

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5428017号  
(P5428017)

(45) 発行日 平成26年2月26日(2014.2.26)

(24) 登録日 平成25年12月13日(2013.12.13)

(51) Int.Cl. F1  
C08G 65/333 (2006.01) C08G 65/333

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2007-76165(P2007-76165)  
(22) 出願日 平成19年3月23日(2007.3.23)  
(65) 公開番号 特開2008-231343(P2008-231343A)  
(43) 公開日 平成20年10月2日(2008.10.2)  
審査請求日 平成22年3月5日(2010.3.5)(73) 特許権者 504159235  
国立大学法人 熊本大学  
熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号  
(74) 代理人 110000109  
特許業務法人特許事務所サイクス  
(72) 発明者 庄司 省三  
熊本県熊本市楠5丁目4-22  
(72) 発明者 三隅 将吾  
熊本県熊本市大江3丁目2-1 白川住宅  
2-35  
(72) 発明者 高宗 暢暁  
熊本県熊本市画図町下江津259-23

審査官 大木 みのり

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘキサグリセロール又はペンタエリスリトールの骨格分子の側鎖の水酸基にポリオキシエチレン(ポリエチレングリコール; PEG)がO-エーテル結合を介して結合し、その末端に複数のアミノプロピル基又は活性エステル基を有する化合物であって、ヘキサグリセロールオクタ(アミノプロピル)ポリオキシエチレンとヘキサグリセロールオクタ(4-ニトロフェノキシカルボニル)ポリオキシエチレンとを5~12:1のモル比で混合して反応させることによって得られる化合物。

【請求項2】

ヘキサグリセロール又はペンタエリスリトールの骨格分子の側鎖の水酸基にポリオキシエチレン(ポリエチレングリコール; PEG)がO-エーテル結合を介して結合し、その末端に複数のアミノプロピル基又は活性エステル基を有する化合物であって、ヘキサグリセロールオクタ(4-ニトロフェノキシカルボニル)ポリオキシエチレンとヘキサグリセロールオクタ(アミノプロピル)ポリオキシエチレンとを5~12:1のモル比で混合して反応させることによって得られる化合物。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の化合物における複数のアミノプロピル基又は活性エステル基に、2種類以上の抗原が結合していることを特徴とする化合物。

【請求項4】

請求項1又は2に記載の化合物における複数のアミノプロピル基又は活性エステル基に、

10

20

2-[N- , N- -ビス(N- , N- -ジガロイルリシニル)リシニル]アミノエチルアミンが結合していることを特徴とする、請求項3に記載の化合物。

【請求項5】

上記2種類以上の抗原が、腫瘍抗原、病原体抗原、又はアレルゲン抗原から選択される抗原である、請求項3又は4に記載の化合物。

【請求項6】

上記2種類以上の抗原が、エイズ(HIV)抗原、インフルエンザ抗原、又は花粉症抗原から選択される抗原である、請求項3から5の何れかに記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、一分子中に2種類以上の抗原が結合していることを特徴とする抗原(ワクチン剤)に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫とは、ヒトや動物などが持つ、体内に入り込んだ「自分とは異なる異物」(非自己)を排除する生体の恒常性維持機構の一つである。免疫は体内に侵入した病原体を排除するための機構として働き、特に病原体による感染から身を守るための感染防御機構として重要である。バクテリアやウイルスなどは生体の上皮組織のような物理的障壁、自然免疫、獲得免疫系の感染防御機構で体内への侵入が妨害されている。物理的障壁や自然免疫を乗り越えてきた病原体は獲得免疫系で撃破する必要がある。獲得免疫系を常時活性化し、病原微生物の侵入に備える必要がある。

20

【0003】

現在のワクチンは単一疾病に対する単一抗原(ワクチン)であり、1つの感染症の流行を予測し、その前にワクチネーションして感染を予防する手段を取ってきている。この手段は感染自体を防御するものではない。生体は病原性生物に一度は感染しないと、獲得免疫系は成立しない。それゆえに、弱毒化病原性生物やその抗原の一部をワクチンとして生体に投与して偽の感染を作りだし、獲得免疫系を成立させ、真の感染に備えているのがワクチネーションである。このワクチネーションには数週間から数ヶ月の時間が必要であり、免疫が見かけ上、消滅すると、その免疫は記憶細胞に記憶される。前もってワクチネーションをしたおかげで、病原性生物の侵入・感染が起こると、ワクチネーションをしない場合に較べ、迅速に初感染から1~2日で獲得免疫系が活性化し、病原体を排斥し、病気が軽く済むか、あるいは疾病には陥らないことが経験上知られている。この方法は病原体が免疫担当細胞系以外の細胞に感染する場合には極めて有効である。例えば、インフルエンザウイルスは呼吸器上皮細胞に感染し、そこで増殖し、ヒトを苦しめるが、免疫担当細胞は健全であるので、暫くすると、免疫系が活動し始めウイルスを撃破し、風邪から回復する。しかし、エイズの原因ウイルスHIV-1は免疫担当細胞の中核細胞に極く短時間(30~60分)でとりつき、6~24時間でヒトの遺伝子に潜り込み、感染が成立する。ウイルスは生体の免疫系が活動して、ウイルスを排斥するいとまを与えていない。エイズに対する免疫系が活動し始めるころには、ウイルスは免疫担当細胞で増殖し、リザーバ細胞の中に隠れ、自己は変異しながら免疫系からの攻撃を巧みにかわし、免疫細胞を破壊しながら、感染固体が生き続けるまで、生きながらえ、他に伝播し、種を保存している。よって、エイズワクチンの開発の原理原則は侵入の場である粘膜(性器粘膜)の水辺で完全に撃退することが肝要である。細胞性免疫を利用したエイズのCTL-ワクチンがサルの実験で注目を集めているが、このワクチンも初感染を防止するのではなく、1度感染を許し、感染した細胞が活動をはじめると、感染した細胞とともにウイルスを死滅させる方法で、リザーバ細胞を殺すことはできず、根元を断つことは出来ない。しばらくすると必ず、耐性ウイルスが出現し、終局的にエイズを発症する。エイズのワクチンの開発のポイントは、エイズワクチンにより獲得免疫が成立し、その免疫が記憶細胞に記憶され、HIV-1が生体に侵入し、獲得免疫を発動するまでの時間(12~24時間、デスタイム)の間を「どのような手段で如何に守る

30

40

50

か」である。エイズワクチンの鍵は、HIV-1が侵入してきた場所にウイルスを迎え撃つHIV-1の免疫系が常時、待ち迎えて、直ちに反応して排斥することである。一度でも感染を許せば2度とHIV-1を生体外にたたき出すことは不可能である、このことが従来の免疫学では達成できないことである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、上記の問題点を解決できるワクチンを提供することである。即ち、本発明は、多機能性粘膜免疫賦活剤を創製し、粘膜免疫により疾病を予防でき、特に病原体が侵入してきた場所で該病原体を迎え撃つ免疫系が常時待ち迎えて、直ちに反応して排斥

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、異種抗原を別々に、さらに粘膜免疫の場合はM細胞標的分子を用いて、ポリエチレングリコール(PEG)を介して化学的に共有結合させたSenju-Hub-抗原を用いることによって、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

即ち、本発明によれば、ヘキサグリセロール又はペンタエリスリトールの骨格分子の側鎖の水酸基にポリオキシエチレン(ポリエチレングリコール; PEG)がO-エーテル結合を介して結合し、その末端に複数のアミノプロピル基又は活性エステル基を有する化合物が提供される。

20

【0007】

好ましくは、本発明の化合物は、ヘキサグリセロールオクタ(アミノプロピル)ポリオキシエチレンとヘキサグリセロールオクタ(4-ニトロフェノキシカルボニル)ポリオキシエチレンとを5~8:1のモル比で混合して反応させることによって得られる化合物である。

【0008】

好ましくは、本発明の化合物は、ヘキサグリセロールオクタ(4-ニトロフェノキシカルボニル)ポリオキシエチレンとヘキサグリセロールオクタ(アミノプロピル)ポリオキシエチレンとを、5~8:1のモル比で混合して反応させることによって得られる化合物である。

30

【0009】

本発明によればさらに、上記の化合物における複数のアミノプロピル基あるいはアミノエチル基等のアミノアルキル基、又は活性エステル基に、2種類以上の抗原が結合していることを特徴とするワクチン剤が提供される。

本発明によればさらに、上記の化合物における複数のアミノプロピル基あるいはアミノエチル基等のアミノアルキル基、又は活性エステル基に、2-[N-, N--ビス(N-, N--ジガロイルリシニル)リシニル]アミノエチルアミンが結合していることを特徴とする、上記のワクチン剤が提供される。

40

好ましくは、上記2種類以上の抗原は、腫瘍抗原、病原体抗原、又はアレルギー抗原から選択される抗原であり、さらに好ましくは、エイズ(HIV)抗原、インフルエンザ抗原、又は花粉症抗原から選択される抗原である。

【発明の効果】

【0010】

本発明の多機能性粘膜免疫賦活剤(Senju-Hub-Mucosal抗原)においては、2種類以上の異種抗原がポリエチレングリコールを介して共有結合していることにより、1抗原による免疫応答が異種免疫応答に高められ、多くの疾病の予防に有用である。本発明のSenju-Hub-Mucosal抗原は、ヘキサグリセロール骨格分子に八方にPEGのO-エーテル結合を介し、末端に数十から数百個の官能基(プロピルアミノ基あるいは活性エステル基4-nitrophen

50

oxy carbonyl)を有する巨大分子で、用いる抗原の種類によって官能基の数・種を自由に使い分けることができる。いずれの場合も、異種抗原、M細胞標的分子、アジュバンドが容易にカルバメート・酸アミド結合を介して容易に結合することができる。例えば、インフルエンザワクチンと花粉症抗原を本発明のSenju-Hub-抗原と結合させ、ワクチネーションすると、インフルエンザにかかると花粉症にはかからない、その逆も可能である。このように、種々様々な可能性を有するSenju-Hub-抗原は、異種抗原を共有結合で化学的に一体化することにより、生体の免疫応答を個々の抗原特異的免疫応答から異種抗原の免疫応答としてカスケード反動的に発現・増幅させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明は、ヘキサグリセロール又はペンタエリスリトールの骨格分子の側鎖の水酸基にポリオキシエチレン(ポリエチレングリコール; PEG)がO-エーテル結合を介して結合し、その末端に複数のアミノプロピル基又は活性エステル基を有する化合物(本明細書中において、Senju-Hub-抗原とも言う)に関するものである。

【0012】

本発明のSenju-Hub-抗原は、ヘキサグリセロール又はPEG骨格分子に骨格と同じ分子が八方にPEGを介してつながり、その末端に数十から数百個の官能基(プロピルアミノ基あるいは活性エステル基4-nitrophenoxy carbonyl)を有する巨大分子であり、用いる抗原の種類によって官能基の数・種を自由に使い分けることができる。いずれの場合も、異種抗原、M細胞標的分子(例えば、2-[N- , N- -ビス(N- , N- -ジガロイルリシニル)リシニル]アミノエチルアミンなど)、アジュバンドなどをカルバメート・酸アミド結合を介して容易に結合することができる。特に粘膜免疫を目指す場合は、M細胞標的分子TGD Kが結合したSenju-Hub-Mucosal抗原を用いることができる。

【0013】

例えば、インフルエンザワクチンおよびHIV-1のgp140タンパク質、HIV-1の第2受容体CCR5を守る抗原、M細胞標的分子、アジュバンド等を多く存在する反応の手を持つSenju-Hub-抗原に結合させ、生体に投与するとそれぞれの抗原に対する免疫の認識連関 Linked recognition(近年、1つの抗原刺激で複数の認識連関 Linked recognitionがありうると考えられている。)が起こりと考えられ始めている。インフルエンザが流行し、このインフルエンザウイルスに感染するとインフルエンザに対する免疫系が活動し始めると同時にHIV-1のgp140タンパク質、CCR5受容体を守るための免疫系が活動始め、インフルエンザとエイズに対する防衛網が完全に完成する。生体はHIV-1には全く接触しないのに、風邪にかかるとエイズに対する防衛網が成立する、このようなときに、性器粘膜においてもHIV-1に対する分泌型IgA, IgGが準備され、侵入してきてHIV-1は抗HIV抗体と瞬時に反応し、洗い出され、不活化することができ、HIV-1の侵入が水辺で完全にブロックされ、感染は成立しないことが考えられる。また、結核予防のBCGワクチンとHIV-1のgp140タンパク質をSenju-Hub-Antigenと結合させ、ワクチネーションすると、幼少の時期から壮年期、すなわちBCGワクチンが消滅するまでの時期まで抗エイズワクチン作用が期待できる。同様に、多剤耐性HIV-1ウイルスを個々に完全に死滅させ、同様にBCGワクチンとSenju-Hub-Antigenに結合させ、ワクチンとして用いると、多剤耐性HIV-1ウイルスに対して有効となりうる。

【0014】

本発明のSenju-Hub-抗原は、ヘキサグリセロール又はペンタエリスリトールの骨格分子の側鎖の水酸基にポリエチレングリコール(PEG)がO-エーテル結合を介して結合し、その末端に多くのプロピルアミンあるいは活性エステル基(p-ニトロフェノキシカルボニル、スクシンイミジルオキシカルボニル、スクシンイミジル)を有する化合物(図1から3を参照)である。本発明の化合物と、付加する抗原との反応は、アミノ基と活性エステルとの脱水縮合反応である。異種官能基をもつ同種骨格分子、異種官能基をもつ異種骨格分子がお互いにどちらかの一方の化合物を大過剰に用いることにより、反応が調節され、同種

10

20

30

40

50

骨格分子および異種骨格分子並びにPEGからなる分子表面に多くの1級アミノ基あるいは多活性エステル基のみを持つ巨大分子化合物を合成できる。両化合物1分子の表面に数分子のM細胞標的分子TGDKをカルバメート結合を介して結合させ、TGDKの結合した多1級アミノ基あるいは多活性エステル基を持つ化合物を得ることができる。前者をSenju-Poly-Amino-PEG-Hub-Mucosal抗原(Senju-A-Hub-MuA)、後者をSenju-Poly-Activated Ester-PEG-Hub-Mucosal抗原(Senju-E-Hub-MuA)と呼ぶ。付加する抗原の反応基の種類により、使い分けることができる。

【0015】

本発明のSenju-Hub-抗原は、例えば、ヘキサグリセロールオクタ(アミノプロピル)ポリオキシエチレンとヘキサグリセロールオクタ(4-ニトロフェノキシカルボニル)ポリオキシエチレンとを5~8:1のモル比で混合して反応させることによって得られるものでもよいし、ヘキサグリセロールオクタ(4-ニトロフェノキシカルボニル)ポリオキシエチレンとヘキサグリセロールオクタ(アミノプロピル)ポリオキシエチレンとを、5~8:1のモル比で混合して反応させることによって得られるものでもよい。

10

【0016】

本発明の化合物における複数のアミノプロピル基又は活性エステル基には、2-[N- , N- -ビス(N- , N- -ジガロイルリシニル)リシニル]アミノエチルアミン(TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)を結合させることができる。TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>は、本明細書の実施例にも記載の通り、4Fmoc-4DK-NH-Resinを脱保護(脱Fmoc)し、Trimethoxybenzoyl chloride(TMBC)でTrimethoxy Benzoyl化を行い、さらに三臭化ホウ素で脱methoxy化することにより合成

20

【0017】

具体的には、まず、2-[N- , N- -bis(N- , N- -difluorenylmethyloxycarbonyllylsinyl)lysiny]-aminoethylaminotriyl resin(4Fmoc-4DK-NH-Resin)に20%ピペリジン(脱水DMF中)を添加し、室温で超音波処理することによって、Fmocを除去することができる。

【0018】

次いで、得られた2-[N- , N- -(dilysinyl)lysiny]aminoethylaminotriyl resin(4DK-NH-Resin)を脱水DMF(ジメチルホルムアミド)で洗浄し(超音波処理)する。洗浄した4DK-NH-Resinに、脱水DMF及びTEAを添加し、さらにTrimethoxybenzoyl chlorideを添加し、反応混合物を40℃で攪拌することによって、Trimethoxy Benzoyl化を行う。得られた4MTBDK-NH-Resinを、1%トリエチルアミン(TEA)を含む脱水DMFで洗浄して過剰のTMBCを除去し、さらに、脱水DMFで5回洗浄して、TEAを除去し、洗浄済みの4MTBDK-NH-Resinを調製することができる。

30

【0019】

次いで、4MTBDK-NH-Resinに、三臭化ホウ素のジクロロメタン溶液を攪拌しながら添加し、添加終了後、ドライヤーで加温しながら、DMF及び塩化メチレンを除く。反応混合物に水を攪拌しながら加える。反応混合物を遠心分離し、樹脂層と上清を分離し、それぞれ凍結乾燥する。樹脂層を「Ppt Resin」とし、上清を「凍結乾燥上清S」とする。「Ppt Resin」を脱水DMFに懸濁し、樹脂を分離し、さらに、樹脂に脱水DMFを加え、合わせて抽出液とする。この抽出液にトリエチルアミン溶液を加え、アルカリ性にし、生じた沈殿を除き、上清にエーテルを加え、生じた沈殿を風乾し、脱水DMFを加え、不溶性沈殿を除き、さらに、エーテルを加えて生じた沈殿を試料(TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)とすることができる。また、「凍結乾燥上清S」には脱イオン水を加え、トリエチルアミンでアルカリ性にし、凍結乾燥する。得られた乾燥品に脱水DMFを加え、不溶性残渣を除き、可溶性画分にエーテルを滴下し、生じた沈殿を試料とすることができる(TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)。TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>は、ペプチド結合又はシッフベースなどを介して、ペプチド、タンパク質、脂質又は糖と結合することにより、腸管免疫賦活剤として使用することができる。

40

【0020】

本発明で用いることができる抗原としては、腫瘍抗原、病原体抗原およびアレルギー抗

50

原などを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。ここで言う病原体抗原とは、病原体に特有の抗原を意味し、ウイルス、細菌、寄生生物または菌類から得られる抗原である。

【0021】

病原体の具体例としては、コレラ菌、毒素原性大腸菌、ロタウイルス、クロストリジウム・ディフィシレ、赤痢菌、サルモネラ・チフィ、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス、ストレプトコッカス・ミュータンス、熱帯熱マラリア原虫、黄色ブドウ球菌、狂犬病ウイルスおよびエプスタインバーウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、アレルゲン抗原としては、ハプテン、または花粉、ほこり、カビ、孢子、鱗屑、昆虫および食品由来の抗原などを挙げることができる。

10

【0022】

本発明のワクチン剤は、薬学的に許容される担体と一緒に適当な製剤にすることができる。担体として、賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤などを用いることができる。また、酸化防止剤のような添加剤を配合してもよい。製剤の形態は特に限定されず、液剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の任意の形態とすることができる。

【0023】

賦形剤としては、例えば、乳糖、ショ糖又はブドウ糖等の糖類；バレイショデンプン又はコムギデンプン等のデンプン類、；結晶セルロース等のセルロース類；無水リン酸水素カルシウム又は炭酸カルシウム等の無機塩類等を使用することができる。結合剤としては、例えば、結晶セルロース、プルラン、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、又はポリビニルピロリドン等を使用することができる。崩壊剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、又はアルギン酸ナトリウム等を使用することができる。潤沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油などを使用することができる。ナノ粒子化剤としてはコレステロールプルラン（日本油脂KK）等を使用することができる。

20

【0024】

本発明のワクチン剤の投与経路は特に限定されず、経口投与でも非経口投与（例えば、直腸投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻腔投与および静脈内投与など）でもよいが、好ましくは経口投与である。

30

【0025】

本発明のワクチン剤の投与量は、投与対象又は患者の年齢、体重、症状等に応じて適宜設定することができるが、例えば、 $1\mu\text{g} \sim 1000\text{mg} / \text{kg} / \text{回}$ 、好ましくは $10\mu\text{g} \sim 100\text{mg} / \text{kg} / \text{回}$ とすることができる。

【0026】

本発明のワクチン剤は、アジュバントと一緒に投与してもよい。アジュバントとしては、ワクチン（抗原）の投与に先立って投与しておくことにより免疫応答を増強できる物質であれば、任意の物質を使用することができる。殺菌微生物のように抗原性をもつもののほか、alum（硫酸アルミニウム・カリウムなど）や鉱物油のように非抗原性のものでもよい。 Freundは1947年抗原水溶液を等量の油（鉱物油85%，界面活性剤15%）と混ぜ、乳剤の状態に注射すると抗体の産生量が増大することを見出した。これは不完全フロイントアジュバント incomplete Freund's adjuvant（IFA）と呼ばれ、これに結核菌の菌体成分を加えたものが完全アジュバント complete F's. a.（CFA）である。このほか、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなどの鉱酸塩はアジュバント効果を示す。また、細菌内毒素、特にグラム陰性菌のリポ多糖類は抗体産生を著明に促進することができ、有効成分はlipid Aにある。本発明では、上記したものをアジュバントとして使用することができる。アジュバントの投与経路は特に限定されず、経口投与でも非経口投与でもよい。

40

【0027】

以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

50

## 【実施例】

## 【0028】

## 1. Polyethylene glycol (PEG) 誘導体

種々のPolyethylene glycol (PEG) 誘導体は日本油脂株式会社)より購入した。

## 【0029】

## 2. M細胞標的分子

粘膜免疫賦活剤、M細胞標的分子、Tetragalloyl D-Triylsinyldiethylamine (TGDK, Mr. 1053) は、PCT/JP2006/321720に記載の方法に従って合成した。具体的には、以下の通りである。

## 【0030】

(材料)

3,4,5-Trimethoxy Benzoyl Chloride (TMBC) は東京化成から購入し、2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -bis(N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -difluorenylmethyloxycarbonyllysinyllsinyll)- aminoethylaminotriethyl resin (略記名4Fmoc-4DK-NH-Resin) は渡辺化学より購入した。Disuccinimidyl suberate (DSS) はPIERCE社、fluoroisothiocyanate (FITC) は和光純薬、Tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate (TRITC)-conjugated donkey anti-mouse IgG(H+L) antibody はJackson Immuno Research(U.S.A)から入手した。

## 【0031】

(方法)

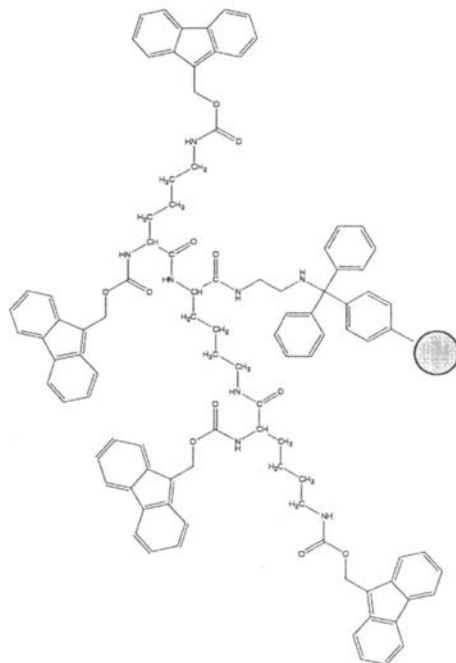
(1) 4Fmoc-4DK-NH-Resinの脱保護による4DK-NH-Resinの調製

2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -bis(N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -difluorenylmethyloxycarbonyllysinyllsinyll)- aminoethylaminotriethyl resin (4Fmoc-4DK-NH-Resin、1 g、0.5m mole Fmoc/g resin)に、20%ピペリジン(脱水DMF中)(20 ml)を添加し、室温で20分間、超音波処理(各5秒)し、Fmocを完全に除いた。上記の操作を2回繰り返して、2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -(diylsinyll)lysinyll]aminoethylaminotriethyl resin (略記名4DK-NH-Resin)を得た。

## 【0032】

【化1】

2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -bis(N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -difluorenylmethyloxycarbonyllysinyllsinyll)- aminoethylaminotriethyl resin (4Fmoc-4DK-NH-Resin)



## 【0033】

10

20

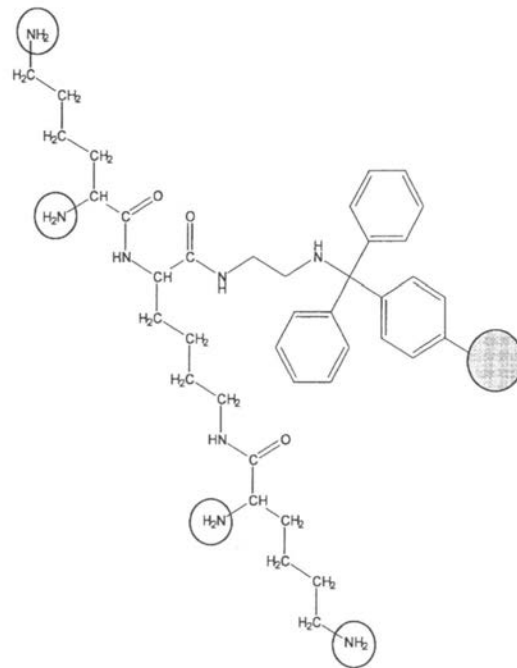
40

30

50

## 【化2】

2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -(dilysinyl)lysiny]aminoethylaminotriyl resin (4DK-NH-Resin)



10

20

## 【0034】

(2) 4DK-NH-Resin の Trimethoxy Benzoyl 化による 4MTBDK-NH-Resin の調製

4DK-NH-Resin を脱水 DMF (15 ml) を用いて 6 回洗浄した (超音波処理、各 5 sec)。各行程では、遠心分離した。洗浄した 4DK-NH-Resin に、脱水 DMF (5 ml) 及び TEA (7 mmole) (1 ml) を添加し、さらに脱水 DMF (1 ml) 中に Trimethoxybenzoyl chloride 1 mmole (TMBC、230 mg) を含む溶液を、0.1 ml ずつ上下に激しく攪拌しながら添加した。Resin の反応混合物 (全量 10 ml) を 40 で 120 分間攪拌した。得られた 4MTBDK-NH-Resin を、1% TEA を含む脱水 DMF (15 ml) で 5 回洗浄して TMBC を除去した。さらに、脱水 DMF (15 ml) で 5 回洗浄して、TEA を除去して、洗浄済みの 4MTBDK-NH-Resin を調製した。

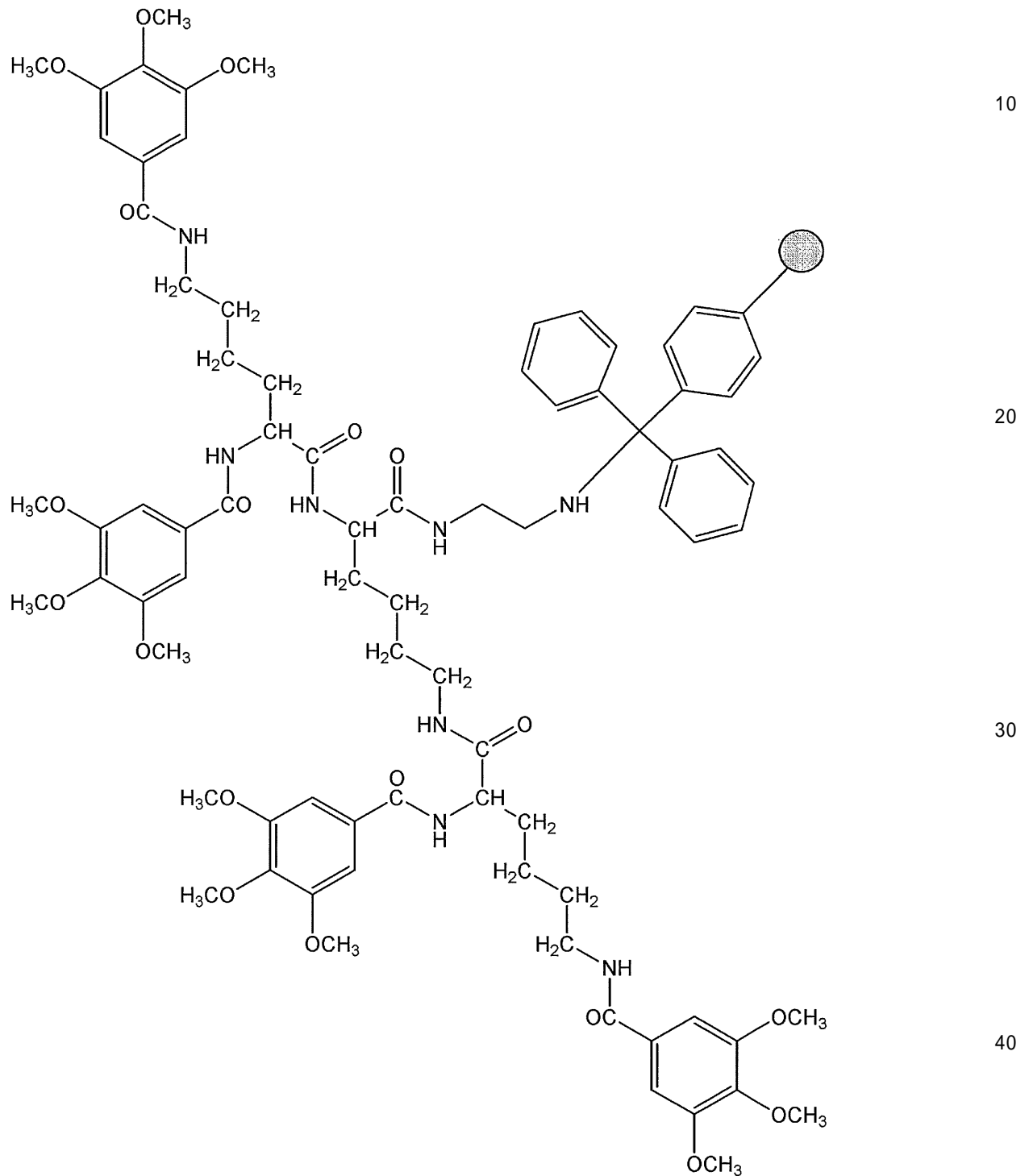
30

## 【0035】



## 【化3】

2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -bis(N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -di-3,4,5-trimethoxybenzoyllysinyllsinyll]-  
aminoethylaminotriethyl resin (略記名 4MTBDK-NH-Resin)



## 【0036】

(3) 4MTBDK-NH-Resin の脱メトキシ化によるTGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>の合成

100mgの4MTBDK-NH-Resin (500  $\mu$ LのDMF中)に、三臭化ホウ素 (BBr<sub>3</sub>、1 mol/L in ジクロロメタン) 10 ml (DMF容積の20当量容積)を激しく攪拌しながら約1~2分かけて添加

した。激しく発煙、発熱する。途中で反応の色が赤褐色から白く変わり、さらに褐色になる。添加終了後、ドライヤーで加温しながら、DMF及び塩化メチレンを除いた。固化し、赤褐色に着色した。水10mlを攪拌しながら加える。発煙、発泡する。反応混合物を3500rpmで5分間遠心分離し、樹脂層と上清を分離し、それぞれ凍結乾燥した。樹脂層を「Ppt Resin」とし、上清を「凍結乾燥上清S」とした。

【0037】

(i) 「Ppt Resin」からTGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>の精製

「Ppt Resin」100mgを脱水DMF1000 μLに懸濁し、樹脂を分離し、さらに、樹脂に脱水DMF1000 μL加え、合わせて抽出液とした。この抽出液にトリエチルアミン溶液を加え、アルカリ性にし、生じた沈殿を除き、上清にエーテル20mlを加えた。生じた沈殿を風乾し、脱水DMF500 μLを加え、不溶性沈殿を除き、さらに、エーテル10mlを加えて生じた沈殿を試料とした。MS分析を行い、純度不良の場合、脱水DMFに溶解し、不純物を除き、エーテル沈殿を行い、この操作を数回して精製した。

10

【0038】

(ii) 「凍結乾燥上清S」からTGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>の精製

100 mg 4MTBDK-NH-Resinから得られた「凍結乾燥上清S」に脱イオン水5.0 mlを加え、トリエチルアミン0.6mlでアルカリ性にし、凍結乾燥した。得られた乾燥品に脱水DMF1000 μLを加え、不溶性残渣を除き、可溶性画分にエーテル15mlを滴下し、生じた沈殿を試料とした。MS分析を行い、純度不良の場合、脱水DMFに溶解し、不純物を除き、エーテル沈殿を行い、この操作を数回して精製した。

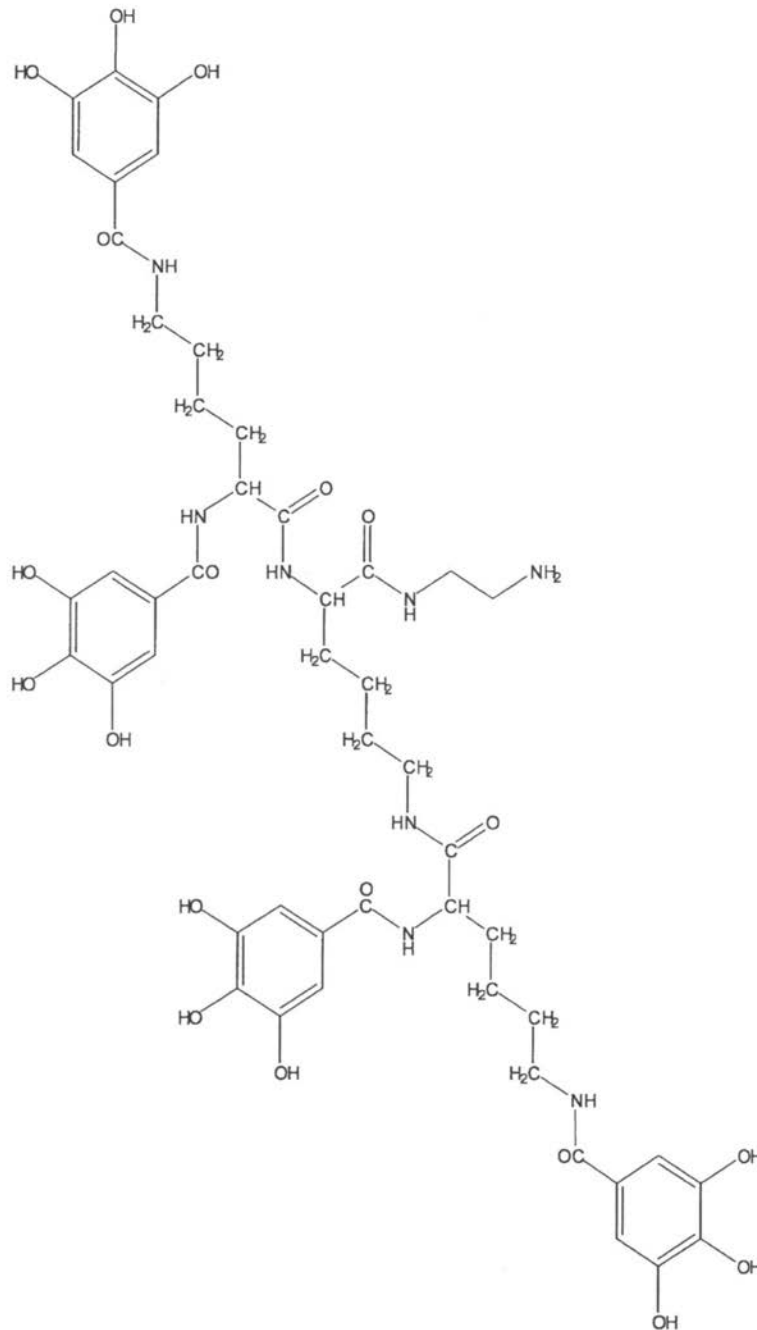
20

【0039】

「Ppt Resin」及び「凍結乾燥上清S」からの合わせた収率は80%で、4Fmoc-4DK-NH-Resin (0.5mmol of Fmoc / 1g resin) から、MS分析上均質なTGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (100mg) が得られた。上記の方法で得られた2-[N- , N- -bis(N- , N- -digalloyllysinyll) lysinyll]aminoethylamine (TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) のMALDI TOF MSで求めた質量数は1053.38であった。TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (McDS) のMALDI TOF MSを図7に示す。

【0040】

## 【化4】

2-[N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -bis(N- $\alpha$ , N- $\epsilon$ -digalloyllysiny)lysiny]aminoethylamine(TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, McDS)

10

20

30

40

## 【0041】

## 3. HIV-1の第2受容体CCR5を守る抗原

HIV-1の第2受容体CCR5の特異抗原 (undecapeptidyl arch, UPA, cDDR5) は下記の論文に従って合成した。

Misumi S, Nakayama D, Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R, Tachibana K, Nakasone T, Umeda M, Shibata H, Endo M, Takamune N, Shoji S Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/Human Immunodeficiency Virus SF162P3 Challenge. *J Immunol* 176 463-471 2006

## 【0042】

50

#### 4. アジュバンド

CpG-ODN : 5'-5tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt-3' (配列番号1) は株式会社日本バイオサービスより購入した。本化合物は5'末端が6-アミノヘキサノールによって誘導化されている。

【0043】

#### 5. Senju-Hub-AntigenとSenju-Hub-Mucosal Antigenの違い

Senju-Hub-Antigen に粘膜免疫標的化合物、TGDKが結合し、粘膜免疫に特化した抗原をSenju-Hub-Mucosal Antigenとし、例として推定構造式を図1に示す。なお、PEGは-( $\text{o-CH}_2\text{-CH}_2$ ) $_n$ -の不均一体として存在するので、あくまでも推定構造として表した。

【0044】

10

#### 6. 合成の方法：

##### (1) Senju-Poly-Amino -PEG-Hub-Antigen (Senju-A-Hub) の合成

Hexaglycerol octa(aminopropyl) polyoxyethylene(SUNBRIGHT HGEO-200PA (登録商標))154mg(7.2  $\mu\text{mole}$ )をDMF(脱水)14 mlに溶かし、Hexaglycerol octa(4-nitrophenoxy carbonyl) polyoxyethylene(SUNBRIGHT HGEO-200NP (登録商標))21 mg(1  $\mu\text{mole}$ )/1 ml DMF(脱水)を激しく、攪拌しながらすばやく加えた。室温で1夜攪拌し、反応液を水に対して3日間透析して凍結乾燥した。収量86.4 mgで収率は50%であった。図2に推定構造を示した。なお、PEGは-( $\text{o-CH}_2\text{-CH}_2$ ) $_n$ -の不均一体として存在するので、あくまでも推定構造として表した。

【0045】

20

##### (2) Senju-Poly-Activated Ester -PEG-Hub-Antigen(Senju-E-Hub) の合成

Hexaglycerol octa(4-nitrophenoxy carbonyl) polyoxyethylene(SUNBRIGHT HGEO-200 NP (登録商標)) 238mg(11.2  $\mu\text{mole}$ )をDMF(脱水)14 mlに溶かし、Hexaglycerol octa(aminopropyl) polyoxyethylene(SUNBRIGHT HGEO-200PA (登録商標))21 mg(1  $\mu\text{mole}$ )/1 ml DMF(脱水)を激しく、攪拌しながらすばやく加えた。室温で1夜攪拌し、反応液にTGDK(2  $\mu\text{mole}$ )を加え、3時間反応させ、エーテルを加え生じた沈殿を凍結乾燥した。収量140 mgで収率は80%であった。図3に推定構造を示した。

【0046】

##### (3) 付加抗原 (Appendix Antigen) の合成

精製Antigen (12  $\mu\text{mole}$ , Free base)をDMF(脱水)600  $\mu\text{l}$ に溶かし、活性エステルPEG 6  $\mu\text{mole}$  をDMF(脱水)300  $\mu\text{l}$ に別々に溶かし、活性エステルPEG溶液とした。この活性エステルPEG溶液に精製抗原溶液600  $\mu\text{l}$ を加え、室温で3~6時間反応させた。反応終了後、4で保存した。活性エステルPEGと反応した抗原の生成物はPNP4(10) - 抗原名、PNP4(20) - 抗原名、PNP8(20) - 抗原名として表し、これら化合物の活性エステル基は4で長時間(1週間以上)安定であった。

【0047】

30

1) Pentaerthritoltetra(4-nitrophenoxy carbonyl) polyoxyethyleneを原料に用いる場合。(SUNBRIGHT PTE-100NP<sup>TM</sup>, PNP4(10)と略記：SUNBRIGHT PTE-200NP<sup>TM</sup>、PNP4(20)と略記)

上記の方法に従い、下記のAppendix antigensを調製した。構造式は図4に示した

(A)PNP4(10)-UPA, PNP4(20)-UPA, PNP8(20)-UPA

(B)PNP4(10)-TGDK, PNP4(20)-TGDK, PNP8(20)-TGDK

(C)PNP4(10)-NTA, PNP4(20)-NTA, PNP8(20)-NTA

【0048】

40

2) Hexaglycerol octa(4-nitrophenoxy carbonyl) polyoxyethyleneを用いる場合(SUNBRIGHT HGEO-200NP<sup>TM</sup>、PNP8(20)と略記)

構造式は、図5に示す。

【0049】

#### 7. Senju-Hub-Antigenを用いてパイライン合成

合成したSenju-Hub-Antigen抗原168mgに、活性化した付加抗原 (Appendix Antigen) を

50

次のように加えて合成した。まず、はじめに、PNP4(10)-UPA溶液を加え室温で2分間攪拌し、次に調製した活性化PNP4(10)-TGDK溶液を加え、さらに室温で2分間攪拌した。そこへ活性化PNP4(10)-NTA溶液を加えて室温で12時間反応させた。12時間の反応後、1.1当量の精製CpG-ODN溶液を加え、室温で48時間反応させた。反応終了後、反応溶液に等量の2次精製水を加え、外液を二次精製水に対して48時間透析した。透析内溶液を凍結乾燥した。これら4つのAppendix抗原を加水分解後、アミノ酸分析計でHub抗原へのUPA、TGDK、NTAの結合量を求めた。UPAの結合量はその配列に含まれるチロシンを指標とし、TGDKは構造の中に含んでいるリシンを指標とし、NTAはNTAの溶出時間に基づき、CpG-ODNは加水分解により分解してくる6-アミノヘキサノールの溶出時間に基づいて定量を行った。この定量の結果を表1に示した。なお、図6にパイプライン合成法の概略を示した。なお、結合量を求めない場合は、透析せず、10倍量のエーテルを加え、生じた沈殿を乾燥して、次の実験に用いた。本化合物は4で長期間(1週間)安定であった。

10

**【 0 0 5 0 】**

表1：各付加抗原 (Appendix Antigen) の結合量

【表 1】

Table 1: パイプライン合成によるSenju-Hub-Mucosal Antigen中の  
各Appendix -Antigenの結合量の算出

|         | nmoles/mg |
|---------|-----------|
| UPA     | 9         |
| TGDK    | 5.6       |
| NTA     | 3.6       |
| CpG-ODN | 2         |

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図 1】図 1 は、Senju-Hub-AntigenとSenju-Hub-Mucosal Antigenの構造の違いを示す。

【図 2】図 2 は、Senju-Poly-Amino -PEG-Hub-Antigen ( Senju-A-Hub ) の合成法の概略と構造を示す。

【図 3】図 3 は、Senju-Poly-Activated Ester-PEG-Hub-Antigen ( Senju-A-Hub ) の合成法の概略と構造を示す。

【図 4】図 4 は、付加抗原 ( Appendeix Antigen ) の合成原料と合成の概略-1を示す。

【図 5】図 5 は、付加抗原 ( Appendeix Antigen ) の合成原料と合成の概略-2を示す。

【図 6】図 6 は、パイプライン合成法の概略を示す。

【図 7】図 7 はTGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>のMALDI TOF MSを示す。TGDK-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>の質量数は1

10

20

30

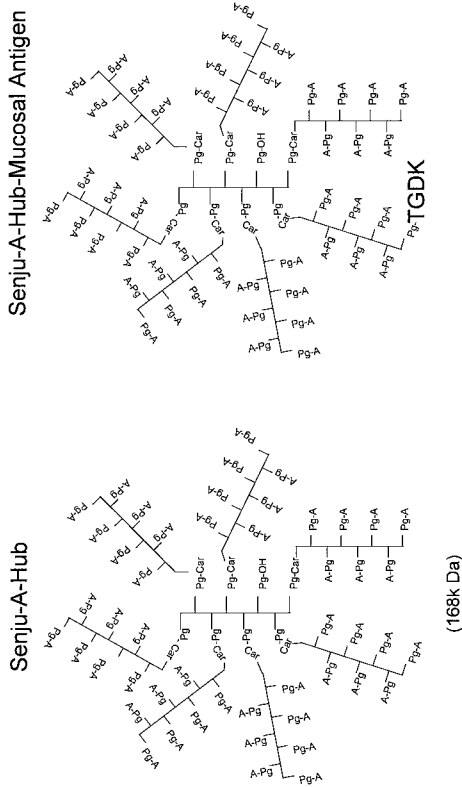
40

50

053.38で、実測値1053.03（安定同位体を含む質量数）及び理論値1052.40（安定同位体を含まない質量数）と良く一致した。

【 図 1 】

図1：Senju-Hub-AntigenとSenju-Hub-Mucosal Antigenの違い



【 図 2 】

図2：Senju-Poly-Amino-PEG-Hub-Antigen (Senju-A-Hub)の合成原料と合成法の概略

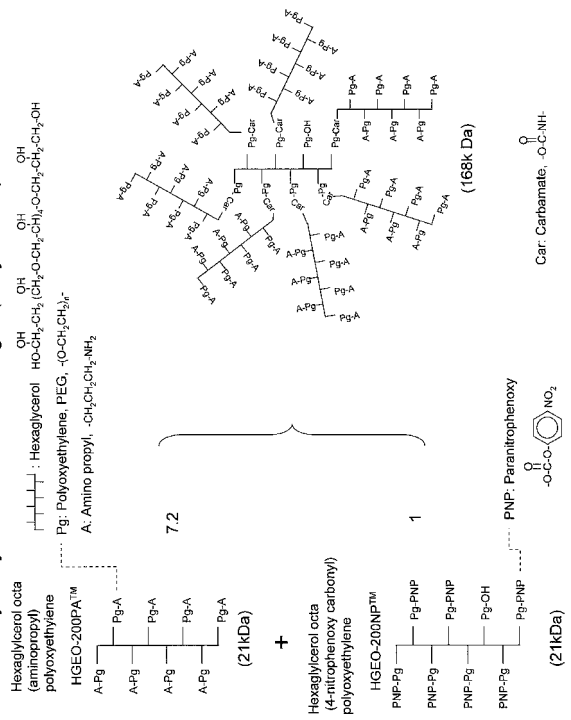


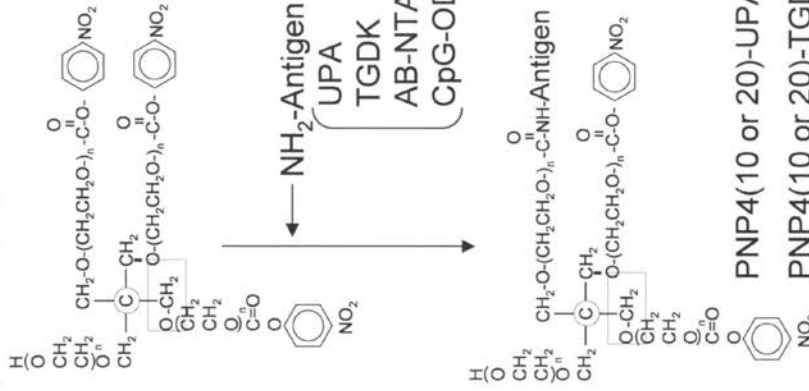




図4 Appendix antigensの合成原料と合成法の概略-1

【 図 4 】

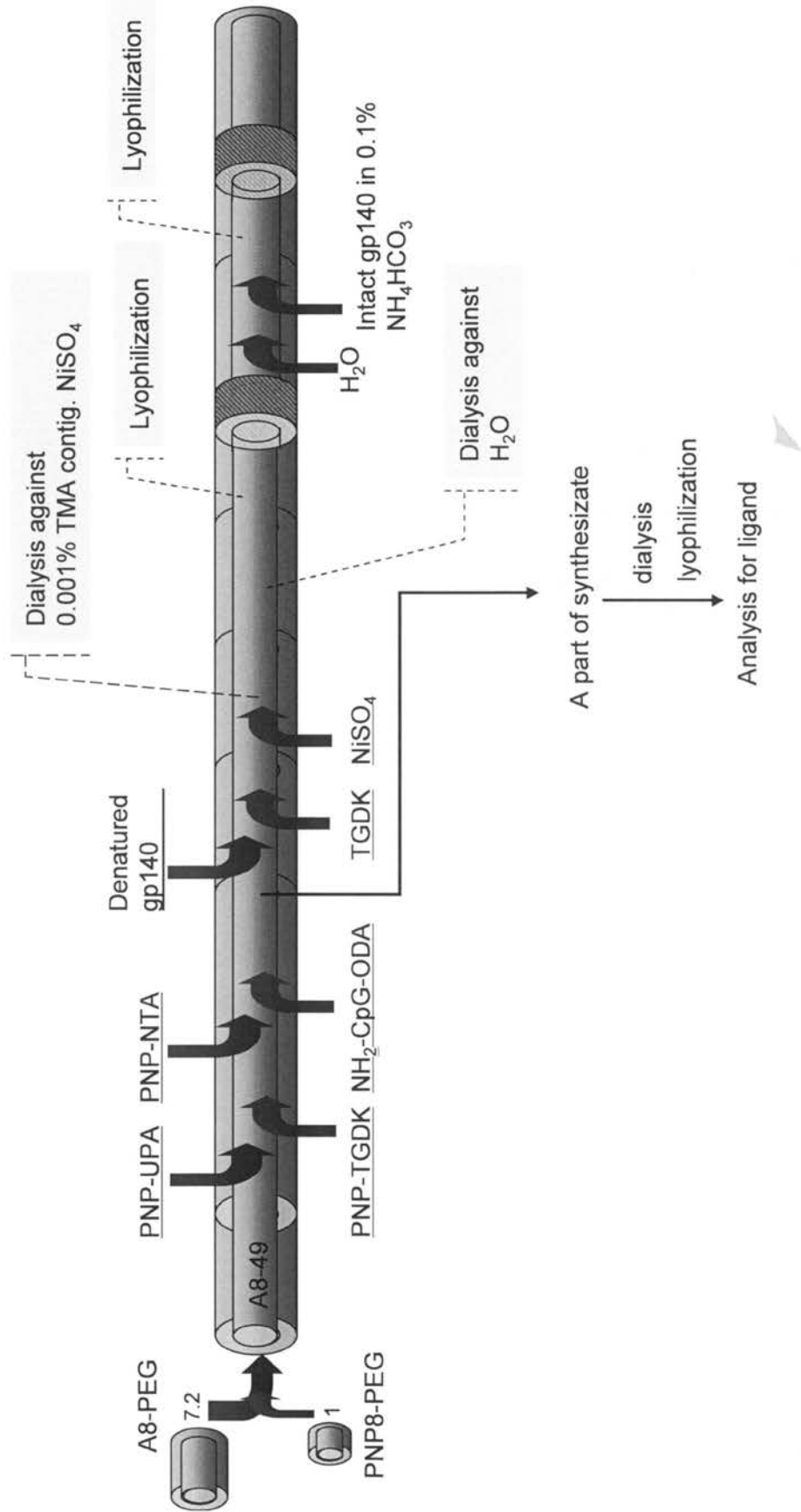
Pentaerythritol tetra(4-nitrophenoxy carbonyl)polyoxyethylene (SUNBRIGHT PTE-100NP™ or SUNBRIGHT PTE-200NP™) PNP4(10) or PNP4(20)と略記



|   |                         |
|---|-------------------------|
| <p>一般名<br/>TGDK (Tetragalloyl D-Lysine)</p> <p>化学名<br/>2-[N-α, N-ε-bis(N-α, N-ε-digalloyllysiny)] aminoethylamine</p> | <p>AB-NTA free acid</p> |
| <p>総称名<br/>UPA<br/>(Undecapeptidyl arch cyclic peptide)</p>   |                         |

【 図 6 】

図6:パイプライン合成法の概略



【 配列表 】

0005428017000001.app

## フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0249130 (US, A1)

特表2007-505928 (JP, A)

特開2003-113241 (JP, A)

特表2002-541923 (JP, A)

特表2002-532387 (JP, A)

CATALOGUE Ver.7.1 WORLD-WIDE LEADER in DDS PEG DERIVATIVES, PHOSPHOLIPIDS AND DRUG DELIVERY MATERIALS FOR PHARMACEUTICAL PRODUCTS AND FORMULATIONS, NOF CORPORATION, 2005年 9月, p. 12-13

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08G 65/00 - 67/04

C08G 81/00 - 85/00

A61K 39/00 - 39/44

A61K 49/00 - 49/04

C07K 1/00 - 19/00

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )