



(51) 国際特許分類6 C07K 7/08, A61K 38/10	A1	(11) 国際公開番号 WO98/43995 (43) 国際公開日 1998年10月8日(08.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01366 (22) 国際出願日 1998年3月26日(26.03.98) (30) 優先権データ 特願平9/92801 1997年3月28日(28.03.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 生化学工業株式会社(SEIKAGAKU CORPORATION)[JP/JP] 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 藤井信孝(FUJII, Nobutaka)[JP/JP] 〒520-0248 滋賀県大津市仰木の里東六丁目5-3 Shiga, (JP) (74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)		
(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書		
(54) Title: NOVEL ANTI-HIV COMPLEXES AND MEDICINAL COMPOSITIONS (54) 発明の名称 新規抗HIV複合体及び医薬組成物 gp120 / AZT-Suc-T22 $K_{aff} = 2.20 \times 10^5 M$ CD4 / AZT-Suc-T22 $K_{aff} = 3.44 \times 10^5 M$ gp120 / AZT-Glu-T22 $K_{aff} = 6.05 \times 10^6 M$ CD4 / AZT-Glu-T22 $K_{aff} = 1.07 \times 10^7 M$ a ... Relative response (RU) b ... Time(s)		
(57) Abstract Medicinal compositions comprising complexes in which one or more reverse transcriptase inhibitors and/or HIV protease inhibitors are chemically bonded to polypeptides having affinity for HIV surface protein gp120 and/or HIV host target cell surface protein CD4 and which thus can lead substances with anti-HIV activity on the target cells due to the affinity for the CD4-positive cell surface protein and HIV surface protein, thus achieving high anti-HIV activity.		

(57)要約

本発明は、H I V表面タンパク質 g p 1 2 0 及び／又はH I V宿主標的細胞表面タンパク質 C D 4 に親和性を有するポリペプチドに、1 又は2 種以上の逆転写酵素阻害剤及び／又はH I Vプロテアーゼ阻害剤が化学的結合により結合している複合体であるため、C D 4 陽性細胞表面タンパク質及びH I V表面タンパク質への親和性により抗H I V活性物質を効果的に標的細胞上へ誘導し、高い抗H I V活性を有する医薬組成物を提供することができる

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア	FI フィンランド	LR リベリア	SK スロヴァキア
AM アルメニア	FR フランス	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AT オーストリア	GA ガボン	LT リトアニア	SN セネガル
AU オーストラリア	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LV ラトヴィア	TD チャード
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	MC モナコ	TG トーゴ
BB バルバドス	GH ガーナ	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BE ベルギー	GM ガンビア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BJ ベナン	GR ギリシャ	ML マリ	UA ウクライナ
BR ブラジル	HR クロアチア	MN モンゴル	UG ウガンダ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MR モーリタニア	US 米国
CA カナダ	ID インドネシア	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CG コンゴ	IL イスラエル	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CH スイス	IS アイスランド	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CI コートジボアール	IT イタリア	NO ノルウェー	
CM カメルーン	J P 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CN 中国	KE ケニア	PL ポーランド	
CU キューバ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CY キプロス	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
CZ チェッコ	KR 韓国	RU ロシア	
DE ドイツ	KZ カザフスタン	SD スーダン	
DK デンマーク	LC セントルシア	SE スウェーデン	
EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール	
ES スペイン	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア	

明細書

新規抗H I V複合体及び医薬組成物

技術分野

本発明は、抗H I V活性を有する新規物質及び当該物質を有効成分として含有する医薬組成物に関する。更に詳しくは抗H I V活性を有するポリペプチドに、逆転写酵素阻害剤及び／又はH I Vプロテアーゼ阻害剤が化学的結合により結合した複合体、及び当該物質を有効成分として含有する抗H I V剤等の医薬組成物に関する。

背景技術

ヒト免疫不全ウイルス（H I V）は、後天性免疫不全症候群（A I D S）やA I D S関連症候群等の様々な臨床症状を引き起こすことが知られている。

抗H I V剤として、H I Vの増殖の各段階を阻害する薬剤が知られているが、実際に薬として認可されているか、あるいは臨床試験が行なわれている薬剤としては、逆転写酵素阻害剤（例えば、ヌクレオシド系の3'－アジド－3'－デオキシチミジン（以下A Z Tとも記載する）、2'，3'－デオキシイノシン（以下d d Iとも記載する）、2'，3'－デオキシシチジン（以下d d Cとも記載する）等）やH I Vプロテアーゼ阻害剤（N'－〔1（S）－ベンジル－3－〔4 a（S），8 a（S），3（S）－（tert－ブチルカルバモイル）デカヒドロイソキノリン－2－イル〕－2（R）－ヒドロキシプロピル〕－N''－キノリン－2－イルカルバモイル）－L－アスパラギンアミド（以下R o 3 1－8 9 5 9とも記載する）等）が知られている。

通常、これらの抗H I V剤は、大量にしかも長期間投与することが必要であるため、副作用（例えば骨髄障害など）や、逆転写酵素あるいはH I Vプロテアーゼのアミノ酸変異による薬剤耐性ウイルスの出現等の問題が生じていた。

これらの問題の解決および抗ウイルス効果の増強を目的として、A Z Tと、d d Iあるいはd d Cとを組合せて使用すること（H I V感染症・A I D S，日本臨床社，p316-326(1993)）、R o 3 1－8 9 5 9と、A Z Tあるいはd d Cとを

組合せて使用すること（J. Infect. Dis., 166(5), p1143-1146(1992)）および 3 T C と A Z T、d d I あるいは R o 3 1 - 8 9 5 9 とを組合せて使用すること（特開平 6 - 2 3 4 6 4 1）が知られている。

しかしながら、これらの組合せによる使用においても、抗ウイルス活性は不十分であり、しかも上記問題の解決も不十分である。

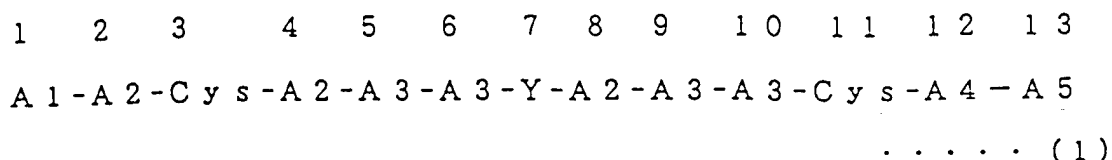
ところで、抗ウイルス活性を有する新規なポリペプチド及びこのポリペプチドを有効成分とする抗 H I V 剤が知られており（国際公開 WO 9 2 / 0 4 3 7 4、特開平 5 - 1 6 3 2 9 8、国際公開 WO 9 5 / 1 0 5 3 4）、当該ポリペプチドは A Z T と比して同程度の抗 H I V 活性を示すことが知られており、逆転写酵素阻害剤や H I V プロテアーゼ阻害剤と組み合わせて投与することにより優れた抗 H I V 活性を示すことも知られている（特開平 9 - 2 5 2 4 0）。

逆転写酵素阻害剤や H I V プロテアーゼ阻害剤などの毒性による副作用は、上記抗 H I V 活性を有するポリペプチドと逆転写酵素阻害剤または H I V プロテアーゼ阻害剤等とを組み合わせた投与によっても低減することはできず、解決すべき問題点として未だに残されており、より毒性の低い抗 H I V 剤が期待されている。

発明の開示

本発明者は優れた抗 H I V 活性を保持し、且つより副作用の少ない抗 H I V 剤として有用な複合体を得るべく、抗 H I V 活性を有し H I V 表面タンパク質に親和性が高いポリペプチドを基に鋭意研究した結果、当該ポリペプチドのアミノ（N）末端に逆転写酵素阻害剤または H I V プロテアーゼ阻害剤等の抗 H I V 活性物質を化学的に結合した複合体は、抗 H I V 剤として使用した場合に優れた抗 H I V 活性を示し、副作用も低減する事が可能であることを見だし本発明を完成した。

即ち、本発明は H I V 表面タンパク質に親和性を持つポリペプチド、好ましくは下記式（1）のポリペプチドに、1 又は 2 種以上の抗 H I V 活性物質（逆転写酵素阻害剤及び／又は H I V プロテアーゼ阻害剤）が化学的結合により結合してなる複合体及び該複合体を有効成分とする医薬組成物からなる。



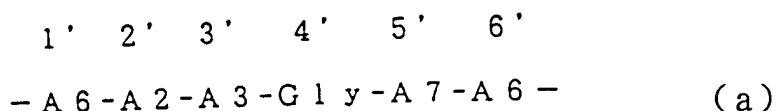
[式中、A1はH- (A2のアミノ基由来) 或いはリジン、アルギニンおよびオルニチンから選ばれる1個の塩基性アミノ酸又はこれらのアミノ酸残基から選択された同一又は異なるアミノ酸残基を少なくとも2個有するペプチド残基、或いは該塩基性アミノ酸残基若しくはペプチド残基のアミノ末端アミノ酸残基のN- α 位の水素原子がアシル基若しくは置換チオカルバモイル基で置換されているN- α アシル置換アミノ酸残基、N- α アシル置換ペプチド残基、N- α 置換チオカルバモイル化アミノ酸残基またはN- α 置換チオカルバモイル化ペプチド残基を示し；

A2は独立してチロシン、フェニルアラニンまたはトリプトファン残基を示し；

A3は独立してリジンまたはアルギニン残基を示し；

A4はリジンおよびアルギニンから選ばれるアミノ酸の少なくとも1個を有するアミノ酸残基またはペプチド残基を示し；

A5は-OH (A4のカルボキシル基由来) 又は-NH₂ (A4のカルボキシル基の酸アミド由来) を示し；Yは下記式(a)で示されるペプチド残基



(式中、A2及びA3は上記(1)式におけると同義である。

A6は独立してアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システインまたはメチオニン残基を示し、

A7はチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システインまたはメチオニン残基を示し、

Glyはグリシン残基を示す。

但し、1'位と6'位が共にシステイン残基である場合にはこれらはジスルフィド結合により連結していてもよい。)、または

D-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、プロリル-D-リジン、プロリル-D-アルギニン、D-リジル-プロリン、D-アルギニル-プロリ

ン、グリシルーリジン、グリシルーアルギニン、オルニチルーグリシン、グリシルーオルニチン、リジルーグリシン及びアルギニルーグリシンで示されるアミノ酸 2 個から構成されたジペプチドから選ばれるものであり、その構成アミノ酸である D-リジン、リジン、D-オルニチン又はオルニチンの側鎖 ω -アミノ基の水素原子はアシル基で置換されていてもよいペプチド残基を示し；

C y s はシステイン残基を示し、3 位と 11 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよい]

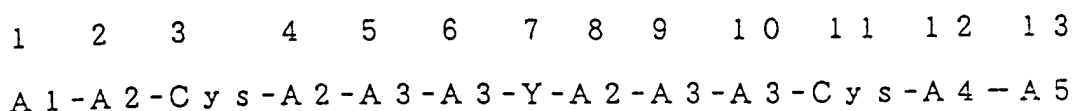
本発明の複合体は、少なくとも上述のポリペプチドと、A Z T 等の抗 H I V 活性物質とが化学的結合により結合されていることにより、生体内において H I V 感染の標的となる C D 4 陽性細胞へ抗 H I V 活性物質を運搬し、当該細胞内において抗 H I V 活性物質を遊離して優れた抗 H I V 活性を示すものであり、また、この新規複合体を有効成分として含有する組成物は安全性が高く、より副作用の少ない抗 H I V 剤などの医薬組成物として有効である。

(発明の実施の形態)

以下に本発明を更に詳細に説明する。

本発明の新規複合体（以下本発明物質と記載することもある。）は H I V 表面タンパク質 g p 1 2 0 及び／又は H I V 宿主標的細胞表面タンパク質 C D 4 に親和性を有するポリペプチドに、1 又は 2 種以上の逆転写酵素阻害剤及び／又は H I V プロテアーゼ阻害剤が化学的結合により結合している複合体である。

本発明を構成するポリペプチドは、H I V 表面タンパク質 g p 1 2 0 及び／又は H I V 宿主標的細胞表面タンパク質 C D 4 に対し親和性を有するポリペプチドであれば特に限定はされず、そのようなポリペプチドとして、例えば抗体或いは下記式（1）で表されるポリペプチドなどが挙げられるが、H I V の宿主標的である C D 4 陽性細胞（宿主標的細胞）の細胞表面タンパク質 C D 4 とも親和性を有し（Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 555-559(1996), Biochem. Biophys. Acta., 1298, 37-44(1996)）、それ自体抗 H I V 活性を有する下記式（1）で表されるポリペプチドが好ましい。



・・・・・・ (1)

[式中、A 1 はH- (A 2 のアミノ基由来) 或いはリジン、アルギニンおよびオルニチンから選ばれる 1 個の塩基性アミノ酸又はこれらのアミノ酸残基から選択される同一又は異なるアミノ酸残基を少なくとも 2 個有するペプチド残基、或いは該塩基性アミノ酸残基若しくはペプチド残基のアミノ末端アミノ酸残基のN- α 位の水素原子がアシル基若しくは置換チオカルバモイル基で置換されているN- α アシル置換アミノ酸残基、N- α アシル置換ペプチド残基、N- α 置換チオカルバモイル化アミノ酸残基またはN- α 置換チオカルバモイル化ペプチド残基を示し；

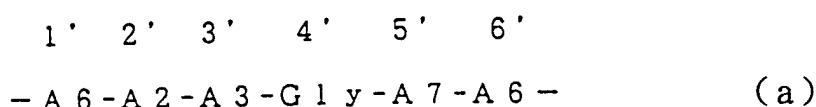
A 2 は独立してチロシン、フェニルアラニンまたはトリプトファン残基を示し；

A 3 は独立してリジンまたはアルギニン残基を示し；

A 4 はリジンおよびアルギニンから選ばれるアミノ酸の 1 個または少なくとも 2 個を有するアミノ酸残基またはペプチド残基を示し；

A 5 は-OH (A 4 のカルボキシル基由来) 又は-NH₂ (A 4 のカルボキシル基の酸アミド由来) を示し；

Y は下記式 (a) で示されるペプチド残基



(式中、A 2 及び A 3 は上記 (1) 式におけると同義である。

A 6 は独立してアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システインまたはメチオニン残基を示し；

A 7 はチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システインまたはメチオニン残基を示し；

Gly はグリシン残基を示す。

但し、1' 位と 6' 位が共にシステイン残基である場合にはこれらはジスルフィド結合により連結していてもよい。)、または

D-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、プロリル-D-リジン、プロリル-D-アルギニン、D-リジル-プロリン、D-アルギニル-プロリン、グリシル-リジン、グリシル-アルギニン、オルニチル-グリシン、グリシ

ルーオルニチン、リジルーグリシン及びアルギニルーグリシンで示されるアミノ酸2個から構成されるジペプチドから選ばれるものであり、且つその構成アミノ酸であるD-リジン、リジン、D-オルニチン又はオルニチンの側鎖ω-アミノ基の水素原子はアシル基で置換されていてもよいペプチド残基を示し；

Cysはシステイン残基を示し、3位と11位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよい。尚、式(1)において、アミノ酸の位置を示す数字は、アミノ酸配列順序を大まかに示すが、アミノ酸残基と必ずしも一対一に対応するものでなく、便宜的にN末端からC末端へ付けたものであり、N末端由来のH、C末端由来の-OH及び-NH₂及びそれ以外のアミノ酸配列内部のアミノ酸残基が1個存在する場合は1個の数字が使用され、該アミノ酸残基が定義に従って、ペプチド残基である場合は、その構成アミノ酸残基の数の数字が使用される。

式8(1)で表されるポリペプチドは、カプトガニ由来のタキプレシン族ポリペプチドを基に合成されたポリペプチドであるため、カプトガニ由来のタキプレシンI、タキプレシンII、タキプレシンIII、ポリフェムシンI又はポリフェムシンII(代謝, 26, p429-439(1989))等を上記ポリペプチドの代替として使用することも可能である。

本明細書中における抗HIV活性を有するとは、HIVの感染を抑制する、HIVの増殖を抑制する、HIVを減少させるなどの効果を発現する性能を有することを意味する。

上記式(1)で表されるポリペプチド(以下便宜上ポリペプチド鎖と記載する)は、それ自体公知のポリペプチド合成法、特に液相合成法あるいは固相合成法(新生化学実験講座1 タンパク質VI, 東京化学同人, p3-29(1992))によって製造することができる。また、これらのポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを遺伝子組み換え技術により宿主細胞に導入し、発現させる方法によっても合成できる。

すなわち例えば固相合成法の場合、例えばポリペプチド鎖のカルボキシル末端アミノ酸残基に対応する、N-保護アミノ酸のカルボキシル基を直接、あるいは場合により介在物を介して、アミノ基あるいは水酸基等の適宜な官能基を有する

不溶性樹脂に結合させた後、前記式(1)で示されるアミノ酸配列の11位から1位までの各保護アミノ酸を固相合成法に従って順次結合し保護基保護化ペプチド樹脂とする。

不溶性樹脂としては、カルボキシル(C)末端のN-保護アミノ酸のカルボキシル基と直接、あるいは場合により介在物を介して共有結合が可能であり、且つ、その後脱離可能なものであれば特に限定はされない。このような不溶性樹脂としては、当該不溶性樹脂を脱離後にアミノ酸あるいはペプチド酸を遊離する樹脂あるいはアルコキシ型樹脂(Alko-resin等)、又は脱離後にアミノ酸アミドあるいはペプチドアミドを遊離するアミド型樹脂(Rink amide resin等)が挙げられる。具体的には、アミノ酸あるいはペプチド酸を遊離する樹脂としてはクロロメチル樹脂、オキシメチル樹脂、PAM(4-(ヒドロキシメチル)フェニルアセトアミドメチル)樹脂及びAlko-resinとしては、p-アルコキシベンジルアルコール(Wang)樹脂、ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸(HMPA)樹脂、ジアルコキシベンジルアルコール型樹脂、トリアルコキシジフェニルメチルアルコール型樹脂等が挙げられ、アミド型樹脂としては、ベンズヒドリルアミン(BHA)樹脂、p-メチルベンズヒドリルアミン(MBHA)樹脂、トリアルコキシベンズヒドリルアミン型樹脂、PAL(peptide amide linker)樹脂及びRink amide resin(4-(2',4'-ジメトキシフェニル-アミノメチル)-フェノキシ樹脂等)等が挙げられる。

保護アミノ酸とは、官能基を公知の方法により保護基で保護したアミノ酸であり、各種の保護アミノ酸が市販されている。保護基は、ペプチドの合成条件に応じ適当な物をそれ自体公知の中から選択することが好ましい。保護アミノ酸の結合は、通常の前記法に従って行うことができるが、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)法、DCC-HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)法、DIPCI(N,N-ジイソプロピルカルボジイミド)-HOBt法、BOP(ベンゾトリアゾリル-N-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩)-HOBt法、HBTU(2-(1H)-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロ

ホスフェート) -HOBt法、対称無水物法等が好ましい。これらの縮合反応は、通常、ジクロロメタン、ジメチルホルムアミド(DMF)、N-メチルピロリドン(NMP)等の有機溶媒又はそれらの混合物中で行われる。

式(1)中A1においてアミノ末端アミノ酸残基のN- α 位の水素原子がアシル基で置換されているN- α -アシルアミノ酸残基またはN- α -アシルペプチド残基を選択する場合は、目的とする上記保護基保護化ペプチド樹脂又は該保護基保護化ポリペプチド樹脂より遊離させたペプチドと、該当するアシル基の酸無水物または該当するカルボン酸により、縮合剤を用いてペプチド樹脂又はペプチドのN末端アミノ基をアシル化し、N-アシル化ペプチド樹脂とする。また、前記式(1)中A1においてアミノ末端N- α 位の水素原子が置換チオカルバモイル基で置換されているN- α -置換チオカルバモイル化アミノ酸残基またはN- α -置換チオカルバモイル化ペプチド残基を選択する場合は、目的とする保護基保護化ペプチド樹脂または該保護基保護化ポリペプチド樹脂より遊離させたペプチドと置換イソチオシアネート化合物を微アルカリ条件下に反応することにより本発明物質のN末端N- α -置換チオカルバモイル化ポリペプチドを得ることができる。この場合不溶性樹脂を適宜選択することにより13位のアミノ酸残基のカルボキシル末端はフリー(式(1)においてA5が-OHに相当)であることもできるし、あるいは酸アミド(式(1)においてA5が-NH₂に相当)に変換することもできる。当該保護基を有し、不溶性樹脂に結合したポリペプチドは以下保護基保護化ポリペプチド樹脂とも記載する。

該保護基保護化ポリペプチド樹脂を構成するポリペプチド鎖(保護基は記載せず)の具体例としては、下記表1に示すものを挙げることができる。

表 1

	ポ リ ペ プ チ ド												
	1	2	3	4	5	6	7	7	7	7	7	7	13
(1)													-NH ₂
(2)													-NH ₂
(3)													-NH ₂
(4)													-NH ₂
(5)													-NH ₂
(6)													-NH ₂
(7)													-NH ₂
(8)													-NH ₂
(9)													-NH ₂
(10)													-NH ₂
(11)													-NH ₂
(12)													-NH ₂
(13)													-NH ₂
(14)													-NH ₂
(15)													-NH ₂

表 1 つづき

1	2	3	4	5	6	7	7	7	7	7	7	8	9	10	11	12	13
(16)	Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(17)	Arg-Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(18)	Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Phe-Lys-Gly-Ser-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(19)	Arg-Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Phe-Lys-Gly-Ser-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(20)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Ala-Tyr-Lys-Gly-Leu-Ala-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(21)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Ala-Tyr-Lys-Gly-Val-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(22)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Ser-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(23)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(24)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(25)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Phe-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(26)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Phe-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(27)	Arg-Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(28)	Arg-Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Trp-Lys-Gly-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(29)	Arg-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(30)	Arg-Arg-Tyr-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(31)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Arg	-NH ₂															
(32)	Lys-Lys-Trp-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Lys	-NH ₂															

表 1 つぎ

[illegible]

表 1 つづき

	1	2	3	4	5	6	7	7	7	7	7	7	7	7	8	9	10	11	12	12	13
(69) Ac	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(70) Oct	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(71) Laur	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(72) Myr	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(73) Parm	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(74) FTC	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(75) PTC	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
(76) Nicot	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
							ϵ -N-Ac														
(77)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
							ϵ -N-But														
(78)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
							ϵ -N-But														
(79) Parm	-Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂
							ϵ -N-But														
(80) Parm	-Orn-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys						-DLys		-Pro						-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg						-NH ₂

同様に、表1においてカルボキシ末端にカルボキシル基をもつポリペプチド鎖(式(1)においてA5が-OHに相当)も挙げることができる。

本明細書のポリペプチドの標記において、各記号は国際的に認められた三文字表示によるアミノ酸残基または置換アミノ酸残基を表し、各記号は下記アミノ酸残基または置換アミノ酸残基を示す。尚、アミノ酸表示の前に「D-」が無い場合は、全て「L-」体であることを意味する。

Arg: アルギニン、Trp: トリプトファン、Cys: システイン、Tyr: チロシン、Lys: リジン、Gly: グリシン、Phe: フェニルアラニン、Ile: イソロイシン、Ser: セリン、Leu: ロイシン、Met: メチオニン、Val: バリン、Ala: アラニン、Pro: プロリン、Orn: オルニチン、DOrn: D-オルニチン、DArg: D-アルギニン、DLys: D-リジン、Ac-Arg: N- α -アセチルアルギニン、Oct-Arg: N- α -オクタノイルアルギニン、Laur-Arg: N- α -ラウリルアルギニン、Myr-Arg: N- α -ミリスチルアルギニン、Parm-Arg: N- α -パルミトイルアルギニン、FTC-Arg: N- α -フルオレセインチオカルバミン化アルギニン、PTC-Arg: N- α -フェニルチオカルバミン化アルギニン、Nicot-Arg: N- α -ニコチニルアルギニン、 ϵ -N-Ac-DLys: ϵ -N- ω -アミノアセチル-D-リジン、 ϵ -N-But-DLys: ϵ -N- ω -アミノブチリル-D-リジン、Parm-Orn: N- α -パルミトイルオルニチン

また、アミノ酸の側鎖官能基の保護基として用いられるものとして例えば、次のものが例示される。

But: 第三ブチル、Boc: 第三ブチルオキシ、Fmoc: 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホ

当該保護基保護化ポリペプチド樹脂からポリペプチド鎖のみを得る方法としては、公知の方法及び後述の一工程による保護基及び不溶性樹脂の脱離とジスルフィド結合の形成方法が挙げられる。

すなわち、 α -アミノ基の保護基の脱離試薬としては、TFA(トリフルオロ酢酸)/ジクロロメタン、HCl/ジオキサン、ピペリジン/DMF又はピペリ

ジン／NMP等が用いられ、該保護基の種類により適宜選択する。

保護基保護化ポリペプチド樹脂は、フッ化水素、TFMSA（トリフルオロメタンスルホン酸）、TMSOTf（トリメチルシリルトリフラート）、TMSBr（トリメチルシリルブロミド）、TMSCl（トリメチルシリルクロリド）又はTFAなどで処理することにより、樹脂及び保護基を同時に脱離させることができる。上記の脱離試薬は、合成ストラテジー（Boc法又はFmoc法）、使用する不溶性樹脂、保護基の種類により適宜選択する。

さらに得られたポリペプチド鎖は、その3位と11位、又は場合により1'位と6'位のシステイン間において、メルカプト基を介してジスルフィド結合（—S—S—）を形成させることができる。これらのジスルフィド結合は、それ自体公知の方法、例えば、温和な空気酸化等により形成することができる。通常、大気中の酸素やフェリシアン酸塩（例えば、フェリシアン化カリウム）のような酸化剤を用いる。

このようにして保護基、樹脂を脱離し、ジスルフィド結合を形成して生じたポリペプチドはさらに公知の方法により単離精製することができるが、逆相高速液体クロマトグラフィーによる方法が最も効果的である。

本発明物質において、上記保護基保護化ポリペプチド樹脂に、抗HIV活性物質である逆転写酵素阻害剤及び／又はHIVプロテアーゼ阻害剤を化学的に結合する。逆転写酵素阻害剤は、HIVの逆転写酵素の活性を阻害する物質であって、ヌクレオシド系の該阻害剤及び非ヌクレオシド系の該阻害剤に分けられる。ヌクレオシド系の該阻害剤は、ピリミジン塩基、プリン塩基、イミダゾール塩基又はトリアゾール塩基のいずれかの塩基と、少なくとも一つの水酸基を有するフラノース又はそのアシクロ体とから構成されるヌクレオシド又はその類縁体が好ましく、例えば、AZT（CAS REGISTRY NUMBERS: 30516-87-1: ジドブジン(zidovudine)）、ddI（CAS REGISTRY NUMBERS: 69655-05-6: ジダノシン(didanosine)）、ddC（CAS REGISTRY NUMBERS: 7481-89-2: ザルシタビン(zalcitabine)）、2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシチミジン（CAS REGISTRY NUMBERS: 3056-17-5: d4T: スタブジン(stavudine)）、3'-チア-2', 3'-ジデオキシシチジン（CAS REGISTRY NUMBERS: 134678-17-4: 3TC:

ラミブジン(lamivudine))、2' - β -フルオロ-d d C、3' -フルオロチミジン (CAS REGISTRY NUMBERS: 25526-93-6: F L T)、9 - (2 -ホスホニル-メトキシエチル) -アデニン (CAS REGISTRY NUMBERS: 106941-25-7: P M E A)、6 - C 1 - d d I、6 - C 1 - d d C等が挙げられる。

また非ヌクレオシド系の該阻害剤としては例えば、テトラヒドロイミダゾーベンゾジアゼピン-オンもしくは-チオン (T I B O) 誘導体 (具体的には、(+)-S-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-5-メチル-6-(3-メチル-2-ブテニル) イミダゾ [4, 5, 1-j k] [1, 4] ベンゾジアゼピン-2 (1 H) -チオン (CAS REGISTRY NUMBERS: 167206-29-3: R 8 2 9 1 3)、ヒドロキシエトキシ-メチルフェニルチオチミン (H E P T) 誘導体、ネビラピン (Nevirapine) (CAS REGISTRY NUMBERS: 129618-40-2)、ピリジノン誘導体等が挙げられる。

これらのうち、上記ポリペプチド鎖との結合の容易性と、DNA中に取り込まれることによって効果的にDNA合成を阻害する機序を考慮すると、ヌクレオシド系の逆転写酵素阻害剤が好ましく、ヌクレオシド系のH I V転写酵素阻害剤の中でも、好ましくはすでに臨床においてヒトに投与されているA Z T、d d I、d d C、d 4 T又は3 T Cであり、より好ましくは、該ポリペプチド鎖との化学的に結合して本発明物質とした際に特に相乗的に抗ウイルス活性が増強されるA Z Tである。これらのヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤等はH I VがRNAから逆転写によってDNAを合成する際にDNA中に取り込まれ、その結果DNAの合成を阻害するために非天然型ヌクレオシド又はヌクレオシドアナログであることが好ましい。上記ヌクレオシドアナログとは、ヌクレオシドと類似の立体構造をもつ非ヌクレオシド化合物を指す。また、これらの逆転写酵素阻害剤は、市販のものあるいは既知の合成法に従って調製したものを使用することが可能である。

また、H I Vプロテアーゼ阻害剤としては、H I Vのプロテアーゼの活性を阻害する物質であって、該プロテアーゼの基質遷移状態ミミック化合物である阻害剤が好ましい。基質遷移状態ミミックとは、酵素の基質結合部位に結合可能な物質で、酵素基質複合体における基質と類似の立体構造を有する物質を指す。例え

ば、R o 3 1 - 8 9 5 9 (CAS REGISTRY NUMBERS: 127779-20-8 : サキナビル(saquinavir))、A - 7 7 0 0 3 (CAS REGISTRY NUMBERS: 134878-17-4)、A - 8 0 9 8 7 (CAS REGISTRY NUMBERS: 144141-97-9)、K N I - 9 3 (CAS REGISTRY NUMBERS: 138258-64-7)、K N I - 1 0 2 (CAS REGISTRY NUMBERS: 139694-65-8)、K N I - 1 7 4、K N I - 2 2 7 (CAS REGISTRY NUMBERS: 147384-69-8)、K N I - 2 7 2 (CAS REGISTRY NUMBERS: 147318-81-8)、L - 7 3 5 5 2 7 (CAS REGISTRY NUMBERS: 150378-17-9 : インジナビル(indinavir))、S C - 5 2 1 5 1 (CAS REGISTRY NUMBERS: 143224-34-4 : テリナビル(Telinavir))、V X - 4 7 8、A B T - 5 3 8 (CAS REGISTRY NUMBERS: 155213-67-5 : リトナビル(ritonavir))、D M P - 3 2 3 (CAS REGISTRY NUMBERS: 151867-81-1)、U - 9 6 9 8 8 (CAS REGISTRY NUMBERS: 149394-65-0) 等が挙げられる。より好ましくは高い抗ウイルス活性を有するR o 3 1 - 8 9 5 9、L - 7 3 5 5 2 7 及びK N - 2 7 2 が好ましいが特に限定はされない。これらH I Vプロテアーゼ阻害剤としては、市販のものあるいは既知の合成法に従って調製したものを使用することができる。R o 3 1 - 8 9 5 9 については例えば、J. Med. Chem. 36, p2300-2310(1993)に記載の調製法が挙げられる。

本発明物質では、上記ポリペプチド鎖と上記抗H I V活性物質とが化学的に結合しているが、その結合が化学的に形成された結合であれば特に限定はされず、具体的には、エステル結合、アミド結合、エーテル結合、ジスルフィド結合等が挙げられるが、これらのうちエステル結合は、結合した抗H I V活性物質が生体内の標的細胞内に運搬された後、細胞内エステラーゼ等で切断が可能な結合であり抗H I V活性物質の作用点近傍で該抗H I V活性物質を遊離しうる。エステル結合は、運搬途中に容易に切断されることがない程度の安定性を有する結合であるので好ましいが、これに限定はされない。

本発明物質において、該抗H I V活性物質との結合する該ポリペプチド鎖の部位は特に限定されないが、該ポリペプチド鎖自体とH I V表面タンパク質g p 1 2 0 及び宿主標的細胞であるC D 4 陽性細胞の細胞表面タンパク質C D 4 との親和性を維持することが可能なアミノ末端部位が好ましい。具体的には、アミノ末端部のアミノ酸の α -アミノ基又は ω -アミノ基、或いはT a mが抗体作成のた

めに開発したMAPシステム (multiple antigenic peptide system)(J. P. Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 85, 5409-5413(1988); J. P. Tam, "Peptides: synthesis, structures, and applications"(B. Gutte, ed.), pp. 456-500, Academic Press, Inc., New York(1995)) の放射状に分枝したリジンをを用いた樹枝状の構造 (dendrimer) を、上記Tamの方法によって上記ポリペプチド鎖のアミノ末端部に作成し、その末端及び側鎖に存在する複数のアミノ基に複数の抗HIV活性物質を結合してポリペプチド鎖一分子あたり複数の抗HIV活性物質を結合させることも可能である。当該樹枝状構造の形成に使用する物質は、上記リジンが最も好ましいが、リジン以外にもオルニチン等の塩基性アミノ酸或いは合成により調製したアミノ酸等であってもアミノ基を2個以上含有する物質であれば使用可能であり好ましい。

該ポリペプチド鎖のアミノ基に結合する抗HIV活性物質の結合部位は、結合する該活性物質の種類により適宜選択されるべきであるが、当該物質中にカルボキシル基または水酸基が存在する場合はこれらの官能基を介して形成される化学的結合が好ましく、特に水酸基を介した化学的結合が好ましい。また、当該官能基の位置が抗HIV活性の中心的役割を有する部位であったとしても、標的細胞中で化学的結合が切断される為、結合する部位となる当該官能基の分子中での位置は特に限定はされない。

例えば、抗HIV活性物質をその物質中のカルボキシル基を介してポリペプチド鎖に結合させて本発明物質を得る場合は、前記保護基保護化ポリペプチド樹脂のアミノ末端部アミノ基と抗HIV活性物質のカルボキシル基の間でアミド結合を形成させ、直接的に結合させることも可能であり、また適切なスペーサー物質を介して生体内で切断が容易な化学的結合を形成させることも可能である。

また、抗HIV活性物質をその物質中の水酸基を介してポリペプチド鎖に結合させて本発明物質を得る場合は、保護基保護化ポリペプチド樹脂のアミノ末端部の官能基と抗HIV活性物質の水酸基の両方に対して化学的に結合可能な官能基を有する多官能性スペーサーを介して結合させることができる。このような多官能性スペーサーとしては、使用するポリペプチド鎖のアミノ末端部のアミノ基と結合が可能な一方のカルボキシル基を有し、さらに上記抗HIV活性物質中の水

酸基ともエステル結合を形成することができる上記とは異なるカルボキシル基を有することが好ましく、具体的にはカルボキシル基を2個以上有する芳香族化合物或いは脂肪族化合物等が挙げられるが、鎖状構造を形成していることから脂肪族化合物が好ましい。

即ち、多官能性スペーサーとしてジカルボン酸を用いた場合、一方のカルボキシル基と前記ポリペプチド鎖のアミノ末端部のアミノ基とでアミド結合を形成し、他方のカルボキシル基と前記抗H I V活性物質中の水酸基とでエステル結合を形成することによりポリペプチド鎖と前記抗H I V活性物質を結合することができる。多官能性スペーサーとしては、合成の簡便性、生体内での酵素による切断の容易性、本発明物質の抗H I V活性などを考慮すると、炭素数4～12の脂肪族ジカルボン酸が好ましく、炭素数4～8の脂肪族ジカルボン酸がより好ましい。ジカルボン酸でも安定性や取り扱いの簡便性からコハク酸あるいはグルタル酸が特に好ましい。なお、ジカルボン酸はポリペプチド鎖及び抗H I V活性物質の結合を妨げない限り他の官能基を有していても良い。

前記保護基保護化ポリペプチド樹脂とA Z Tとを、ジカルボン酸（例えばコハク酸あるいはグルタル酸）を多官能性スペーサーとして結合する方法としては、まずA Z Tと多官能性スペーサーの結合体を形成する。すなわち、例えばジメチルアミノピリジン存在下でA Z Tを無水コハク酸あるいは無水グルタル酸と反応させ、常法処理後、A Z Tにコハク酸あるいはグルタル酸がエステル結合したA Z Tと多官能性スペーサーの結合体を得る。次いで、このA Z T-多官能性スペーサー結合体を、前記保護基保護化ポリペプチド樹脂のN末端部のアミノ酸の α -アミノ基若しくは ω -アミノ基、あるいは該アミノ酸にdendrimer状に結合した樹枝状構造の末端及び側鎖に存在する複数のアミノ基に公知の方法、例えばDIPCI-HOBt法などにより縮合させて結合することができる（この物質を保護基保護化ポリペプチド樹脂-スペーサー-A Z T複合体とも記載する）。

上記の如くして得られた保護基保護化ポリペプチド樹脂-スペーサー-A Z T複合体は、例えば以下の方法により不溶性樹脂及び保護基の脱離及びジスルフィド結合の形成を一工程で行うことにより、本発明物質とすることができる。

すなわち、例えば保護基保護化ポリペプチド樹脂－スパーサー－A Z T複合体に10%以下、好ましくは5%未満、さらに好ましくは0.5～1.5% (v/v) のアニソール、1当量以上、好ましくは5～15当量、より好ましくは8～12当量のTMSCl (トリメチルシリルクロリド)、TFAを加えて5分以上、好ましくは30～120分間、0～80℃、好ましくは10～40℃、より好ましくは15～30℃条件下で反応させ、続いて好ましくは10℃以下、より好ましくは氷冷下で100当量以上、好ましくは200～400当量のDMSOを添加し20分以上、好ましくは30～120分、より好ましくは60～100分間反応させることにより脱保護基、脱樹脂及びジスルフィド結合の形成が一工程でなされる。当該保護基、樹脂の脱離を行い、ジスルフィド結合の形成を行う系を以下TMSCl－DMSO/TFA系と記載する。抗HIV活性物質を複数結合した本発明物質を調製する際は、本発明物質の分子の大きさを考慮すると、一つのポリペプチド鎖あたり32個以下の抗HIV活性物質を結合することが好ましく、より好ましくは16個以下である。

このようにして得られた本発明物質は、公知の方法により単離精製することができるが、逆相高速液体クロマトグラフィーによる方法が最も効果的である。

本発明の医薬組成物の有効成分は上記本発明物質又はその薬理学的に許容されうる塩である。薬理学的に許容されうる塩とは、例えば無機酸（塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸など）、有機カルボン酸（酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸など）、酸性糖（グルクロン酸、ガラクトuron酸、グルコン酸、アスコルビン酸など）、または有機スルホン酸（メタンスルホン酸、p－トルエンスルホン酸など）等との塩が挙げられ、また、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等も挙げられるが、特に限定はされない。本発明物質をそのままとして投与することも可能であるが、さらに薬剤の投与方法及び投与形態に応じて選択された薬理学上許容されうる担体を加えた医薬組成物としてもよい。この医薬組成物としては、治療法などに応じて経口的或いは非経口的に投与され、その投与方法に応じて適宜な薬物担体により、注射薬、内用薬、外用薬、坐薬（例えば粉末、顆粒、注射用若しくは内服用液剤、錠剤、ペッサリー、軟膏、クリーム、エアゾール等）の

製剤とすることができる。

本発明の医薬組成物を例えば注射剤として直接、生体に投与する場合には、薬剤成分として1日あたりヒト体重1kgに対して10mg～5gを投与することができる。

本発明の医薬組成物の示す抗HIV活性は、少なくともHIV表面タンパク質に親和性を示すポリペプチド鎖による抗HIV活性物質の標的細胞内への運搬と、標的細胞上でのポリペプチド鎖と抗HIV活性物質との化学的結合の切断によって、ポリペプチド鎖と抗HIV活性物質という作用機序の異なる抗HIV剤、即ち、HIVのCD4陽性細胞への吸着、融合及び侵入段階を抑制すると考えられるポリペプチドと、HIV逆転写酵素あるいはHIVプロテアーゼの酵素活性を阻害する抗HIV剤とが組み合わせられることで生じるものと考えられる。すなわち、本発明物質の単体により多剤併用療法と同等の治療効果が期待される。また、従来の抗HIV剤と比して毒性が低下している理由は、それ自体に細胞毒性を持つAZT等の抗HIV活性物質を化学的に結合させ、標的細胞に的確に送り込むことによって薬剤有効濃度を抑え、正常細胞への毒性を抑えるためであると考えられる。

図面の簡単な説明

図1は本発明物質12 (AZT-Suc-T22) 及び22 (AZT-Glu-T22) のgp120及びCD4への親和性を表すBIAcore分析図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限りこれらに限定されるものではない。

試験例1

TMSCl-DMSO-TFA系の脱側鎖保護能力

Fmoc-Asp(Bu^t)-OH、Fmoc-Glu(Bu^t)-OH、Fmoc-His(Boc)-OH、Fmoc-Ser(Bu^t)-OH、Fmoc-Thr(Bu^t)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-A

Arg (Pmc) -OH 各 6 mg に TMSCl ($42 \mu\text{l}$)、DMSO ($762 \mu\text{l}$)、及び TFA (5.2 ml) を加え、 4°C 下で処理して 5、10、30、60、90 分後に $100 \mu\text{l}$ ずつサンプリングして $\text{H}_2\text{O}-\text{MeCN}$ (1:1) で 1 ml に希釈し、その溶液の一部を HPLC にインジェクションして、Fmoc アミノ酸、側鎖保護 Fmoc アミノ酸を定量した。

以下において HPLC 分析は、Cosmosil 5C18-AR ($4.6 \times 150 \text{ mm}$) カラムを使用し、流速 1 ml/min で行った。溶出は、0.1% (v/v) TFA- H_2O と 0.1% (v/v) TFA-MeCN (アセトニトリル) の直線勾配により行った。HPLC での分取には Cosmosil C18-AR ($2.0 \times 25 \text{ cm}$) を流速 7 ml/min で使用した。

その結果、何れの側鎖保護基も、この切断試薬系で 60 分以内に定量的に除去できることが判明した。

試験例 2

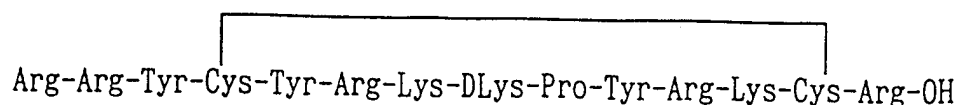
TMSCl-DMSO-TFA 系の樹脂からのアミノ酸遊離能力

切断処理によりアミノ酸或いはペプチド酸を遊離するアルコキシル型樹脂に Leu を結合した H-Leu-Alko resin (0.60 mmol/g , $2 \mu\text{mol}$)、或いは切断処理によりアミノ酸アミド或いはペプチドアミドを遊離するアミド型樹脂に Arg (Pmc) を結合した H-Arg (Pmc)-Rink amide resin (0.32 mmol/g , $2 \mu\text{mol}$) に内部標準として Boc-Gly-OH ($3 \mu\text{mol}$) を加え、TMSCl ($7 \mu\text{l}$, 750 eq) と TFA ($870 \mu\text{l}$) を加えて、室温下で 1 時間攪拌後、DMSO ($127 \mu\text{l}$, 750 eq) を加え、更に 1 時間攪拌した。30、60、90、120 分後にそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつサンプリングして蒸留水で 1 ml に希釈した。アミノ酸分析機により再生アミノ酸を定量した。その結果、2 時間処理した後のアミノ酸の再生率は、Leu: 100%、Arg: 87% であった。このことより、この切断試薬系で、Alko resin 及び Rink amide resin に結合したアミノ酸が定量的に切断、遊離できることが判明した。

調製例 1

下記式 (A) のポリペプチド鎖を持つ保護基保護化ポリペプチド樹脂の調製

1 1 2 3 4 5 6 7 7 8 9 10 11 12 13



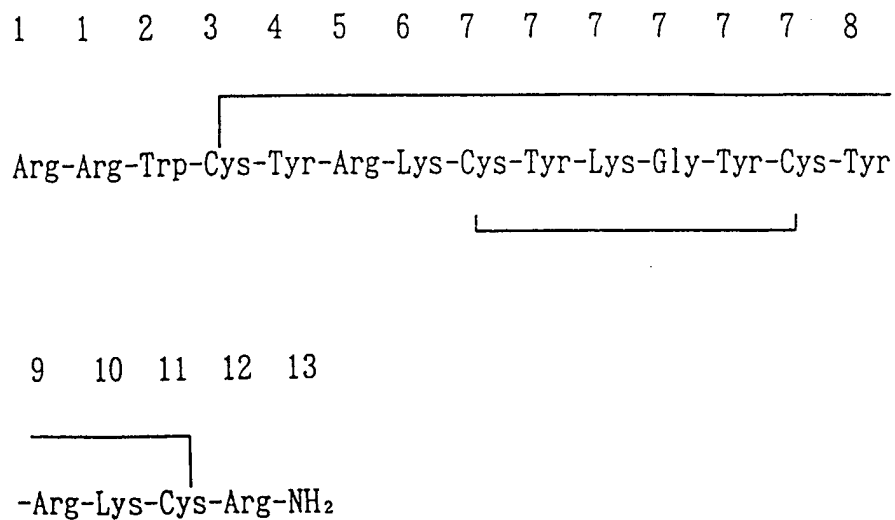
... (A)

(式中、Arg、Tyr、Cys、Lys、DLysおよびProは前記したアミノ酸残基を示し、3位と11位のCys間の実線はジスルフィド結合をしめす。)

式(A)のポリペプチド鎖を持つ保護基保護化ポリペプチド樹脂の調製は、Fmoc型固相合成法を用いて手動で行った。ペプチド合成用樹脂として、Fmoc-Arg(Pmc)-Alko resin (Arg換算で0.52 mmol/g)を使用した。20%ピペリジン/DMFで15分間処理し、Fmoc基の除去を行った。Fmocアミノ酸の縮合には、DIPCI-HOBt/DMFを使用した。Fmocアミノ酸及び縮合試薬等はそれぞれ樹脂に対して2.5当量使用した。以下、このように合成された物質を便宜上保護基保護化ポリペプチド樹脂1と記載する。

また、上記式(A)の13位がNH₂となったポリペプチド鎖のアミド体を生成する保護基保護化ポリペプチド樹脂を、ペプチド合成用樹脂としてFmoc-Arg(Pmc)-Rink amide resin (Arg換算で0.34 mmol/g)を用いて上記同様のFmoc型固相合成法により合成した。

さらに、下記式(B)のポリペプチド鎖を持つ保護基保護化ポリペプチド樹脂はペプチド合成用樹脂として切断処理によりアミノ酸アミド或いはペプチドアミドを遊離するFmoc-PAL (peptide amide linker) resin (アミノ基換算で0.38 mmol/g)を用いて上記同様のFmoc型固相合成法により合成した。このようにして合成された当該物質を便宜上保護基保護化ポリペプチド樹脂2と記載する。



..... (B)

(式中、Arg、Trp、Tyr、Cys、Gly及びLysは前記のアミノ酸残基を示し、3位と11位間、両7位間のCysを結ぶ実線はジスルフィド結合を示す。)

なお、固相合成における各アミノ酸縮合反応は表2に示す操作条件に従って行った。

表 2

操作	試 薬	溶媒	時間×繰返し回数
Fmoc基除去	20%ピペリジン	DMF	5分×3
洗 浄	—	DMF	1分×6
縮合反応	Fmocアミノ酸 (2.5eq) + DIPCDI+HOBT (2.5eq)	DMF	2時間×1
洗 浄	—	DMF	1分×4

調製例 2

3' -アジド-3' -デオキシチミジン-5' -モノスクシネート (AZTコハク酸エステル) の調製

3' -アジド-3' -デオキシチミジン (AZT) (534.8mg、2mmol) を THF (10ml) に溶解し、4℃で無水コハク酸 (200.1mg、2mmol)、ついでジメチルアミノピリジン (48.8mg、0.4mmol) を加え、48時間攪拌した。更に、無水コハク酸 (400.2mg、4mmol) を追加し24時間攪拌した。反応液をAcOEt (酢酸エチル：50ml) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、飽和NaHCO₃水溶液を加え分液した。水層にクエン酸を加えてpH4に調整し、AcOEt (50ml×3) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水MgSO₄で乾燥、MgSO₄を濾過し、濾液を減圧留去し、目的のAZTコハク酸エステルの結晶を得た (5

67.8 mg、収率77.3%）。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz、 CDCl_3) δ 1.86 (d, 3H)、2.6–2.9 (m, 6H)、4.11–4.13 (m, 1H)、4.23–4.29 (dd, 1H)、4.34–4.39 (m, 1H)、4.82–4.88 (dd, 1H)、5.88–5.93 (q, 1H)、7.45 (d, 1H)、10.68 (s, 1H)

調製例3

3'-アジド-3'-デオキシチミジン-5'-モノグルタレート (AZTグルタル酸エステル) の調製

調製例2のAZTコハク酸エステルの調製と同様の反応条件及び同様反応操作により、AZT (534.8 mg、2 mmol) と無水グルタル酸 (228.2 mg、2 mmol) を反応させ、同様の処理後、目的のAZTグルタル酸エステルの結晶を得た (収率80.0%)。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz、 CDCl_3) δ 1.91 (s, 3H)、1.96–2.05 (m, 2H)、2.36–2.57 (m, 6H)、3.98–4.08 (m, 1H)、4.24–4.33 (m, 2H)、4.51–4.55 (dt, 1H)、6.05–6.09 (t, 1H)、7.39 (s, 1H)、10.27 (s, 1H)

調製例4

保護基保護化ポリペプチド樹脂からのポリペプチドの調製

上記調製例1で調製した保護基保護化ポリペプチド樹脂1 (50 mg、9.6 mmol) に、アニソール (0.15 ml)、 TMSCl (0.105 ml、1.0 eq) 及びTFA (1.3 ml) を加えて室温下で1時間攪拌した。次いで、4℃でDMSO (1.9 ml、3.00 eq) を加えて1時間30分攪拌した。反応後、冷エーテル (50 ml) を加えてポリペプチドを析出させ、遠心分離操作により該ポリペプチドを得た。この粗ポリペプチドをエーテル (50 ml $\times$ 3) で洗浄した後、風乾させた。HPLCを用いて精製し、凍結乾燥の後、目的の上記式(A)のポリペプチドを得た (6.2 mg, 収率33%)。以下のイオンスプレーマススペクトル (IS-MS) の測定はトリプルステージ四重極型質量分析装置APIIII型 (Perkin-Elmer Sciex社製) で行った。IS-MS (reconstructed) m/z : Found 1974.0 (1973.2 Calc. for $\text{C}_{86}\text{H}_{140}\text{N}_{32}\text{P}_{18}$)

S₂)、 $[\alpha]^{26}_D = -24.5^\circ$ (c=0.2, H₂O)、10～40%の30分間のアセトニトリル濃度勾配、流速1ml/minでのWaters μ Bondasphere 5 μ C18-100 Å (3.9×150mm、日本ミリポア製)による分析的HPLCでの保持時間は14.2分、6N HClによる加水分解物のアミノ酸分析(カッコ内の数値は理論値)ではCys未決定(1)、Tyr 3.00(3)、Lys及びD-Lys 2.86(3)、Arg 5.11(5)、Pro 0.95(1)。

上記と同様な反応操作により、上記式(A)のポリペプチドアミド体(保護基保護化ポリペプチド樹脂(Rink amide 樹脂を使用)からの収率56%(8.4mg))を得た。IS-MS (reconstructed) m/z: Found 1972.5(1972.1 Calc. for C₈₆H₁₄₁N₃₃P₁₇S₂)、 $[\alpha]^{26}_D = -18.8^\circ$ (c=0.2, H₂O)、10～40%の30分間のアセトニトリル濃度勾配、流速1ml/minでのWaters μ Bondasphere 5 μ C18-100 Å (3.9×150mm、日本ミリポア製)による分析的HPLCでの保持時間は14.8分、6N HClによる加水分解物のアミノ酸分析(カッコ内の数値は理論値)ではCys未決定(1)、Tyr 3.00(3)、Lys及びD-Lys 2.80(3)、Arg 5.13(5)、Pro 0.88(1)。

同様にして上記式(B)のポリペプチドアミド体(保護基保護化ポリペプチド2からの収率43%)を得た。

以下便宜上本方法により得た物質を合成ポリペプチドと記載し、上記式(A)のポリペプチド鎖を持つ合成ポリペプチド(T131)を合成ポリペプチド1、上記式(B)のポリペプチド鎖を持つ保護基保護化ポリペプチド樹脂2を用いて上記と同様の方法により調製した合成ポリペプチド(T22)を合成ポリペプチド2と記載する。

調製例5

本発明物質(ポリペプチド-AZTコハク酸エステル複合体)の調製

上記調製例1で調製した保護基保護化ポリペプチド樹脂1あるいは2のN末端のアミノ酸の α -アミノ基に、上記調製例2で調製したAZTコハク酸エステル(2.5eq)のカルボキシル基をDIPCI-HOBt法により縮合した。このようにして得た保護基保護化ポリペプチド-AZTコハク酸エステル複合体樹

脂 (50 mg) を調製例 4 の合成ポリペプチドの調製法と同様の脱保護、脱樹脂、ジスフィド結合形成を行い、同様の単離、精製法により、目的のポリペプチド-AZTコハク酸エステル複合体の本発明物質を得た。以下便宜上本調製方法による本発明物質を本発明物質 1 と記載し、上記式 (A) のポリペプチド鎖を持つ本発明物質 1 (AZT-Suc-T131) を本発明物質 1 1、上記式 (B) のポリペプチド鎖を持つ本発明物質 1 (AZT-Suc-T22) を本発明物質 1 2 と記載する。

本発明物質 1 1 : 収率 29.99% (5.5 mg)、IS-MS(reconstructed)m/z: Found 2323.23(2322.1 Calc. for $C_{100}H_{155}N_{37}O_{24}S_2$, $[\alpha]^{18}_D = -16.7^\circ$ (c=0.1, 1N AcOH)、10~50%の30分間のアセトニトリル濃度勾配、流速1ml/minでのWaters μ Bondasphere $5\mu C18-100\text{\AA}$ (3.9×150mm、日本ミリポア製) による分析的HPLCでの保持時間は17.5分、6N HClによる加水分解物のアミノ酸分析(カッコ内の数値は理論値)では、Cys未決定(1)、Tyr 3.00(3)、Lys及びD-Lys 3.00(3)、Arg 5.37(5)、Pro 1.24(1)。

本発明物質 1 2 : 収率 2.76%、IS-MS(reconstructed)m/z: Found 2834.47(2836.3 Calc. for $C_{123}H_{179}N_{43}O_{28}S_4$, $[\alpha]^{20}_D = 47.8^\circ$ (c=0.01, 1N AcOH)

調製例 6

本発明物質 (ポリペプチド-AZTグルタル酸エステル複合体) の調製

上記調製例 1 で調製した保護基保護化ポリペプチド樹脂 1 あるいは 2 の N 末端アミノ酸の α -アミノ基に、上記調製例 3 で調製した AZT グルタル酸エステル (2.5 eq) のカルボキシル基を DI PCI-HOBt 法により縮合した。このようにして得た保護基保護化ポリペプチド樹脂-AZTグルタル酸エステル複合体を調製例 4 の合成ポリペプチドの調製と同様の調製法により、目的のポリペプチド-AZTグルタル酸エステル複合体の本発明物質を得た。

以下便宜上本調製方法による本発明物質を本発明物質 2 と記載し、上記式 (A) のポリペプチド鎖を持つ本発明物質 2 (AZT-Glu-T131) を本発明物質 2 1、上記式 (B) のポリペプチド鎖を持つ本発明物質 2 (AZT-Glu-T22) を本発明物質 2 2 と記載する。

本発明物質 2 1 : 収率 6.27% (2.3 mg)、IS-MS(reconstructed

)m/z: Found 2337.73(2336.2 Calc. for $C_{101}H_{157}N_{37}O_{24}S_2$, $[\alpha]^{20}_D = -38.2^\circ$ (c=0.3, 1N AcOH)、10～50%の30分間のアセトニトリル濃度勾配、流速1ml/minでのWaters μ Bondasphere $5\mu C18-100\text{\AA}$ (3.9×150mm、日本ミリポア製)による分析的HPLCでの保持時間は17.4分、6N HClによる加水分解物のアミノ酸分析(カッコ内の数値は理論値)では、Cys未決定(1)、Tyr 2.92(3)、Lys及びD-Lys 3.00(3)、Arg 5.08(5)、Pro 1.22(1)であった。

本発明物質22: 収率8.81%、IS-MS(reconstructed)m/z: Found 2849.97(2850.3 Calc. for $C_{121}H_{181}N_{43}O_{28}S_4$, $[\alpha]^{20}_D = 21.4^\circ$ (c=0.1, 1N AcOH)

調製例7

Dendrimer型本発明物質の調製

上記調製例1で作製した保護基保護化ポリペプチド樹脂1あるいは2のN末端アミノ酸の α -アミノ基にさらに同様のアミノ酸縮合法(DIPCI-HOBt法等)を用いて保護アミノ酸であるFmoc-Lys(Fmoc)を結合した。

更に、脱Fmoc基操作及びFmoc-Lys(Fmoc)の導入を2回繰り返し、該ポリペプチドのアミノ末端部にLysが7個導入された樹枝状の構造をもつLys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂を調製した。以下、調製例1で得た保護基保護化ポリペプチド1から調製した該樹脂をLys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂1とし、保護基保護化ポリペプチド2から調製した該樹脂をLys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂2と記載する。

上記Lys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂1のFmoc基を除去し、調製例5と同様にして調製例2で調製したAZTコハク酸エステル(2.5eq)をDIPCI-HOBt法により縮合した。このようにして得たLys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂-AZTコハク酸エステル複合体を、調製例4の合成ポリペプチド1の調製法と同様の脱保護、脱樹脂、ジスルフィド結合形成を行い、同様の単離、精製法により目的のAZTが8個導入されたdendrimer型の本発明物質を得た。以下便宜上本調製方法による本発明物質をdendrimer型本発明物質1と記載する。

dendrimer型本発明物質1: 収率13.18%(7.3mg)、IS-

MS (reconstructed)m/z: Found 5665.47(5664.5 Calc. for $C_{240}H_{346}N_{86}O_{73}S_2$, $[\alpha]^{18}D=22.6^\circ$ (c=0.1, 1N AcOH)、10～50%の30分間のアセトニトリル濃度勾配、流速1ml/minでのWaters μ Bondasphere 5 μ C 18-100 Å (3.9×150mm、日本ミリポア製)による分析的HPLCでの保持時間は26.5分、6N HClによる加水分解物のアミノ酸分析(カッコ内の数値は理論値)では、Cys未決定(1)、Tyr 2.87(3)、Lys及びD-Lys 10.00(10)、Arg 5.42(5)、Pro 1.26(1)。

上記と同様にして、Lys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂1に調製法3で調製したAZTグルタル酸エステルを結合し、同様な脱保護、脱樹脂、ジスルフィド結合形成、単離、精製を行い目的の本発明物質を得た。以下、本発明物質をdendrimer型本発明物質2と記載する。

dendrimer型本発明物質2: 収率0.72%、IS-MS (reconstructed)m/z: Found 5775.22(5780.3 Calc. for $C_{248}H_{362}N_{86}O_{73}S_2$, $[\alpha]^{20}D=-12.3^\circ$ (c=0.05, 1N AcOH)

上記と同様にして、Lys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂2に調製例2で調製したAZTコハク酸エステルを結合した。得られたLys導入保護基保護化ポリペプチド-AZTコハク酸エステル複合体樹脂(100mg)にm-クレゾール(300 μ l)、1,2-エタンジチオール(300 μ l)、チオアニソール(300 μ l)、TFA(4.8ml)、蒸留水(300 μ l)を加えて室温下で2時間攪拌して脱保護、脱樹脂後、調製例4の合成ポリペプチド1または2の調製操作法に準じて処理操作、風乾を行い、得られた粗ペプチド誘導体を1N

AcOH(3ml)に溶解し、超純水で40mlに希釈した。この溶液に4℃でDMSO(10ml)を加え、室温下で24時間放置し、ジスルフィド結合を形成させた。さらにHPLCを用いて単離、精製を行い、凍結乾燥後、目的のAZTが8個導入されたdendrimer型の本発明物質を得た。以下、便宜上本調製方法による本発明物質をdendrimer型本発明物質3と記載する。但し、ジスルフィド異性体2種が得られたので、それぞれ異性体1および2と表記する。

dendrimer型本発明物質3：ジスルフィド異性体の2種の化合物が得られた。

異性体1：収率2.62%、IS-MS (reconstructed)m/z: Found 6178.22(6180.7 Calc. for $C_{263}H_{370}N_{92}O_{77}S_4$, $[\alpha]^{20}_D=3.1^\circ$ (c=0.1, 1N AcOH)

異性体2：収率4.31%、 $[\alpha]^{20}_D=-15.4^\circ$ (c=0.1, 1N AcOH)

上記と同様にして、Lys導入保護基保護化ポリペプチド樹脂2に調製例3で調製したAZTグルタル酸エステルを結合し、同様な脱保護、脱樹脂、ジスルフィド結合形成、単離、精製を行い目的の本発明物質を得た。以下、本発明物質をdendrimer型本発明物質4と記載する。

dendrimer型本発明物質4：収率6.20%、IS-MS (reconstructed)m/z: Found 6292.97(6292.9 Calc. for $C_{271}H_{386}N_{92}O_{77}S_4$, $[\alpha]^{20}_D=10.3^\circ$ (c=0.2, 1N AcOH)

実施例1

本発明物質のgp120及びCD4への親和性の測定

調製例5及び6で得た本発明物質12 (AZT-Suc-T22) 及び22 (AZT-Glu-T22) のgp120及びCD4への親和性を表面プラズモン共鳴を利用して測定するバイオセンサー、BIAcore™ biosensor (Pharmacia BiosensorAB製) 用いてBiochem. Biophys. Res. Commun., 219, 555-559(1996)、Biochem. Biophys. Acta., 1298, 37-44(1996)の方法に準じて測定、解析した(図1)。その結果、本発明物質12のgp120及びCD4に対する親和定数(Kaff)は、それぞれ $2.20 \times 10^{-7}M$ と $3.44 \times 10^{-6}M$ であった。同様に本発明物質22のgp120及びCD4に対するKaffは、それぞれ $6.05 \times 10^{-6}M$ 及び $1.07 \times 10^{-7}M$ であった。これらの親和定数は、調製例4で得た合成ポリペプチド2のgp120及びCD4に対するKaff(それぞれ $5.99 \times 10^{-6}M$ と $9.90 \times 10^{-6}M$: Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 555-559(1996)、Biochem. Biophys. Acta., 1298, 37-44(1996))に匹敵し、本発明物質12及び22がgp120及びCD4に高い親和性を示すことが明らかになった。

実施例2

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する抗ウイルス活性

上記調製例 4 で得た合成ポリペプチド 1 (T131) 及び 2 (T22)、上記調製例 5 で得た本発明物質 1 1 (AZT-Suc-T131)、上記調製例 7 で得た dendrimer 型本発明物質 1 及び AZT の HIV に対する抗ウイルス活性を以下の方法に従い試験し評価した。すなわち 96 穴マイクロタイタープレートに、種々の濃度の試験物質と共に HIV 感染 MT-4 細胞 (2.5×10^4 個/well、感染多重度 (MOI) : 0.001) を感染直後に加える。CO₂ インキュベーター中、37℃で 5 日間培養した後、生存細胞数を MTT 法 (Pauwel et. al., J. Virol. Methods 20, 309-321(1988)) で測定した。抗ウイルス活性は、HIV 感染による細胞死を 50% 抑制する濃度 (EC₅₀ : 50% effective concentration) で表す。一方、試験物質の MT-4 細胞に対する細胞毒性を知るために、ウイルス非感染細胞を上記と同様に種々の濃度の試験物質と共に培養を行った。細胞毒性は試験物質による 50% 細胞障害濃度 (CC₅₀ : 50% cytotoxic concentration) で表す。また、CC₅₀ と EC₅₀ の概略比 (CC₅₀/EC₅₀) を選択係数 (S. I.) として表した。抗 HIV 活性測定の結果を表 3 に示す。本発明物質 1 1 の抗 HIV 活性は AZT の抗 HIV 活性と比較して 2 倍であり (EC₅₀ 値比較)、選択係数も 2 倍以上であり抗 HIV 活性の明らかな増強を認めた。また既知の抗 HIV 活性ポリペプチドである合成ポリペプチド 1 よりも抗 HIV 活性は高い。更に、dendrimer 型本発明物質 1 が最も高い抗 HIV 活性を示した。

表 3 MTT 法による抗 HIV 活性測定

	CC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (nM)	S.I.
合成ポリペプチド 1	>80	17	>4615
合成ポリペプチド 2	27	8.4	3208
本発明物質 1 1	6.8	1.1	5713
dendrimer 型本発明物質 1	1.7	0.18	9694
AZT	5.6	2.5	2299

実施例 3

H I V 感染阻害活性

上記調製例 4 で得た合成ポリペプチド 1 及び 2、上記調製例 4、5、6 で得た本発明物質 1 1、2 2 及び dendrimer 型本発明物質 1、及び A Z T の、H I V 感染阻害活性を以下の方法に従い試験し評価した。すなわち、T 細胞株指向性 H I V - 1 (N L 4 - 3) 及びマクロファージ指向性 H I V - 1 (J R - C S F) を用い、P H A (Phaseolus vulgaris agglutinin) 活性化 P B M C (peripheral blood mononuclear cells) への H I V - 1 感染阻害活性を、H I V - 1 の p 2 4 抗原への抗体を用いる E L I S A 法による p 2 4 抗原発現抑制試験により測定した。すなわち種々の濃度の試験物質を H I V - 1 感染直後の M T - 4 細胞に加え、C O₂ インキュベーター中、3 7 °C で 3 日間（場合により 4 日間或いは 7 日間）培養した後、培養上澄液中の H I V 由来の p 2 4 抗原量を E L I S A キット (C e l l u l a r P r o d u c t s 製) で測定した。その結果を表 4 に示す。上記調製例 4 で得た合成ポリペプチド 1 及び 2 が本来抗 H I V 活性を全く示さないマクロファージ指向性 H I V - 1 である J R - C S F に対し、本発明物質はいずれも A Z T と同様に抗 H I V 活性を示し、マクロファージ指向性の H I V - 1 に対しても有効であることが判明した。

表 4 p 2 4 抗原発現抑制試験による H I V 感染阻害活性測定

	EC ₅₀ (nM)	
	NL4-3 (T細胞指向性)	JF-CSF (マクロファージ指向性)
合成ポリペプチド 1	1790	>4000
合成ポリペプチド 2	63	>3000
本発明物質 1 1	168	7.4
本発明物質 2 2	11.4	4.2
dendrimer 型本発明物質 1	88	7.3
A Z T	65	4.9

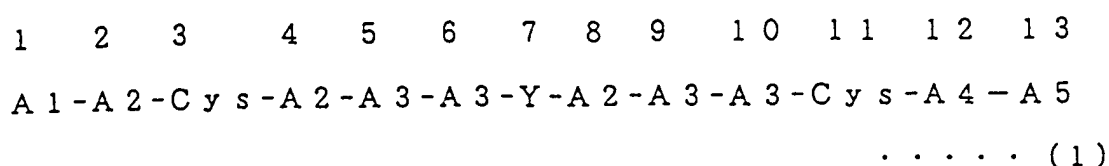
産業上の利用可能性

本発明物質により、CD 4 陽性細胞表面タンパク質及びH I V表面タンパク質への親和性により抗H I V活性物質を効果的に標的細胞上へ誘導し、高い抗H I V活性を有する医薬組成物を提供することができる。

請求の範囲

1. HIV表面タンパク質 gp120 及び／又は HIV 宿主標的細胞表面タンパク質 CD4 に親和性を有するポリペプチドに、1 又は 2 種以上の逆転写酵素阻害剤及び／又は HIV プロテアーゼ阻害剤が化学的結合により結合していることを特徴とする複合体。

2. HIV表面タンパク質 gp120 及び／又は HIV 宿主標的細胞表面タンパク質 CD4 に親和性を有するポリペプチドが下記式 (1) で表されるポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載の複合体。



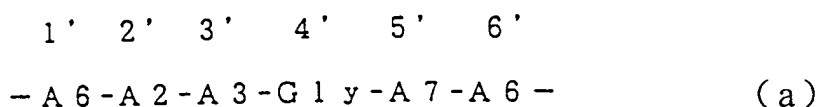
[式中、A1 は H- (A2 のアミノ基由来) 或いはリジン、アルギニンおよびオルニチンから選ばれる 1 個の塩基性アミノ酸残基又はこれらのアミノ酸残基から選択された同一又は異なるアミノ酸残基少なくとも 2 個を有するペプチド残基、或いは該塩基性アミノ酸残基若しくはペプチド残基のアミノ末端アミノ酸残基の N- α 位の水素原子がアシル基若しくは置換チオカルバモイル基で置換されている N- α アシル置換アミノ酸残基、N- α アシル置換ペプチド残基、N- α 置換チオカルバモイル化アミノ酸残基または N- α 置換チオカルバモイル化ペプチド残基を示し；

A2 は独立してチロシン、フェニルアラニンまたはトリプトファン残基を示し；

A3 は独立してリジンまたはアルギニン残基を示し；

A4 はリジンおよびアルギニンから選ばれるアミノ酸の少なくとも 1 個を有するアミノ酸残基またはペプチド残基を示し；

A5 は -OH (A4 のカルボキシル基由来) 又は -NH₂ (A4 のカルボキシル基の酸アミド由来) を示し；Y は下記式 (a) で示されるペプチド残基



(式中、A2 及び A3 は上記 (1) 式におけると同義であり、

A 6 は独立してアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システインまたはメチオニン残基を示し；

A 7 はチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、システインまたはメチオニン残基を示し；

G 1 y はグリシン残基を示す。

但し、1' 位と 6' 位が共にシステイン残基である場合にはこれらはジスルフィド結合により連結していてもよい。）、または

D-オルニチル-プロリン、プロリル-D-オルニチン、プロリル-D-リジン、プロリル-D-アルギニン、D-リジル-プロリン、D-アルギニル-プロリン、グリシル-リジン、グリシル-アルギニン、オルニチル-グリシン、グリシル-オルニチン、リジル-グリシン及びアルギニル-グリシンで示される 2 個のアミノ酸から構成されたジペプチドから選ばれるものであり、且つその構成アミノ酸である D-リジン、リジン、D-オルニチン又はオルニチンの側鎖の ω -アミノ基の水素原子はアシル基で置換されていてもよいペプチド残基を示し；

C y s はシステイン残基を示し、3 位と 11 位のシステイン残基はジスルフィド結合により連結していてもよい]。

3. 化学的結合が、上記式 (1) で表されるポリペプチドのアミノ末端アミノ酸の α 及び ω アミノ基の少なくとも一方と、逆転写酵素阻害剤及び／又は HIV プロテアーゼ阻害剤との、多官能性スペーサーを介した結合であることを特徴とする請求項 2 記載の複合体。

4. 多官能性スペーサーがアミノ基及び水酸基の双方に結合することが可能な物質であることを特徴とする請求項 3 記載の複合体。

5. 多官能性スペーサーが少なくとも 2 個のカルボキシル基を有する化合物であることを特徴とする請求項 3 又は 4 記載の複合体。

6. 多官能性スペーサーが脂肪族ジカルボン酸であることを特徴とする請求項 3 ～ 5 のいずれか一項記載の複合体。

7. 逆転写酵素阻害剤が、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載の複合体。

8. ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤が非天然型ヌクレオシド又はヌクレオシ

ドアナログであることを特徴とする請求項7記載の複合体。

9. ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤がピリミジン塩基、プリン塩基、イミダゾール塩基及びトリアゾール塩基からなる群から選ばれた塩基と、少なくとも1個の水酸基を有するフラノース又はそのアシクロ体からなるヌクレオシドもしくはその類縁体であることを特徴とする請求項7記載の複合体。

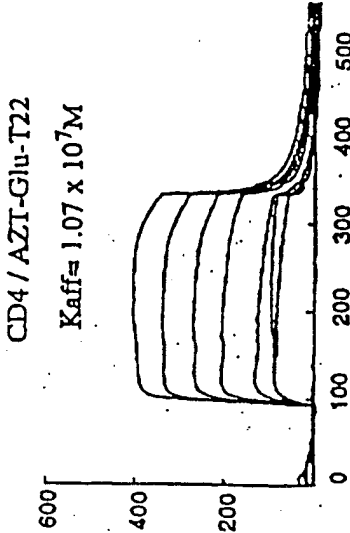
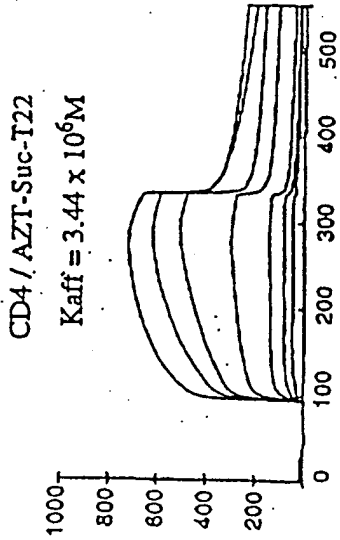
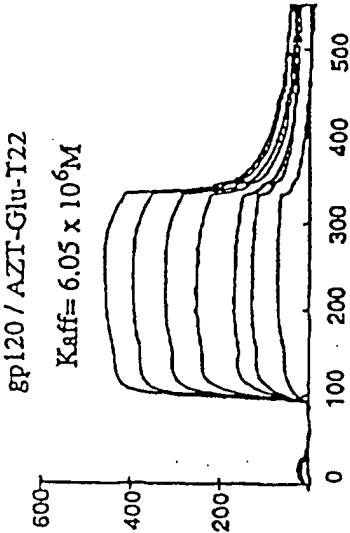
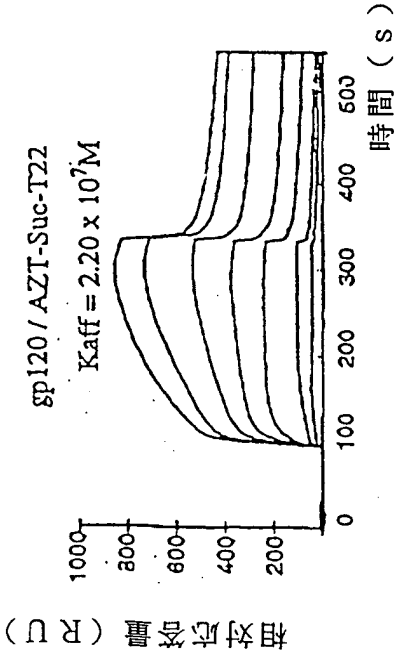
10. ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤が、3'-アジド-3'-デオキシチミジンである請求項7記載の複合体。

11. HIVプロテアーゼ阻害剤が、HIVプロテアーゼの基質遷移状態ミミック化合物であることを特徴とする請求項1又は2記載の複合体。

12. HIVプロテアーゼ阻害剤が、RO31-8959、A-77003、KNI-93、KNI-102、KNI-174、KNI-227、KNI-272、L-735527、SC-52151、VX-478、ABT-538、DMP-323及びU-96988から成る物質群より選択される1又は2以上の物質である請求項1～6いずれか一項記載の複合体。

13. 請求項1～12のいずれか一項記載の複合体またはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分として含有する医薬組成物。

1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁶ C07K7/08, A61K38/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C07K7/00, 14/00, A61K38/00, 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 3-504556, A (Tanox Biosystems Inc.), October 9, 1991 (09. 10. 91), Pages 7 to 10 & WO, 88/09181, A1 & EP, 366718, A1	1-13
Y	JP, 3-206888, A (The Green Cross Corp.), September 10, 1991 (10. 09. 91), Pages 8 to 10 & WO, 91/07494, A1 & EP, 453561, A1	1-13
Y	JP, 2-152932, A (Tosoh Corp.), June 12, 1990 (12. 06. 90), Pages 2, 3 (Family: none)	1-13
Y	JP, 9-25240, A (Seikagaku Corp.), January 28, 1997 (28. 01. 97), Pages 3 to 9 (Family: none)	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
June 17, 1998 (17. 06. 98)

Date of mailing of the international search report
July 7, 1998 (07. 07. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01366

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 8-504837, A (Seikagaku Corp.), May 28, 1996 (28. 05. 96), Pages 7 to 15 & EP, 677061, A1 & WO, 95/10534, A1	1-13
Y	JP, 5-163298, A (Seikagaku Corp.), June 29, 1993 (29. 06. 93), Pages 3 to 6 & EP, 513613, A1 & WO, 92/19645, A1	1-13
Y	WO, 92/04374, A1 (Seikagaku Corp.), March 19, 1992 (19. 03. 92), Pages 2 to 12 & EP, 502198, A1	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07K7/08, A61K38/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07K7/00, 14/00, A61K38/00, 39/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 3-504556, A (タノックス・バイオシステムズ・インコーポレーテッド) 9. 10月. 1991 (09. 10. 91) 第7-10頁 & WO, 88/09181, A1 & EP, 366718, A1	1-13
Y	J P, 3-206888, A (株式会社ミドリ十字) 10. 9月. 1991 (10. 09. 91) 第8-10頁 & WO, 91/07494, A1 & EP, 453561, A1	1-13
Y	J P, 2-152932, A (東ソー株式会社) 12. 6月. 1990 (12. 06. 90) 第2-3頁 (ファミリーなし)	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 06. 98

国際調査報告の発送日

07.0798

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

前田 憲彦

印

4H

8318

電話番号 03-3581-1101 内線 3445

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 9-25240, A (生化学工業株式会社) 28. 1月. 1997 (28. 01. 97) 第3-9頁 (ファミリーなし)	1-13
Y	JP, 8-504837, A (生化学工業株式会社) 28. 5 月. 1996 (28. 05. 96) 第7-15頁 & EP, 677 061, A1 & WO, 95/10534, A1	1-13
Y	JP, 5-163298, A (生化学工業株式会社) 29. 6 月. 1993 (29. 06. 93) 第3-6頁 & EP, 5136 13, A1 & WO, 92/19645, A1	1-13
Y	WO, 92/04374, A1 (生化学工業株式会社) 19. 3 月. 1992 (19. 03. 92) 第2-12頁 & EP, 502 198, A1	1-13