH(5mL)溶液に加えた。この溶液を窒素下で静置し、10% Pdカーボン500mgを加え、そして得られた混合物を2時間攪拌しながら還流した。冷却時、混合物をケイソウ土を通して濾過し、そして濃縮して、500mg(100%)の化合物 3 6 をオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (50/50 CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) d 1.21 (m, 8H), 1.49 (m, 8H), 1.62 (m, 8H), 2.19 (t, J=7.4Hz, 8H), 2.67 (t, J=7.4Hz, 8H), 3.36 (bd s, 16H), 3.67 (s, 4H), 3.71 (m, 4H), 4.21 (m, 4H)。

## 【 0 1 6 6 】

&lt; 化合物 2 0 &gt;

NaHCO<sub>3</sub> 3.9g(46.4mmol)を5.0g(5.8mmol)の化合物 3 6 のジオキサン(37.5mL)とH<sub>2</sub>O(12.5mL)との溶液に加えた。この混合物を氷浴中で0 まで冷却し、そして4-ニトロフェニルプロモアセテート(化合物 1 0) 8.7g(34.8mmol)を加えた。この混合物を0 で1時間攪拌し、そして1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50mLを穏やかに加えた。混合物をEtOAc(50mLずつ)で3回抽出した。EtOAc抽出物を廃棄し、そして水層を20/80 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mLずつ)で6回抽出した。MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ステップグラジエント 9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH次いで85/15/5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/THF)で精製して、3.62g(46%)の化合物 2 0 を白色の固形物として得た：m.p. 66.0-70.5 。分析試料を分取用HPLC(C<sub>18</sub>逆相カラム、グラジエント 25/75/0.1~35/65/0.1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 50分間にわたって、225nm)で調製して、透明のオイルを得た。このオイルを減圧下で静置して白色の固形物を得た：m.p. 87-89 ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.35 (m, 8H), 1.55 (m, 8H), 1.64 (m, 8H), 2.26 (m, 8H), 3.28 (m, 8H), 3.42 (bd s, 16H), 3.66 (s, 4H), 3.70 (m, 4H), 3.89 (s, 8H), 4.19 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 25.1, 26.2, 28.8, 29.0, 38.5, 39.1, 40.0, 47.8, 48.3, 64.7, 69.1, 70.3, 157.0, 166.3, 174.9; MS(F AB) m/e (相対強度) MH<sup>+</sup> [1341(25), 1343(60), 1345(70), 1347(56), 1349(21)], 705.6 (100); 分析値：C<sub>48</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>Br<sub>4</sub>に対する計算値：C, 42.86; H, 6.29; N, 9.27; Br, 23.77. 実測値：C, 42.15; H, 6.28; N, 9.87; Br, 25.33。

10

20

30

40

50

## 【0167】

<化合物 2 1 - [テトラキス-(2-シアノエトキシメチル)メタン]>

報告された方法(Bruson, H.A., 米国特許第2,401607号;1946年6月4日)と同様にして、この化合物を調製した。アクリロニトリル27.3mL(21.8g, 411mmol)を、ペンタエリスリトール8.0g(58.8mmol)と40%水酸化ベンジルトリメチルアンモニウム水溶液1.76mLとの攪拌されたH<sub>2</sub>O(50mL)溶液に加えた。還流冷却器を備え付け、そして混合物をN<sub>2</sub>雰囲気下で攪拌しながら、40 °Cで16時間、次いで60 °Cで24時間加熱した。冷却時、混合物を濃HCl 1mLで酸性化し、そして分液ポートに移した。底に沈澱したオイルを集め、そして水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mLずつで3回抽出した。オイルおよび合わせた抽出物を、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイル23.5gを得た。ビスシアノエチルエーテルを、クーゲルロール(Khugelrohr)蒸留によって、110 °Cで0.25torrで除去した。ポット残留物をH<sub>2</sub>O 1Lから結晶化して8.43g(41%)の化合物 2 1 を白色の針状結晶として得た：m.p. 42.5 [(Macromolecules 1991, 24, 1443-1444.)には 39-40 °Cと報告されている]; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.61 (t, J=6Hz, 8H), 3.50 (s, 8H), 3.6 (t, J=6Hz, 8H)。

10

## 【0168】

<化合物 2 2 - [テトラキス-(2-カルボキシエトキシメチル)メタン]>

5.0g(14.35mmol)の化合物 2 1 の濃HCl(21.5mL)溶液を75 °Cで3時間攪拌した。この間、白色の沈澱が生成した。減圧下でHCl水溶液を除去し、そして混合物をH<sub>2</sub>O(25mLずつ)から2回濃縮した。得られた固形物質9.68gを、水酸化物の形態のDOW-1-X2樹脂床16.5cmを含有する内径45mmのカラム上に装填し、そしてカラムをH<sub>2</sub>O 200mL、次いで1N HClで溶出した。TLC (80/20/1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/HOAc)で示される、生成物を含有する画分を濃縮して、1.21g(21%)の 2 2 をオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) d 2.46 (t, J=6Hz, 8H), 3.22 (s, 8H), 3.55 (t, J=6Hz, 8H)。

20

## 【0169】

<化合物 2 3 >

塩化チオニル3.71mL(6.06g, 50.8mmol)を、1.12g(2.85mmol)の化合物 2 2 のTHF(7.0mL)溶液に加えた。この混合物を室温で3時間攪拌し、そして溶媒を減圧下で除去した。粗製の酸クロライドをTHF(7mL)に溶解した。次いで、この溶液にEt<sub>3</sub>N 2.12mL(1.54g, 15.24mmol)を加えた。この混合物をN<sub>2</sub>下で攪拌し、そして0 °Cまで冷却した。3.60g(12.74mmol)の化合物 4 のTHF(5mL)溶液を1分間かけて加えた。冷却浴を除去し、そして混合物を室温で5.5時間攪拌し、次いで、1N HCl(25mL)と4つのEtOAc(25mLずつ)とで分けた。EtOAc層を合わせ、ブラインで洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、粘稠なオイル3.46gを得た。シリカゲルのクロマトグラフィー(95/5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)によって精製することにより、1.26g(30%)の化合物 2 3 を粘稠なオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.40 (t, 8H), 3.29 (s, 8H), 3.35 (m, 16H), 3.48-3.77 (m, 48H), 5.12 (s, 8H), 5.60 (bd, 4H), 6.85 (bd, 4H), 7.34 (s, 20H)。

30

## 【0170】

<化合物 3 7 >

シクロヘキセン 4.0mLおよび10% Pdカーボン 83mgを、N<sub>2</sub>下で、142mg(0.093mmol)の化合物 2 3 のEtOH(8.4mL)溶液に加えた。この混合物を90 °Cの油浴で3時間攪拌しながら還流し、そして、冷却時、ケイソウ土を通して濾過してCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を用いてフィルターおよびフラスコを洗浄した。濾液を濃縮して70mg(78%)の化合物 3 7 をオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.90 (t, 8H), 3.33 (s, 8H), 3.45 (t, 8H), 3.52-3.73 (m, 48H)。

40

## 【0171】

<化合物 2 4 >

NaHCO<sub>3</sub> 40mg (0.48mmol)および104mg(0.40mmol)の化合物 1 0 を、70mg(0.098mmol)の化合物 3 7 のジオキサン(2mL)とH<sub>2</sub>O(0.67mL)との溶液に加えた。この混合物を室温で17時間攪拌し、そして1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5mLを加え、pHを4にする。混合物を濃縮し、そして濃縮物をG-10 Sephadex (登録商標) (MeOH)のクロマトグラフィーで精製した。生成物を含有する画分を減圧下で濃縮してオイル91mgを得た。HPLC (C<sub>18</sub>, グラジエント 20/80/0.1 ~ 35/65/0.1

50

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H)によって粗製の生成物36mgを精製することにより、19mg(44%)の化合物 2 4 をオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.50 (t, 8H), 3.31 (s, 8H), 3.36-3.72 (m, 56H), 3.91 (s, 8H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 28.8, 36.5, 39.7, 40.0, 67.2, 69.3, 69.5, 70.3, 166.6, 173.0. MS(FAB) m/e (相対強度) MH<sup>+</sup> [1425(15), 1427(63), 1429(75), 1431(64), 1433(12)], 577(100)。

**【 0 1 7 2 】**

< 化合物 2 5 a - [PEG<sub>3350</sub> のビス-トシレート] >

ピリジン6.47mLを、共沸蒸留(トルエン)によって乾燥したポリエチレングリコール(J.T. Baker、平均分子量 1モルあたり3350g) 16.75g(5.0mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40mL中の溶液に加えた。溶液を窒素下で静置し、そして0 °Cまで冷却した。塩化トシル7.63g(40mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40mL)溶液を25分間かけて加えた。冷却浴を除去し、そして混合物を室温で16時間攪拌した。混合物を1N HCl 80mLと共に振盪し、そしてエマルジョンを含有するCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層をH<sub>2</sub>O 100mLで洗浄した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮した。この残留物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>Oから結晶化して、16.82g(92%)の化合物 2 5 a を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.50 (s, 6H), 3.48 (t, J=5Hz, 4H), 3.55-3.77 (m, 600Hより大きい、大きすぎて正確ではない積分値), 3.83 (t, J=5Hz, 4H), 7.44 (d, J=7Hz, 4H), 7.94 (d, J=7Hz, 4H)。

**【 0 1 7 3 】**

< 化合物 2 6 a - [ジアジド-PEG<sub>3350</sub>] >

10.83g(2.96mmol)の化合物 2 5 a とNaN<sub>3</sub> 1.92g(29.6mmol)とのDMF(30mL)溶液を、N<sub>2</sub> 下で、120 °Cの油浴中で3時間加熱した。冷却時、この混合物をH<sub>2</sub>O(100mL)とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を用いて200mLまで希釈し、そして1N HCl 100mLで洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮した。得られたロウ質の固形物を再結晶(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O)し、そして得られた固形物をシリカゲルのクロマトグラフィー(グラジエント 98/2~95/5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)でさらに精製して、4.75g(47%)の化合物 2 6 a をロウ質の固形物として得た：TLC Rf 0.41 (9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 3.35 (t, J=5Hz, 4H), 3.44 (t, J=5Hz, 2H), 3.54-3.77 (m, およそ300H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.79 (t, J=5Hz, 2H)。

**【 0 1 7 4 】**

< 化合物 2 7 a - [ジアミノ-PEG<sub>3350</sub>] >

10% Pdカーボン(Aldrich)473mgを、4.75g(1.39mmol)の化合物 2 6 a のEtOH(140mL)溶液に加えた。この混合物を60psiのH<sub>2</sub>下で30時間振盪した。反応が不完全であった(TLC, 9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)ため、さらに10% Pdカーボン473mgを加え、そしてこの混合物を60psiのH<sub>2</sub>下でさらに5時間振盪した。次いで、混合物をケイソウ土を通して濾過し、減圧下で濃縮し、そして濃縮物を結晶化して(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O)、4.03g(86%)の化合物 2 7 a を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.92 (t, 4H), 3.49 (t, 2H), 3.66 (t, 4H), 3.67 (m, およそ300H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.86 (t, 2H)。

**【 0 1 7 5 】**

< 化合物 2 8 - [化合物 7 のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル] >

ジシクロヘキシルカルボジイミド596mg(2.89mmol)を、1.84g(2.41mmol)の化合物 7 とNHS 278mg(2.41mmol)とのTHF(12mL)溶液にN<sub>2</sub> 下0 °Cで加えた。冷却浴を除去し、そして混合物を室温で16時間攪拌した。この混合物に酢酸250μLを加えた。室温で1時間攪拌を続けた。次いで、混合物を冷凍機中に2時間静置した。固形物を濾過によって除去し、そして濾液を濃縮して、2.27g(110%)の粗製の化合物 2 8 を粘稠なオイルとして得た。化合物 2 8 を分解しないように精製することは困難であったので、この化合物 2 8 は、ジアミノ-PEGをアシル化するために直接用いた。

**【 0 1 7 6 】**

< 化合物 2 9 a >

900mg(1.05mmol)の化合物 2 8 のジオキサン(4.68mL)溶液を、877mg(0.26mmol)の化合物 2 7 a とNaHCO<sub>3</sub> 176mg(2.10mmol)とのH<sub>2</sub>O(3.12mL)溶液に0 °Cで加えた。この混合物を2時間

10

20

30

40

50

攪拌し、次いで1N HCl(25mL)と2つのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mLずつ)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、粘稠なオイルを得た。シリカゲルクロマトグラフィー(グラジエント, 95/5~87/13 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)によって精製することにより、695 mg(55%)の化合物 2 9 a をロウ質の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.55 (bd, 8H), 3.39 (m, 16H), 3.44-3.72 (m, およそ432H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.89 (s, 4H), 4.03 (s, 4H), 5.09 (s, 8H), 7.36 (s, 20H)。

## 【 0 1 7 7 】

< 化合物 3 8 a >

シクロヘキセン7.1mLを、688mg(0.142mmol)の化合物 2 9 a のEtOH(14.2mL)溶液にN<sub>2</sub>下で加えた。10% Pdカーボン284mgを加え、そして得られた混合物を2時間還流した。冷却時、混合物をケイソウ土を通してEtOHで濾過し、そして濾液を減圧下で濃縮して550mg(90%)の化合物 3 8 a をロウ質の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.58 (m, 8H), 2.93 (m, 8H), 3.38-3.76 (m, およそ550H), 4.00 (s, 4H), 4.13 (s, 4H)。

## 【 0 1 7 8 】

< 化合物 3 0 a >

268mg(1.04mmol)の化合物 1 0 のジオキサン(4.65mL)溶液を、550mg(0.13mmol)の化合物 3 8 a とNaHCO<sub>3</sub> 175mg(2.08mmol)とのH<sub>2</sub>O(3.11mL)溶液に0 で加えた。この混合物を20時間攪拌し、そして1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50mL)と2つのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mLずつ)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。G-10 Sephadex (登録商標) クロマトグラフィー (MeOH) で精製することにより、非晶質の固形物を得た。この固形物を結晶化して(EtOH/Et<sub>2</sub>O)、378mg(61%)の化合物 3 0 a を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.59 (bd s, 8H), 3.38-3.82 (m, およそ500H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.88 (s, 8H), 3.98 (s, 4H), 4.10 (s, 4H); プロモアセチル測定法 (European Journal of Biochemistry, 1984, 140, 63-71): 計算値, 0.84mmol/g; 実測値, 0.50mmol/g。

## 【 0 1 7 9 】

< 化合物 2 5 b - [PEG<sub>8000</sub>のビス-トシレート]>

トリエチルアミン2.3mL(16.5mmol)、次いでTsCl 3.15g(16.5mmol)を、共沸蒸留(トルエン)によって乾燥したPEG<sub>8000</sub>(Aldrich、平均分子量8000g/mmol) 12.0g(1.5mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 30mL中の溶液に加えた。この混合物を室温で18時間攪拌し、そして1N HCl(50mLずつ)で4回、次いで飽和NaCl溶液(50mL)で1回抽出した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして減圧下で濃縮して、ロウ質の固形物を得た。再結晶(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O)により、11.0g(92%)の化合物 2 5 b を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.38 (s, 6H), 3.40-3.89 (m, およそ800H, 大きすぎて正確ではない積分値), 4.14 (m, 4H), 7.34 (d, J=8.2Hz, 4H), 7.79 (d, J=8.2Hz, 4H)。

## 【 0 1 8 0 】

< 化合物 2 6 b - [PEG<sub>8000</sub>のジアジド]>

NaN<sub>3</sub> 1.86g(28.6mmol)を、10.8g(1.3mmol)の化合物 2 5 b の乾燥DMF(30mL)溶液に加えた。この混合物をN<sub>2</sub>下で120 にて2.5時間加熱した。冷却時、この混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (240mL)と3つの0.5N HCl(50mLずつ)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を飽和NaCl溶液(50mL)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、固形物を得た。シリカゲルのクロマトグラフィー(グラジエント 2/98~6/94 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)で精製し、そして精製した生成物を再結晶(MeOH/Et<sub>2</sub>O)することにより、6.95g(66%)の化合物 2 6 b を白色の固形物として得た：TLC (Rf=0.33, 12/88 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 3.39-3.86 (m)。

## 【 0 1 8 1 】

< 化合物 2 7 b - [ジアミノ-PEG<sub>8000</sub>]>

6.9g(0.86mmol)の化合物 2 6 b のアンモニアで飽和したMeOH(150mL)溶液を窒素でページした。10% Pdカーボン 1.5gを加え、そしてこの混合物を65psiのH<sub>2</sub>下で振盪した。20時間

10

20

30

40

50

後、TLC分析により、反応が不完全であることが示された。結果として、10% Pdカーボン200mgを加え、そして65psiのH<sub>2</sub>下でさらに20時間振盪を続けた。この混合物をケイソウ土を通して濾過し、濾液を減圧下で濃縮した。得られた口ウ質の固形物を再結晶して(MeOH/Et<sub>2</sub>O)、6.0g(89%)の化合物 2 7 b を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.96 (t, J=5.1Hz, 4H), 3.40-3.89 (m, およそ700H, 大きすぎて正確ではない積分値)。

## 【 0 1 8 2 】

< 化合物 2 9 b >

NaHCO<sub>3</sub> 221mg(2.63mmol)を、3.0g(0.375mmol)の化合物 2 7 b の水(10mL)とジオキサン(3mL)との溶液に加えた。次いで、ジオキサン(10mL)に溶解した1.3g(1.51mmol)の化合物 2 8 を加えた。この混合物を24時間攪拌し、次いで0.5N HCl(40mL)を加えた。この混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mLずつ)で4回抽出した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。MeOH/Et<sub>2</sub>Oから結晶化することにより、2.0g(58%)の化合物 2 9 b を得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.52 (m, 8H), 3.40-3.64 (m, およそ700H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.89 (s, 4H), 4.02 (s, 4H), 5.09 (s, 8H), 7.35 (s, 20H)。

## 【 0 1 8 3 】

< 化合物 3 8 b >

10% Pdカーボン123mgを、600mg(0.063mmol)の化合物 2 9 b の無水EtOH(5mL)とシクロヘキセン(2.5mL)との溶液に、窒素下に加えた。この混合物を窒素下で2時間還流した。この反応混合物をケイソウ土を通して濾過し、エバポレートして549mg(97%)の化合物 3 8 b を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.58 (m, 8H), 2.90 (m, 8H), 3.39-3.70 (m, およそ700H, 大きすぎて正確ではない積分値), 4.05 (s, 4H), 4.15 (s, 4H)。

## 【 0 1 8 4 】

< 化合物 3 0 b >

NaHCO<sub>3</sub> 100mg(1.2mmol)、次いで84mg(0.32mmol)の化合物 1 0 を、529mg(0.059mmol)の化合物 3 8 b のジオキサン(2mL)と水(5mL)との溶液に加えた。12時間攪拌後、この反応物を1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で酸性化し、そしてCHCl<sub>3</sub>(40mLずつ)で4回抽出した。CHCl<sub>3</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、503mgの半固形の残留物を得た。この残留物を、G-10 Sephadex (登録商標)のクロマトグラフィー(MeOH)で精製し、そして結晶化して(MeOH/Et<sub>2</sub>O/ヘキサン)、215mg(39%)の化合物 3 0 b を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.58 (m, 8H), 3.35-3.70 (m, およそ700H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.89 (s, 8H), 4.01 (s, 4H), 4.16 (s, 4H); プロモアセチル測定法(*European Journal of Biochemistry*, 1984, 140, 63-71): 計算値, 0.42mmol/g; 実測値, 0.27mmol/g。

## 【 0 1 8 5 】

< 化合物 3 1 - [PEG<sub>3350</sub>-ビス-クロロホルメート] >

乾燥ピリジン2滴、次いでトリホスゲン125mg(0.418mmol)を、共沸蒸留(トルエン)によって乾燥したポリエチレングリコール(J.T. Baker、平均分子量 1モルあたり3350g) 1.0g(0.249mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 12mL中の溶液に加えた。この混合物を室温で20時間攪拌し、そして溶媒を減圧下でエバポレートして1.0g(100%)の化合物 3 1 を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 3.40-3.65 (m, およそ300H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.77 (m, 4H), 4.46 (m, 4H)。

## 【 0 1 8 6 】

< 化合物 3 2 >

1.0g(0.25mmol)の化合物 3 1 の5:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ジオキサン(12mL)溶液を、600mg(1.0mmol)の化合物 1 8 のジオキサン(10mL)とピリジン(1.5mL)との50 の溶液に滴下した。得られた濁った溶液を72時間攪拌した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)を加え、次いでこの混合物を濾過した。濾液をエバポレートし、そして半固形の残留物を、G-10 Sephadex (登録商標)のクロマトグラフィーで精製した。得られた固形物を結晶化して(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O)、829mg(75%)の化合物 3 2 を微黄色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.30 (m, 8H), 1.40 (m, 8H), 1.61 (m, 8H), 2.18 (m, 8H), 3.17 (m, 8H), 3.40 (m, 16H), 3.62 (m, およそ300H, 大きすぎて正確ではない積分値), 4.15 (m, 4H), 5.07 (s, 8H), 7.33 (m, 20H)。

## 【 0 1 8 7 】

## &lt; 化合物 3 9 &gt;

10% Pdカーボン100mgを、300mg(0.065mmol)の化合物 3 2 の無水EtOH(5mL)とシクロヘキセン(2mL)との溶液に窒素下で加えた。この混合物を窒素下で2時間還流した。この混合物をケイソウ土を通して濾過し、溶媒をエバポレートして237mg(90%)の化合物 3 9 を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.37 (m, 8H), 1.48 (m, 8H), 1.65 (m, 8H), 2.21 (m, 8H), 2.50 (m, 8H), 3.39 (m, 16H), 3.64 (m, およそ300H, 大きすぎて正確ではない積分値), 4.19 (m, 4H)。

## 【 0 1 8 8 】

## &lt; 化合物 3 3 &gt;

NaHCO<sub>3</sub> 125mg(0.67mmol)および115mg(0.44mmol)の化合物 1 0 を、225mg(0.055mmol)の 3 9 のジオキサン(5mL)と水(5mL)との溶液に加えた。得られた黄色の溶液を室温で12時間攪拌した。次いで、この溶液をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30mLずつ)で3回抽出した。水層を1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で酸性化し、そしてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30mLずつ)で3回抽出した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、黄色のオイルを得た。G-10 Sephadex (登録商標)のクロマトグラフィー(MeOH)で精製し、そして得られたオイルを再結晶して(EtOH/Et<sub>2</sub>O)、182mg(73%)の化合物 3 3 を白色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.35 (m, 8H), 1.55 (m, 8H), 1.65 (m, 8H), 2.22 (m, 8H), 3.28 (m, 8H), 3.42 (m, 16H), 3.50-3.64 (m, およそ300H, 大きすぎて正確ではない積分値), 3.87 (s, 8H), 4.18 (m, 4H); プロモアセチル測定法(*European Journal of Biochemistry*, 1984, 140, 63-71): 計算値, 0.87mmol/g; 実測値, 0.73mmol/g. 分析値: C<sub>191</sub>H<sub>375</sub>O<sub>87</sub>N<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>に対する計算値: C, 50.84; H, 8.33; N, 3.09; Br, 7.05. 実測値: C, 51.98; H, 8.34; N, 2.45; Br, 10.19。

## 【 0 1 8 9 】

## &lt; 化合物 4 0 - [4-ニトロフェニルヨードアセテート]&gt;

ジシクロヘキシルカルボジイミド5.15g(25mmol)と4-ニトロフェノール2.92g(2.92mmol)とのEtOAc(100mL)溶液を、ヨード酢酸3.72g(20mmol)の0 の溶液に加えた。この混合物を0 で1時間、および室温で2時間攪拌した。固形物を濾過によって除去し、そして濾液を減圧下で濃縮した。得られた黄色の固形物を再結晶して(EtOAc/ヘキサン/痕跡量のHOAc)、4.82g(78%)の化合物 4 0 を黄褐色の固形物として得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 4.00 (s, 2H), 7.39 (d, 2H), 8.40 (m, 2H)。

## 【 0 1 9 0 】

## &lt; 化合物 4 1 &gt;

NaHCO<sub>3</sub> 103mg(1.22mmol)、次いで211mg(0.692mmol)の化合物 4 0 を、110mg(0.104mmol)の化合物 3 4 のジオキサン(5mL)とH<sub>2</sub>O(5mL)との溶液に加えた。この混合物を18時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮した。Sephadex (登録商標)のクロマトグラフィー(MeOH)で精製することにより、140mg(87%)の化合物 4 1 をオイルとして得た。分析試料を分取用HPLC(C<sub>18</sub>, グラジエント 20/80/0.1~25/75/0.1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA 60分間にわたって、225nm)で調製した：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.59 (m, 4H), 2.65 (m, 4H), 3.44-3.62 (m, 60H), 3.77 (s, 4H), 3.78 (s, 4H), 4.02 (s, 4H), 4.21 (s, 4H)。

## 【 0 1 9 1 】

## &lt; 化合物 4 2 &gt;

N-メトキシカルボニルマレイミド145mg(0.935mmol)を、171mg(0.161mmol)の化合物 3 4 のジオキサン(8mL)と飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2mL)とH<sub>2</sub>O(2mL)との溶液に0 で、勢いよく攪拌しながら加えた(*The Practice of Peptide Synthesis*, M. BodanskyおよびA. Bodansky, Springer-Verlag, ニューヨーク, 1984, 29-31頁. Keller, O., Rudinger, J. *Helv. Chim. Acta* 1975, 58, 531.)。15分後、ジオキサン25mLを加え、冷却浴を除去し、そして室温で45分間攪拌を続けた。この混合物をCHCl<sub>3</sub>(30mLずつ)で2回抽出し、そしてCHCl<sub>3</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。G-10 Sephadex (登録商標)のクロマトグラフィー(MeOH)で精製することにより、103mg(45%)の化合物 4 2 をオイル

10

20

30

40

50

として得た。分析試料を分取用HPLC(C<sub>18</sub>, グラジエント 20/80/0.1~25/75/0.1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA 65分間にわたって、225nm)で調製してオイルを得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.57 (m, 4H), 2.67 (m, 4H), 3.42-3.65 (m, 52H), 3.72 (m, 8H), 4.03 (s, 4H), 4.17 (s, 4H), 6.74 (s, 4H), 6.75 (s, 4H)。

**【 0 1 9 2 】**

<化合物 4 3 - [ヒドロキシメチル-トリス-(2-シアノエトキシメチル)メタン]> KOH 0.30g(5.41mmol)、次いでアクリロニトリル23mL(18.6g, 350mmol)を、ペンタエリスリトール6.8g(50mmol)のH<sub>2</sub>O(50mL)溶液に加えた。この混合物を室温で16時間攪拌し、濃HCl溶液 1.5mLで酸性化し、そしてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mLずつ)で2回抽出した。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、16.97gの液体を得た。シリカゲルのクロマトグラフィ- (EtOAc)で精製することにより、8.49g(51%)の化合物 4 3 を粘稠なオイルとして得た：TLC, Rf=0.15(EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.62 (t, 6H), 3.54 (s, 6H), 3.68 (t, 6H), 3.70 (s, 2H)。

10

**【 0 1 9 3 】**

<化合物 4 4 - [ヒドロキシメチル-トリス-(2-カルボキシメチルエトキシメチル)メタン]>

HClで飽和したMeOH溶液78mLを、5.45g(15.6mmol)の化合物 4 3 に加えた。この混合物を1時間還流状態で加熱し、そして冷却時、H<sub>2</sub>O(100mL)と4つのEt<sub>2</sub>O(100mLずつ)とで分けた。Et<sub>2</sub>O層を合わせて、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(100mL)および飽和NaCl溶液(100mL)で順次洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、4.74gの粘稠な液体を得た。シリカゲルのクロマトグラフィ-で精製することにより、3.05g(50%)の化合物 4 4 をオイルとして得た：TLC, Rf=0.27 (80/20 EtOAc/ヘキサン); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.58 (t, 6H), 3.43 (s, 6H), 3.61 (s, 2H), 3.69 (t, 6H), 3.70 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 34.8, 44.9, 51.6, 65.2, 66.9, 71.0, 172.1。

20

**【 0 1 9 4 】**

<化合物 4 5 >

560mg(1.4mmol)の化合物 4 4 と1.69g(6.0mmol)の化合物 4 との混合物を、150 °Cで4時間窒素下で加熱した。この混合物をEtOAc(50mL)と1N HCl (25mL)とに分け、そしてHCl層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)で抽出した。EtOAcおよびCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>の抽出層を合わせて、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液で洗浄し、乾燥し(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)、濾過し、そして濃縮して、粘稠な残留物を得た。シリカゲルのクロマトグラフィ- (グラジエント 95/5~90/10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)で精製することにより、300mg(19%)の化合物 4 5 を粘稠なオイルとして得た：TLC, Rf=0.24 (90/10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.40 (t, 6H), 3.38 (s, 6H), 3.39-3.48 (m, 12H), 3.52-3.67 (m, 32H), 5.13 (s, 6H), 5.62 (bd s, 3H), 6.80 (bd s, 3H), 7.40 (s, 15H)。

30

**【 0 1 9 5 】**

<化合物 4 6 >

10% Pdカーボン104mgを、308mg(0.269mmol)の化合物 4 5 のEtOH(10.4mL)とシクロヘキセン(5.2mL)との溶液に窒素下で加えた。還流冷却器を取り付け、そしてこの混合物を85 °Cの油浴中で1.5時間加熱した。冷却時、この混合物をケイソウ土を通して濾過し、そして濾液を濃縮して177mgの残留物を得た。この残留物をジオキサン 5.98mLに一部溶解した。得られた混合物を、386mg(1.49mmol)の化合物 1 0 に加え、次いでこれをNaHCO<sub>3</sub> 251mg(2.99mmol)のH<sub>2</sub>O(3.99mL)溶液に加えた。得られた混合物を窒素下で18時間攪拌し、そして1N HCl(25mL)と3つのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mLずつ)とで分けた。水層を3/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(25mLずつ)で3回および1/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(25mLずつ)で3回抽出した。最初の2回分のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>抽出物を廃棄し、そして残りの抽出物を合わせて、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、102mgの粘稠なオイルを得た。HPLCで(C<sub>18</sub>, 23/77/0.1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 234nm 検出)で精製することにより、43mg(14%)の化合物 4 6 を粘稠なオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 2.48 (t, 6H), 3.40 (s, 6H), 3.44-3.54 (m, 14H), 3.56-3.62 (m, 12H), 3.63 (s, 12H), 3.67 (t, 6H), 3.91 (s, 6H), 6.90 (t, 3H), 7.10 (t, 3H); MS (FAB) m/e (相対強度) MH<sup>+</sup> [1103(17), 1105(42), 1107(41), 1109(18)], MNa<sup>+</sup> [1125(38), 1127(100), 112

40

50

9(99), 1131(39)].

【0196】

<化合物47 - [S-(6-ヒドロキシヘキシル)イソチオウロニウムクロライド]>  
 チオ尿素11.1g(146mmol)を6-クロロヘキサノール16.6mL(20.0g, 146mmol)のエタノール(49mL)溶液に加え、そしてこの混合物を24時間還流した。混合物を0℃まで冷却し、そして生成物を結晶化した。この結晶を減圧濾過によって集め、そして乾燥して、28.4g(92%)の化合物47を白色の固形物として得た：mp 122-124℃；<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ 1.40 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.41 (t, 2H), 9.27および9.33 (重複した広幅シングレット, 4H)；分析値：C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Sに対する計算値：C, 39.51；H, 8.06；N, 13.17；S, 15.07。実測値：C, 39.69；H, 8.00；N, 13.01；S, 15.16。

10

【0197】

<化合物48 - [6-メルカプトヘキサン-1-オール]>  
 NaOHのペレット9.25gを、17.8mg(83.6mmol)の化合物47のH<sub>2</sub>O(120mL)とEtOH(120mL)との溶液に加えた。この混合物を4時間還流した。混合物をおよそ75mLになるまで注意深く濃縮し、そして濃縮物を減圧蒸留によって精製して、7.4g(66%)の化合物48を得た：bp 95-105 (5mmHg)；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.41(m, 9H), 2.59 (dt, 2H), 3.69 (brd sと重複したt, 3H)；<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 24.5, 25.2, 28.0, 32.5, 33.9, 62.7；分析値：C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>Sに対する計算値：C, 53.68；H, 10.51；S, 23.89。実測値：C, 53.35；H, 10.72；S, 23.60。

【0198】

<化合物49 - [ビス-(6-ヒドロキシヘキシル)ジスルフィド]>  
 I<sub>2</sub> 4.02g(15.8mmol)のMeOH(90mL)溶液を、4.26g(31.7mmol)の化合物48のMeOH(10mL)とEt<sub>3</sub>N(13.7mL (9.97g, 98.5mmol))との溶液にN<sub>2</sub>雰囲気下で10分間かけて滴下し、そして氷浴で冷却した。冷却浴を除去し、そして混合物を雰囲気温度で4時間攪拌した。この混合物をロータリーエバポレーターで濃縮し、そしてシリカゲルクロマトグラフィー(1:1ヘキサン/EtOAc)で精製して、3.12g(73%)の化合物49を淡黄色の固形物として得た：TLC R<sub>f</sub> 0.18 (1:1ヘキサン/EtOAc)；mp 38-48℃；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.15-2.20 (m, 16H), 2.73 (t, 4H), 3.70 (t, 4H)；分析値：C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する計算値：C, 54.09；H, 9.84；S, 24.06。実測値：C, 54.85；H, 9.86；S, 24.11。

20

【0199】

<化合物50 - [モノ-0-(4',4''-ジメトキシトリフェニルメチル)-ビス-(6-ヒドロキシヘキシル)ジスルフィド]>

30

4,4'-ジメトキシトリフェニルメチルクロライド3.97g(11.7mmol)を、3.12g(11.7mmol)の化合物49のピリジン(45mL)溶液に加えた。この混合物を雰囲気温度で16時間攪拌した。大部分のピリジンをロータリーエバポレーターで除去し、そして残留物を飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(100mL)とEtOAc(100mL)とで分けた。EtOAc層を飽和NaCl溶液 50mLで洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。シリカゲルクロマトグラフィー(9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc)で精製することにより、2.84g(43%)の化合物50を粘稠なオイルとして得た：TLC R<sub>f</sub> 0.35 (9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc)；<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.41 (m, 8H), 1.65 (m, 8H), 2.70 (2つの重複したトリプレット, 4H), 3.08 (t, 2H), 3.65 (t, 2H), 3.81 (s, 6H), 6.85 (d, 4H), 7.32 (m, 7H), 7.47 (d, 2H)；HRMS (FAB, M+), C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>に対する計算値：568.2681。実測値：568.2665。

40

【0200】

<化合物51 - [0-[14-(4',4''-ジメトキシトリフェニルメトキシ)-7,8-ジチオテトラデシル]-0-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト]>  
 0-シアノエチル-N,N,N',N'-テトラ-イソプロピルホスホロジアミダイト458mg(1.52mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(0.5mL)溶液を、771mg(1.36mmol)の化合物50とジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド116mg(0.68mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(6.8mL)溶液にN<sub>2</sub>雰囲気下で加えた。混合物を4時間攪拌し、そしてNaHCO<sub>3</sub>(25mL)とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3×25mL)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を合わせて、飽和NaCl溶液で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。25mmカラム中の塩基性のアルミナ(2"プラグ)を通して濾過し、9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>Nで溶出することによって精製して、8

50

31mg(80%)の化合物 5 1 を粘稠なオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.25 (m, 12H), 1.45 (m, 8H), 1.70 (m, 8H), 2.72 (m, 6H), 3.09 (t, 2H), 3.65 (m, 4H), 3.87 (s, 6H), 3.91 (m, 2H), 6.89 (d, 4H), 7.35 (m, 7H), 7.49 (d, 2H); <sup>31</sup>P NMR (15% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を内部標準として有するCDCl<sub>3</sub>) 147,69; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS<sub>2</sub>に対する計算値：769.3839, 実測値：769.3853。

【 0 2 0 1 】

<化合物 5 2 - [トリチル-HADアルコール]>

塩化トリチル60g(0.21mol)を、57g(0.21mol)の化合物 4 9 のピリジン(60mL)溶液に加えた。この混合物を100 で19時間攪拌した。この反応混合物を室温まで冷却し、そして濾過した。濾液を塩化メチレン 300mLで希釈し、そして飽和炭酸水素ナトリウム 200mLで抽出した。有機層を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。シリカゲルクロマトグラフィー(グラジエント 9:1 ヘキサン：酢酸エチル~3:1 ヘキサン：酢酸エチル)で精製することにより、55g(50%)の化合物 5 2 を得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.38 (m, 8H), 1.63 (m, 8H), 2.66 (m, 4H), 3.04 (t, 2H), 3.62 (t, 2H), 7.25 (m, 9H), 7.42 (m, 6H). HRMS (FAB, M<sup>+</sup>), C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>Sに対する計算値：508.2470. 実測値：508.2482。

10

【 0 2 0 2 】

<化合物 5 3 - [トリチル HAD ホスホロアミダイト]>

10g(19.7mmol)の化合物 5 2 とジイソプロピルエチルアミン6.3mL(36.2mmol)との塩化メチレン(90mL)溶液に、アルゴン下で0 にて、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロホスホロアミダイト4.5mL(20.2mmol)をゆっくりと加えた。この混合物を90分間攪拌した後、反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム100mLずつで2回抽出した。この塩化メチレン溶液を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、そして濃縮して、オイルを得た。塩基性アルミナクロマトグラフィー(75:24:1, ヘキサン：酢酸エチル：トリエチルアミン)で精製することにより、11.3g(81%)の化合物 5 3 をオイルとして得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.18 (m, 12H), 1.37 (m, 8H), 1.62 (m, 8H), 2.6 (m, 6H), 3.04 (t, 2H), 3.60 (m, 4H), 3.82 (m, 2H), 7.26 (m, 6H), 7.44 (m, 9H). HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS<sub>2</sub>に対する計算値：709.3626. 実測値：709.3621。

20

【 0 2 0 3 】

<化合物 5 4 - [0-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-ヘキセノール]>

イミダゾール15.66g(230mmol)とtert-ブチルジメチルシリルクロライド20.0g(130mmol)を、5-ヘキセン-1-オール12.47mL(10.4g, 104mmol)のDMF(104mL)溶液に加えた。この混合物を雰囲気温度で4時間攪拌し、そしてEtOAc(200mL)と飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(100mL)とで分けた。EtOAc層を飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液100mL、飽和NaCl溶液100mLで洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、およそ容量100mLとした。減圧下で蒸留することにより、70.07g(90%)の化合物 5 4 を得た：bp 130-143 (100mmHg); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0.11 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 1.48 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 2.11 (dt, 2H), 3.66 (t, 2H), 5.03 (m, 2H), 5.86 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) -5.25, 18.40, 25.21, 26.01, 32.35, 33.60, 63.09, 114.40, 138.92; 分析値：C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Siに対する計算値：C, 67.22; H, 12.22. 実測値：C, 66.96; H, 12.16。

30

【 0 2 0 4 】

<化合物 5 5 - [1-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-1,5,6-ヘキサントリオール]>

9.86g(46.0mmol)の化合物 5 4 のアセトン(92mL)溶液に、N-メチルモルホリンオキサイド6.46g(55.2mmol)のH<sub>2</sub>O(23mL)溶液を加えた。この混合物に、2.5%のOsO<sub>4</sub>のtert-ブチルアルコール溶液443 μl(溶液360mg, OsO<sub>4</sub> 9.0mg, 35 μmol)および30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μLを加えた。この混合物を16時間攪拌し、そして亜ジチオ酸ナトリウム474mgのH<sub>2</sub>O(14mL)溶液を加えた。さらに0.5時間後、この混合物をセライトを通して濾過した。濾液をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、150mLのプフナート中の1"のシリカゲルを通して濾過し、EtOAc 250mLずつを用いて溶出した。生成物を含有する画分を濃縮して、11.0g(96%)の 5 5 を粘稠なオイルとして得た：TLC R<sub>f</sub> 0.2 (1:1 ヘキサン/EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0.05 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.25 (m, 4H), 1.55 (m, 2H), 3.41 (dd, 2H), 3.62 (t, 2H), 3.71 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) -

40

50

5.23, 18.42, 21.91, 26.02, 32.68, 32.81, 63.16, 66.74, 72.24; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), C<sub>12</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub>Siに対する計算値: 249.1886. 実測値: 249.1889.

【0205】

<化合物56 - [5,6-(ビス-0-ベンゾイル)-1-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-1,5,6-ヘキサントリオール]>

塩化ベンゾイル6.18mL(7.48g, 53.2mmol)を、5.29g(21.3mmol)の55のピリジン(106mL)溶液に加えた。この混合物を18時間攪拌し、そしてロータリーエバポレーターで濃縮した。混合物を冷1N HCl(100mL)とEtOAc(100mL)とで分けた。水層のpHを調べて、確実に酸性にした。EtOAc層をH<sub>2</sub>O 100mLおよび飽和NaCl 100mLで順次洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、10.33g(99%)の化合物56を粘稠な黄色のオイルとして得た: TLC R<sub>f</sub> 0.45 (1:4 EtOAc/ヘキサン); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 0.05 (s, 6H), 0.88 (s, 9H), 1.59 (m, 4H), 1.85 (m, 2H), 3.14 (t, 2H), 4.49 (dd, 1H), 4.59 (dd, 1H), 5.54 (m, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.58 (m, 2H), 8.05 (m, 4H)。

【0206】

<化合物57 - [5,6-(ビス-0-ベンゾイル)-1,5,6-ヘキサントリオール]>

1N フッ化テトラブチルアンモニウム10.7mL(10.7mmol)のTHF溶液を、2.62g(5.36mmol)の56のTHF(10.9mL)溶液に加えた。この混合物を16時間攪拌した。混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(25mL)とEtOAc(3×25mL)とで分けた。EtOAc抽出物を合わせて、飽和NaCl溶液で洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、粘稠なオイルを得た。このオイルをシリカゲルクロマトグラフィー(1:1 ヘキサン/EtOAc)で精製して、823mg(41%)の化合物57を粘稠なオイルとして得た: R<sub>f</sub> 0.14 (1:1 ヘキサン/EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.58 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 3.68 (t, 2H), 4.52 (dd, 1H), 4.62 (dd, 1H), 5.56 (m, 1H), 7.46 (m, 4H), 7.58 (m, 2H), 8.05 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 22.08, 31.20, 31.30, 32.88, 62.92, 66.17, 72.63, 128.93, 130.19, 130.57, 133.62, 166.72, 166.86; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>に対する計算値: 343.1545. 実測値: 343.1553。

【0207】

<化合物58 - [0-[5,6-(ビス-0-ベンゾイルオキシ)-ヘキシル]-0-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト]>

0-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト989mg(3.28mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2.0mL)溶液を、1.02g(2.98mmol)の57とジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド255mg(1.49mmol)(ジイソプロピルアミンのアセトニトリル溶液とテトラゾールとを1:1のモル比で混合し、そして濃縮して、白色の固形物として調製した)とのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(14.9mL)溶液に加えた。この混合物を4時間攪拌し、次いでCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)と冷飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(25mL)とで分けた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層を飽和NaCl溶液で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮した。25mmカラム中の塩基性のアルミナ(2"プラグ)を通して濾過し、9:1 EtOAc/Et<sub>3</sub>Nで溶出することにより精製して、1.5g(93%)の化合物58を粘稠なオイルとして得た: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 1.19 (m, 12H), 1.62 (m, 2H), 1.73 (m, 2H), 1.90 (m, 2H), 2.62 (dd, 2H), 3.53-3.92 (m, 6H), 4.53 (dd, 1H), 4.62 (dd, 1H), 5.58 (m, 1H), 7.48 (m, 4H), 7.60 (m, 2H), 8.09 (m, 4H); <sup>31</sup>P NMR (15% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を内部標準として有するCDCl<sub>3</sub>) d 148.2; HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>), C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Pに対する計算値: 543.2624. 実測値: 543.2619。

【0208】

<化合物59 - [4(ヨードアセトアミド)安息香酸]>

Weltman, J.K., 1983 *Biotechniques* 1:148-152に記載のようにして、この化合物を調製した。簡単に述べると、ヨード酢酸無水物708mg(2.0mmol)を、パラアミノ安息香酸137mg(1.0mmol)のジオキサン(10mL)溶液に加えた。この混合物を暗所で18時間攪拌し、そしてH<sub>2</sub>O(25mL)とEtOAc(25mL)とで分けた。EtOAc層を飽和NaCl溶液で洗浄し、乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、濾過し、そして濃縮して、桃色の固形物797mgを得た。ヘキサン/EtOAcから再結晶することにより、4-(ヨードアセトアミド)安息香酸221mg(72%)を白色の固形物として得た: mp 220-230; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) d 3.86 (s, 2H), 7.68 (d, 2H), 7.91 (d, 2H), 10.60 (s, 1H)。

10

20

30

40

50

【0209】

<化合物60-[ , -ビス-(N-2-アミノエチルカルバモイル)ポリエチレングリコールの4-(ヨードアセトアミド)ベンゾイル誘導体]>

ジシクロヘキシルカルボジイミド188mg(0.909mmol)を、4-(ヨードアセトアミド)安息香酸185mg(0.606mmol)と , -ビス-(N-2-アミノエチルカルバモイル)ポリエチレングリコール(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., トルエンとの共沸蒸留により乾燥)406mg(0.121mmol)とのTHF(2mL)溶液に加えた。この混合物を2時間攪拌し、次いで酢酸6滴を加えた。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10mLを加え、そして混合物を30分間冷凍機中に置いた。混合物を濾過して固形物を除去し、そして濾液を濃縮して粘稠な残留物を得た。シリカゲルクロマトグラフィー(グラジエント 99/1~96/4 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)で精製することにより、固形物を得た。この固形物をMeOHを用いて粉碎して微黄白色の固形物292mgを得た：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 3.48 (m, 8H), 3.63 (bd s, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, 大きすぎて積分不可能), 3.98 (s, 4H), 4.18 (bd m, 4H), 5.91 (bd m, 2H), 7.48 (bd m, 2H), 7.76 (d, 4H), 7.88 (d, 4H), 9.38 (bd m, 2H):ヨードアセチル測定法(European Journal of Biochemistry 1984, 140, 63-71): 計算値, 0.46mmol/g; 実測値, 0.37mmol/g。

10

【0210】

(実施例3: 活性結合手プラットフォーム分子および複合体の調製)  
生物学的分子または化学的分子と、結合手プラットフォーム分子との複合体を形成する方法は、多数ある。特定の方法には、生物学的分子または化学的分子に結合したチオールを用いて、結合手プラットフォーム分子上の反応性の「チオフィリック(イオウ親和性)」基と求核反応させて、チオエーテル結合を形成させる方法があるが、プラットフォーム分子上の反応基と、生物学的分子または化学的分子上の反応基との他の組合せも、生物学的分子または化学的分子を結合手プラットフォーム分子に共有結合的に結合させるために用いられ得る。表1に、相互反応基のいくつかの組合せを挙げる。与えられる方法のうちどれが優先的に行われるかは、生物学的分子または化学的分子の性質(溶解度、他の反応性基の存在など)により決定される。

20

【0211】

【表1】

求核基	相互反応基
アミン, ヒド"ラジド" ヒド"ラジン	活性エステル, 無水物, 酸 ハライド", スルホニルハライド", イミド エステル, イソシアネート, イソキシアネート, クロロホルメート カルボジイミドイオノ物, アルデヒド", ケトン
スルフィドリル	ハロアセチル, アルキルハライド", アルキル スルホネート, マレイミド", α,β- 不飽和カルボニル, アルキル 水銀, スルフィドリル, α,β- 不飽和スルホン

30

40

【0212】

以下に記載の実施例は、種々の結合手プラットフォーム分子の合成方法、および上記分子と生物学的分子または化学的分子とを複合体化する方法を例示する。これらの実施例は、

50

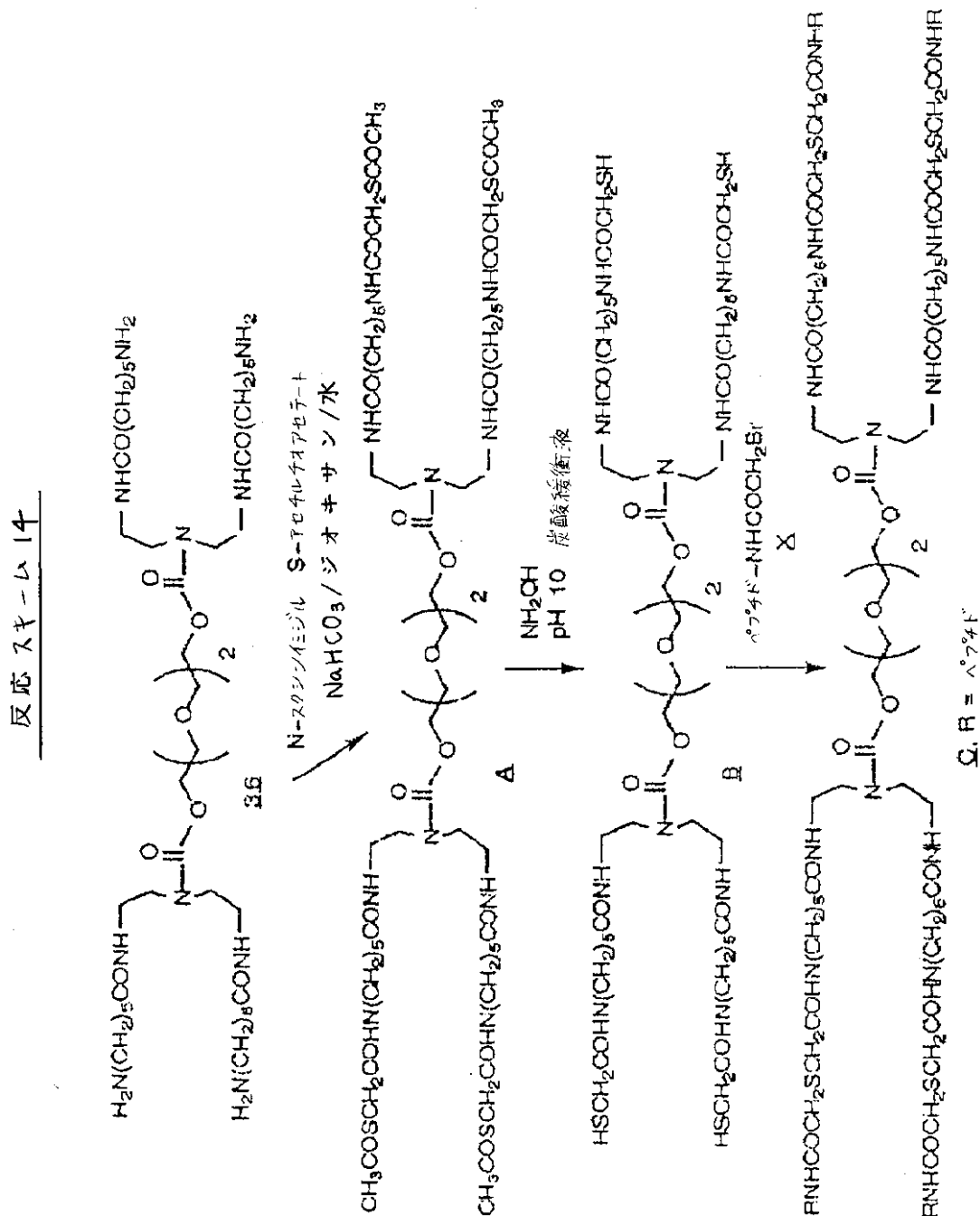
ペプチドおよびオリゴヌクレオチドが、表1中の相互反応基を用いて結合手プラットフォーム分子と複合体化する方法を示している。ペプチドおよびオリゴヌクレオチドの他に、他の生物学的分子(タンパク質、薬剤など)もまた、結合手プラットフォーム分子と複合体化し得る。

【0213】

(組合せ1: プラットフォームのチオール-リガンドのチオフィリック基)

【0214】

【化29】



10

20

30

40

【0215】

<化合物A>

化合物 3.6 (861mg、1.0mmol) および NaHCO<sub>3</sub> 252mg (3.0mmol) を、1/1 ジオキサン/H<sub>2</sub>O 20mL に溶解する。混合物を 0 に冷却し、そして N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート (Prochem Inc.) 1.16g (5.0mmol) のジオキサン (40mL) 溶液を、この混合物を攪拌しながら加える。1時間後、この混合物を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出する。抽出物全量を MgSO<sub>4</sub> で乾燥

50

し、濾過し、濃縮する。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、Aを得る。

【0216】

<化合物B - 4つのチオール基を有するプラットフォーム>

A 732mg (0.55mmol) のDMSO (7.3mL) 溶液を、ヘリウムを吹き込んだpH10の緩衝液 (100 mM 炭酸ナトリウム、10mM NH<sub>2</sub>OH) 55mLに加える。この混合物をN<sub>2</sub>ガス下におき、1時間攪拌して、約10mMのテトラチオールプラットフォームBの溶液を得る。

【0217】

<化合物X - プロモアセチル化ペプチド>

FMOC化学法を用いて、Wang(p-アルコキシベンジル)樹脂上で、標準固相法によりペプチドを合成する。FMOC (フルオレニルメトキシカルボニル) で保護されたアミノ酸を、アミノ末端に順次加える。最終工程は、N-プロモアセチルアミノカプロン酸の結合を包含する。保護基を除去し、ペプチドをトリフルオロ酢酸で樹脂から取り外して、Xを得、これを調製用逆相HPLCにより精製する。

10

【0218】

<ペプチド - プラットフォーム複合体、C>

テトラチオールプラットフォームBの約10mmol溶液 (pH10の緩衝液中) に、プロモアセチル化ペプチドXのDMSO溶液の過剰量を加える。ペプチド複合体Cを調製用逆相HPLCにより精製する。

【0219】

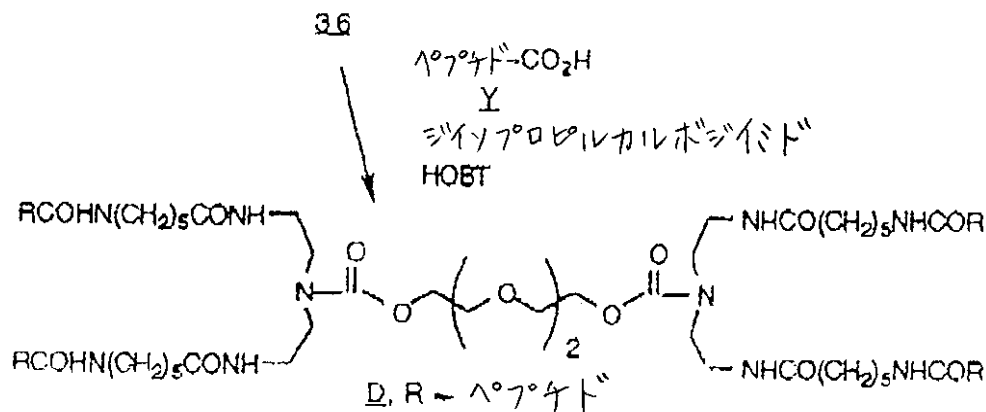
(組合せ2 : プラットフォームのアミン - ペプチドの活性カルボキシレート)

20

【0220】

【化30】

反応スキーム 15



30

【0221】

<化合物Y - 活性カルボキシレートを有するペプチド>

TFAに安定な保護基 (カルボキシル基にはベンジルエステル、アミノ基にはCBZ) を用いて、Wang(p-アルコキシベンジル)樹脂上で標準固相法によりペプチドを合成する。アミノ末端に、アミノ酸残基を順次加える。ペプチドをTFAにより樹脂から取り外すことにより、カルボキシ末端に1つの遊離カルボキシル基を有し、他の全てのカルボキシルおよびアミンがブロックされているペプチドを得る。保護されたペプチドYを、逆相HPLCにより精製する。

40

【0222】

<ペプチド - プラットフォーム複合体D>

化合物Y (0.3mmol) をDMF 1mLに溶解し、この溶液に、ジイソプロピルカルボジイミド0.

50

3mmolおよびHOBT (ヒドロキシベンゾトリアゾール) 0.3mmolを加える。この溶液を、テトラアミノプラットフォーム 3.6 0.025mmolのDMF (1mL) 溶液に加える。反応が完了すると、DMFを減圧下で除去し、粗製の完全に保護された複合体を得る。この複合体をMeOHに溶解し、そしてこの溶液を複合体 1グラム当り100mgの10% Pdカーボンと共にParr水素添加装置中に置く。混合物を60psi H<sub>2</sub>下において振とうし、そして脱保護された複合体 D を調製用逆相HPLCにより精製する。

【 0 2 2 3 】

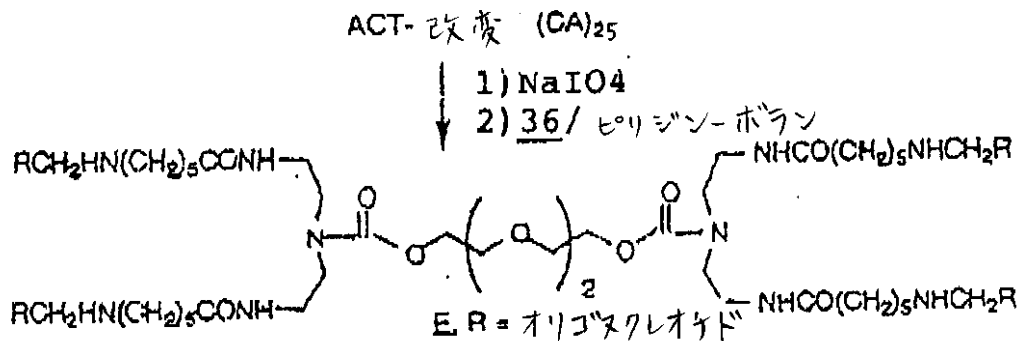
( 組合せ 3 : プラットフォームのアミン - オリゴヌクレオチドのアルデヒド )

【 0 2 2 4 】

【 化 3 1 】

10

### 反応スキーム 16



20

【 0 2 2 5 】

< オリゴヌクレオチド - プラットフォーム複合体 E >

NaIO<sub>4</sub> (200mM) 溶液の500 μLアリコート (100 μmol) を、ACT改変(CA)<sub>25</sub> 1.0g (全長400mg、25 μmol) のH<sub>2</sub>O (19.5mL) 溶液に、暗所で、0 °Cで加える。この混合物を0 °Cで40分間おき、EtOH 50mLを加えた。この混合物を-20 °Cで30分間おき、2000RPMで5分間遠心分離する。上澄みを捨て、残ったペレットを減圧下で乾燥する。このペレットを、H<sub>2</sub>O 3.3mLに溶解し、得られた溶液に、4.3mg (0.005mmol) の 3.6 を100mMホウ酸ナトリウム (pH8.0) 2.0mLに溶かした溶液を加える。得られた溶液に、ピリジン - ボラン複合体の200mM溶液 (MeOH溶液) の250 μL (50 μmol) を加え、この混合物を37 °Cで4日間おく。この複合体 E は、イオン交換クロマトグラフィーで精製し得る。

30

【 0 2 2 6 】

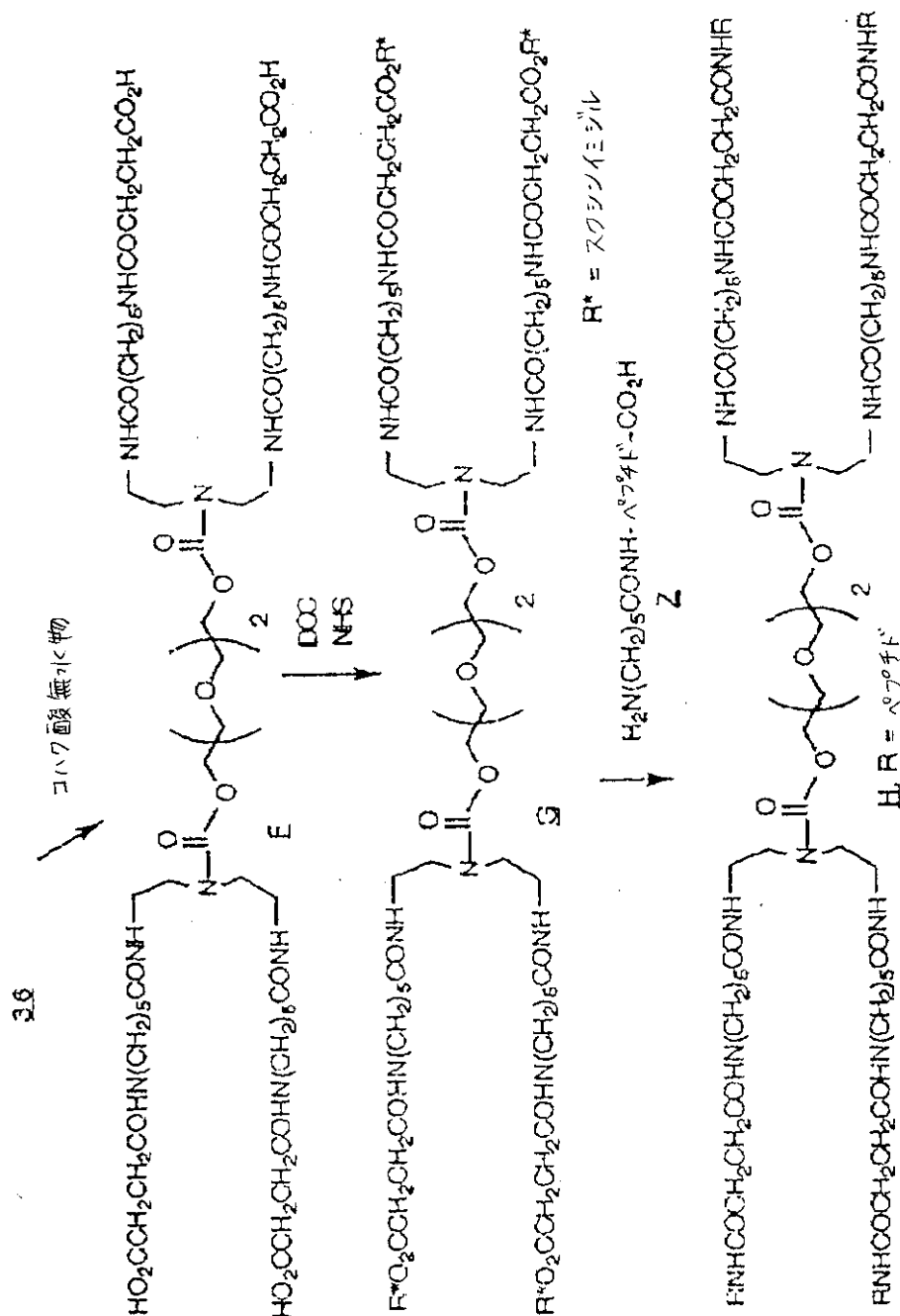
( 組合せ 4 : プラットフォームの活性カルボキシレート - リガンドのアミン )

【 0 2 2 7 】

【 化 3 2 】

40

## 反応スキーム 17



10

20

30

## 【0228】

<化合物 F - 4つのカルボン酸基を有するプラットフォーム>

無水コハク酸 (1.0g、10mmol) を、3.6 861mg (1.0mmol) および  $\text{NaHCO}_3$  252mg (3.0mmol) を 1/1 ジオキサン/ $\text{H}_2\text{O}$  20mL に溶かした溶液に加え、この混合物を室温で16時間攪拌する。混合物を 1N HCl で酸性化し、濃縮する。この濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、F を得る。

40

## 【0229】

<化合物 G - 4つのN-スクシンイミジルエステル基を有するプラットフォーム>

F 126mg (0.1mmol) および N-スクシンイミド 46mg (0.4mmol) の無水 THF (5mL) 溶液を調製する。混合物を 0 に冷却し、ジシクロヘキシルカルボジイミド 103mg (0.5mmol) を加える。この混合物が室温になるまで、数時間攪拌する。濾過により固形物を除去し、濾液を濃縮して G を得る。この G は、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し得る。

## 【0230】

<化合物 Z - アミノ基を有するペプチド>

Wang(p-アルコキシベンジル)樹脂上で標準固相法によりペプチドを合成する。リジン

50

アミンはCBZ基として保護する。FMOC化学法を用いて、アミノ末端に、アミノ酸残基を順次加える。加える最後の残基は、N-FMOC-アミノカプロン酸である。トリフルオロ酢酸で樹脂から切断した後、FMOC基をピペリジンにより脱離し、遊離アミンリンカーを有するペプチドを得る。このペプチド Z を、逆相HPLCにより精製する。

【0231】

<ペプチド-プラットフォーム複合体 H >

Z 0.05mmolおよびEt<sub>3</sub>N 0.1mmolのDMF (1mL) 溶液を調製する。この溶液に、G 16.5mg (0.01mmol) のDMF (1mL) 溶液を加える。この混合物を、反応が完了するまで攪拌する。保護基を除去するために、この複合体をMeOHに溶解し、そしてこの溶液を複合体1グラム当たり100mgの10% Pdカーボンと共にParr水素添加装置中に置く。混合物を60psi H<sub>2</sub>下において振とうし、脱保護された複合体 H を調製用逆相HPLCにより精製する。

10

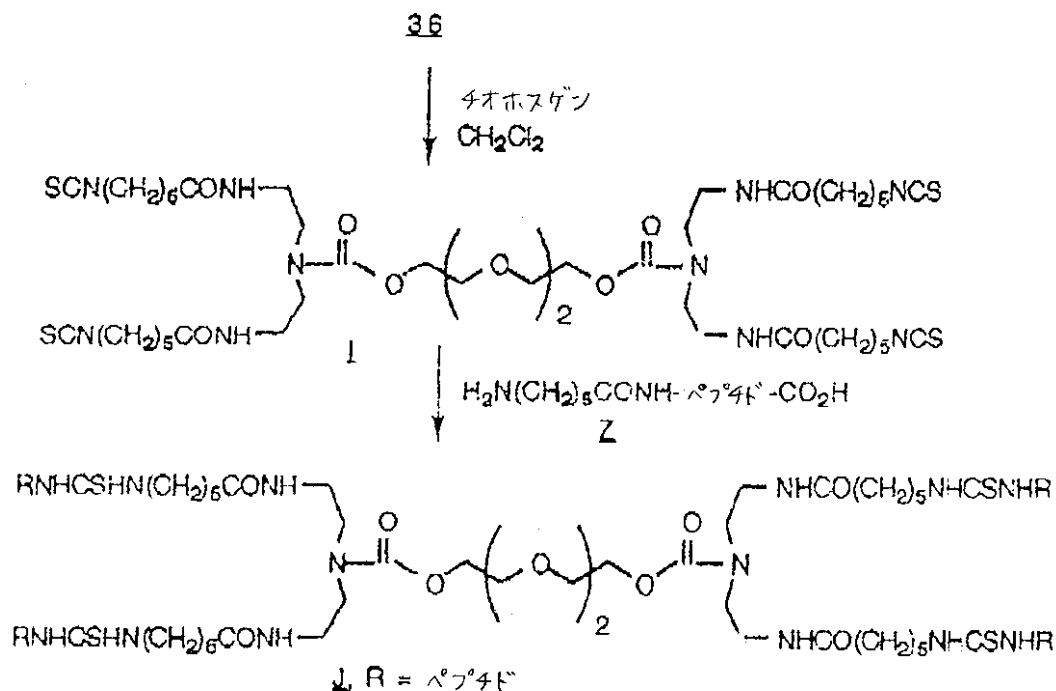
【0232】

(組合せ5: プラットフォームのイソチオシアネート-リガンドのアミン)

【0233】

【化33】

### 反応スキーム 18



20

30

【0234】

<化合物 I - 4つのイソチオシアネート基を有するプラットフォーム >

チオホスゲン (381 μL, 575mg, 5.0mmol) を、36 861mg (1.0mmol) のTHF (10mL) 溶液に加え、この混合物を、室温で、TLCによって反応が完了したことが確認されるまで攪拌する。この混合物を、塩化メチレンと5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液との間で分液抽出にかけ、この抽出物をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮する。生成物 I をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製する。

40

【0235】

<ペプチド-プラットフォーム複合体 J >

Z 0.05mmolおよびEt<sub>3</sub>N 0.1mmolのDMF (1mL) 溶液を調製する。この溶液に、I 10.3mg (0.01mmol) のDMF (1mL) 溶液を加える。この混合物を、反応が完了するまで攪拌する。保

50

護基を脱離させるために、この複合体をMeOHに溶解し、そしてこの溶液を複合体1グラム当り100mgの10% Pdカーボンと共にParr水素添加装置中に置く。混合物を60psi H<sub>2</sub>下において振とうし、脱保護された複合体 L を調製用逆相HPLCにより精製する。

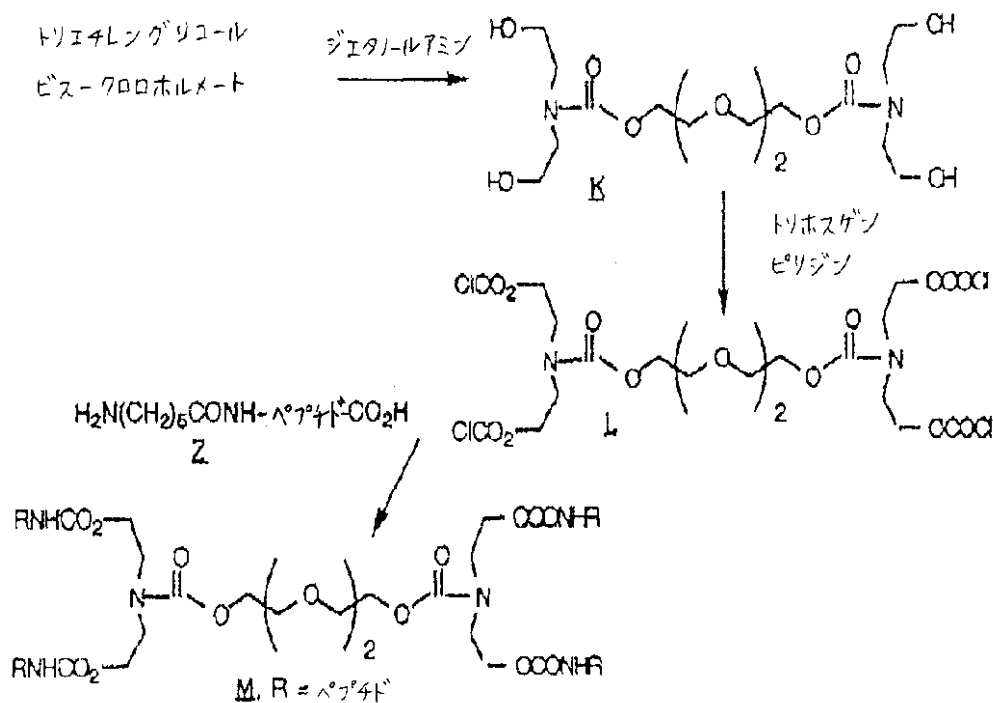
【 0 2 3 6 】

( 組合せ 6 : プラットフォームのクロロホルメート - リガンドのアミン )

【 0 2 3 7 】

【 化 3 4 】

### 反応スキーム 19



【 0 2 3 8 】

< 化合物 K - 4つのヒドロキシル基を有するプラットフォーム >

トリエチレングリコールビス-クロロホルメート 205 μL (275mg, 1mmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5mL) 溶液を、ジエタノールアミン 497 μL (525mg, 5mmol) および Et<sub>3</sub>N 696 μL (506mg, 5mmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5mL) 溶液に、0 で加える。この混合物を室温になるまで温め、TLCにより反応が完了したことが示されるまで、これを攪拌する。この混合物を濃縮し、生成物 K をシリカゲルクロマトグラフィーにより分離する。

【 0 2 3 9 】

< 化合物 L - クロロホルメート基を有するプラットフォーム >

ピリジン (100 μL)、次いでトリホスゲン 1.19g (4mmol) を、K 412mg (1mmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20mL) 溶液に加える。この混合物を、室温で20時間攪拌し、溶媒を減圧下でエバポレートして、化合物 L を得る。

【 0 2 4 0 】

< ペプチド - プラットフォーム複合体 M >

Z 1mmol のピリジン (10mL) 溶液を、L 132mg (0.2mmol) の 1/1 THF/ピリジン (5mL) 溶液に加える。この混合物を、反応が完了するまで攪拌する。溶媒を減圧下で除去する。保護基を脱離するために、この複合体をMeOHに溶解し、そしてこの溶液を複合体1グラム当り100mgの10% Pdカーボンと共にParr水素添加装置中に置く。混合物を60psi H<sub>2</sub>下におい

10

20

30

40

50

て振とうし、脱保護された複合体 M を調製用逆相HPLCにより精製する。

【0241】

(実施例4: 2つの異なる生物学的分子を含有する複合体の合成)

1種類よりも多くの生物学的活性基をプラットフォーム分子に複合体化することが有用であり得る。本実施例は、2つのマレイミド基(チオール含有ペプチドと反応する)および2つの活性化エステル基(遊離アミンを含有する薬剤と反応する)を含有するプラットフォームの調製を記載している。得られる複合体は、スキーム20に示されるように、2つのペプチドおよび2つの薬剤分子を含有する。

【0242】

<ヘテロ活性結合手プラットフォーム分子ベンジル6-アミノカプロン酸トシル酸塩 K の調製> 10

6-アミノカプロン酸32mmol、p-トルエンスルホン酸51mmol、およびベンジルアルコール40mmolの混合物のトルエン(60mL)溶液を、Dean-Starkトラップを用いて還流し、水を除去する。反応が完了すると、混合物を冷却し、生成物を沈澱させる。濾過により固形物を集め、EtOH/Et<sub>2</sub>Oから再結晶化し、化合物 K を得る。

【0243】

<化合物 L>

ジシクロヘキシルカルボジイミド(2当量)を、1当量の化合物 5 および2当量のN-ヒドロキシスクシンイミドのTHF溶液に加える。この混合物を4時間攪拌し、化合物 K を2.2当量で加える。TLCにより反応が完了したことが示されるまで、この混合物を攪拌する。この混合物を濾過し、濃縮する。生成物をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製する。 20

【0244】

<化合物 M>

化合物 L をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈したトリフルオロ酢酸で処理する。反応が完了すると、混合物を減圧下で濃縮し、トリフルオロ酢酸塩として化合物 M を得る。

【0245】

<化合物 N>

化合物(N-tert-ブチルオキシカルボニル-2,2'-ビス-(N-カルボベンジルオキシ-6-アミノヘキサノアミドエチル)アミン)をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈したトリフルオロ酢酸で処理する。反応が完了すると、混合物を減圧下で濃縮し、トリフルオロ酢酸塩として化合物 N を得る。 30

【0246】

<化合物 O>

トリエチレングリコールビス-クロロクロロホルメート3.2mmolを、化合物 M 4mmolおよび化合物 N 4mmolのピリジン(162mL)溶液に、20℃水浴中で加える。この混合物をTLCによって反応が完了したことが示されるまで攪拌し、減圧下で濃縮する。この濃縮物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶解し、続けて1N HCl溶液、5% NaHCO<sub>3</sub>溶液、および飽和NaCl溶液の順で洗浄する。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮する。この濃縮物をEtOH 10mLに溶解し、1M NaOH 10mLを加える。TLCにより反応がさらに起こらないことが示されるまで、この混合物を数時間攪拌する。混合物を1N HClでpH1にまで酸性化し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出する。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮する。生成物 O をシリカゲルクロマトグラフィーにより分離する。 40

【0247】

<化合物 P>

化合物 O をEtOHに溶解し、そしてParr振とう装置中で O 1グラム当たり100mgの10% Pdカーボンで水素添加する。TLCにより、反応の完了を確認する。反応が完了すると、濾過により触媒を除去し、そして混合物を濃縮して、化合物 P を得る。

【0248】

<化合物 Q>

N-メトキシカルボニルマレイミド3mmolを、化合物 P 1mmolをジオキサン20mLおよび飽和N 50

aHCO<sub>3</sub> 5mLに溶かした溶液に、0 で加える。この混合物を1時間攪拌し、1N HClで酸性化し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出する。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>層をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮し、そして生成物をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、Qを得る。

【0249】

<化合物R>

DCC 2mmolを、Q 1mmolおよびp-ニトロフェノール2mmolのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液に加え、混合物を16時間攪拌する。濾過により固形物を除去し、濾液を濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製してRを得る。

【0250】

<2つのペプチドおよび2つの薬剤分子を有する複合体、化合物S>

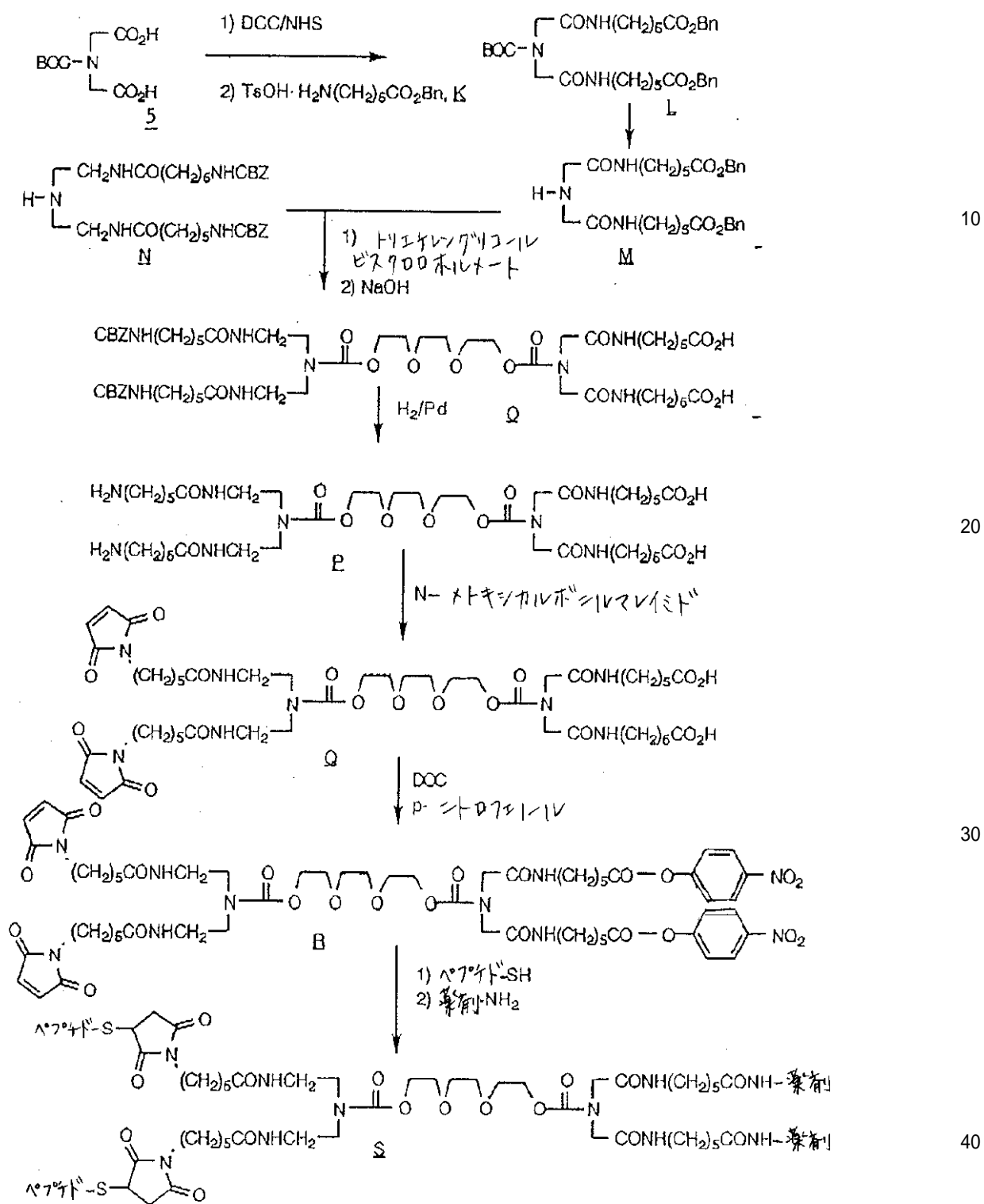
10

チオール含有ペプチド2当量余りを、ヘテロ活性化プラットフォームR 1当量のpH7.5リン酸緩衝液溶液に加える。混合物を1時間攪拌し、アミン含有薬剤2当量余りを加える。この複合体Sを、逆相HPLCまたはイオン交換クロマトグラフィー、またはそれらの組合せにより単離する。

【0251】

【化35】

反応スキーム 20



【 0 2 5 2 】  
 ( 実施例 5 : 複合体 3 - II の合成および試験 )  
 【 0 2 5 3 】  
 【 化 3 6 】



し、空気乾燥し、そして濃アンモニア100mLで16時間、55 で処理した。温度が下がると、混合物をGelman 10 $\mu$ ポリプロピレンフィルターを通して濾過した。NaOHでpH12に調整した2mM NaCl 200mLで、フィルターを洗浄した。次いで、濾液を、初めに3M NaClで、次いで2mM NaClでpH12に平衡化されたQ-Sepharose (Pharmacia) を充填したAmiconクロマトグラフィーカラム (0.45 $\times$ 9.4 cm、150mL) に通した。カラムを直線グラジエント (2mM NaCl、pH12から1.3M NaCl、pH12まで) 500mLで溶出し、次いで全てのU.V.吸光物質が現れるまで1.3M NaCl (pH12) で洗浄した。260nm吸光画分をポリアクリルアミド電気泳動によりさらに分析し、純粋生成物を含有する画分をプールする。このプール (120mL) を冷イソプロパノール240mLで処理し、-20 で30分間保持した。モデルH-6000Aローターを用いるSorvall RC 3B遠心分離器で、3000rpm、4 で15分間遠心分離を行い、これにより沈澱物を採集し、DMTr-5'-改変(CA)<sub>10</sub> (14946 A<sub>260</sub> ユニット、498mg、62.2 $\mu$ M、20%(300 $\mu$ M CPGヌクレオシドに基づく)) を得た。

10

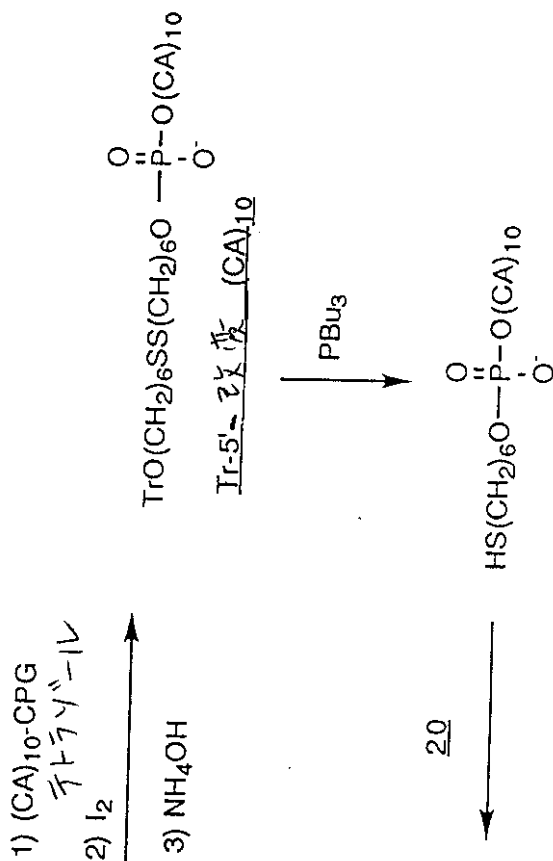
【 0 2 5 5 】

< Tr-5'-改変(CA)<sub>10</sub> の合成 >

【 0 2 5 6 】

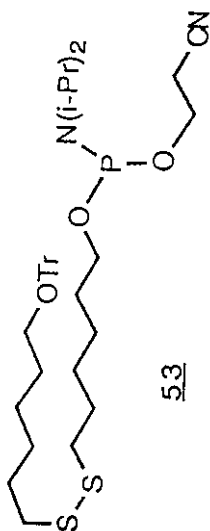
【 化 3 7 】

反応スキーム 22



10

20



30

40

【 0 2 5 7 】

Tr-5'-改変(CA)<sub>10</sub>の合成を、化合物 5 1 を化合物 5 3 (反応スキーム 11 に記載のように調製) に置き換えることにより、DMTr-5'-改変(CA)<sub>10</sub>の合成のための上記の記載と同様にしてみた。

【 0 2 5 8 】

< DMTr-5'-改変ポリヌクレオチドと化合物 3 (IA-DABA-PEG、反応スキーム 1) との複合体化 - 複合体 3 - I の調製 >

以下に示す複合体化の手順において、用いられる全ての緩衝液および溶液に十分なヘリウムを吹き込み、全ての反応容器を使用前にアルゴンでパージした。DMTr-5'-改変(CA)<sub>10</sub>の

50

11,568  $A_{260}$  ユニット (48.2  $\mu\text{mol}$ 、260nmでの推定モル吸光度 = 240,000) の水 (7.7mL) 溶液を、0.1M  $\text{NaHCO}_3$  1mLおよびトリブチルホスフィン210  $\mu\text{L}$  (876  $\mu\text{mol}$ 、18倍過剰モル) を用いて、室温で0.5時間処理した。この懸濁液をときどき振とうした。懸濁液を3M  $\text{NaCl}$  0.8mLおよび冷イソプロパノール16mLで処理した。-20 で30分おいた後、この物質を3000rpmで20分間遠心分離した。得られたペレットを水2mL、3M  $\text{NaCl}$  0.2mLに再び溶解し、イソプロパノール4mLで処理し、再び遠心分離した。ペレットを減圧下で短時間乾燥し、ヘリウムを吹き込んだ水2.8mLおよび0.1N  $\text{NaHCO}_3$  1mL中に溶解した。化合物 3 (IA-DABA-PEG) 6.7mgを加え、この混合物を暗所に室温で16時間おいた。最終容量6mLの反応混合物を、Sephacryl 200 (Pharmacia) を詰めた  $5 \times 91$  (1800ml) Pharmaciaカラムに通した。カラムを0.5M  $\text{NaCl}$ 、0.1Mホウ酸ナトリウム (pH8.3) で溶出した。ぜん動性のポンプを用い、流速が約2mL/分になるように設定し、15mlの画分を集めた。この画分の260nmでの吸光度を測定した。さらに、この画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、純粋な複合体を含む画分をプールした。

10

## 【0259】

< 複合体 3-Iのハイブリダイゼーション - 複合体 3-IIの調製 >

上記プールした画分は726  $A_{260}$  ユニットを含む画分であった。当量の  $(\text{TG})_{10}$  を加え、チューブを90 で10分間加熱し、次いで1.5時間かけて室温にまで冷却した。等量のイソプロパノールを加え、この混合物を-20 で3時間おいた。3000rpmで20分間遠心分離した後、ペレットを0.15 M  $\text{NaCl}$ 、0.01Mクエン酸ナトリウム (pH6.8) に溶解した。53mgのハイブリッドを得た。この物質の一部を上記緩衝液で希釈し、二重らせんの融解温度 ( $T_m$ ) を Carey 3E分光光度計で測定した。この物質は、その  $T_m$  が73.4 であり、濃色性は24.3%であった。生成物の10  $A_{260}$  ユニットの部分を、上記に記載のように過剰の  $(\text{TG})_{10}$  でアニールした。この物質と同様に非アニール複合体および  $(\text{TG})_{10}$  標準物とを、Rainin HPLC装置を用いShodex Protein KW 8025カラムでゲルパーミエーションHPLCにより分析した。カラムを、0.05M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH6.5)、0.5M  $\text{NaCl}$  でイソクラティックに溶出した。溶出時間は12分であった。生成物の保持時間は6.9分であり、 $(\text{TG})_{10}$  は9.2分であった。ピーク面積の比較により、この生成物の98.09%が二本鎖DNAであることが示された。この複合体は、図6の「複合体 3-II」を示す構造により表される。

20

## 【0260】

( 実施例 6 : PN-KLH複合体の調製 )

PN-KLH複合体を、以下に示すスキームによって調製した :

## 【0261】

## 【化38】

30



5]からDMTrブロック基を除去し、そして活性化剤溶液 (Milligen、Cat. No. MBS5040) 40 mLおよび化合物 5.8 800mgを反応混合物に加えた。懸濁液をアルゴン吹き込みにより8分間混合し、そして通常の酸化工程を行った。支持体に結合したポリヌクレオチドを反応容器から取り出し、空気乾燥し、そして濃アンモニア100mLで40時間、55 で処理した。温度が下がると、混合物をGelman 10 $\mu$ mポリプロピレンフィルターを通して濾過し、次いで、濾液を通常のイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。260nmで吸光度を示す画分をポリアクリルアミド電気泳動によりさらに分析し、純粋な生成物を含有する画分を合わせて、イソプロパノールで沈澱させ、ACT-改変(CA)<sub>25</sub> 510mg (31.9 $\mu$ mol、10%)を得た。

#### 【0263】

<一本鎖PN-KLH複合体の合成>

NaIO<sub>4</sub>処理したACT-改変(CA)<sub>25</sub> 100mg (2.5 $\mu$ mol)を50mM ホウ酸ナトリウム (pH8.0) 1.33mLに溶かした溶液に、KLH 31.3mg (0.208 $\mu$ mol)およびピリジノーボラン 2.0mg (31.8 $\mu$ mol)を加えた。この混合物を37 で72時間おき、生成物をS-200でのクロマトグラフィーにより精製した。

#### 【0264】

<一本鎖PN-KLH複合体の(TG)<sub>25</sub>とのハイブリダイゼーション>

当量の(TG)<sub>25</sub>を、一本鎖PN-KLH複合体に加え、チューブを90 で10分間加熱し、次いで1.5時間かけて室温にまで冷却した。イソプロピルアルコールで沈澱させ、53mgのPN-KLHを得た；T<sub>m</sub> (0.15 M NaCl、0.01Mクエン酸ナトリウム、pH6.8) 73.4 、31.1%濃色性；過剰の(TG)<sub>10</sub>でアニールしたサンプル、非アニール複合体、および非アニール(TG)<sub>10</sub>からなる標準物質に対するHPLCでの比較により、98%が二本鎖であることが確認された (Shodex Protein KW 8025カラム、0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH6.5、0.5M NaCl)。この複合体は以下の式で表し得

KLH-[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>OPo<sub>2</sub>·O-(CA)<sub>25</sub>:(TG)<sub>25</sub>]-<sub>5</sub>

(KLHの分子量は10<sup>5</sup>であると推定される)、「PN-KLH」と称される。

#### 【0265】

<免疫寛容原としての複合体3-IIの試験>

複合体3-IIを、免疫原の形態のポリヌクレオチドにより免疫化したマウスに免疫寛容を起こさせる能力について試験した。

#### 【0266】

<材料および方法>

マウス：C57BL/6の雌マウス (6週齢)をJackson Laboratories (Bar Harbor, ME)から購入した。マウスは、国立衛生研究所(NIH)の改良法により飼育した。免疫処置：Iversonの方法 (Handbook of Experimental Immunology、第2巻のCellular Immunology、(D. M. Weir, L.A. Herzenberg, C. Blackwell、およびA. Herzenberg編、第4版、Blackwell Scientific Publications、Oxford)中のAssay for in vivo Adoptive Immune Response)に従って、ミョウバン沈降させたPN-KLH 100 $\mu$ gと、アジュバントとしてホルマリン固定百日咳菌2 $\times$ 10<sup>9</sup>とを、マウスの腹腔内に注射することにより、マウスを初回免疫した。このマウスを、生理食塩水に溶かした50 $\mu$ gのPN-KLHでブーストした (腹腔内)。

#### 【0267】

PNのSRBCへの結合：ヒツジ赤血球細胞(SRBC)のオルシーバー溶液をColorado Serum Co. (Denver, CO)から購入し、2週間以内に用いた。このSRBCを、KippおよびMillerの方法 (Selected Methods in Cellular Immunology、(1980)、B.B.MishellおよびS.M. Shiigi編、W.H. Freeman and Co. (San Francisco)、103ページの「タンパク質複合赤血球細胞のECDIを用いる調製(改変)」)により、(CA)<sub>25</sub>:(TG)<sub>25</sub> (CA:GTからなる50マー)で被覆した。簡単に言えば、SRBCを冷生理食塩水で4回洗浄し、カルボジイミド10mgを含む0.01M NaCl、0.35Mマンニトール中のD-EK結合(CA)<sub>25</sub>:(TG)<sub>25</sub> 2mgと混合し、4 で30分間インキュベートした。被覆SRBCを冷平衡塩類溶液で2回洗浄し、10% (v/v)に再懸濁した。

10

20

30

40

50

【0268】

ブランクアッセイ：抗PNブランク形成細胞(pfc)の数を、カニンガム法 (Selected Methods in Cellular Immunology, (1980)、B.B.MishellおよびS.M. Shiigi編、W.H. Freeman and Co. (San Francisco)、86ページの、Marbrook, J., 「液体マトリックス(スライド法)」)を用いて測定した。IgG pfcの数を、Henryによる記載 (Selected Methods in Cellular Immunology, (1980)、B.B.MishellおよびS.M. Shiigi編、W.H. FreemanおよびCo., San Francisco、91ページの「IgMブランクの除去によるIgG応答の評価」)に基づき、ウサギ抗マウスIgGを用いてIgMブランクを除去することにより測定した。簡単に言えば、脾臓を採取し、単細胞懸濁液を平衡塩類溶液(BSS)中で調製した。ギニアピッグ血清をポリヌクレオチド被覆SRBCに加えて、最終希釈物が1:9ギニアピッグ血清となるようにし、そして充分量のウサギ抗マウスIgGを加えて、最終希釈物が1:100ウサギ抗マウスIgGとなるようにした。SRBC混合物と希釈脾臓細胞とを、マイクロタイターウェル中で等量で混合し、カニンガムチャンバーに移した。各脾臓を個別に3回試験した。チャンバーの端をパラフィンで封じ、チャンバーを37℃で1時間インキュベートした。ブランクの数を、倒立顕微鏡下でチャンバーを観察して数えた。

10

【0269】

<結果>

アジュバントとしての百日咳(A&P)と一緒にミョウバン沈降PN-KLHでマウスを初回免疫し、7週間後に各グループ3匹ずつに分けた。このマウスを、PN-DABA-PEG、すなわち複合体3-IIの2倍ずつ濃度を変化させた希釈液で処理し(腹腔内)、5日後コントロールを含めてすべてのマウスを、生理食塩水に入れたPN-KLH 50µgでブーストした(腹腔内)。4日後、脾臓を採取し、IgG pfcの数を測定した。表2に示されるように、複合体3-IIを投与した試験体は、pfcの数がコントロールグループと比較して顕著な減少を示した。

20

【0270】

上記と同様の条件により、複合体3-IIおよびD-EK結合(PN)<sub>50</sub>を用いてマウスを処理し、Farrrアッセイにより抗dsPN抗体を測定した。結果を図14に示す。LJP-105(D-EK結合(PN)<sub>50</sub>)に比べて、LJP-249AおよびLJP-249B(複合体3-II)は、抗dsPN抗体を減少させる効果が著しく高かった。

【0271】

【表2】

30

複合体3-IIの免疫寛容活性 (PN-DABA-PEG)

投与量 (µg/マウス)	pfc/10 <sup>6</sup>	
	脾臓細胞 平均 (S.D.)	減少% 平均
なし	12865 (2846)	
62.5	2868 (6809)	77.7
125	3331 (939)	74.1
250	3044 (1929)	76.3
500	1809 (759)	85.9
1000	2814 (554)	78.1

40

【0272】

(実施例7：複合体20-IIの調製および試験)

<5'-改変(CA)<sub>10</sub>の結合手プラットフォーム分子20への複合体化 - 一本鎖複合体20-Iの調製>

50

トリ-n-ブチルホスフィン969 $\mu$ L(789mg、3.89mol)を、5'-改変(CA)<sub>10</sub>918mg(0.14mmol)のH<sub>2</sub>O(30mL)溶液にアルゴンガス下で加えた。この混合物を1時間攪拌し、次いで3M NaCl溶液2.4mLを加え、次にヘリウムを吹き込んで酸素をパージしたイソプロパノール42mLを加えた。混合物を冷凍機中に-20で1時間おき、次いで3000rpmで30分間遠心分離した。上澄みを除去し、油状の残留物を、ヘリウムを吹き込んだH<sub>2</sub>O 15.5mLに溶解した。3M NaCl 1.24mLおよびヘリウムを吹き込んだイソプロパノール21.7mLを、混合物に加えた。次いで、得られた混合物を冷凍機中に-20で1時間おき、3000rpmで20分間遠心分離した。得られた油状のペレットを減圧下で18時間乾燥して、固形物を得た。この固形物を、ヘリウムを吹き込んだH<sub>2</sub>O 6mLに溶解し、全容量は6.4mLとなった。260nmでのUV吸光度測定により、DNA量は863mgであった(pH7.5食塩加リン酸緩衝液での、吸光単位当り0.333mg)。  
 この溶液を、50mL三口フラスコにアルゴンガス下で移した。フラスコの1つの口をアルゴンガスの導入口とし、他の2つには栓をした。ヘリウムを吹き込んだ1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.8)0.87mLとMeOH 0.97mLとH<sub>2</sub>Oとを加えて、全容量を7.7mLに調整した。化合物20の17.7mg/mL MeOH溶液1.9mL(33.63mg、0.025mmol)を、混合物に加えた。得られた混合物を、アルゴンガス下で20時間攪拌し、次いで0.1M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム(pH7.5)、および10% MeOHを含有する溶液で100mLに希釈した。精製は、Fractogel(登録商標)でのクロマトグラフィーにより行った(平衡:0.1M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、pH7.5、10% MeOH:溶離グラジエント 0.5M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、pH7.5、10% MeOHから0.8M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、pH7.5、10% MeOHまで)。HPLCおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動により示される、純粋な複合体20-Iを含む画分を、232mLの溶離液中に集めた。等量のイソプロパノールを加え、これを冷凍機中に-20で1時間おくことにより、生成物および塩を沈澱させた。H<sub>2</sub>Oに対して透析し(2 $\times$ 100 vol)、335mgの複合体20-I(濃度10.47mg/mLで32mL、0.033mg/吸光単位(260nm))を得た。

10

20

### 【0273】

<二本鎖複合体20-IIを形成するための、複合体20-Iと(TG)<sub>10</sub>とのアニーリング>  
 複合体20-I 150mg(0.033mg/吸光単位(260nm)に基づき、濃度10.47mg/mLで14.33mL)および(TG)<sub>10</sub> 157.5mg(0.033mg/吸光単位(260nm)に基づき、104.6mg/mLで1.50mL)を、50mLポリプロピレン遠心管に入れた。pH7.2 10 $\times$  PBSを2.0mLおよびH<sub>2</sub>Oを2.17mL加えることにより、濃度を15mg/mLに調整した。混合物を、90湯浴中におき、そして1.5時間かけて室温にまで冷却した。濃度は、260nmの吸光度(0.050mg/吸光単位)により、17.7mg/mLであると確認された; 転移融解温度 67.5; 濃色性 27%; 重量オスモル濃度 346; pH7.2であった。複合体20-IIの最終の処方のために、pH7.2 1/2  $\times$  PBSを7.23mL加え、0.22 $\mu$ フィルターを通して濾過することにより、溶液を最終濃度12.7mg/mLおよび重量オスモル濃度299に希釈した。

30

### 【0274】

<5'-改変(CA)<sub>10-20</sub>の別の複合体化、一本鎖複合体20-Iの調製>  
 10当量のトリ-n-ブチルホスフィン、5'-改変(CA)<sub>10</sub>をHe吹き込み100mM酢酸ナトリウム(pH5)に溶かした10mg/mL溶液に加える。この混合物を1時間攪拌し、次いで1.4倍量のイソプロピルアルコール(IPA)で沈澱させる。混合物を冷凍機中に-20で1時間おき、次いで3000rpmで20分間遠心分離する。上澄みを除去し、ペレットを、ヘリウムを吹き込んだIPAに10mg/mLで溶解する。混合物を冷凍機中に-20で1時間おき、次いで3000rpmで20分間遠心分離する。ペレットを減圧下で18時間乾燥し、固形物を得る。この固形物の50mg/mL溶液を、ヘリウムを吹き込んだ100mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH10)中で調製する。9/1 MeOH/H<sub>2</sub>O中の40mg/mL溶液として、0.25当量の化合物20を、この混合物に加える。この混合物を室温で3~20時間攪拌し、希釈する(0.1M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム(pH7.5)、10% MeOH)。Fractogelのクロマトグラフィーにより精製を行う。(平衡:0.1M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、pH7.5、10% MeOH:溶離グラジエント 0.5M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、pH7.5、10% MeOHから0.8M NaCl、0.05M リン酸ナトリウム、pH7.5、10% MeOHまで)。HPLCおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動により示される、純粋な複

40

50

合体 20-I を含む画分を集めた。等量の IPA を加え、これを冷凍機中に  $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 時間おくことにより、生成物および塩を沈澱させる。H<sub>2</sub>O に対して透析し ( $2 \times 10$  vol)、複合体 20-I を得る。

【0275】

<二本鎖複合体 20-II を形成するための、20-I の (TG)<sub>10-20</sub> による別のアニーリング>  
アニーリングを  $90^{\circ}\text{C}$  で行う代わりに  $70^{\circ}\text{C}$  で行ったこと以外は、上記方法と実質的に同一である。

【0276】

<5'-改変 (CA)<sub>10-20</sub> のさらに別の複合体化、一本鎖複合体 20-I の調製>

トリ-n-ブチルホスフィン 4.8mL を、Ar 吹き込み 100mM 酢酸ナトリウム (pH5) 104mL に 7.75 g の 5'-改変 (CA)<sub>10</sub> を溶かした溶液に N<sub>2</sub> ガス下で加えた。この混合物を 1 時間攪拌し、次いで IPA 232.5mL で沈澱させた。混合物を冷凍機中に  $-20^{\circ}\text{C}$  で 1.5 時間おき、次いで 3000rpm で 20 分間遠心分離し、そして  $-20^{\circ}\text{C}$  で 24 時間おいて凍らせた。上澄みを除去し、ペレットをヘリウム吹き込み 0.3M NaCl 溶液 170mL に溶解した。混合物を Ar 吹き込み IPA 232mL で再び沈澱させた。次いで混合物を冷凍機中に  $-20^{\circ}\text{C}$  で 2 時間おき、3000rpm で 20 分間遠心分離し、そして  $-20^{\circ}\text{C}$  で 11 時間おいた。上澄みを除去し、ペレットを減圧下で 12 時間乾燥し、固形物を得た。この固形物の溶液を、Ar 吹き込み 100mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH10) 110 mL 中で調製した。9/1 MeOH/H<sub>2</sub>O (4.4mL) 溶液として、406mg の化合物 20 を、この混合物に加えた。この混合物を室温で 2 時間攪拌した。得られた混合物は、高圧イオンクロマトグラフィーにより 62% の 20-I を含有していることが示された。このクロマトグラフィーは、Waters Gen Pak Fax カラム (100 × 4 mm)、60、直線グラジエント 65% A / 35% B から 18% A / 82% B ; A = 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.5 1mM EDTA、10% MeOH(v/v) ; B = 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.5、1M NaCl、1mM EDTA、10% MeOH(v/v) で行い、20-I は 19.5 分で溶出した。

【0277】

<複合体 20-II および非複合体コントロールの試験>

C57BL/6 マウスを、PN-KLH および A&P で免疫化した。3 週間後、マウス 5 匹/グループのグループに、それぞれ種々の投与量の複合体 20-II、または 4.5nM HAD-AHAB-TEG (誘導体化した結合手プラットフォーム分子、AHAB-TEG にリンカー HAD を接続、図 7 参照)、または 18nM (4 × 4.5) (CA)<sub>10</sub>:(TG)<sub>10</sub>、または 4.5nM HAD-AHAB-TEG と 18nM (CA)<sub>10</sub>:(TG)<sub>10</sub> との混合物を腹腔内投与した ; そして、1 つのグループには処理を行わなかった。各グループに注射してブーストし、血清を採集して、実施例 6 に記載のアッセイを行った。抗 PN 応答の減少 (百分率で表示) を図 4 に示す。これらのマウスの抗 KLH 応答は普通であり、図 2 に示される抗 KLH 応答とは顕著に異なるものではなかった。本実施例の結果から、抗 PN 応答は、(i) 結合手プラットフォーム分子のみ、(ii) PN のみ、または (iii) この 2 つの混合物によって影響されなかったことが明らかである。PN は、免疫寛容を誘導するためには、非免疫原の結合手プラットフォーム分子と結合されなければならない。

【0278】

<複合体 20-II が PN 特異性抗体産生細胞の数の減少をもたらすこと>

C57BL/6 マウスを、PN-KLH および A&P で免疫化した。3 週間後、マウス 3 匹/グループのグループを、種々の投与量の複合体 20-II で、それぞれ腹腔内投与した ; そして、1 つのグループには処理を行わなかった。5 日後、全てのマウスに、生理食塩水に入れた PN-KLH を腹腔内注射してブーストし、次いで 4 日後、それらの脾臓を採取し、溶血ブランクアッセイを用いて、PN 特異性の IgG 産生細胞の数についてアッセイした。結果を表 3 に示す。この結果から、この複合体によって、PN 特異性 IgG 産生細胞の数が減少したことが明らかである。

【0279】

【表 3】

複合体 20-II による pfc 数値の減少

グループ 番号	投与量 μg/マウス	脾臓細胞10 <sup>6</sup> 個当たりの PN 特異性 pfc (平均および S.E.)		減少%
1	None	5562	(2570)	
2	274	982	(1871)	82.3
3	91	1867	(1335)	66.4
4	30	2247	(1606)	59.6
5	10	6109	(2545)	0
6	3	4045	(1411)	27.3
7	1	4578	(2475)	17.7
8	0.4	5930	(897)	0

## 【0280】

(実施例 8 : 複合体の免疫寛容原としての試験)

< 複合体 17-II の免疫寛容原としての試験 >

C57BL/6マウスを、PN-KLHおよびA&Pで免疫化した。3週間後、マウス5匹/グループのグループに、種々の投与量の複合体17-IIを、それぞれ腹腔内投与した；そして、1つのグループには処理を行わなかった。5日後、全てのマウスに、生理食塩水に入れたPN-KLHを腹腔内注射してブーストし、7日後、このマウスの採血を行った。血清を、PN濃度10<sup>-8</sup>MでFarrアッセイにより抗PN抗体について分析した。抗PN応答の減少(百分率表示)を図1に示す。また、この血清を、ELISAアッセイを用いて抗KLH抗体についても分析した。この結果を、抗KLH血清の標準プールに比較した抗KLHの百分率として表し、図2に示す。図1中のデータにより、この複合体が抗PN応答を低減したことが示される。これらのマウスはすべて、抗KLH(プラットフォーム分子)応答は普通であった(図2参照)。

## 【0281】

< 種々の11シリーズの複合体の免疫寛容原としての試験 >

C57BL/6マウス/グループのグループを、PN-KLHおよびA&Pで免疫化した。3週間後、2つのグループに対し、それぞれ3つの異なる投与量の複合体11-IV、複合体11-II、複合体11-VI、または複合体11-VIIIを腹腔内投与し、1つのグループには処理を行わなかった。これらの複合体は、図6に記載されており、上記の実施例7の方法に従って調製した。5日後、全てのマウスに、生理食塩水に入れたPN-KLHを腹腔内注射してブーストし、7日後、このマウスの採血を行った。血清を、PN濃度10<sup>-8</sup>MでFarrアッセイにより抗PN抗体について分析した。抗PN応答の減少(百分率表示)を図3に示す。これらのマウスの抗KLH応答は、図2に示される抗KLH応答と顕著に異なるものではなかった。4つの複合体は全て、試験した全ての投与量で、抗PN応答を顕著に減少させた。

## 【0282】

< 複合体11-IIがPN特異性抗体産生細胞の数の減少をもたらすこと >

C57BL/6マウスを、PN-KLHおよびA&Pで免疫化した。3週間後、マウス3匹/グループのグループに対し、種々の投与量の複合体11-IIを腹腔内投与し、1つのグループには処理を行わなかった。5日後、全てのマウスに、生理食塩水に入れたPN-KLHを腹腔内注射してブーストし、次いで4日後、それらの脾臓を採取し、溶血ブランクアッセイを用いて、PN特異性のIgG産生細胞の数についてアッセイした。種々の投与量の複合体11-IIによる実験の結果を表4に示す。この結果から、この複合体により、PN特異性IgG産生細胞の数が

10

20

30

40

50

減少し、そして抗体力価の減少は、複合体に結合した血清抗体のクリアランスによるものではないことが明らかである。

【0283】

【表4】

複合体 II-IV による pfc 数の減少

グループ #	$\mu\text{g}/\text{マウス}$	脾臓細胞 $10^6$ 個当たりの PN 特異性 pfc (平均値 S.E.)		減少 % (SD)		
1	None	10845	(1308)			
2	263	3613	(547)	66.23	(8.6)	10
3	87	3462	(1041)	64.98	(17)	
4	29	7354	(1504)	29.5	(23.8)	
5	9	6845	(2031)	30.9	(32.2)	
6	3	7982	(223)	26.8	(3.52)	
7	1	6043	(545)	44.5	(7)	20
8	0.4	9343	(1251)	13	(19.8)	

【0284】

(実施例 9 : HADpS-(CA)<sub>10</sub>-複合体 20-IV の調製)

5'末端にリンカーを結合するホスホロチオエートを有する改変ポリヌクレオチドを調製した。20マーの(CA)<sub>10</sub>の合成およびHADリンカーのポリヌクレオチドへの付加を、以下に記載することを除いて、実施例 5 の方法に従って行った。最終の酸化工程において、ヨウ素溶液を、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン 1,1 ジオキシド (Glen Research, Sterling, VA) の 0.05M アセトニトリル溶液に置き換えた。イオウ化処理は、製造者の指示に従って行った。アンモニア処理および精製は、実施例 5 と同様にして行った。ポリヌクレオチドのAHAB-TEG結合手プラットフォームへの複合体化は、実施例 5 の方法に従って行った。

【0285】

< 複合体 20-IV の免疫寛容原としての試験 >

PNの5'ホスフェートは酵素分解を受け易いので、末端ホスフェートの酸素分子のうち1つをイオウで置換した(従って、HAD<sub>p</sub>Sという名とする)。C57BL/6マウスを、PN-KLHおよびA&Pで免疫化した。3週間後、マウス5匹/グループのグループを、種々の投与量の複合体20-IVで腹腔内投与し、1つのグループには処理を行わなかった。グループにブースター注射を行い、血清を採集して、上記のアッセイを行った。抗PN応答の減少(百分率表示)を示す結果を図5に示す。これらのマウスの抗KLH応答(データは示さず)は普通であり、図2に示される抗KLH応答と顕著に異なるものではなかった。これらの結果は、この複合体が抗PN応答を顕著に減少させたことを示す。

【0286】

< 複合体 20-IV が PN 特異性抗体産生細胞の数の減少をもたらすこと >

C57BL/6マウスを、PN-KLHおよびA&Pで免疫化した。3週間後、マウス3匹/グループのグループに対し、種々の投与量の複合体20-IVを腹腔内投与し、1つのグループには処理を行わなかった。5日後、全てのマウスに、生理食塩水に入れたPN-KLHを腹腔内注射してブーストし、次いで4日後、それらの脾臓を採取し、溶血ブランクアッセイを用いて、PN特異性のIgG産生細胞の数についてアッセイした。この結果を表5に示す。この結果から、この複合体により、PN特異性IgG産生細胞の数が減少したことが明らかである。

【 0 2 8 7 】

【表 5】

複合体 20-Ⅱ による pfc 数の減少

グループ #	投与量 μg/マウス	脾臓細胞の $10^6$ (個当りの PN 特異性 pfc (平均値 ± S.E.))		減少 %	
		平均値	S.E.		
1	None	5889.4	(3444)		10
2	274	3413	(1604)	42	
3	91	222	(752)	96.2	
4	30	1492	(2269)	74.7	
5	10	5421	(832)	8	
6	3	5077	(1946)	13.9	
7	1	7023	(679)	0	
8	0.4	4159	(2688)	29	20

【 0 2 8 8 】

(実施例 10 : LJP394、複合体 20 - II での BXS Bマウスの処理)

&lt; マウス処理プロトコル &gt;

6 ~ 9 週齢の雄 BXS Bマウス ( Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me ) を La Jolla Pharmaceutical facility で飼育した。食物および水は随意に与えた。実験に使用する前に、動物を 1 週間休ませた。最初の複合体処理を行う前に、初期の血液サンプルを得、そして初期体重を測定した。複合体の処理は 7 ~ 9 週齢で開始し、59日から150日まで 1 週間に 2 回腹腔内投与を行った。動物の採血を定期的に行い、その抗 DNA 抗体力価を決定した。

30

【 0 2 8 9 】

&lt; IgG 抗 DNA 抗体産生に対するアッセイ &gt;

各マウスから得た血清サンプルを、抗 DNA 抗体の存在を ELISA により評価した。Falcon Probind 96 ウェルマイクロタイテーションアッセイプレート ( Becton Dickerson, Oxnard, CA ) を、50 μg/mL の濃度の (PN)<sub>50</sub>-D-EK ( D-グルタミン酸および D-リジンのコポリマー ) 100 μL / ウェルで、4 度で一晩被覆した。このプレートを、カルシウムおよびマグネシウムを含有しない PBS および 0.05% Tween 20 ( 洗浄緩衝液 ) で、M96V plate washer ( ICN Bio medical, Inc., Irvine, CA ) を用いて 2 回洗浄した。プレートを、1%ゼラチン ( Norland Products, Inc, New Brunswick, NJ ) を含有する PBS および 0.05% Tween 20 により、室温で 1 時間遮断した。血清サンプルまたは標準物を加える前に、プレートを洗浄緩衝液で 2 回洗浄した。血清サンプルおよび標準物を、1%ゼラチンを有する PBS、0.05% Tween 20、および 10% ヤギ血清を含む希釈液として調製した。プレートを 37 °C で 60 ~ 90 分間、血清サンプルを用いてインキュベートし、次いでウェルを洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。ビオチニル化ヤギ抗マウス IgG ( Sigma Chemical Co., St. Louis, MO ) を、10% ヤギ血清を含む遮断溶液で 1/1000 に希釈した。プレートを 37 °C で 1 時間インキュベートし、4 回洗浄した。基質となる OPD ( Sigma Chemical Co. ( St. Louis, MO ) ) を加えた。OD 450nm での ELISA プレートリーダーにより最も高い標準物の最高読み取り値が約 1.0 OD ユニットになるまで、プレートを暗所中でインキュベートした ( Bio-Tek Instruments, Winooski, VT ) 。反応を 3M HCl 50 μL で中断し、プレートを 490nm で読み取った。各マイクロタイテーションプレートにはリファレンスの陽性血清が含まれており、各アッセイからの陽性ウェルは

40

50

このリファレンスの時間曲線の95%範囲内の感度であった。後に採血した血液では、陽性サンプルのいくつかがりファレンスカーブを超過した。しかし、ほとんどの希釈マウス血清サンプルは、リファレンスカーブ範囲内にあった。正常のコントロール陰性血清による、顕著な結合は観察されなかった。結果を図15に示す。

【0290】

(実施例11：メリチンペプチドおよび複合体の調製)

メリチン分子は、26のアミノ酸からなり、ミツバチ毒の主成分の1つである。ミツバチ毒感受性個体の3分の1は、メリチン特異性抗体を有する。メリチンは、数種のマウス系統(Balb/c、CAF1)では、高い免疫原性を有する。応答マウス系統のメリチン特異性抗体の多く(>80%)は、メリチンのC末端の7つのペプチドであるB細胞エピトープに結合する。

10

【0291】

<メリチン>

【0292】

【表6】

H<sub>2</sub>N-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-CONH<sub>2</sub>  
(配列番号 : 1).

20

【0293】

<T細胞を刺激するメリチンペプチド>

【0294】

【表7】

メリチンペプチド #1.

Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gly ("7マー") (配列番号 : 2).

メリチンペプチド #2.

Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gly ("8マー") (配列番号 : 3).

30

メリチンペプチド #3.

Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gly ("9マー") (配列番号 : 4).

メリチンペプチド #4.

Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gly ("10マー") (配列番号 : 5).

メリチンペプチド #5.

Cys-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gly ("11マー") (配列番号 : 6).

40

【0295】

<ペプチド合成>

メリチンペプチドは、グリシン樹脂(Advanced ChemTech #SG5130)あるいはその等価物(Advanced ChemTech、2500 Seventh Street Road、Louisville、KY)上で標準的なFmoc化学法により調製した。各結合工程では、2.3M過剰のアミノ酸誘導体を用いた。結合の完了は、プロモフェノールブルーでモニターし、ニンヒドリンで確認した。

50

【0296】

&lt;複合体に用いられるメリチンペプチド&gt;

【0297】

【表8】

メリチンペプチド #6.

$\text{H}_2\text{N-Cys-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Gly-CO}_2\text{H}$  (配列番号  
: 7).

メリチンペプチド #7.

$\text{H}_2\text{N-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Lys-Cys-Gly-CO}_2\text{H}$  (  
配列番号: 8).

メリチンペプチド #8.

$(\text{H}_2\text{N-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln})_2\text{-Lys-Cys-Gly-CO}_2\text{H}$

10

【0298】

ペプチドをチオエーテル結合により結合手プラットフォーム分子に結合させるために必要なので、システインを加えた。ペプチドを、合成後に逆相HPLCにより精製し、凍結乾燥により乾燥した。次いで、適度な量のペプチドを、各複合体化に対して秤量した。

【0299】

&lt;予め形成されたジスルフィド結合の還元(トリブチルホスフィン法)&gt;

全ての緩衝液にヘリウムを吹き込んだ。ペプチドを、最少容量(約10~20mg/mL)の0.05M  $\text{NaHCO}_3$  (pH8.25)に溶解した。0.7Mトリブチルホスフィン(TBP; MW=202.32g/モル; d=0.812g/mL)の1mL溶液は、TBP 174.4 $\mu\text{L}$ をイソプロパノール(iPrOH) 825.6 $\mu\text{L}$ に加えることにより調製した。次いで、上記のように調製したペプチド溶液に、TBPを(1:1)の当量で加え、十分に混合し、次いで時々攪拌してTBPを溶液中に溶解および/または分散させながら、30分から1時間反応させた。HPLCにより、還元が完了したことを確認した。

20

【0300】

&lt;結合手プラットフォーム分子#3または#60へのペプチドの複合体化&gt;

全ての緩衝液にヘリウムを吹き込んだ。ポリエチレングリコール(PEG)誘導体#3または#60を、最少容量(約20mg/mL)の0.05M  $\text{NaHCO}_3$  (pH8.25)に溶解した。PEG誘導体のヨードアセチル基当り、約3当量のペプチドを用いた。p-アミノ安息香酸(PABA)-PEG(ヨードアセチル基2個; MW=約4100g/モル)では、PABA-PEG各当量について6当量のペプチドを用いた。ジアミノ安息香酸(DABA)-PEG(ヨードアセチル基4個; MW=約4300g/モル)では、DABA-PEG各当量について12当量のペプチドを用いた。還元したペプチド溶液にPEG溶液を加え、暗所で少なくとも1時間反応させた。ペプチド複合体を調製用HPLCで精製した。プールおよび凍結乾燥を行う前に、15%トリシゲルを用いる電気泳動により画分を確認した。

30

【0301】

【表9】

40

メリチンペプチドおよびPEGの複合体

複合体番号	結合平 ラットフォーム	複合したペプチド	分子当りの B細胞エレクトロポ数	複合末端	ペプチドまたは複合体 によるT細胞活性化 <sup>1</sup>
1	60	6	2	N	なし (pep)
2	3	6	4	N	なし (pep/conj)
3	3	7	4	C	nd
4	3	5	4	N	あり (pep)
5	3	8	8 <sup>2</sup>	C	nd

<sup>1</sup> メリチン感受マウス由来の培養T細胞による [<sup>3</sup>H] チミジンの取り込みの刺激; nd=測定せず; pep = ペプチドで試験; conj = ペプチド-PEG複合体で試験

<sup>2</sup> 各々2つの同一の分枝を含む、分枝ペプチド4コピー; 各分枝はB細胞エレクトロプを含む

10

20

30

40

【0302】

<マウスリンパ節増殖アッセイ>

雌のBalb/cマウス(6~8週齢; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)を得て、La Jolla Pharmaceutical animal facilityで、国立衛生研究所のガイドラインに従って飼育した。食物および水は随意に与えた。Balb/cマウスを、完全フロイントアジュバント(CFA)(Sigma Chemical Co., St.Louis, MO)に入れたメリチン50µgで、各後ろ足の裏に免疫処置した。7日後、膝窩リンパ節を無菌状態で採取した。50メッシュふるいスクリーンを通して細胞を細かくすることにより、リンパ節を穏やかに分離した。単細胞懸濁物を、グルタミン、ペニシリン、およびストレプトマイシンを含むRPMI-1640(Irvine Scientific

50

、Irvine、CA) 中で洗浄した。丸底96ウェルCorningマイクロタイションプレート  
の4つ組のウェル中で、10%ウシ胎児血清を補充したRPMI培地において、 $5 \times 10^5$ 個の細胞  
を、10、1.0、または $0.1 \mu\text{g/mL}$ の、メリチンまたはメリチンペプチドで培養した。陽性コ  
ントロールウェルにおける細胞を、100または50 U/mLのマウスインターロイキン2 (IL-2)  
、 $1 \mu\text{g/mL}$ のPHA (フィトヘマグルチニン) で培養した。陰性コントロールウェルは、RPM-  
1640および10% FCS中にリンパ節細胞を有した。細胞を、5% CO<sub>2</sub>の37 インキュベーター  
中で、4日間培養した。各ウェルを、 $1 \mu\text{Ci}$ の<sup>3</sup>Hチミジン (ICN Biochemicals、Costa Me  
sa、CA) で、さらに18時間パルスした。半自動式細胞捕集器 (Scatron、Sterling、VA)  
により、グラスファイバーフィルターマット上に、細胞を集めた。<sup>3</sup>Hチミジンの取り込  
みを、液体シンチレーションにより測定した。結果は、1分間当りの平均カウントで表し

10

## 【0303】

## &lt;インビボプロトコル&gt;

Balb/cマウスを、CFA中のメリチン $4 \mu\text{g}$ を腹腔内に投与することにより、初回免疫した。  
1カ月後、潜在免疫寛容原または調合緩衝液を腹腔内投与した。3日後、全てのマウスに  
対して、不完全フロイントアジュバント(ICF) (Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO) に  
入れたメリチン $4 \mu\text{g}$ の腹腔内注射を行った。10日後に、100~200  $\mu\text{L}$ の血液を、後眼窩静  
脈叢から採集した。血清サンプルを、抗ペプチドまたは抗メリチンIgG抗体についてアッ  
セイした。

## 【0304】

## &lt;IgG抗メリチンまたは全抗メリチン抗体に対するアッセイ&gt;

個々のマウスの血清サンプルについて、連続して、抗メリチン抗体の存在についてELISA  
により評価した。Falcon Probind 96ウェルマイクロタイションプレートを、食塩  
加リン酸緩衝液(PBS) (pH7.2) に入れたメリチンまたはメリチンペプチド $10 \mu\text{g/mL}$ により  
、4 で一晩、予備被覆した。このプレートを、PBS、0.02% Tween-20、および1%ゼラ  
チン (Norland Products Inc.、New Brunswick、NJ) を含有する洗浄溶液で2回洗浄した  
。プレートを、5%ゼラチンを含有するPBS  $200 \mu\text{L}$ により、37 で1時間遮断した。血清  
サンプルを、5%ゼラチンを含有するPBSの希釈液として調製した。サンプルを、1:100か  
ら1:1000に希釈して試験した。37 で1時間インキュベートした後、プレートを4回洗浄  
した。エキストラアビジンパーオキシダーゼ (Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO) を、  
5%ゼラチンを含有するPBSで1:1000で希釈した。このプレートを、37 で1時間インキ  
ュベートし、次いで5回洗浄した。ウェルを -フェニレンジアミン(OPD) (Sigma Chemi  
cal Co.、St. Louis、MO) により、暗所で15~30分間展開させ、反応を3M HClで中断した。  
光学濃度(OD)を、マイクロプレートリーダー (Bio-tek Instrument、Winooski、VT) 上で  
450nmで測定した。

20

30

## 【0305】

## &lt;抗体産生細胞アッセイ&gt;

セルロースマイクロタイションプレート (Millipore Co.、Bedford、MA) を、IgG  
抗体 (ELISA) アッセイについて上記で示したように調製した。しかし、上記IgG抗体アッセ  
イで血清サンプルをウェルに加える時点で、脾臓細胞 ( $5 \times 10^5$ /ウェル) を血清の代わり  
に加え、一晩インキュベートした。ELISAアッセイの残りの工程は、上記と同様にして行  
った。

40

## 【0306】

## &lt;T細胞エピトープ&gt;

メリチンで感作したマウスから得たT細胞は、全メリチン分子およびC末端メリチンペプ  
チド3、4、および5に应答して、T細胞増殖を示した (図8)。しかし、C末端ペプチ  
ド1および2は、顕著なT細胞増殖を誘導しなかった。メリチンペプチド2および5をPE  
Gに複合体化した。メリチンペプチド2と同様に、メリチンペプチド2のPEG複合体もまた  
、顕著なT細胞増殖を誘導しなかった。

## 【0307】

50

<メリチンで初回免疫しブーストしたマウスを免疫寛容にするメリチン複合体化ペプチドによる実験>

上記の複合体 (10mg/kg、200 µg/マウス) で処理したマウスは、調合緩衝液で処理したコントロールBalb/cマウスに比較して、顕著に低いレベルの抗メリチンペプチド2抗体を有し (図9)、また低いレベルの抗メリチン抗体を有していた (図10)。緩衝液コントロールまたは上記の複合体で処理したマウス由来の脾臓細胞を、抗メリチン抗体または抗メリチンペプチド2抗体を産生する抗体産生細胞の能力について、可溶性ELISAアッセイでの測定によりアッセイした。図11に示すように、複合体で処理したグループにおける抗メリチンペプチド2抗体産生細胞のレベルは、調合緩衝液を投与したコントロールグループにおけるレベルよりも、顕著に低い値であった。複合体4 (T細胞エピトープを含むペプチド5の複合体) で処理したマウスは、処理マウスにおいてペプチド5に対する抗体の力価を低下させなかった。従って、T細胞エピトープを含む複合体は、免疫寛容原ではない (図12)。事実、応答を低下させるよりもむしろ、抗ペプチド抗体のレベルはわずかに上昇し得る。

#### 【0308】

(実施例12:メリチンで初回免疫しブーストしたマウスを免疫寛容にするメリチンペプチド複合体によるさらなる実験)

雌のC57BL/6マウス (5~8週齢) をThe Jackson Laboratory、Bar Harbor、MEから購入した。国立衛生研究所のガイドラインに従って、動物を維持し、取り扱った。

#### 【0309】

<免疫処置プロトコル>

ミョウバン沈降メリチン5 µgおよびアジュバントとして百日咳菌 (*B. pertussis*) (Michigan Department of Public Health、Lansing、MI)  $2 \times 10^9$  を、マウスに腹腔内注射した。このマウスに対し、PBSに入れたメリチン5 µgを腹腔内投与してブーストした。

#### 【0310】

<pfcアッセイ>

ヒツジ赤血球細胞 (SRBC) (Colorado Serum Co.、Denver、Colorado) を、カルボジイミドを用いてメリチンペプチド2と複合体化した。新鮮SRBC (2週齢未満) を、冷生理食塩水で4回およびマンニトール (0.35M マンニトール、0.01M NaCl) で1回洗浄した。このSRBCを、10% (v/v)濃度となるようにマンニトール中に懸濁した。メリチンペプチド#3 30 µgを含有するマンニトール 100 µLを、10% SRBCの1mLアリコートに加え、次いでこれを氷中で10分間インキュベートした。次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド HCl (EDCI)の100mg/mL溶液 100 µLを加えて、氷中で30分間インキュベートした。SRBCを平衡塩類溶液 (BSS) (Irvine Scientific Co.、Irvine、CA) で2回洗浄し、10% (v/v)になるように再懸濁した。凍結乾燥ギニアピッグ補体 (GIBCO、New York、NY) をBSSで再構成し、次いでBSSで1:3に希釈した。希釈ギニアピッグ補体 1mLを複合体化SRBC 3mLに加えた。ウサギ抗マウスIgGを加え、ウサギ抗血清の1:100の最終希釈液を得た。この濃度は、IgG pfcの最大数を増加させる一方、全てのIgG pfcを阻害するように予め決定した。この補体/抗マウスIgG/SRBC溶液と、1匹のマウスから採取したマウス脾臓細胞の細胞懸濁液とを、等量で混合した。混合物を各50 µLずつ、カニンガムスライドのチャンパー (スライド当り3チャンパー) に移した。次いで、端をパラフィンで封じ、37で1時間インキュベートした。チャンパー当りのプラークの数を、解剖顕微鏡を用いて数えた。コントロールとして非複合体化SRBCを用いた、各脾臓懸濁液のアッセイを行った。生細胞の数を、各脾臓細胞懸濁液において測定した。脾臓細胞  $10^6$  個当りのpfcの数を各チャンパーについて測定し、3つ組の平均を算出した。非複合体化SRBCでのpfc数を複合体化SRBCでのpfc数から引いて、ペプチド特異性pfcの数を測定した。

#### 【0311】

<pfc測定のための最適時間の決定>

マウスをメリチンで初回免疫した。感作マウスのグループ (グループ当りマウス3匹) を、2、4、6、および8日目にメリチンでブーストした。10日目に、マウスを殺し、それ

10

20

30

40

50

らの脾臓を採取した。細胞懸濁液を調製し、ペプチド特異性pfcの数の測定のためにアッセイした。pfcの最適数は、6日後メリチンブーストで得られた。

【0312】

< PEG複合体でのペプチドの方向が免疫寛容を誘導する複合体の能力に影響しないこと >  
PEG複合体のペプチド方向が、免疫寛容を誘導する複合体の能力に影響するかどうかを決定するために、2つの異なる免疫寛容原を構成した。ペプチドを、そのC末端を通じて、結合手プラットフォーム分子3に共有結合させ、メリチン複合体3を生成した。メリチンで初回免疫したマウスのグループ(3/グループ)を、異なる複合体または生理食塩水で腹腔内処理した。5日後、未処理コントロールマウスを含めた全てのマウスを、メリチン5µgでブーストした。6日後、マウスを殺し、それらの脾臓を採取し、ペプチド特異性pfcの数を測定した。表10に示すように、両方向共に、親タンパク質メリチンで初回免疫しブーストしたマウスにおいて、ペプチド特異性pfc/10<sup>6</sup>脾臓細胞の数を減少させる効果があった。

10

【0313】

【表10】

PEG複合体のペプチド方向が免疫学的寛容を誘導する複合体の能力に影響しないこと

メリチン 複合体番号	µg/マウス	脾臓細胞10 <sup>6</sup> 個当りの ペプチド特異性 (平均およびS.D.)	減少%
3	1000 µg	386 (85)	86.8%
"	500 µg	489 (一匹のマウス)	83.3%
"	250 µg	957 (298)	67.3%
2	1000 µg	546 (160)	81.3%
"	500 µg	866.6 (235)	70.4%
"	250 µg	1280 (一匹のマウス)	56.2%
なし	なし	2924 (164)	- -

20

30

【0314】

< PEG複合体当りのペプチド数が免疫寛容を誘導する複合体の能力に影響すること >  
PEG分子に対してのペプチドの比率が重要であるかどうかを決定するために、3つの異なる複合体(PEG複合体当りのペプチド数がそれぞれ異なる)を構成した。複合体1は、PEG複合体当り2個のペプチドのみを有した。別の複合体は、PEG複合体当り4個のペプチドを有した(複合体2)。3番目の複合体は、PEG複合体当り8個のペプチドを有した(複合体5)。メリチンで初回免疫したマウスのグループ(3/グループ)を、複合体または生理食塩水で腹腔内処理した。5日後、未処理コントロールマウスを含めた全てのマウスを、メリチン5µgでブーストした。6日後、マウスを殺し、それらの脾臓を採取し、ペプチド特異性pfcの数を測定した。表11に示すように、複合体1(PEG分子当り2個のペプチドを含む)は、親タンパク質メリチンで初回免疫しブーストしたマウスにおいて、ペプチド特異性pfc/10<sup>6</sup>脾臓細胞の数を減少させるのに有効ではなかった。この結果は、メリチン複合体2および5は、ともに免疫寛容原として有効であったことをしめす。しかし、複合体5(8個のペプチドを含む)は、複合体2(結合手プラットフォーム分子当り4個のペプチドを含む)よりも少ない投与量で有効であった。

40

【0315】

【表11】

PEG複合体当たりのハフチド数が免疫学的寛容を誘導する複合体の能力に影響を与える

ハフチド特異性阻害

処理に用いた分子	投与量 μg/マウス (n.モル数)	IgG pfc(SD)	減少%
未処理		1159 (280)	std
複合体 1	1000 (217)	1290(98)	-11%
	250 (54)	1350(206)	-16%
複合体 2	500(80)	585(125)	49.5%
	250(40)	1001(176)	14%
複合体 5	500(53)	630(325)	45.6%
	250(26.5)	443(105)	61.8%
	125(13.25)	583(69)	49.7%

10

【0316】

以上に記載されたように、本発明は、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子、ならびに、化学的に定義された非ポリマー性の結合手プラットフォーム分子および生物学的または化学的分子を含む複合体を提供する。生物学的分子としては、ヒト狼瘡の抗dsDNA自己抗体に対して著しい結合活性を有する、少なくとも20塩基対からなるポリヌクレオチド二本鎖が含まれる。

20

【0317】

ポリヌクレオチド化学、複合体化学、免疫学、および関連分野の当業者に明らかである、本発明の実施のための上記態様の改変は、添付した特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

【0318】

【配列表】

30

【0319】

【配列番号：1】

配列の長さ：26

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu

40

1

5

10

15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

20

25

【0320】

【配列番号：2】

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly

1

5

10

【0321】

【配列番号：3】

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly

1

5

20

【0322】

【配列番号：4】

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly

1

5

10

30

【0323】

【配列番号：5】

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly

1

5

10

40

50

【 0 3 2 4 】

【 配列番号 : 6 】

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly

1                    5                    10

10

【 0 3 2 5 】

【 配列番号 : 7 】

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly

1                    5                    10

20

【 0 3 2 6 】

【 配列番号 : 8 】

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Lys Cys Gly

1                    5                    10

30

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、PN-KLHで初回免疫し、図に示した投与量の $[(PN)_{20}\text{-BAHA}]\text{-EDDA}$ (複合体17-II)で処理し、PN-KLHのブースター注射を行い、そして5日後に採血したマウスの、抗-PN応答を示している。3つの希釈系列の血清を、 $10^{-8}$  Mで放射標識したPNを用いたFarrアッセイで試験し、そしてデータは抗-PN抗体の減少百分率で表した。1グループには、5匹のマウスを用いた。

【 図 2 】 図 2 は、PN-KLHで初回免疫し、図に示した投与量の $[(PN)_{20}\text{-BAHA}]\text{-EDDA}$ (複合体17-II)で処理し、PN-KLHのブースター注射を行い、そして5日後に採血したマウスの、抗-KLH応答を示している。抗-KLH抗体を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)で調べた。結果を、抗血清の標準プールの百分率で表した。1グループには、5匹のマウスを用いた。

40

50

【図3】図3は、PN-KLHで初回免疫し、図に示した投与量の $[(\text{PN})_{16}-\text{BAHA}_{0x}]$ -EDDA(複合体11-IV)、 $[(\text{PN})_{20}-\text{BAHA}_{0x}]$ -EDDA(複合体11-II)、 $[(\text{PN})_{24}-\text{BAHA}_{0x}]$ -EDDA(複合体11-VI)、あるいは $[(\text{PN})_{32}-\text{BAHA}_{0x}]$ -EDDA(複合体11-VIII)の何れかで処理し、PN-KLHのブースター注射を行い、そして5日後に採血したマウスの、抗-PN応答を示している。血清を、 $10^{-8}$  Mで放射標識したPNを用いたFarrアッセイで試験した。1グループには、5匹のマウスを用いた。

【図4】図4は、PN-KLHで初回免疫し、図に示した投与量の $(\text{PN})_{20}$ -HAD<sub>p</sub>-AHAB-TEG(複合体20-II)で、あるいはHAD-AHABのみで、あるいはPNのみまたは各々の混合物で、処理し、次いでPN-KLHでブースターし、そして5日後に採血したマウスの、抗-PN応答を示している。血清を、 $10^{-8}$  Mで放射標識したPNを用いたFarrアッセイで試験した。減少率百分率を計算し、このデータを示した。1グループには、5匹のマウスを用いた。

10

【図5】図5は、PN-KLHで初回免疫し、図に示した投与量の $(\text{PN})_{20}$ -HAD<sub>p</sub>S-AHAB-TEG(複合体20-IV)で処理し、次いでPN-KLHでブースターし、そして5日後に採血したマウスの、抗-PN応答を示している。血清を、 $10^{-8}$  Mで放射標識したPNを用いたFarrアッセイで試験した。1グループには、5匹のマウスを用いた。

【図6】図6は、複合体3-I、3-II、11-I、11-II、11-IV、11-VI、11-VIII、17-I、17-II、20-I、20-II、20-III、および20-IVのための、誘導体化した結合手プラットフォーム分子、および、ポリヌクレオチドを該結合手プラットフォーム分子と結合するリンカーの構造を示している。

【図7】図7は、誘導体化した結合手プラットフォーム分子「HAD-AHAB-TEG」の構造を示している。

20

【図8】図8はメリチンペプチド類で誘起したT細胞増殖のレベルを比較している。

【図9】図9は、メリチンペプチド複合体で処理したマウスと、調合緩衝液で処理した対照マウス中とで産生された、抗-(メリチンペプチド2)抗体のレベルを比較している。

【図10】図10は、メリチンペプチド複合体で処理したマウスと、調合緩衝液で処理した対照マウス中とで産生された、抗-(メリチン)抗体のレベルを比較している。

【図11】図11は、メリチンペプチド複合体で処理したマウスと、調合緩衝液で処理した対照マウス中との、抗-(メリチンペプチド2)抗体-産生細胞のレベルを比較している。

【図12】図12は、T細胞エピトープを含むペプチド#5の複合体であるメリチンペプチド複合体4が、免疫寛容原ではないことを図示している。

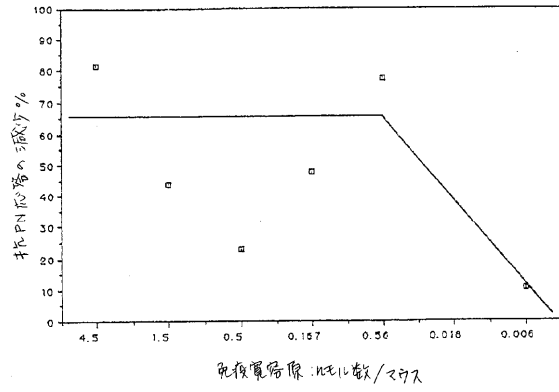
30

【図13】図13は、本発明に含まれるメリチン複合体を図示している。

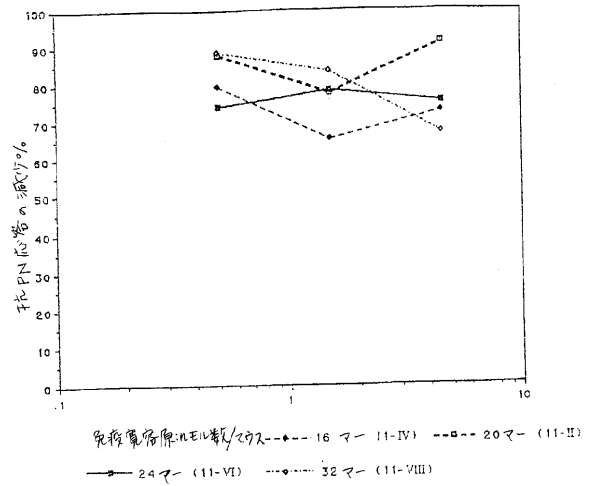
【図14】図14は、本発明の複合体(LJP-249AおよびLJP-249B(複合体3-II))で達成された、抗-dsPN抗体の減少百分率の増加と、D-EKおよびポリヌクレオチド $(\text{PN})_{50}$ を含む従来技術の複合体(LJP-105)でのそれとの比較を図示している。

【図15】図15は、本発明の複合体LJP-394、複合体20-IIで処理した雄のBXSBマウスの循環血清中の抗-DNA IgG抗体の抑制を示している。ELISAアッセイで、D-EKに結合させた $(\text{PN})_{50}$ に対するIgG抗体を測定した。各グループの各8個体のマウスからの血清を個々にアッセイした。

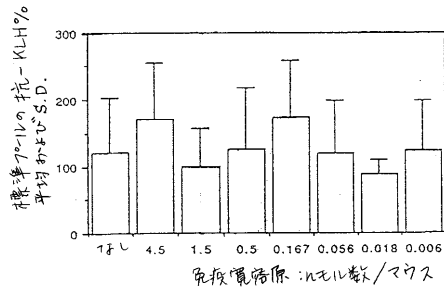
【 図 1 】



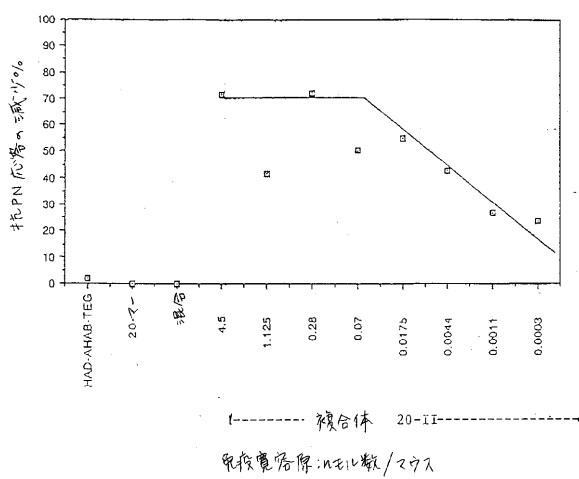
【 図 3 】



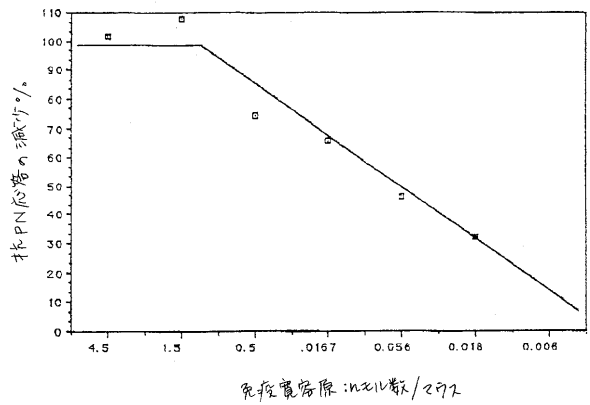
【 図 2 】



【 図 4 】

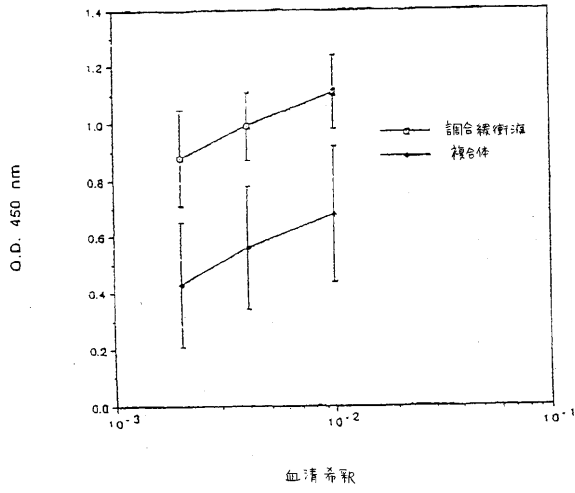


【 図 5 】

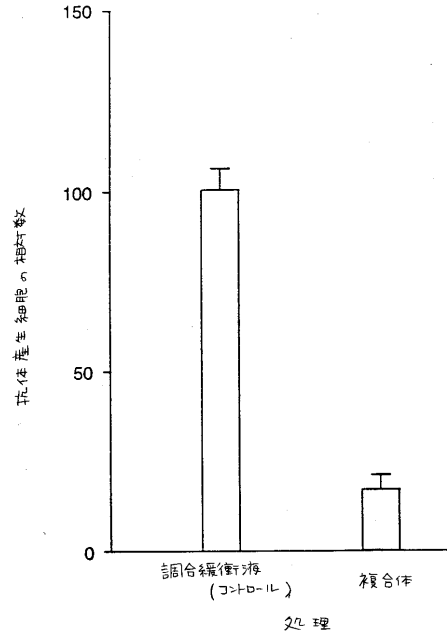




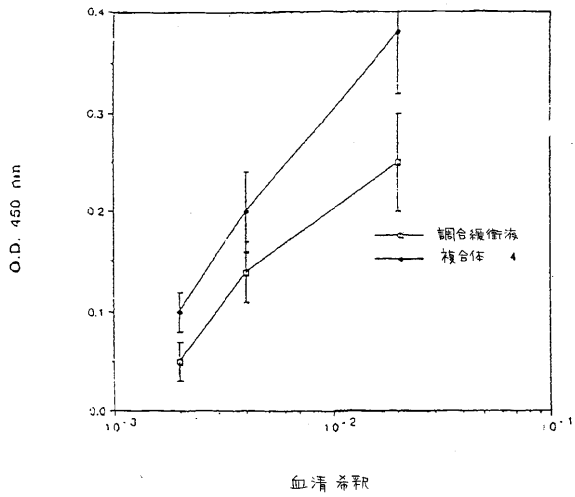
【 図 1 0 】



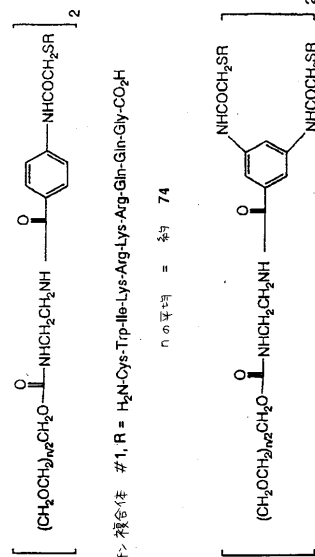
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



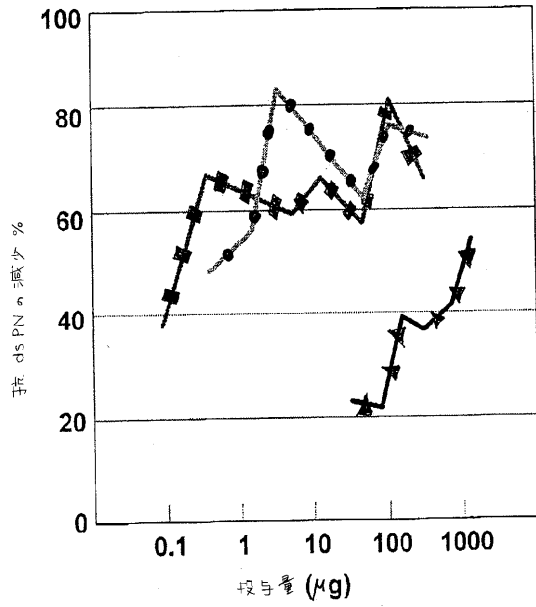
【 図 1 3 】



×1) 複合体 #2, R = H<sub>2</sub>N-Cys-Tip-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gly-CO<sub>2</sub>H  
 ×2) 複合体 #3, R = H<sub>2</sub>N-Trip-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gly-Cys-Gly-CO<sub>2</sub>H  
 ×3) 複合体 #4, R = H<sub>2</sub>N-Cys-Ile-Ser-Trip-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gly-CO<sub>2</sub>H  
 ×4) 複合体 #5, R = (H<sub>2</sub>N-Trip-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gly)<sub>2</sub>-Lys-Cys-Gly-CO<sub>2</sub>H  
 ×5) 複合体 #6, R = (H<sub>2</sub>N-Trip-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gly)<sub>2</sub>-Lys-Cys-Gly-CO<sub>2</sub>H

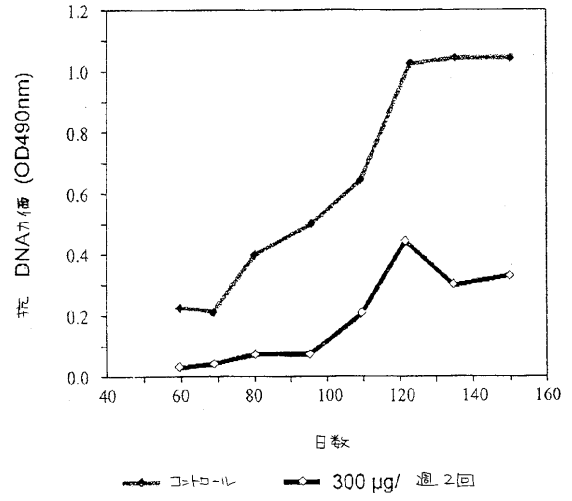
大分子複合体は加水分解により容易に電荷を帯び、その平均は約74

【 図 1 4 】



● LJP- 249 A    ■ LJP- 249 B    ▲ LJP- 105

【 図 1 5 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 スティーブン カウツ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067, ランチョ サンタ フェ, ランチョ ディエグエ  
ノ ロード 6151
- (72)発明者 デイビッド エス. ジョーンズ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92127, サンディエゴ, フロリンド ロード 11265
- (72)発明者 ダグラス アラン リビングストーン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122, サンディエゴ, ナンバー115, フィオレ テラ  
ス 5260
- (72)発明者 リン ユ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122, サンディエゴ, エイピーティー. 228, ロン  
バード プレイス 8933

## 合議体

審判長 塚中 哲雄

審判官 吉住 和之

審判官 谷口 博

- (56)参考文献 国際公開第92/02531(WO, A1)  
特開昭61-33195(JP, A)  
特開昭63-118301(JP, A)  
東独国特許出願公開第287950(DD, A5)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K39/395