

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4699609号
(P4699609)

(45) 発行日 平成23年6月15日 (2011.6.15)

(24) 登録日 平成23年3月11日 (2011.3.11)

(51) Int. Cl.		F I	
C07C 237/22	(2006.01)	C O 7 C 237/22	
A61K 31/66	(2006.01)	A 6 1 K 31/66	
A61P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A61P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C07F 9/09	(2006.01)	C O 7 F 9/09	U

請求項の数 14 (全 57 頁)

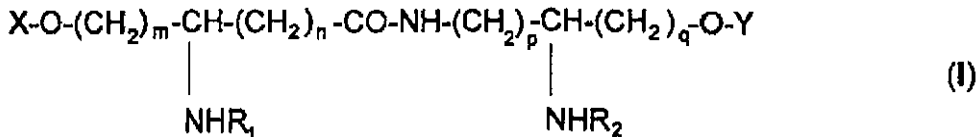
(21) 出願番号	特願2000-557223 (P2000-557223)	(73) 特許権者	501007753
(86) (22) 出願日	平成11年6月23日 (1999.6.23)		オーエム ファルマ
(65) 公表番号	特表2002-519338 (P2002-519338A)		スイス国 1217 メラン 2 ビー.
(43) 公表日	平成14年7月2日 (2002.7.2)		オー. ボックス 84 ルー デュ ボワ
(86) 国際出願番号	PCT/IB1999/001170		ーデューラン 22
(87) 国際公開番号	W02000/000462	(74) 代理人	100092277
(87) 国際公開日	平成12年1月6日 (2000.1.6)		弁理士 越場 隆
審査請求日	平成18年6月23日 (2006.6.23)	(72) 発明者	ボーエ ジャック
(31) 優先権主張番号	FR9801396		スイス国 1162 サンープリ シュマ
(32) 優先日	平成10年6月30日 (1998.6.30)		ン ドゥ ラ モレヌ 31
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	マルタン オリヴィエ リチャード
			フランス国 45100 オルレアン ア
			ブウニュ ドファン 62 ビス
		審査官	宮田 和彦
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なアシルージペプチド様化合物と、その製造方法と、それを含む医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式 (I) の化合物：



[ここで

R₁およびR₂は直鎖または分岐した2～24の炭素原子を有する飽和または不飽和のカルボン酸鎖に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび((C1-24)アルキル)チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、

mは1～4であり、nは0であり、pは3または4であり、qは1で、

XおよびYは水素またはホスホノ基を表し、ただし、置換基XおよびYの少なくとも一つはホスホノ基を表す)]

【請求項 2】

ホスホノ基が無機または有機塩基との塩の形をしている請求項1の化合物。

【請求項 3】

3-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ) 9-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)-4-オキソ-5-アザデカン-1, 10-ジオール1-および/または10-二水素ホスフェー

トまたはその有機または無機塩基との付加塩である請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

3-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ) 9-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)-4-オキソ-5-アザデカン-1, 10-ジオール1,10-ビス-(二水素ホスフェート)またはその有機または無機塩基との付加塩である請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 5】

3-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ) 9-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)-4-オキソ-5-アザデカン-1, 10-ジオール 1,10-ビス-(二水素ホスフェート)またはその有機または無機塩基との付加塩である請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 6】

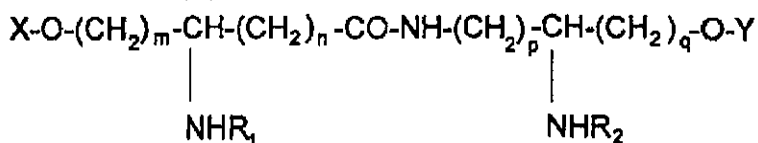
3-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ) 9-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)-4-オキソ-5-アザデカン1, 10-ジオール 1-二水素ホスフェートまたはその有機または無機塩基との付加塩である請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 7】

3-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ) 9-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)-4-オキソ-5-アザデカン-1, 10-ジオール 1-二水素ホスフェートまたはその有機または無機塩基との付加塩である請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 8】

下記一般式(I) :



[ここで

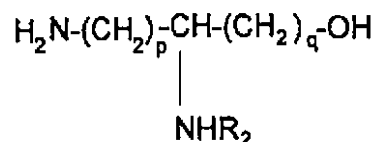
R₁およびR₂は直鎖または分岐した2～24の炭素原子を有する飽和または不飽和のカルボン酸鎖に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび((C1-24)アルキル)チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、

mは1～4であり、nは0であり、pは3または4であり、qは1で、

XおよびYは水素またはホスホノ基を表し、ただし、置換基XおよびYの少なくとも一つはホスホノ基を表す)]

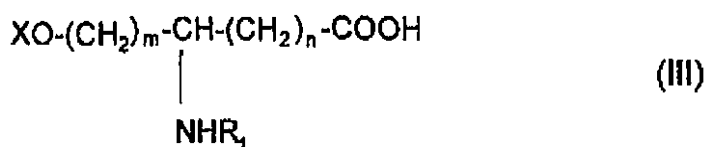
で表される請求項1または2に記載のホスホジペプチド様化合物の製造方法であって、

式：H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q-1}COOHのジアミノ酸の非末端位置と末端位置のアミン官能基を容易に酸加水分解および水素化分解されるブロッキング剤でブロックし、遊離した形にあるカルボキシル基を還元剤と反応させて対応するアルコールにし、非末端位置のアミン官能基をフリーにした後に式R₂OH(ここでR₂は上記定義のもの)のカルボン酸の活性誘導体を用いてアシル置換し、次いで、末端位置のアミン官能基を水素化分解によって遊離させて、一般式(II) :

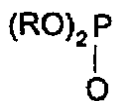


(ここで、R₂は2～24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、一つ以上の上記定義の置換基を有していてもよく、pは3または4であり、qは1である)

のジアミノアルコールを作り、このジアミノアルコールを不活性溶媒中でペプチド縮合剤の存在下で下記一般式(III) :



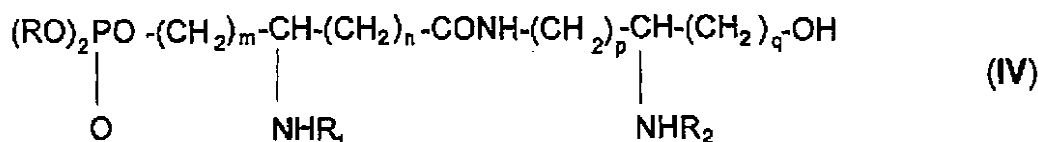
[ここで、 R_1 は2～24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、上記定義の置換基を一つ以上有してもよく、 m は1～4であり、 n は0であり、 X は下記式のジアルキルオキシ-またはジアリールオキシ-ホスホリル基を表す：



10

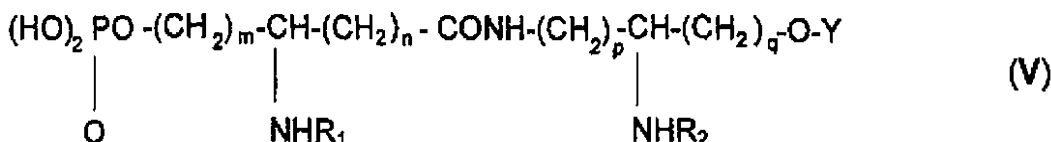
(ここで、 R は容易に水素化分解される基を表す)

の-ヒドロキシアミノ酸誘導体と縮合させて下記一般式(IV)：



(ここで、置換基 R_1 、 R_2 、 R および添字 n 、 m 、 p 、 q は上記定義の意味を有する)のジペプチド様化合物にし、必要な場合には、上記式(IV)中のアルコール官能基を必要に応じて用いるカップリング剤の存在下でホスホリル化剤によってホスホリル化し、 R_2 中にアルコール基が存在する場合には触媒水素化によってそれをフリーにし、第2のホスフェート基が存在する場合にはそのホスフェート基を第2の水素化分解でフリーにして下記一般式(V)：

20



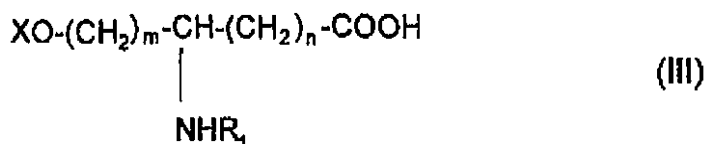
(ここで、 Y は水素原子またはフォスフォノ基を表し、 m 、 n 、 p および q は上記の意味を有する)

の誘導体とし、必要な場合には有機または無機塩基を用いてさらに塩の形にする。

30

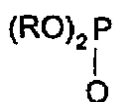
【請求項9】

一般式(I)の化合物の合成中間体である下記式(III)の-ヒドロキシアミノ酸誘導体：



[ここで、 R_1 は2～24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび((C1-24)アルキル)チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、 m は1～4であり、 n は0であり、 X は下記式のジアルキルオキシ-またはジアリールオキシ-ホスホリル基を表す：

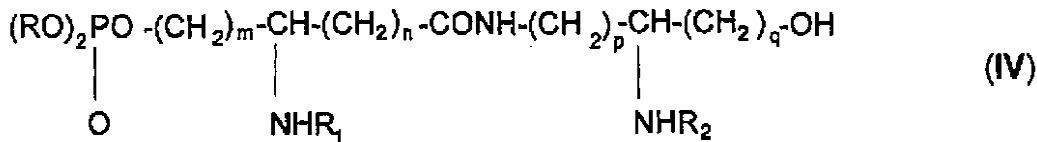
40



(ここで、 R は容易に水素化分解されるアルキル基またはアリール基を表す)

【請求項10】

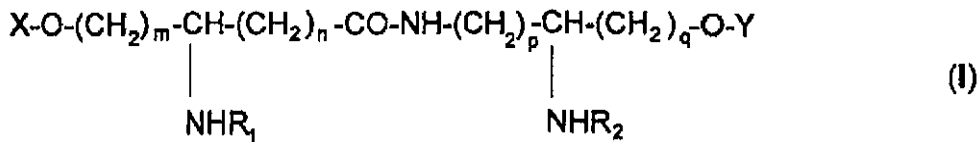
一般式(I)の化合物の合成中間体である下記式(IV)のジペプチド様化合物：



(ここで、置換基 R_1 、 R_2 および添字 n 、 m 、 p 、 q は請求項 1 に定義の意味を有し、 R は容易に水素化分解されるアルキル基またはアリアル基を表す)

【請求項 1 1】

有効成分として少なくとも一種の請求項 (I) に記載の下記一般式 (I) の化合物を含み、それと一緒にまたは混合して薬学的に許容される無毒な不活性賦形剤またはキャリアを含む医薬組成物：



[ここで

R_1 および R_2 は直鎖または分岐した 2 ~ 24 の炭素原子を有する飽和または不飽和のカルボン酸鎖に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび (C1 - 24) アルキル) チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、

m は 1 ~ 4 であり、 n は 0 であり、 p は 3 または 4 であり、 q は 1 であり、

X および Y は水素またはホスホノ基を表し、ただし、置換基 X および Y の少なくとも一つはホスホノ基を表す)

【請求項 1 2】

式 (I) の化合物の X および Y がホスホノ基を表す請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

有効成分が治療用途の有機または無機塩基との塩の形をしている請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

有効成分が純粋なエナンチオマーの形または立体異性体混合物の形をしている請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】

本発明は化学の分野、特に医薬品に関するものである。

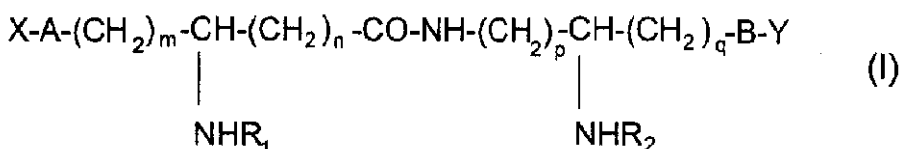
本発明は特に、ヒドロキシ化されたアミノ酸から得られる、アミノ酸のフリーなアミン官能基が脂肪酸によってアミド化された準ジペプチド (pseudodipeptides) 化合物 (以下、ジペプチド様化合物という) に関するものである。

【0002】

本発明は特に、少なくとも一つの水酸基が中性または帯電した形の酸基によってエステル化された、下記一般式 (I) で表される N-アシルされたジペプチド様化合物に関するものである：

【0003】

【化 1 5】



【0004】

10

20

30

40

50

[ここで

R_1 および R_2 は直鎖または分岐した2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和のカルボン酸に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび((C1-24)アルキル)チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、

m 、 p および q は1~10の整数であり、

n は0~10までの数であり、

X および Y は水素または中性でも帯電した形でもよい酸基を表し、ただし、置換基 X および Y の少なくとも一つは中性または帯電した形の酸基を表し、

A および B は互いに独立して酸素原子、硫黄原子またはイミノ基-NH-を表す]

置換基 X および Y は下記の1)~9)の中から選択するのが好ましい :

- 1) カルボキシ[(C1-5)アルキル]
- 2) $\text{CH}-(\text{CH}_2)_m\text{COOH}[(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]$
(ここで $m = 0 \sim 5$ 、 $n = 0 \sim 5$)
- 3) ホスホノ[(C1-5)アルキル]
- 4) ジヒドロキシホスホリルオキシ[(C1-5)アルキル]
- 5) ジメトキシホスホリル
- 6) ホスホノ
- 7) ヒドロキシスルホニル
- 8) ヒドロキシスルホニル[(C1-5)アルキル]
- 9) ヒドロキシスルホニルオキシ[(C1-5)アルキル]

10

20

【 0 0 0 5 】

置換基 X および Y または Y が中性である酸基としてはフリーなカルボキシル基、スルホン酸基または燐酸基を挙げることができる。帯電した形の酸基としてはカルボン酸塩、スルホン酸塩または燐酸塩、すなわち、有機または無機塩基、特に医薬用途の塩基の付加塩を挙げることができる。医薬用途以外の塩基は同定、精製および分離のための手段を提供する。

X および Y または Y がカルボキシルアルキル、アルセニルビスカルボキシル、ヒドロキシスルホニル、ヒドロキシスルホニルアルキル、ヒドロキシスルホニルオキシアルキル、ホスホノアルキル、ホスホリルオキシアルキル基を表す場合にも同じことがいえる。

30

【 0 0 0 6 】

医薬用途の塩を形成する塩基にはアルカリ塩基、例えば水酸化ナトリウム、カリウムまたはリチウム、アンモニウム塩、アルカリ土類金属塩基、例えば水酸化カルシウムまたはストロンチウム、マグネシウム塩、第一鉄金属塩や、有機塩基、例えば第一、第二、第三アミン、例えばメチルアミン、ジエチルアミン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、ベンジルアミン、*N*-メチルベンジルアミン、ペラトリルアミン、トリメトキシベンジルアミンや、リシンやオルニチンのような塩基性アミノ酸またはアミノ糖に由来する有機塩基が含まれる。

医薬用途以外の塩基の例としてはブルシン、ストリキニーネ、アグマチン、ホマリン、グルコサミン、*N*-メチルグルコアミンまたは*N*-メチルモルホリンを挙げることができる。既に述べたように、これらから誘導される塩は分離、識別手段として利用できる。

40

【 0 0 0 7 】

m が1で、 n が0の場合の重要な分子はセリンから得られる。 m が2で、 n が0の場合に考えられる分子はホモセリンから得られる。 m が3で、 n が0の場合にはペンタホモセリン化合物になり、 m が4で、 n が0の場合にはヘキサホモセリン化合物になる。

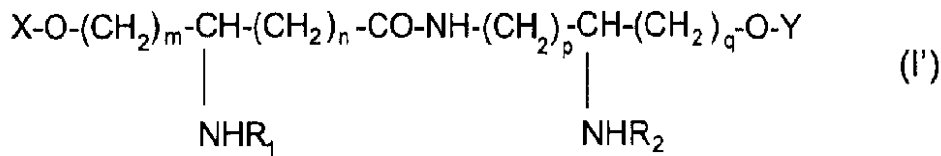
p が3で、 q が1の場合に重要な化合物はシトルリン、オルニチンまたはアルギニン化合物である。 p が4で、 q が1の場合にはホモアルギニンまたはリシン化合物が挙げられる。

本発明に含まれるジペプチド様化合物において、下記一般式(1')の化合物に特に注目されたい :

50

【 0 0 0 8 】

【 化 1 6 】



【 0 0 0 9 】

[ここで

R_1 および R_2 は直鎖または分岐した2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和のカルボン酸鎖に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび(C1-24) アルキル) チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、

m 、 p および q は1~10の整数であり、

n は0~10までの整数であり、

X および Y は水素またはホスホノ基を表す]

【 0 0 1 0 】

すなわち、

3-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)9-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)4-オキソ-5-アザデカン-1、10-ジオール1および/または10-二水素ホスフェートおよびその有機または無機塩基付加塩、

3-(3-ドデカノイルオキシ-テトラデカノイルアミノ)9-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)4-オキソ-5-アザデカン-1、10-ジオール1,10-ビス(二水素ホスフェート)およびその有機または無機塩基付加塩、

3-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)9-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)4-オキソ-5-アザデカン-1、10-ジオール1,10-ビス(二水素ホスフェート)およびその有機または無機塩基付加塩、

3-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)9-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)4-オキソ-5-アザデカン-1、10-ジオール1-二水素ホスフェートおよびその有機または無機塩基付加塩、

3-(3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ)9-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)4-オキソ-5-アザデカン-1、10-ジオール1-二水素ホスフェートおよびその有機または無機塩基付加塩、

3-(3-ヒドロキシテトラエカノイルアミノ)9-(3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ)4-オキソ-5-アザデカン-1、10-ジオール10-二水素ホスフェートおよびその有機または無機塩基付加塩。

【 0 0 1 1 】

R_1 および R_2 は飽和または不飽和の分岐または直立鎖の各種長さの鎖を有するアシル誘導体を含み、互いに同一でも違ってしてもよく、アルキル、アミノ、アシルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アシロキシアシルチオおよびアルキルチオ基から成る群の中から選択される一つ以上の置換基を有していてもよい。

アシル化された置換誘導体の例はリシノイル、12-ヒドロキシステアロイル、2-ヒドロキシ-3-メチルブチロイル、3-ヒドロキシ-2-アミノペンタノニル、パルミトイル、エライジル、エレオステアロイル、アラキドイル、アラキドニル、ガドレイル、ベヘニル、エルシル、8-メチルデカノイル、9-メチルデカノイル、ドデカソヘキサノイルまたはエイコサペンタノイル基である。

【 0 0 1 2 】

一般式(I)の化合物、特にコード名でOM-294-MP (MP) およびOM-294-DP (DP) とよばれるモノ-およびビス-フォスフォリル化された化合物は重要な薬理的性質、主として免疫修飾に関する特性を有している。これらは特に免疫防御系の欠失または免疫応答の過剰発現

10

20

30

40

50

に関連する疾患の治療に使われる。どちらの治療に用いるかによって服用量を変える。また、これらは癌の治療およびワクチン製造でのアジュバントまたは応答エンハンサとして使用することができる。

その他の用途としては治療用分子のためのベクターとしての使用がある。これはその親水性または疎水性の作用に基づく共有結合複合体を作るその能力のためである。また、その両親媒特性から治療用分子の形成および膜受容体、細胞膜および細胞原形質への輸送を促進する。本発明化合物は単独または治療用分子と一緒に経口、経腸管外、経直腸、局所、経皮下または経粘膜経路で投与することができる。また、本発明化合物は単独または治療用分子と一緒に血液細胞でイクスピボ即時培養を行って、それを注射する前の免疫応答細胞の形成を促進し、インピボの非経口投与へ戻ることができる。

10

【0013】

上記のMPおよびDPの分子は、適当な抗原と組み合わせて、ウイルス、寄生性、微生物または菌類を起源とする疾患に対する例えばワクチンで用いた場合には免疫系のアジュバントとしてと同様な性質を示す。これとは対照的に、本発明化合物は全く異なる性質を示し、サイトカイン産生や、造血性およびリンパ性器官に由来する免疫適格幹細胞の成熟を誘導する。

MP化合物は、適当な抗原の存在下または非存在下に単核細胞の成熟と官能性樹状細胞への分化を促進し、体液および細胞を介した免疫性を促進する役目をする。一方、DP化合物は抗腫瘍性を示す。

【0014】

20

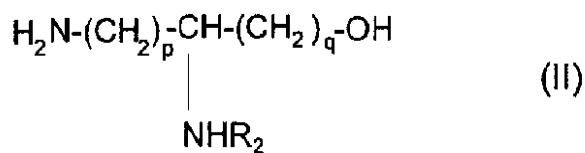
本発明化合物は毒性が低い点で特に重要であり、人間および動物に0.025mgから100mgの単位供与量で服用でき、一日当たりの投与量は0.05から200mgである。

本発明はさらに、一般式(Ⅰ)のジペプチド様化合物の製造方法にも関するものである。本発明方法は、容易に酸加水分解および水素化分解が可能なブロッキング剤によってジアミノ酸の(q+1)位置および位置のアミン官能基をブロックし、フリーであるカルボキシル官能基を還元剤とを反応させて対応するアルコールを作り、(q+1)位置のアミン官能基をフリーにし、次いで、式R₂OHのカルボン酸官能性誘導體(ここで、R₂は上記定義のもの)によってアシル化し、その後、水素化分解によって末端のアミン官能基をフリーにして一般式(Ⅱ)：

【0015】

30

【化17】



【0016】

(ここで

R₂は2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、一つ以上の上記置換基を有していてもよく、pおよびqは1~10まで整数を表す)

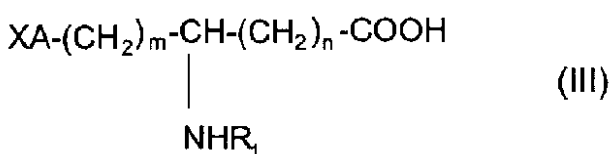
40

のジアミノアルコールを作り、

このジアミノアルコールを不活性溶媒中でペプチド縮合剤の存在下で下記一般式(Ⅲ)：

【0017】

【化18】



50

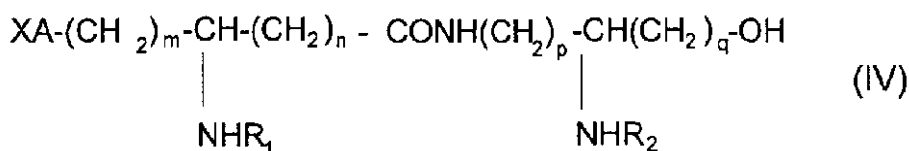
【0018】

(ここで、 R_1 は2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、一つ以上の上記置換基を有していてもよく、 m は1~10までの整数を表し、 n は0~10までの整数を表し、 A は酸素原子、硫黄原子またはイミノ基NHを表し、 X は酸基を表し、必要に応じてエステル形をしていてもよい)

の -ヒドロキシ、 -アミノまたは -チオアミノ酸化合物と縮合させて下記一般式(IV)のジペプチド様化合物にする：

【0019】

【化19】



10

【0020】

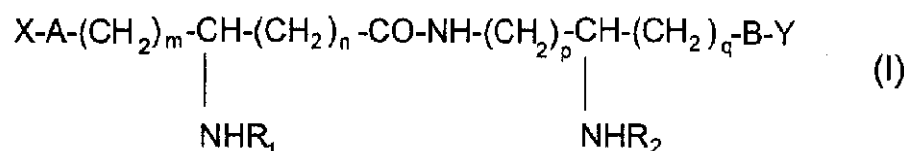
(ここで、置換基 R_1 、 R_2 および添字 n 、 m 、 p 、 q は上記定義の意味を有する)

この式のアアルコール官能基を必要に応じてアルキルまたはアシルでもよく、あるいは、アルキルまたはアシルで置換されていてもよく、さらには、必要な場合にはカップリング剤の存在下に、他の置換試剤で置換されていてもよく、触媒水素化または他の脱保護方法で一般式(I)の誘導体を得る：

20

【0021】

【化20】



【0022】

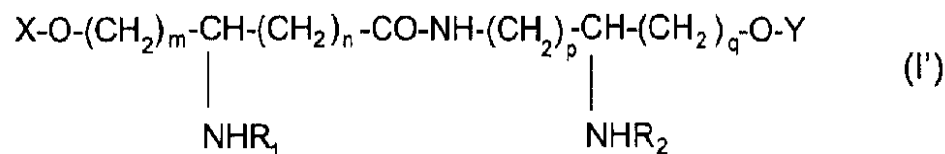
(ここで、置換基および A 、 B 、 X 、 Y 、 R_1 、 R_2 、 n 、 m 、 p および q は上記と同じ意味を有する)。

30

本発明はさらに、下記一般式(I')のフォスフォジペプチド様化合物の製造方法に関するものである：

【0023】

【化21】



【0024】

[ここで

40

R_1 および R_2 は直鎖または分岐した2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和のカルボン酸鎖に由来するアシル基を表し、ヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、アシルチオおよび((C1-24)アルキル)チオ基から成られる群の中から選択される一つまたは一つ以上の置換基を有していてもよく、

m 、 p および q は1~10の整数であり、

n は0~10までの整数であり、

X および Y は水素またはホスホノ基を表し、中性でも帯電した形でもよい]

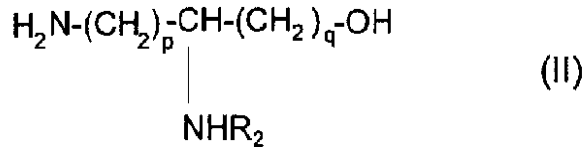
本発明方法は、式： $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_p\text{CHNH}_2(\text{CH}_2)_{q+1}\text{COOH}$ のジアミノ酸の($q+1$)位置および位置のアミン官能基を容易に酸加水分解および水素化分解されるブロッキング剤でブロック

50

し、遊離した形にあるカルボキシル基を還元剤と反応させて対応するアルコールにし、(q+1)位置のアミン官能基をフリーにし、次いで、式R₂OH(ここでR₂は上記定義のもの)のカルボン酸官能性誘導体を用いてアシル置換し、次いで、水素化分解によって末端アミン官能基を遊離させて、一般式(II)：

【0025】

【化22】



10

【0026】

(ここで

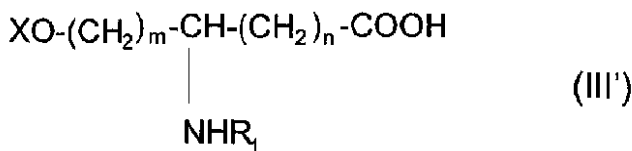
R₂は2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、一つ以上の上記置換基を有してもよく、pおよびqは1~10まで整数を表す)

のアミノアルコールを作り、

このアミノアルコールを不活性溶媒中でペプチド縮合剤の存在下で下記一般式(III')：

【0027】

【化23】



20

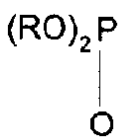
【0028】

(ここで、R₁は2~24の炭素原子を有する飽和または不飽和の直鎖または分枝鎖のカルボン酸に由来するアシル基を表し、一つ以上の上記置換基を有してもよく、mは1~10までの整数を表し、nは0~10までの整数を表し、Aは酸素原子、硫黄原子またはイミノ基NHを表し、Xは下記の式：

30

【0029】

【化24】



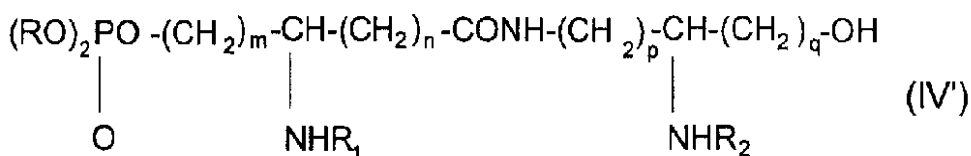
【0030】

ジアルキルオキシ-またはジアリールオキシ-ホスホリル基を表す)

の-ヒドロキシアミノ酸化合物と縮合させて下記一般式(IV')：

【0031】

【化25】



40

【0032】

(ここで、置換基R₁、R₂および添字n、m、p、qは上記定義の意味を有し、Rは容易に水素化分解される基を表す)

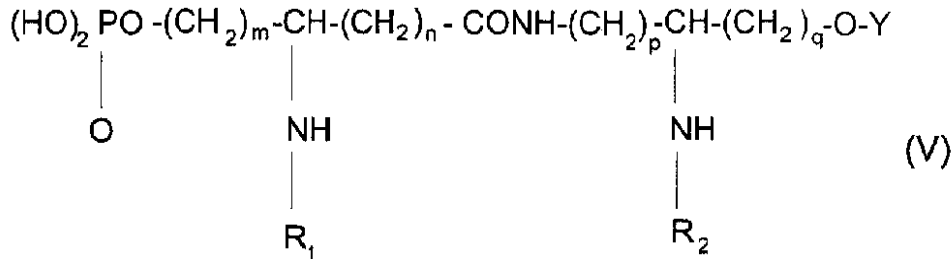
のペプチド様化合物にし、必要な場合には、この式の他のアルコール官能基をカップリン

50

グ剤の存在下で（必要な場合）フォスフォリレート化剤によってフォスフォリレート化し、必要に応じて、触媒水素化してアシル基R₂上に必要に応じて存在するアルコール官能基のブロックを外し、フォスフェート官能基を自由にし、次いで、水素化分解によって必要に応じて存在する第2のフォスフェート官能基のブロックを外して下記一般式(V)の誘導体にする：

【0033】

【化26】



10

【0034】

（ここで、Yは水素原子またはフォスフォノ基を表す）。

さらに、必要に応じて有機または無機塩基によつ塩を作るステップを実行する。

【0035】

アシルアミノ基のキラル中心の立体化学は先ず最初に用いたアミノ酸構造によって決定され、アシルアミノ基の立体化学は最初に用いた脂肪酸の構造に依存する。LまたはD構造のジアミノ酸またはラセミ体から出発することができる。L、D構造のヒドロキシ化されたアミノ酸またはラセミ体混合物から出発することができる。この種の全ての立体異性体またはジアステレオアイソマが本発明の範囲に含まれる。

20

本発明方法は下記の反応スキーム1、2、3（図33、34、35）に概要を示した現時点での好ましい操作手順で定義することもできる：

【0036】

1. オルニチン誘導体鎖の位置のアミン官能基をN-ベンジルオキシカルボニル置換によってブロックする。先ず最初にアルカリ性媒体中で酸官能基を銅の塩と反応させ、銅カルボキシレートとベンジルクロロホルメートと反応させ、酸性環境中で銅をキレート化してエルボン酸基をフリーにし、Organic Preparations and Procedures International, 23, 1992, 191 - 194に開示される方法に従ってN-ベンジルオキシカルボニル置換誘導体を得る。

30

【0037】

2. アルカリ媒体中でアルキルピロカルボネート、例えばtert-ブチルピロカルボネートによってtert-ブチルオキシカルボニル置換を行って、オルニチン誘導体の位置のカルボキシルアミン官能基をブロックする。tert-ブチルピロカルボネートがアミン官能基と反応すると、N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-tert-ブチルカルボニルアミノカルボキシル誘導体を得られる。

40

【0038】

3. Tetrahedron Letters, 32 (1991) 923 -926に開示の方法に従ってカルボキシル官能基を第一級アルコール官能基へ変換する。この方法ではカルボキシル誘導体をアルキルクロロホルメート（例えばイソブチルクロロホルメート）と反応させて混合無水物を作り、それをアルカリまたはアルカリ土類金属のポロハイドレートと反応させて、第一アルコール官能基を有する対応するヒドロキシ化誘導体にする。

【0039】

4. 位置のtert-ブチルオキシカルボニル基の除去をトリフルオロ酢酸を用いて実行する。それと同時にアミン官能基対応トリフルオロアセタトが形成される。
5. フリーになったアミン官能基のアシル化は、R₂OH酸とアルキルクロロホルメートから調製される混合無水物によるトリフルオロ酢酸の塩から出発する。

50

6. 末端アミン官能基の遊離は貴金属をベースにした触媒（例えば炭素またはイリジウム上に保持した白金またはパラジウム）の存在の水素化分解で行う。

【0040】

7. 式(II)のアミノ化合物と式(III')のホスホリル誘導体との間のペプチドカップリングまたは連結は、カップリング剤、例えば1-イソブチルオキシ-2-イソブチルオキシカルボニル-1, 2-ジヒドロキノリンの存在に不活性溶媒（例えばハロゲン含有溶媒）の存在下またはカルボジイミドの存在下で行う。

こうして、一般式(IV')のジペプチド様化合物が得られる。この化合物のアシル基 R_2 によって生じるヒドロキシル官能基は必要に応じてブロックされる。

【0041】

8. アシル基 R_2 のヒドロキシル官能基をフリーにするには炭素等の基質上に塗布したパラジウムのような貴金属の存在下で水素化分解する。

9. 燐酸基をフリーにするには酸化白金のような貴金属酸化物の存在下で触媒水素化する。

10. ジペプチド様誘導体(IV')のフォスホリル化は2段階で行う(Helv. Chim. Acta, 70(1987), 175)。最初のステップで、カップリング剤、例えば[1H]-テトラゾールテトラの存在下で、ヒドロフランのような極性溶媒中で化合物(IV')をジアルキルまたはジアリール-N,N-ジアルキルフォスホロアミダイト(phosphoramidite)と反応させる。得られた亜リン酸エステルを芳香族ペルオキシカルボン酸、例えばたとえばペルオキシフタル酸、m-クロロ過安息香酸またはニトロ過安息香酸によって酸化してフォスフェートにする。燐酸基Y(式V)をフリーにするには炭素に含浸したパラジウムのような貴金属の存在下で触媒水素化する。

【0042】

11. ホモセリン誘導体のフォスホリル化はピリジンおよびN,N-ジアルキルアミノピリジンの存在下でハロゲン化ジフェニルホスホリルによって行う(Helv. Chim. Acta, 58:(1975), 518)。まず、アルカリ媒体中でtert-ブチルピロカーボネートによってtert-ブトキシカルボニル置換でアミン官能基をブロックし、次いで、カルボニル置換基をブロックし、セシウム塩を形成し、ジメチルホルムアミドまたはジメチルアセトアミド中でベンジルハライドによってカルボキシル官能基をベンジル化する。

【0043】

12. ホモセリン誘導体の窒素原子のアクリル化は、トリフルオロ酢酸によってアミン官能基の保護を解除してアミノトリフルオロ酢酸塩を得、N-メチルモルホリンのようなアミンの存在下でのカルボン酸 R_1OH とアルキルクロロホルメートとの反応で得られる混合無水物と反応させる。

【0044】

本発明はさらに、純粋のエナンチオマーまたは立体異性体混合物の形をした、一般式(II)(III)および(III')の中間体に関するものである。

本発明はさらに、少なくとも一種の一般式(I)の化合物を中性または帯電させた形で有効成分として含み、それと薬学的に許容される有毒、不活性な賦形剤またはキャリアとを組合わせた医薬組成物に関するものである。

本発明は特に、有効成分として一般式(I)の化合物の少なくとも一種の塩と、治療を目的とする有機または無機の塩基とを一緒に含む医薬品組成物に関するものである。

【0045】

本発明はさらに、純粋なエナンチオマーの形または立体異性体の混合物の形の一般式(I)の化合物をベースにし、それに製薬賦形剤またはキャリアとを組合わせた医薬組成物に関するものである。

医薬品製剤としては経粘膜投与、経皮、局所投与、経腸管外、経消化系または吸入投与が挙げられ、例えば糖衣錠、非糖衣錠、カプセル、注射液、懸濁液、スプレー、ゲル、膏薬または速吸収液等が適している。

本発明の化合物は水溶液または懸濁液にし、必要に応じてアミンまたはヒドロキシルアミ

10

20

30

40

50

ンによって中和した注射液として投与するのが好ましい。

以下、本発明の実施例を示すが、本発明が以下の実施例に限定されるものではない。本発明の反応スキーム1~6は図33~38にその概要が示されている。

【0046】

実施例1

4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-2-[(R)3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]ブタン酸

1. N -tert-ブチルオキシカルボニル-DL-ホモセリン

2gのホモセリン(16.78mmol)を20mlの水に溶解し、得られた溶液に16.78mlの1M NaOHと3.006gの炭酸セシウム(9.23mmol)とを加えた。5分間攪拌した後、溶液を氷/水浴で冷却された。次に、60mlのジオキサソールとtert-ブチルピロカルボネートを加えられた。反応液を氷/水浴で中で1時間攪拌した後、室温で5時間攪拌した。次いで、溶媒を真空除去した。乾燥した残さ次のステップで直接用いた。

10

【0047】

2. N -tert-ブチルオキシカルボニル - ベンジル-DL-ホモセリネート

ステップ1の残基に20mlのジメチルホルムアミドを加え、溶媒を蒸発乾燥させた。次いで、60mlのジメチルホルムアミドと、4.5mlの臭化ベンジル(20.13mmol)とを反応液に加えた。この時点で白い沈澱物ができる。混合物を16時間攪拌下に維持する。次いで溶媒を真空除去する。残基を乾固し、20mlの酢酸エチルで二度抽出する。有機層を水(20ml)と塩水(20ml)とでそれぞれ洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥する。溶媒を蒸発する。残さは次のステップで使用する。

20

【0048】

3. ベンジルN -tert-ブチルオキシカルボニル(0-(ジフェニルオキシホスホリル)-DL-ホモセリネート

前のステップの残基を高真空下で乾燥した後、塩化メチレン(60ml)に溶かす。次いで、溶液に4.11gの4-ジメチルアミノピリジン(33.56mmol)を加え、反応液を10分間攪拌し、12mlのピリジンと6.95mlのクロロホスフェート(33.56mmol)とを加える。溶液を18時間の室温で攪拌した後、1N-塩酸塩(5x20ml)、水(30ml)および塩水(30ml)で洗浄する。有機層は無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を真空除去する。残基はフラッシュクロマトグラフィ(ヘキサソール/酢酸エチル=4:1)で精製する。主要画分を濃縮して残基を結晶化する。その結果、7.49gのフォスホリレート化された化合物が得られた(収量:82.4%)。融点:63.5-64.0。

30

【0049】

4. ベンジル0-(ジフェニルオキシホスホリル)-DL-ホモセリネート

前のステップ(7.88g、15.4mmol)のフォスホリレート化された化合物を15mlのトリフルオロ酢酸に溶解し、溶液を室温下で2.5時間攪拌する。溶媒を真空除去し、残基をフラッシュクロマトグラフィ(MeOH/CH₂Cl₂ = 10:1)で精製する。主要画分を濃縮して残基を室温で結晶化する。その結果、7.17gのフォスホリレート化された化合物を回収する(収量:88.9%)。これを次のステップでそのまま使用する。

【0050】

5. ベンジル2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)プトネート

Bull. Chem. Soc. Jpn., 60 (1987), 2205 - 2214に記載の方法に従って調製した4.284g(10.07mmol)の(R)3-ドデカノイルオキシテトラデカン酸を30mlのテトラヒドロフランに溶解し、溶液を氷冷した塩水槽で-15℃に冷却する。次いで、1.108ml(10.07mmol)のN-メチルモルフォリンと、1.31ml(10.07mmol)のイソブチルクロロホルメートを加える。攪拌を30分間継続する。反応液に30mlのテトラヒドロフランと5mlのトリエチルアミンとの混合物中に溶かした5.724g(10.07mmol)のベンジル0-(ジフェニルオキシホスホリル)-DL-ホモセリネートを加える。室温で一晩攪拌した後、溶媒を真空除去し、残基に20mlの水を加える。得られた混合物を酢酸エチル(2x30ml)で抽出し、有機層を水(20ml)お

40

50

よび塩水(20ml)で連続して洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥する。溶媒を蒸発し、残基をフラッシュクロマトグラフィで精製した(ヘキサン-酢酸エチル 2:1、 $R_f = 0.29$)、収量7.455 g すなわち87.1%、m.p. $31.0^\circ - 32.1^\circ$ 、 $^1\text{H-NMR}$ (250MHz、 CDCl_3)、ppm: 7.4 - 7.1 (15H, m)、6.90 (2d, 1H, 3J 7.6Hz =, NH)、5.3-5.1 (3H, m)、4.7 (1H, m)、4.35 (2H, m)、2.45 (2H, m)、2.4-2.1 (4H, m)、1.6 (4H, m)、1.4-1.1 (34H, m)、0.9 (6H, t)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (63MHz、 CDCl_3) (ppm): 173.01、171.08、169.66、150.18 (d (2JP, C =) 7.1Hz) 135.01、129.60、128.33、128.14、127.96、125.21、119.80 (d (3JP, C =) 5.0Hz)、70.69、67.05、65.19 (d, 2JP, C = 5.6Hz)、49.13、40.97、40.77 (二つのdiast.)、34.20、33.98、33.82、31.70、29.42、29.34、29.14、28.94、25.01、24.47、13.91。

10

【0051】

6. 4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-ブタン酸

ステップ5で得られた2.23gすなわち2.6mmolのベンジルエステルを三つの首丸底フラスコ中で300mlのHPLC-グレートメタノールに溶かした溶液を調製する。次いで、10%炭素-パラジウムを1.0g加える。丸底フラスコ中の空気を真空除去してからフラスコに大気圧下の水素ガスを加える。

反応液を1時間室温で攪拌し、触媒を膜で素早くろ過して取り除く。ろ液を濃縮すると無色の溶液が得られる。得られた化合物が均質であることを薄層クロマトグラフィおよびNMRで確認する。この化合物を精製処理しないで次のステップで直接使用する。 $R_f = 0.75$ (ジクロロメタン-メタノール-トリエチルアミン10:1:0.5)。 $^1\text{H-RMN}$ (250MHz、 CDCl_3) (ppm): 7.4 - 7.1 (10H, m)、6.85 (2d, 1H, NH)、5.15 (1H, m)、4.6 (1H, m)、4.35 (2H, m)、2.45 (2H, m)、2.4-2.15 (4H, m)、1.6 (4H, m)、1.4-1.1 (34H, m)、0.9 (6H, t)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (63MHz、 CDCl_3) (ppm): 173.35, 171.30 (2 diast.), 172.75, 170.37, 150.0 (d, 2JP, C = 7.5 Hz), 129.55, 125.28, 119.71 (d, 3JP, C = 4.4 Hz), 70.78, 65.65, (d, 2JP, C = 5.9 Hz), 49.00, 40.77, 40.63 (2 diast.), 34.13, 33.86, 33.76, 31.59, 29.31, 29.25, 29.03, 28.82, 24.88, 24.68, 22.36, 13.76。

20

【0052】

4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]-ブタン酸は実施例Iのステップ5で(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカン酸を(R)-3-ベンジルオキシテトラデカン酸に代えることによって同じ反応スキームで調製することができる。

30

【0053】

実施例II

(2R)-5-アミノ-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]-ペンタン-1-オール

1. D-オルニチンの銅塩

D-オルニチン(5.25gすなわち30mmol)の1M水酸化ナトリウム溶液30mlに50mlの硫酸第二銅五水和物(3.814gすなわち15.3mmol)の水溶液を加えた。氷水浴で2時間継続して攪拌した。溶媒を乾燥蒸発させた。60mlのメタノールを加えると紫色をした固体が得られた。それを分離し、ジオキサンおよびメタノールで洗浄した。

40

【0054】

2. (2R)-5-アミノ-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ)ペンタノ酸銅

得られた紫色の固体を40mlの1Mソーダ灰と70mlのジオキサンに溶解し、溶液を氷水浴で冷却し、5.14ml(36mmol)のベンジルクロロホルメートを加えた。氷水浴で3時間攪拌した。その後、室温で15時間攪拌を継続した。紫色の沈澱物を集め、95%エタノール(40ml)、水(50ml)、そしてエタノール(60ml)で洗浄した。沈澱物を炉(真空下、 $T < 45^\circ$)中で乾燥した。2段階プロセスでの収量は8.27g、すなわち予測収量の93%であった。

【0055】

3. (2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(tert-ブチルオキシカルボニルア

50

ミノ)ペンタン酸

ステップ2で得られた銅塩を2M - 塩酸 (400ml) に溶解し、それにEDTA (27.8mmol、8.15g) を加えた。得られた混合物を2.5時間攪拌し、ソーダ灰 (約160ml) を加えてpH 7に中和した。白い沈澱物が得られた。混合物を氷水浴で2.5時間攪拌した。沈澱物を濾過し、排水が無色になるまで冷水で洗浄した。次いで、炉中で60 で乾燥した。得られた固体を1M - NaOHの156mlに溶解し、溶液を氷水浴で冷却した。この溶液にジオキサン (160ml) に溶かした7.7g、35.2mmolのtert-ブチルピイロカルボネートを加えた。混合物を0 で45分間、室温で16時間攪拌した。有機系溶剤を蒸発させてから、残基に70mlの酢酸エチルを加えた。水層は2N - 塩酸塩を加えてPhを約3に酸性化した。水層を再度100mlの酢酸エチルで抽出した。有機層を合せ、水 (30ml) そして塩水 (30ml) で洗浄した。溶媒は真空除去した。フラッシュクロマトグラフで精製後に無色の油が得られた (2段階ステップでの収量: 8.42g、すなわち予測収量の76.7%) (Rf = 0.19、ジクロロエタン - MeOH 20 : 1)。

10

【0056】

4. (2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(tert-ブチルオキシカルボニルアミノ)ペンタン-1-オル

ステップ3で得られたジアミノペンタン酸誘導体5.45g (すなわち14.8mmol) の冷えた溶液 (-15) に60mlのTHFと、1.654ml (すなわち14.8mmol) のN-メチルモルホリンと、9.6ml (14.8mmol) のイソブチルクロロホルメート (IBCF) を加えた。溶液を-15 で1分間攪拌してから、10mlの水に溶かした5.104g (44.6mmol) の水素化ホウ素ナトリウムを加えた。-15 でさらに10分間攪拌した後、400mlの水を加えて反応を停止した。得られた溶液を酢酸エチル (100ml × 2) で抽出した。有機層を合せ、50mlの水および60mlの塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥した。溶媒を除去し、残基を酢酸エチル/ヘキサン混合物から再結晶した (4.95g、収量94.9%)。m.p. 47.5 - 48 。

20

【0057】

5. 2,5-ジアミノペンタン-1-オル誘導体のアンプロキシング

ステップ4で得られた6.32 g (18mmol) の (2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-(tert-ブチルオキシカルボニルアミノ)-ペンタン-1-オルを室温で25mlのトリフルオロ酢酸に溶かし、溶液を2.5時間攪拌した。溶媒を蒸発除去し、残基をフラッシュクロマトグラフで精製した (MeOH/CH₂Cl₂ = 10 : 1)。この結果、室温で溶ける無色のガラス状バルク製品が得られた。収量はトリフルオロ酢酸塩に関して5.45gであった (収量=82.7%)。塩酸塩化合物は133.0 ~ 134.3 °で熔融 (メタノールから再結晶)。

30

【0058】

6. (2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オル

予め-15 に冷した溶液に30mlのテトラヒドロフランに溶かした5.27g (15.8mmol) の (R)-3-ベンジルオキシテトラデカン酸 (Bull. Chem.Soc., Jpn., 60 (1987), 2197-2204) と、1.89ml (15.8mmol) のN-メチルモルホリンと、2.21mlのIBCF (15.8mmol) とを加えた。反応液を攪拌下に-15 に30分間保った。この溶液に30mlのテトラヒドロフランに溶かした上記実施例のトリフルオロ酢酸塩5.25g (14.4mmol) と1.44mlのトリエチルアミンとを加えた。16時間の室温で攪拌を継続し、30mlの水と60mlの酢酸エチルとは加えた。有機層を分離し、水層は一度だけ酢酸エチル (60ml) で抽出された。有機層を合わせ、水 (30ml)、そして塩水 (30ml) で洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥した。溶媒を蒸発させ、残基を酢酸エチル/ヘキサン混合物から再結晶された (収量5.842gすなわち71.2%)。m.p.= 117.5 (118)、Rf = 0.32、酢酸エチル - 石油エーテル3 : 1。

40

¹H-NMR (250MHz、CDCl₃) (ppm) : 7.4 - 7.2 (10H, m)、6.5 (2d、1H、NH)、5.1 (2H, s)、4.9 (m、1H、NH)、4.5 (2d、AB、2H)、3.8 (2H, m)、3.5 (2H, m)、3.1 (2H, m)、2.4 (2H, m)、2.4 (2H, m)、1.6-1.4 (6H, m)、1.4-1.2 (18H, m)、0.9 (3H, t)。¹³C-NMR (63MHz、CDCl₃) (ppm) : 172.24、156.49、138.06、136.53、128.46、128.04、127.87、76.76、71.39、66.60、65.44、51.54、41.43、40.65、33.76、31.87、29.61、29.30、28.01、26.47、25.05、22.65、14.09。

50

【 0 0 5 9 】

7. (2R)-5-アミノ-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オール

三首フラスコ中で300mlのHPLCグレードのエタノール中に溶かした(2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オール(3.0g、5.27mmol)と6mlのトリエチルアミンとの溶液に150mgの20%パラジウム/炭素を加えた。空気を真空除去してからフラスコに水素を加えた。反応液を室温で2時間攪拌してから触媒を限界濾過して取り除き、ろ液を濃縮すると、TLCで示すように、次のステップで精製なしに使用可能な均質な白い固体を得た。Rf = 0.2、ジクロロメタン-メタノール-トリエチルアミン5:10.5、m.p.= 47-48。

¹H-NMR (250MHz、CDCl₃) (ppm) : 7.4 - 7.2 (5H, m) 6.75 (d, 1H, NH) 4.5 (2d, AB, 2H)、3.9 (2H, m)、3.5 (2H, m)、2.3-2.6 (7H, m)、1.7-1.2 (24H, m)、0.9 (3H, t)。¹³C-NMR (63MHz、CDCl₃) (ppm) : 171.86、138.13、128.37、127.87、127.75、76.81、71.50、64.57、51.38、41.51、41.17、33.89、31.82、29.26、28.57、28.03、25.07、22.60、14.04。

(2R)-5-アミノ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オールは、実施例IIに記載のステップ6で(R)-3-ベンジルオキシテトラデカン酸を(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカン酸に代えて同じ反応スキームで得られる。

【 0 0 6 0 】

実施例III

3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-デカン-1、10-ジオール1-ニ水素ホスフェート

1. ペプチドカップリング

20mlの塩化メチレンに溶かした実施例Iで得られた(2Rs)-4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]ブタン酸の溶液(1.0mmol)に、363.6mg(1.2mmol)IDQ(1-イソブチルオキシ-2-イソブチルオキシカルボニル-1、2-ジヒドロキノリン)を懸濁する。15分間攪拌した後、10mlの塩化メチレンに溶かした実施例IIの(2R)-5-アミノ-2-[(R)-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オールの1.0mmolを加え、反応液を4時間攪拌下に維持する。

得られた溶液を濃縮し、残基をフラッシュクロマトグラフ(CH₂Cl₂/アセトン= 5:2、Rf 0.23)で精製した。溶媒を除去するとフォスホリレート化されたジペプチド様化合物の無色の濃厚な溶液が得られる(0.620g、収量52.7%)。Rf = 0.49、ジクロロメタン-メタノール-トリエチルアミン(10:1:0.5)。

¹H-NMR (250MHz、CDCl₃) (ppm) : 7.40 - 7.15 (m, 15), 7.00 (m, 1H), 6.90 and 6.80 (2d, 2 diast., 1H), 6.65 (d, 1H) (3 x NH), 5.15 (m, 1H), 4.50 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.41 - 2.14 (m, 8H), 1.6 - 1.4 (m, 8H), 1.4 - 1.1 (m, 54H), 0.9 (t, 9H, 3CH₃)。 ¹³C-NMR (63MHz、CDCl₃) (ppm) : 173.11, 171.68, 170.52 (2 diast.), 169.94 (2 diast), 150.0 (d, JPC = 7.2 Hz), 138.0 (2 diast.), 129.58, 127.99, 127.49, 127.26, 125.24, 119.73 (t, JPC = 5.0 Hz), 76.48, 71.12, 70.71, 65.86 (broad spin), 64.22, 50.96, 49.71 (broad spin), 41.46, 41.05, 39.07, 34.13, 34.00, 32.70, 31.61, 29.34, 29.06, 28.87, 27.98, 25.25, 24.92, 24.72, 22.38, 13.80。

【 0 0 6 1 】

2. 1-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-10-オール

65mlのHPLCグレードのエタノールに溶かした上記で得られたフォスホリレート化されたジペプチド様化合物の溶液(488mg、0.42mmol)と酢酸(1.9ml)とを三首丸底フラスコに入れ、炭素に担持させた10%のPdを含むパラジウム200mgを加えた。空気を真空除去した後、フラスコに水素を加えた。反応液を2時間室温で攪拌してから触媒を限界濾過で取り除

10

20

30

40

50

き、溶媒を真空除去すると、92%の収量で粗製品が回収された。この粗製品のサンプルをフラッシュクロマトグラフ (CH₂Cl₂/アセトン5:4、R_f = 0.24) で精製すると、ガラス状の固体が得られた。R_f = 0.68、塩化メチレン - メタノール 5:2。

¹³C-NMR (63MHz、CDCl₃) (ppm) (ジアステレオアイソマの存在のための二重項の形の2、3の信号が観測された) : 173.60、173.15、170.67、170.60、170.27、170.07、150.24 (d)、129.92、125.66、120.05、119.90 (2d)、71.11、71.05、68.83、66.21 (幅広いスピン)、64.71、51.38、50.32、50.12、43.25、43.12、41.66、41.57、39.30、37.26、34.45、32.84、31.86、29.62、29.5、29.29、29.13、28.08、25.57、25.19、24.97、22.62、14.03。

【 0 0 6 2 】

3. 3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1、10-ジオール1-二水素ホスフェート
絶対エタノール (5ml) 中で水素で10分間予備活性化した酸化白金 (137mg) を三首丸底フラスコに入れ、絶対エタノール (20ml) に溶かした1-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-10-オール (411mg、0.38mmol) の溶液を加えた。空気を高真空にして除去した後、フラスコに水素を入れた。反応液を室温で2~3時間攪拌し、触媒を限界濾過で取り除き、最後に溶媒を真空除去した。その結果、白い固体の形の粗製品が得られた (粗製品収量: 98%)。R_f = 0.50、クロロホルム - メタノール - 水、6:4:0.6。

3-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-デカン-1、10-ジオール1-二水素ホスフェートは、同じ反応スキーム (スキーム3) (図35) に従って、4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ブタン酸および (2R)-5-アミノ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オールを出発物として得られる。

【 0 0 6 3 】

また、3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-デカン-1、10-ジオール1-二水素ホスフェートはアスパラギン酸から出発して以下の反応スキームで得られる (反応スキーム1、5、6) (図33、37、38)。すなわち、(2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オールのフリーなOH官能基をベンジルオキシメチル基で保護し、この化合物の5-アミノ官能基を水素化分解によってフリーにし、このアミンをアミン官能基の所に保護基または (R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイル基を有するDまたはL-アスパラギン酸のモノエステル誘導体とペプチドカップリングさせる。無水混合物によって末端のカルボキシル官能基をフリーにし、還元し、必要に応じて、アスパラギン酸に由来するアミン官能基の保護を外し、(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカン酸誘導体でN-アシル化し、C₁の所のヒドロキシ官能基をフォスホリレート化し、最後に水素化分解によってフォスフェートおよびヒドロキシル官能基のブロックを外す。

【 0 0 6 4 】

実施例 IV

3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1、10-ジオール1、10-ビス (二水素ホスフェート) の製造

1-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]デカン-10-オール (985mg、0.84mmol) をテトラヒドロフラン (35ml) 中で [1H]-テトラゾール (182mg) の存在下で、ジベンジルN,N'-ジエチルフォスフォロアミダイト (amidite) (0.58ml、純度85%) と室温で30分間反応させる。このヤオスファイト中間体を25mlの塩化メチレ

10

20

30

40

50

ンに溶かしたm-クロルペルオキシ安息香酸(535mg)の溶液を加えて0 から-20 の温度で酸化させる。20分後、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20ml) の溶液を加えて過剰な酸化剤を中和し、有機層をエーテルで希釈する。有機層を分離し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 × 20ml) の水溶液、 NaHCO_3 (2 × 20ml) の溶液、次いで塩酸水溶液(20ml)で洗浄した後、 MgSO_4 上で乾燥させ、濃縮した。粗製品はシリカゲルのフラッシュクロマトグラフ処理で精製した(CH_2Cl_2 - アセトン10 : 3)。こうして得られた保護されたジフォスフォリレート化誘導体が(900mg、75%収量)(R_f 0.64、ジクロロメタン - アセトン5 : 2)を、HPLCグレートのメタノール(1000ml)中で、10%のパラジウム - 炭素(300mg)の存在下、室温、大気圧下で4時間、触媒水素化した。触媒を限界濾過で取り除き、ろ液を減圧濃縮して、粗製品の10-(ジヒドロキシホスホリルオキシ)-1-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカンを89%の収量で回収した(R_f = 0.63、クロロホルム-メタノール - 水6:4:0.6)。この粗製品をHPLCグレートのエタノール(130ml)中で大気圧下、室温で2 4 時間、酸化白金(380mg)上で触媒水素化した。触媒は限界濾過で取り除き、ろ液を濃縮すると、フリーなビス二水素ホスフェート化合物を得る(R_f = 0.20 (クロロホルム - MeOH - 水 6 : 4 : 0.6))。

【0065】

3-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-デカン-1、10-ジオール1,10-ビス(二水素ホスフェート)は、4-(ジフェニルオキシホスホリルオキシ)-2-[(R)-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ブタン酸および(2R)-5-アミノ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オールから出発して同じ反応スキーム(スキーム3)(図35)で得られる。

また、3-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1、10-ジオール1,10-ビス(二水素ホスフェート)は、アスパラギン酸から出発して以下の反応スキーム(反応スキーム1、4、6)を用いて得られる。すなわち、(2R)-5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-2-[(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイルアミノ]ペンタン-1-オールの5-アミノ官能基を水素化分解によってフリーにし、このアミンをアミン官能性の所に保護基または(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイル基を有するDまたはL-アスパラギン酸のモノエステル化誘導体とペプチド連結させ、無水混合物によって末端カルボキシル基をフリーにし、還元し、必要な場合には、アスパラギン酸に由来するアミン官能基の保護を外し、(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカン酸誘導体をN-アシル化し、 C_1 および C_{10} の所のヒドロキシ官能基をフォスフォリレート化し、最後に水素化分解によってホスフェートおよびヒドロキシル基のブロックを外す。

【0066】

実施例 V

本発明化合物の精製と分析

1. モノフォスフォリレート化およびジフォスフォリレート化された化合物の精製

モノフォスフォリレート化およびジフォスフォリレート化された合成物を0.1%のトリエチルアミンを含む水-イソプロパノール混合物(1:1 vol/vol)中に溶し、pHを8~9の範囲に調節した。次いで、2M-重炭酸アンモニウムの必要量を加えて25mMの濃度にした。

精製は下記条件下で逆相HPLCで行った：

コラム：Bondapack C18 Prep Pak、40 × 200mm、15-20 μm、300ナ、Waters

移動相：

A：イソプロパノール - 水、1 : 1、vol/vol、50mM重炭酸アンモニウム

B：イソプロパノール - 水、2 : 8、vol/vol、50mM重炭酸アンモニウム

流量：40ml/分

溶出：コラム上でのアイソクラチック吸着：40% B (60% A)、10分

A : B 勾配 : 40 - 80%B 10分以内

10

20

30

40

50

アイソクラチック溶出：80%B、30分

洗浄ステップ：100%B、10分

検出：UV、210ナノメートル（波長）

【0067】

上記溶出条件でモノフォスホリレート化合物の保持時間は25～30分で変化し、ジフォスホリレート化合物の保持時間は18～25分で変化する。モノフェニル化合物の存在が観測されたら（最後の脱フェニル化での脱保護処理が不完全）さらに精密な精製ステップが必要である。この精製は以下の条件で実行する：

コラム：Kromasil C18、21×250mm、5 μm、100ナ、Macherey-Nagel

移動層：

A：イソプロパノール - 水、1：1、v/v、50mM重炭酸アンモニウム

B：イソプロパノール - 水、2：8、v/v、50mM重炭酸アンモニウム

流量：10ml/分

溶出：コラム上でのアイソクラチック吸着：40%B（60% A）、10分

アイソクラチック溶出：

モノ化合物をフォスホリレート化合物：80%B、30分

ジフォスホリレート化合物：74%B、30分

洗浄：100%B、10分

検出：UV、210、254ナノメートル（波長）

モノホスホリレート化合物またはジフォスホリレート化合物を含む画分をアンモニウム塩の形で集め、C18相、Bondapack、15-20 μm、300ナ、Water上での吸着によって濃縮した。モノフォスホリレート化合物またはジフォスホリレート化合物のナトリウム塩は水-イソプロパノール(9：1、v：v)中で10g/l NaCl溶液で洗浄することによって得られる。コラムに5倍の体積の水 - イソプロパノール混合物(9：1、v/v)を流して過剰なNaClを除去した後、化合物を純粋なイソプロパノールで溶出する。溶媒はローターパー (Rotavapor)で乾燥蒸発させる。必要量の水(モノフォスホリレート化合物の場合には0,1%トリエタノールアミン)を添加して、目標濃度の2mg/mlにする。滅菌濾過を0,2 μmフィルタ(Express Membrane, Millipore)で行う。50ml未満の体積の場合にはSteriflip系統は推薦され、50mlを超える体積の場合にはSteritop系統が推薦される。

モノフォスホリレート化合物を扱う際には滅菌濾過前に溶液を室温で超音波処理するのが好ましい(3×10秒)。

【0068】

2. モニターリングおよび精製収量

各ステップの終了後に各画分を下記条件で逆相分析HPLCクロマトグラフで分析する：

コラム：Supelcosil C18、3 μm、4.6×150mm、100ナ、Supelco

移動相：

A：水：アセトニトリル(1：1、v/v)、5mM TBAP

B：水 - イソプロパノール(1：9、v/v) 5mM TBAP

TBAP：テトラブチルアンモニウムフォスフェート

流量：1ml/分

溶出：A：B勾配(75：25 - 0：100)37.5分以内

検出：UV、210、254ナノメートル（波長）

クロマトグラフでモノおよびジフォスホリレート化合物の観測される保持時間は25.5±0.5および20.8±0.5分である。精製収量はモノフォスホリレート化合物では57～94%、ジフォスホリレート化合物では71～92%である。モノ - およびジフォスホリレート化合物は311mgおよび189mg得られる。

【0069】

3. 最終生成物純度レベルでのアッセイおよび分析

得られた製品の量的アッセイおよび純度レベルでの分析は上記のクロマトグラフィ運転条件でHPLC/UVで実施した。このアッセイでは異なるロットから得られたモノおよびジフ

10

20

30

40

50

オスフォリレート化合物の純度レベルが99~100%まで変化した。UVレンジの不活性不純物の存在を示すためにLC/ES-MS分析を行った（エレクトロスプレータイプのイオン化、正のモード）。このために、エレクトロスプレー界面でのイオン化必要条件を満たすために、（5mM）テトラブチルアンモニウムフォスフェートを（25mM）酢酸アンモニウムに置き換えた。

最終溶液を分析するために別の定量法も用いた。例えば、全フォスフェートの定量分析（Ames, B.N., Methods in Enzymology VII (1966), 115 _ 117を採用）、アミノ酸定量分析（Hughes et al., J. Chromatography, 389 : (1987) 327-333を採用）およびアシル鎖定量分析（Miller, L.T., Hewlett Packard Application Note (1984), 228-237を採用）を挙げることができる。

10

【0070】

4. 分光分析

4.1. 質量分析

モノおよびジフォスフォリル化合物のES-MSスペクトル（負および正のモード）を3種類の質量分析機を用いてプロットした（Finnigan LCQ、イオン・トラップ、Micromass Quattro II、三段四重極、Hewlett-Packard MSD、単一四重極）。補足のMS/MS分析も行った。上記製品の同定および純度スペクトルは添付図面に示してある。

ES-MSスペクトル（正のモード）

ジフォスフォリレート化合物：

（Micromass Quattro II：スペクトル1、HP-MSD：スペクトル3）（図39、41）

20

低エネルギーレベルで、メジャーな準分子（pseudomolecular）イオンが1014.6 [M+H]⁺のm/z比で観測される。ナトリウム付加物は1036.6[M+Na]⁺、1058.6[M-H+2Na]⁺、1080.5[M-2H+3Na]⁺のm/z比で観察される。

断片化程度に従って916.5[M-98+H]⁺および818.6[M-98-H]⁺の2つのm/z断片観測される。この事実は分子上に2つのホスホリル基が存在することを示す。スペクトル3（図41）に示すように、観測されたイオンの相対強度は加えたエネルギーレベルによって大きく変化する。

【0071】

モノフォスフォリレート化合物：

（Micromass Quattro II：スペクトル2）（図40）

30

モノフォスフォリレート化合物では、分析される溶液中にトリエタノールアミン（TEoA）が存在するために少し異なるイオン化線図が得られる。メジャーな準分子イオンは934.4[M+H]⁺のm/z比で観測され、ナトリウム付加物[M+H]⁺そしてカリウム付加物[M+K]⁺はそれぞれ956.3および972.3のm/z比で観測される。二番目のグループの付加生成物は1083.4 [M+TEA+H]⁺のm/z比、1105.3 [M+TeOH+Na]のm/z比、1121.3 [M+TeOH+K]⁺のm/z比で同様に観測される。分子内のホスホリル基の存在は836.4[M-98+H]⁺のm/z比に対応する高エネルギー準位で検出され断片によって証明される。

【0072】

ES-MSスペクトル（負のモード）

モノおよびジフォスフォリレート化合物の負のモードでのES-MSスペクトルで観測されるイオン種は、正のモードで得られた結果と良く一致する。

40

FABイオン化分析（正の方式）

低分解レベルで、モノおよびジフォスフォリレート化合物はナトリウム付加物 [M+Na]⁺を956.5および1036.5のm/z比でそれぞれ示す。

高解像度レベル（3-ニトロベニルアルコールマトリクス）では、モノホスファート化合物の場合に、956.667のm/z比でピークが観測された。これは予想された分子式：C₄₉H₆₉O₁₁N₃P₂Naに対応する（予想値：956.668 原子質量単位）。

ジフォスフォリレート化合物の場合には、1036.635のm/z比でピークが記録され、これは予想された分子式：C₄₉H₉₇O₁₄N₃P₂Naに対応する（計算値：1036.634 原子質量単位）。

全てのMS分析は得られた製品が高純度レベルにあることを証明した。

50

この酵素反応は37 で実施され、時間-コースクロモゲン形成を405ナノメートルで測定する。この時間-コース決定アッセイの最終段で0.2単位のODを達成するのに要求される時間を記録、LPS標準（標準曲線）に基づいて内同性活性を計算した。

結果は大腸菌リポサッカライドの標準調整品との関係でEU（エンドトキシン単位）で表した。このアッセイでは1EUはLPS等量の0.08mgに対応する。

結果はかなりの多様性を示した。これは本質に大きさの指数を与えるこの種の量的アッセイでは通常のことである。LAL試験は主として医薬中のパイロジェンの非共存を示すために行われる（エンドトキシン濃度の上限）。このパイロジェンの量的アッセイは周知の一連の標準化実験と比較する必要がある。

結果

本発明化合物で得られた結果（平均±標準偏差）は表(A)に記載してある：

【0078】

【表2】

表(a) リムルスアメーバ様細胞溶解物 (LAL) の放射性化

化合物	EU/mg の LAL 活性	LAL 活性 (LPS 当量) ng eq.LPS/mg
OM-294-DP	56 ± 48	6.2
OM-294-MP	13 ± 2	1.4
大腸菌 LPS (基準)	7.7 ± 1.6 × 10 ⁶	0.85 × 10 ⁶

【0079】

本発明化合物はLAL試験でLPSより10⁶倍非活性である。従って、OM-294-DPおよびOM-294-MPはその毒性が低いため、生物学的製剤活性および免疫修飾物質として作用を考えたときに特に重要である（生体内および試験管内の両方）。

【0080】

2. LPS刺激または本発明化合物に応答したハツカネズミの骨髄幹細胞増殖の決定手順

二匹の6週齢のオスのC57/BL6ハツカネズミをCO₂吸入で殺し、頸部脱臼した。ハツカネズミをアルコールで洗淨し、後股関節部の表皮を完全に除去した。大腿骨および脛骨骨組織は関節破壊して除去した。肉はメスを使用して大きく除去し、骨組織をきれいし、骨組織の端部をはさみで切断した。骨髄はさみを切断した骨組織の端部に1mlのダルベッコの修正イーグル媒体 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DH媒体) を三回注射して骨ル

ーメンから抽出した。細胞をDH媒体に懸濁し、300gで5分間遠心分離した。上澄は捨て、幹細胞は20%ウシ胎仔血清 (FCS) を補ったDH媒体に懸濁させた。菌体濃度は500000 細胞/mlに調整した。FCSとアミノ酸と抗生物質とを補ったDH媒体に予め溶した製品を96-ウエルマイクロタイタープレートに連続的且つ直接に希釈した。9つの希釈を3.16の希釈比で実行した。製品を連続6回テストした。各マイクロタイタープレートにはただの媒体を含む負の対照を含めた。各ウエルの最終体積は100 μlにした。マイクロタイタープレートは37、8% CO₂-100%RH下のインキュベータで1時間培養して媒体を緩衝させた。1時間以後、細胞懸濁液の100 μlを製品に加え、培養を7日間継続した。

【0081】

増殖は生菌コンドリオソームの色素基質 (XTT) の酸化を測定して求めた。

7日後に、マイクロタイタープレートを400 gで5分間遠心分離した。上澄の100の μ lを取り、捨てた。各ウェルにRPMI媒体中の1mg/mlのXTTナトリウム3-[1-フェニルアミノ-カルボニル]-3, 4-テトラゾリウム]-ビス[(4-メトキシ-6-ニトロ)ベンゼンスルホネート]と0.008mg/mlのPMS (N-メチルジベンゾピラジン、硫酸ジメチル)の50 μ lを加えた。100% RHで8%CO₂下のインキュベータで37 $^{\circ}$ Cで8時間培養した後、マイクロタイタープレートを分光光度計で690ナノメートルの標準に対して480ナノメートルで読みとった。結果はレスポンス曲線対投与量をプロットして平均値で表した(平均 \pm 標準偏差)。DH媒体から成る負の対照の値(全ての実験データの平均 \pm 標準偏差)も視覚的に示した。

この実験から、本発明化合物はハツカネズミ骨髄幹細胞の有意な細胞増殖を誘導することが分かる。その応答程度は大腸菌LPSによって誘導されるものにほぼ等しいが、有意な応答を誘導するのに必要な最小濃度はそれよりも高い。モノフォスフォリレート化合物はジフォスフォリレート化合物よりも応答誘導が穏やかである。図1は異なる細胞調整物で行った一組の三つの独立的した代表的な実験を示している。

【0082】

3. マクロファージ培養液の上澄液の酸化窒素産生量の決定

手順

二匹の6週齢のオスのC57/BL6ハツカネズミをCO₂吸入で殺し、頸部脱臼した。ハツカネズミをアルコールで洗淨し、後股関節部の表皮を完全に除去した。大腿骨および脛骨骨組織は関節破壊して除去した。肉はメスを使用して大きく除去し、骨組織をきれいし、骨組織の端部をはさみで切断した。骨髄ははさみを切断した骨組織の端部に1mlのダルベッコの修正イーグル媒体(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(DH媒体)を三回注射して骨髄から抽出した。細胞をDH媒体に再懸濁し、300gで5分間遠心分離した。上澄を捨て、細胞を20%ウマ血清(HS)および30%L929培養液上清を補ったDH媒体に40000細胞/mlの密度で再懸濁した。L929はネズミの繊維芽細胞細胞株で、その上澄にはマクロファージ(M-CSF)のための成育因子が豊富に含まれている。この細胞懸濁液をシャーレ上で12mlアリクォットに分割し、8% CO₂且つ100% RH下のインキュベータで37 $^{\circ}$ Cで8日間培養した。8日後、幹細胞は成熟したマクロファージ細胞に分化した。マクロファージ細胞は冷たいPBS緩衝剤中で4 $^{\circ}$ Cで45分間培養して掻き取った。遠心分離後、上澄液を除去し、5%ウシ胎仔血清(FCS)、グルタミン、アルギニン、葉酸、メルカプトエタノールおよび抗生物質(ペニシリンおよびストレプトマイシン)を補ったDH媒体に細胞を再懸濁した。幹細胞を集め、細胞密度を700000細胞/mlに調整した。

【0083】

FCSとアミノ酸と抗生物質とを補ったDH媒体に予め溶した製品を96-ウェルマイクロタイタープレートに連続的且つ直接に希釈した。9つの希釈を3.16の希釈比で実行した。製品を連続3回テストした。各マイクロタイタープレートにはただの媒体を含む負の対照を含めた。各ウェルの最終体積は100 μ lにした。マイクロタイタープレートを37 $^{\circ}$ C、8% CO₂-100%RH下のインキュベータで1時間培養して媒体を緩衝させた。1時間以後、細胞懸濁液の100 μ lを製品に加え、培養を22時間継続した。

22時間後、400gで5分間マイクロタイタープレートを遠心分離し、100 μ lの上澄液流体を取り、マイクロタイタープレートに移した。100 μ lのグリース試薬[5mg/mlのサルファニルアミド+の0.5mg/mlのN-(1-ナフチルエチレンジアミン)塩酸塩の2.5%磷酸水溶液]を各ウェルに加えた。マイクロタイタープレートは分光光度計で562ナノメートル波長の基準に対して690ナノメートルで読んだ。亜硝酸塩濃度は酸化窒素含量に比例した。亜硝酸塩含量は標準曲線に基づいて求めた。1~25 μ Mの範囲でリニアな関係が示された。

結果は、負の対照値を求めた後、平均 \pm 標準偏差で表し、投与量対応答曲線とてプロットした。

この実験で、本発明化合物はネズミのマクロファージ細胞によって酸化窒素の産生を誘導し、投与量対応答曲線と一致した。ジフォスフォリレート化合物は大腸菌LPSよりも非常に大きく増殖を誘導するが、有意な応答を誘導するのに必要な濃度はより高い。モノフォス

10

20

30

40

50

フォリレート化合物はジフォスフォリレート化合物および大腸菌LPSより弱い応答を誘導する。図2は互いに異なる細胞標品で独立して行った三つ測定値から得られた代表的な実験を表している。

【0084】

4. 本発明化合物のヒト肺胞マクロファージ細胞による -TNF産生能力の決定
手順

肺胞マクロファージ細胞の調整

ヒト肺胞マクロファージ細胞は肺癌患者の肺臓の気管支肺胞を洗浄（BAL）して得られた。BALは肺葉の健康な部分を含む肺組織外科の直後に実施する。洗浄は50ml容量の注射器を用いて0.8% NaClを用いて実行される。回収した細胞をマクロファージ細胞が85%を超えるようにした。他の主要な細胞はリンパ球である。遠心分離後、細胞をRPMI媒体に懸濁し、赤血球は遠心分離で除去する（フィコール・バック、Ficoll Pack、研究プレート）。マクロファージ細胞をHBSSで3回洗浄し、24-ウエルのマイクロタイタープレートに1mlを種付けした。一つのウエルは合計で1000000の細胞を含んでいる。37℃で1時間培養後、マクロファージ細胞は粘着性になる。ウエルを粘着しない細胞を除去するために1mlのHBSSで3回洗浄する。洗浄後、各マクロファージ細胞-含んでいるウエルに1mlのRPMIを加える。製品を用いた培養と、 -TNFのアッセイ

肺胞マクロファージ細胞を37℃で5%CO₂下で下記製品の0.1 μg/ml、1 μg/mlおよび10 μg/ml濃度の存在下で培養した：

- (1) 負の対照：RPMI
- (2) 正の対照：大腸菌LPS（セロタイプ05：B5、Difco、デトロイト、米国）
- (3) 本発明のモノフォスフォリレート化合物（OM-294-MP）
- (4) 本発明のジフォスフォリレート化合物（OM-294-DP）

培養上澄を24時間後に回収し、TNF含量を分析した（BioSource Cytoscreenキット、Cam arillo, CA, U.S.A, 1pg/ml.の感度を有する）。

【0085】

結果

本発明のモノフォスフォリレート化およびジフォスフォリレート化誘導体は10 μg/mlのような低濃度で TNFの産生を穏やかに誘導した。本発明のモノフォスフォリレート化誘導体はジフォスフォリレート化合物よりも大きくTNF産生を誘導する。LPSの正の対照はテストした三つの濃度で全て TNFの産生を多量に誘導した。

結果は表(a)にまとめてある。

【0086】

【表3】

表(a) ヒト肺胞マクロファージ細胞での OM-294-MP および
OM-294-DP による TNF 産生の誘導

製品	α TNF [pg/ml]			
	3回の独立した実験での平均の±標準偏差			
	0 μg/ml	0.1 μg/ml	1 μg/ml	10 μg/ml
負の対照：RPMI	195±70			
正の対照：大腸菌 LPS		7667±115	9858±2148	10390±3415
OM-294-MP-1		246±38	353±75	1049±295
OM-294-MP-2		205±62	291±70	1124±406
OM-294-DP-1		156±66	117±85	329±141
OM-294-DP-2		171±79	88±61	

【0087】

5. 大腸菌リポポリサッカリド (LPS) に応答する本発明化合物のヒト肺胞マクロファージ細胞の TNF産生の抑制能力

手順

肺胞マクロファージ細胞の調整：

肺癌患者の気管支肺胞洗浄 (BAL) によってヒト肺胞マクロファージ細胞を得た。このBALは肺葉の健康な部分を含む肺組織外科の直後に実施される。洗浄は50ml容量の注射器を用いて0.8% NaClを用いて行う。回収した細胞はマクロファージ細胞85%を超える様に作る。他の大多数の細胞はリンパ球である。遠心分離後、細胞をRPMI媒体に懸濁し、赤血球をフィコール・パック (研究プレート) で遠心分離で除去する。マクロファージ細胞をHBSSで3回洗浄し、各ウェルに1mlの濃度で、合計1000000細胞を含むように24-ウェルのマイクロタイタープレートに種付けする。37℃で1時間培養後、マクロファージ細胞は粘着性になる。粘着性のない細胞を除去するために1mlのHBSSでウェルを3回洗浄する。洗浄後、各マクロファージ-含んでいるウェルに1mlのRPMIを加える。

【0088】

製品の培養と TNF分析：

肺胞マクロファージ細胞を、37℃で5% CO₂下で大腸菌LPSの存在したで1mg/mlで培養する (O5:B5セロタイプ、Difco、デトロイト、米国)。同時に下記製品を10 μg/mlの濃度で加えた：

- (1) 負の対照：RPMI
- (2) 本発明のモノフォスホリレート化合物 (OM-294-MP)
- (3) 本発明のジフォスホリレート化合物 (OM-294-DP)

培養上清液を24時間後に回収し、TNF含量を分析した (BioSource Cytoscreenキット、Cambridge, CA, U.S.A、感度1pg/ml)。

結果

ジフォスホリレート化誘導体はLPSによって一般に誘導される TNFの産生をかなり抑制する。モノフォスホリレート化誘導体はLPSによって誘導される TNFの産生を部分的に抑制する。

結果は表(a)に記載してある。

【0089】

【表4】

表(a) ヒト肺胞マクロファージ細胞での OM-294-MP および OM-294-DP による LPS-誘導 α-TNF 産生の阻害

製品	α TNF[pg/ml]	%阻害
RPMI (負の対照)	73	—
大腸菌 LPS (10 μg/ml) (正の対照)	8470	0
OM-294-MP-1 (10 μg/ml) +大腸菌 LPS (1 μg/ml)	4577	44
OM-294-MP-2 (10 μg/ml) +大腸菌 LPS (1 μg/ml)	4789	41
OM-294-DP-1 (10 μg/ml) +大腸菌 LPS (1 μg/ml)	1267	84
OM-294-DP-2 (10 μg/ml) +大腸菌 LPS (1 μg/ml)	1280	84

【0090】

6. 樹状細胞成熟でのOM-294-MPおよびOM-294-DPの影響

予備樹状細胞を樹状細胞への成熟を誘導するOM-294-MPおよびOM-294-DP製品の能力を評価した。下記のパラメータを測定した：FITC-Dextran結合体移入およびCD40、CD80、CD83、CD86表面マーカの発現

手続

細胞：末しょう血液の単核細胞を6人の健康なドナーの Buffy コートから単離した。ドナーは供血前にいかなる処置も受けなかった。

細胞標品：付着選択によって精製した単核細胞を10%のウシ胎仔血清(Sigma-Aldrich: St. -Louis, MO, U.S.A)、GM-CSF (10ng/ml、IM-HGMI、Immungenex Corp., Los Angeles, CA, U.S.A.) およびIL-4 (10ng/ml、204-IL、R&D System, Minneapolis, MN, USA) を含む RPMI-1640媒体に 1×10^6 細胞/ml 密度で再懸濁し、直径10cmのシャーレ (P10、Falcon、Bect on Dickinson、プリマス、UK) に分割 (一枚のP10皿に 10×10^6 の細胞) し、6日間培養する (3日以後は新鮮な媒体に交換)。この細胞は前樹枝状(predendritic)細胞 (DC-6) と呼ばれる。成熟した樹枝状細胞へこの前樹枝状細胞の成熟を細胞をOM-294-MP、OM-294-DPまたはLPSと一緒に3日以上にわたって以下の「製品セクション」に記載の濃度で培養することで達成する。9日目 (DC-9) に細胞を採り入れ、樹状細胞成熟の各種インジケータ：CD40、CD80、CD83、CD86表面マーカのアセスメントおよびFITC-Dextran接合体のテークアップ能力を分析した。これらの全てのパラメータはEPICS-XL-MCLモデルFACで分析した (Coulter Immunology、Hialeah、フィンランド)。Lanzavecchia et al., J. Exp. Med., 179 (1994) 09; Lanzavecchia et al., J. Exp. Med., 182 (1995) 389.

【 0 0 9 1 】

データ分析：

表面マーカの発現はLPS (正のモード) により刺激される細胞の平均蛍光%として現れる。FITC-Dextran接合体は塩基性媒体中に維持した細胞に対するテークアップ率で計算し、%で表される。t-スチューデント試験による統計分析では正のモードのデータで得られるを異なる試験からのデータと比較する。データ有意水準は $p < 0.05$ にセットした。

製品：

OM-294-MPおよびOM-294-DPの原液は0.9% NaCl / 水中に1mg/mlの濃度で調製し、OM-294-MPの場合には0.1%のトリエチルアミンを加えた。この溶液を37 °Cで20分間培養し、3分間の強力で攪拌した後、RPMI-1640培地で100 μ g/mlに希釈し、10mg/mlの濃度 (図3、6、7、8) または0.02 ~ 25 μ g/mlの濃度 (図4、5) で用いた。

【 0 0 9 2 】

基準製品：PBS中の大腸菌リポポリサッカリド (LPS、DIFCO、デトロイト、MI、USA) の5mg/ml原液。中間体100 μ g/ml溶液はRPMI 1640培地に調整した。テストすべき濃度は10 μ g/ml (図3、6、7、8) または0.02 ~ 10 μ g/ml (図4、5) の範囲である。

結果

単核細胞分化で生じる早熟な樹状細胞 (DC-6) はGM-CSFおよびIL-4の接合によってFITC-Dextran接合体を組み入れることができる。成熟過程中に細胞はFITC-Dextran接合体を組み入れる能力を失う。分析はDC-9 分化段に達した時に実施される。

結果は非刺激細胞 (塩基性媒体) (図3) で観測されるFITC-Dextran接合体の移入%で表される。LPSまたはOM-294-MPで処理した細胞はそれぞれそれらの食細胞の容量の10%および19%だけしか保持しないが、OM-294-DPで刺激された細胞はFITC-Dextran接合体を組み入れる能力を完全に保持する (98、99%)。投与量対応答曲線は、OM-294-MPは0.02 μ g ~ 25 μ g / mlの濃度範囲でDC-6をDC-9細胞へ分化させるのを誘導する著しい能力を有することを示している。図 (4) は低濃度でテストしたもの、また、図 (5) は高濃度でテストしたもの。

【 0 0 9 3 】

共刺激表面マーカの発現はDC成熟性を査定するために他の判定基準である。CD40、CD80、CD83、CD86の発現をテストした。結果はこれらマーカのLPS-誘導発現に基づく平均蛍光%で表してらある。

OM-294-MPはテストした全ての表面マーカ：CD40 (39%)、CD80 (62%)、CD83 (60%)、CD86

10

20

30

40

50

(77%)の発現を増加させる。図(6、7、8、9)を参照。

OM-294-DPは調べたマーカーの発現に基礎培地と同様な作用を与えるが、その影響はLPS働きの20%を超えない。

【0094】

7. DC-6段での単核細胞および前樹枝状細胞による TNFおよびIL-12 p70の産生におけるOM-294-DPおよびOM-294-MP製品の影響

DC-6細胞(5 × 10⁵/500 μl媒体)をLPS(10 μg/ml)またはOM-294-MP(10 μg/ml)またはOM-294-DP(10 μg/ml)によって4時間、6時間、24時間刺激した。

手順

インビボ実験条件:

抹消血液の単核細胞を6匹の健康なドナーのバフィーコートから回収した(ドナーは供血前にいかなる処置もしなかった)。単核細胞をフィコール勾配で単離し、付着選択によって精製した。ゆるく粘着している単核細胞を採り入れ、その細胞の一つの画分を単核細胞として保存した。精製した単核細胞を10%のFCSを含むRPMI-1640媒体中に1 × 10⁶細胞/mlで再懸濁する。10 × 10⁶細胞/P10で直径10cmのシャーレ(P10 - falcon、Becton Dickinson、プリマス、UK)に分けた。細胞はGM-CSF(10ng/ml)およびIL-4(10ng/ml)を含む全RPMI 1640媒体で6日間培養した。6日目に細胞を採り入れてHBSSで洗浄し、5 × 10⁵細胞/ウェルの密度で500 μlの全RPMI媒体中に24-ウェルプレートに種付けし、LPS(10 μg/ml)、OM-294-MP(10 μg/ml)またはOM-294-DP(10 μg/ml)で刺激し、TNFおよびIL-12 p70を4、6、24時間後に回収した培養液上澄のエリサによって分析した。

製品: OM-294-MPおよびOM-294-DP製品(無菌水の1mg/ml原液)を37 °Cで20分間培養した。3分間は強力な攪拌下に保持し、100mg/mlに希釈し、RPMI 1640培地で10 μg/mlの最終濃度で使った。

【0095】

基準製品: 大腸菌リポポリサッカリド(LPS、DIFCO、デトロイト、MI、USA)、PBS中の5mg/ml原液、培地の中間溶液: 100 μg/ml、10 μg/mlの最終濃度で使用。TNFおよびIL-12 p70のアッセイ: TNF KHC3012キット(Biosource提供のバッチ#PP003-J061703(Biosource、International Camarillo、CA、USA))。エリサは供給業者の取扱い説明書に記載の方法で行った。IL-12 p70はヒトのIL-12キット(番号D1200、ロット990 6232、R & Dsystems、ミネアポリス、MN、USA)を使用して培養液上澄中でエリサ分析した。

【0096】

結果

TNF

OM-294-MPは時間-コース産生およびTNF濃度(図10)に対してLPSと同様にDC-6細胞によるTNF産生を刺激する。両方の製品の場合に6時間~24時間の間にTNFピークが見られる。

OM-294-DPはDC-6細胞によるTNF産生に小さな刺激作用しか有しない。

IL-12 p70

一般的に言って、IL-12は単核細胞(図12)およびDC-6細胞(図11)中でIFN(LPS + IFN、OM-294-MP + IFN)の存在で誘導される。サイトカイン産生開始期は単核細胞よりDCの方が早い。

【0097】

8. ネズミ免疫化モデルでのPlasmodium berghei circumsporozoite表面蛋白のC末端領域の合成ペプチド(Pb CS His6-242-310)によるOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバント性質の評価

抗原: PbCS(HHHHHHGGMN NKNNNNDDSY IPSAEKILEFVKQIRDSITE EWSQCNVTCG SGIRVRKRKRKRG SN KKAEDLTL EDIDTEI)ペプチド(以下、His6-242-310という)はPlasmodium berghei circumsporozoite A N K A株の表面蛋白の242-310アミノ酸配列に6つのヒスチジン、2つのグリシンおよび1つのメチオニン残基をN末端伸びを加えたものに対応し、Merrifield Atherton合成法で得られる(Athenon et al., Bioorg Chem., 8: (1979) 350 - 351)。このポ

10

20

30

40

50

リペチドは0.4mmol/g.の置換率を有するp-アルコキシベンジルアルコール樹脂(ワング樹脂)上に調製された。10モル倍の過剰なF-mocアミノ酸誘導体を30分のカップリング時間で使いた。ペプチドをサイズ排除クロマトグラフ(セファデックスG25、Pharmacia、スウェーデン)および逆相クロマトグラフ(W-Porex 5C-4、250×10mm、Phenomenex、Torrance、CA、U.S.A)で精製した(40分、勾配、10~50%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸混合物(v/v)、3ml/分の流量)。ペプチドのアミノ酸組成はKnecht and Changの方法(Anal. Chem.、58、(1986)2373-2379)で決定し、分子量はVoyager DEモデル装置を使用して質量分析で検査した(Perspective Framingham、MA、USA)。抗原原液は0.9% NaCl/水中に0.4mg/mlの濃度でpH 8.0で調製した。

【0098】

アジュバント：OM-294-DPおよびOM-294-MPの原液は0.9% NaCl-水中に1mg/mlの濃度で調製した(OM-294-MPの場合には0.1%トリエチルアミンを入れた)。正の対照は不完全フロイントアジュバント(Difco、デトロイト、MI、USAからのIFA)から成る。負の対照は0.9% NaCl溶液である。

抗原-アジュバント混合物：抗原の一容積とアジュバントの一容積とを3分間攪拌して混合する。

免疫化：6週齢のメスのBALB/cマウス(1グループに6匹のハツカネズミ)に下記の混合物の0.1mlを後尾の皮下に注射して3回免疫化した：

【0099】

【表5】

グループ	アジュバント 0.05 mg/注射	抗原 0.02 mg/注射	ハツカネズミの数
1	—	Pb CS His ₆ -242-310	6
2	IFA	Pb CS His ₆ -242-310	6
3	OM-294-MP	Pb CS His ₆ -242-310	6
4	OM-294-DP	Pb CS His ₆ -242-310	6
5	OM-294-MP	—	6
6	OM-294-DP	—	6

【0100】

【表6】

免疫化とサンプリングスケジュール：

週	0	3	4	7	9
免疫化	^	↑		↑	
抗体応答性	↑	↑		↑	↑
CTL 応答			↑		↑

【0101】

リンパ性器官および採血法：

血清サンプリング：

採血法は第0、3、7、9週に実施する。血液は37℃に6分間放置し、4℃で一晩保持する。その後、血清は-80℃で抗体アッセイ時まで凍結保存する。

鼠径部リンパ節および脾臓の回収：

各動物グループの一部を第4または9週以後殺し、鼠径部リンパ節および脾臓を外科的に除去する。

抗Pb CS His₆ 242-310抗体価の決定：

Pb Cs His₆ 242-310抗原に対する抗体のアッセイをエリサで行う。抗原の結合を4℃の湿

10

20

30

40

50

った室内で一晩培養して96-ウエルのマイクロタイタープレート (Maxisorp F96、Nunc、DK) で実施する。各ウエルは0.001mg/mlのPb CS His₆ 242-310の抗原を含む0.1mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) を含んでいる。マイクロタイタープレートのブロックは1%のウシ血清アルブミン (BSA、Fluka、スイス) を含むPBSで行う。プレートを0.05%トゥイーン20 (シグマ、セントルイス、MO、USA) を含むPBSで洗浄する。第0、3、7、9週目に回収した血清サンプルを希釈緩衝剤 (2.5%のスキムミルク微粉と0.05%のトゥイーン20を含むPBS) で連続的に希釈し、マイクロタイタープレートに移し、1時間室温で放置する (RT)。プレートをPBSで洗浄し、アルカリホスファターゼ (シグマ、セントルイス、MO、USA) に結合したハツカネズミのポリクローナル抗Igを含む希釈液を各プレートに分配し、1時間室温で培養した。プレートをPBSで洗浄し、アルカリホスファターゼ基質、p-ニトロフェニルフォスフェート (シグマ、セントルイス、MO、USA) を加えて特異抗体を呈色反応で表す。405ナノメートルでの吸光度をマイクロタイタープレートリーダーで読む (Dynatech 25000のエリサリーダー、アッシュフォード、ミドルセックス、UK)。各血清サンプルは2回測定した。結果は各グループのハツカネズミに関する全ての測定値の平均を表す。抗体価は正の応答を与える最も高い希釈度で表した。すなわち、ODはバックグラウンドノイズレベル±3SDより大きい。

【0102】

ELISPOTアッセイ：

ELISPOTマイクロタイタープレートの50 µg/mlで抗体溶液を加え、ウエル底をニトロセルロース (ミリポア、Molsheim、フランス) で覆うことで、ネズミのγ-インターフェロン (1E703B2) に対する抗体を湿った室で4℃で一晩培養して結合させる。10%のウシ胎仔血清 (FCS、Fakola、スイス) を含むDMEM媒体を加えてブロックを行い (Life Technology、グランドアイランド、NY、USA)、37℃に2時間放置した。リンパ性器官から得られる細胞 (鼠径部リンパ節および脾臓) をマイクロタイタープレートで200000細胞/ウエルの密度で培養し、次いで、100000 P815細胞 (Pb CS 245-252の短いペプチドを抗原投与したものではないもの) と一緒に37℃で24時間共培養した。培養後、細胞を除去し、洗浄する。第2のネズミの抗IFN抗体-ビオチン複合体を (ANI、1% BSAを含むPBS中の2 µg/ml) を加え、2時間培養し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ接合体 (Boehringerマンハイム、マンハイム、GFR) を加え、37℃で1時間培養した。その後、0.05%トゥイーン20を含むPBSで3回洗浄し、PBSで3回洗浄した。抗IFN免疫複合体の存在はBCIP/NBT基質 (シグマ、セントルイス、MO、USA) を加えることによって示した。この反応は水道水で洗浄することにより停止させた。IFNに対して正である点は立体顕微鏡下で数える。ペプチドを抗原投与した細胞とペプチドが存在しない細胞とを数え、その差から点比を数えた。結果は各グループのハツカネズミに対して平均測定値で記録した。培養した血液細胞100万当たりの点の数で表した。

【0103】

結果

抗体応答：一回、二回、三回免疫注射したハツカネズミに対するエリサで求めたPb CS His₆-242-310に対する抗体の産生はグラフに示してある。対照は抗原を一回だけ注射したもので、抗体価は非常に弱い。OM-294-MPまたはOM-294-DPを混合して単一の抗原注射した時に得られる抗体価は不完全フロイントアジュバント (IFA) に同じ抗原を加えたものと同程度の高い応答を示す (図13)。2回の注射で、OM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントは血清学的応答を引き出すことができ、それはIFAのそれより大きい (図14)。次の3回の注射でOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントは血清学的な応答を引き出すことができ、それはIFAのそれより大きい (図15)。

図13：エリサ、最初の免疫化注射後3週間で実施。

図14：エリサ、第2回免疫化注射後4週間で実施。

図15：エリサ、第3回免疫化注射後2週間で実施。

図16：一回、二回、三回目の免疫化注射の前後で測定した抗体価。

免疫化注射前と、二回、三回目の免疫化注射後の各グループの動物の抗体価は平均値で示

10

20

30

40

50

してある(図16)。

【0104】

CTL応答： 免疫化で使ったPb CS His₆-242-310ペプチドに存在するT細胞エピトープPb CS 245-252の認識はELISPOT試験によってよく示される。免疫済み動物に記録されたTリンパ球応答(鼠径のリンパ節および脾臓、第2回注射後1週および第3回注射後の2週間後にそれぞれ回収)は インターフェロン(IFN)の正の点のカウントの上昇で示される。図(17、18、19、20)に記載の結果は各希釈度および各グループのハツカネズミに対する測定値の平均として計算されている。培地の100万細胞当たりの点の数で表してある。OM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントは脾臓および鼠径部リンパ節由来のリンパ球のCTL応答を大幅お増加させる。脾臓応答は鼠径リンパ節応答より高い。OM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントにより誘導されるCTL活性性はIFAによるものよりも明らかに優れている。

10

【0105】

9. 毛細管電気泳動による非共有結合性OM-294-抗原複合体

この実施例ではワクチン製造時にOM-294-DPとPb CS His₆-242-310ペプチドとの間に形成される非共有結合性錯体が存在することを毛細管電気泳動を用いて示す。

手順

分析法：

20mMホウ砂緩衝剤(ジナトリウム四硼酸塩十水化物、メルク、N°6306) 1N NaOHでpH 7.4に調整(Fluka N°72072)。

20

ゾーン-分割毛細管(接手なし)、長さ30cm、直径50μm。

検出はBeckmanのPACE MDQモデル装置(Beckman、Brea、CA、USA)を使用し、200ナノメートルで行った。

【0106】

【表7】

分離条件

時間[分]	方法	圧力	溶媒
0.00	毛細管洗浄	20.0psi	H ₂ O
3.00	細管洗浄	20.0psi	1N NaOH
6.00	サンプル注射	0.5psi	ホウ酸塩緩衝剤
6.08	分離	30.0kV	ホウ酸塩緩衝剤

30

抗原：H₂O中1mg/ml濃度のPb CS His₆-242-310合成ペプチド

アジュバント：H₂O中1mg/ml濃度のOM-294-DP

抗原-アジュバント混合物：250μg/ml+250μg/ml

【0107】

結果

このワクチン製造時に見られる抗原-アジュバント複合体の形成は電気泳動線図上でアジュバントピークの消滅と、抗原ピークがシフトし、複合体形成に特有な新しいピークができることで示される(図21)。

40

10. BDIXラットのPROb同系腫瘍性遺伝子由来の細胞の注射により生じた腹膜癌腫の処理
この実験は、数mmの肉腫瘍を有するラットに一連のi.v.注射でOM-294-DPを投与した時の抗腫瘍効果を示すためのものである。

手順

動物： In-bred BDIXラット株は1937にH. Druckreyによって作られた。Fribourg Max Planck Institute (RFA)からのラットの一部がこのコロニーの最初の供与源となり、それは1971年以後実験動物ハウスで単一系統が維持されている。この系統では一対の姉妹-兄弟

50

が次世代の子孫を残すために選択される。この実施例で使われるラットは本出願人の実験室に代って増殖を実施しているExperimental Animal Breeding Center in Iffa-Credo (Arbresle, France)から得た。使用したラットは3か月±1週間の年齢のオスである。

【0108】

PROb細胞注射による腫瘍誘導：

PROb細胞オリジン：

DHD/K12細胞株は、1、2-ジメチルヒドラジン処理によってIn-bred BDIXラット株に生じさせた大腸癌腫断片の移植から得た。この付着性細胞株はトリプシン処理に対する感度に従って2つのサブラインに再分割した。分けるのが困難な細胞にDHD/K12-TRの名を付けた。このDHD/K12-TR細胞をIn-bred BDIXラットに注射するとラットは必ず腫瘍を引き起こした。この株をクローン化した。この実験ではこのDHD/K12-TRbクローンだけをPROb細胞として用いた。

培養条件：粘着性PROb細胞を10%ウシ胎仔血清（FCS, Anval, Betton, France）を加えたHarm's F10媒体（バイオ-ホイテカー、Walkersville、USA）から成る完全培地で37℃で溶封ビン（Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA）中で培養した。培地の交換は3日毎に行った。交配に達した時に細胞を開放し、3～5分以内に2mlのEDTA/トリプシン溶液で掻き取り、次に2～3分以内に同じ溶液2mlで3回洗う。細胞を完全媒体へ再懸濁させ、FCSを加えてトリプシンの働きを停止させる。マイコプラズマおよび細菌性細胞の污染がないことは規則的な間隔でHoechst fluorochrome 33258でDNA染色（Aldrich Chimie, Steinheim, GFR）して検査した。

【0109】

腹膜癌腫の誘導： PROb細胞を「培養条件」の所で説明したようにしてその支持体から開放し、トリパンプルー色素溶液で数えて細胞の生存性を査定した。細胞をHam's F10媒体に兼抱くする。エーテル麻酔下で共通遺伝子BDIXラットへ 10^6 の生きたPROb細胞を腹腔内投与（i.p.）して腹膜癌腫を誘導した。腫瘍細胞注射は10日目に行った。この条件で全てのラットに観血的腹水を伴う腹膜癌腫ができ、細胞注射から第6日～第12日の間に死ぬ。

腹膜癌腫の処理： 処置は癌腫の直径が数mmの結節になる腫瘍細胞注射後13日目に開始する。処置ではOM-294-DPを10回i.v.注射で1mg/kg体重量かつ0.9% NaCl溶液に溶かした0.6mg/mlの投与量で投与した。注射は1週間に3回陰茎静脈に投与した（月曜日、水曜日、金曜日）。対照群はただのピヒクル（すなわち0.9% NaCl）のみで処置した。

処置効果の確認： D42（腫瘍細胞注射後6週目）にラットを殺し、切開して癌腫の発達を盲検試験で査定した。癌腫体積の測定は信頼性がないが、癌腫を4つの異なるタイプに分類することはできる。結節の数および直径に応じて下記の5つのクラスを定義することができる：

【0110】

クラス0：結節が見えない。

クラス1：直径0.1～0.2cmの結節が容易に数えられる。

クラス2：0.5～0.1の無数の結節。

クラス3：腹腔が結節により侵略され、直径1cmのものも測定される。

クラス4：大きさが2、3cmの腫瘍で体くうが完全に侵略される。

腹水容積と動物の体重変化：

腹水容積は動物を2回計ることにより測定した。0.9% NaClの注射だけで処置をしなかった対照ラットのグループは癌腫の発達を許したままにした。

処置効率の確認：

処置したグループのラットの生残率を対照群の生残率と比較し、処理したグループのラットの癌腫および腹水容積を対照群のラットの測定と比較した。

統計解析：免疫療法の効果の統計的有意差を癌腫分類用Kruskal-Wallis試験を用いて決定した。同様に、腹水容積データに対して分散分析試験を実施し、ログランク試験で生残率を求めた。

10

20

30

40

50

【0111】

結果

癌腫： OM-294-DPはこのモデルで著しい抗腫瘍活性を示す。この活性は無腫瘍動物の数によって証明された（クラス0）。また、NaCl対照との相違は腫瘍体積で有意（ $p < 0.05$ ）である。腹水容積におけるOM-294-DPを用いた処置も有意（ $p < 0.05$ ）である。

【0112】

【表8】

表(a) 癌腫の分類と腹水容積

処置	下記クラスに属する癌腫のラット数					化合物の効果(*)	腹水容積 ml/ラット		化合物の効果(**)
	0	1	2	3	4		範囲	平均±σ	
NaCl ⁽¹⁾	1	0	1	0	7	—	0-84	38±29	—
OM-294-DP ⁽²⁾	4	1	2	1	2	$p < 0.05$	0-73	8±23	$p < 0.05$

(*) : Kruskal-Wallis 試験

(**): 分散分析。

(1) : 8~10匹のラットは殺す前に癌で死んだ。一匹のラットはD34に結節と黄疸を示しが、正確なクラス決定はできなかった（共食）。一匹のラットはD37に（クラス4）に属し、二匹のラットはD38に（クラス4）に属し、一匹のラットはD39に（クラス4）に属し、二匹のラットはD40で（クラス4）に属し、一匹のラットはD41に（クラス4）属した。クラス0の一匹のラットは切開した時に皮下腫瘍であることが分かり、癌細胞の注射が失敗したと考えられる。

(2) : 一匹のラットは最初の処理注射時にD14に死んだ。後者は癌腫ではなかった。クラス0で殺した一匹のラットは皮下腫瘍を示した（癌細胞の注射は失敗した）。

【0113】

生残：

各動物はD42に殺した。生残は腫瘍細胞の注射後42日目に決定した。OM-294-DPを処置した動物は90%生存したが、未処置のグループの動物の生存率は20%であった。

ラット生残率はOM-284-DPによって大幅に延長した（ $p < 0.001$ ）。

体重： 表(b)のデータが示すように、OM-294-DPはNaClのみを投与した動物に比較して体重変化に有意な影響を及ぼさない。

【0114】

【表9】

10

20

30

40

表 (b) ラットの体重変化 (平均±標準偏差)

日	NaCl	OM-294-DP
0	314±19	277±19
13	337±18	310±21
20	342±20	304±23
29	361±23	317±24
41	314±38	327±26

10

【0115】

11. Heliobacter pyloriのウレアーゼBサブユニットを鼻噴投与するネズミの免疫化モデルにおけるOM-294-DPアジュバントの評価

コレラトキシン (CT) ベースのアジュバントの存在下に経口または鼻投与でHeliobacter pyloriのウレアーゼBサブユニットを免疫化すると、ハツカネズミはHeliobacter pylori感染から保護されるということは分かっている(Corthesy-Teulaz I., et al., Gastroenterology, 109: (1995): 115; Michetti P. et al., gastroenterology, 116: (1999) 804; Saldinger P.F. et al., Gastroenterology 115: (1998) 891)。免疫化したハツカネズミの血清中で測定されるこの抗Ure B体液性応答を主としてIgG1タイプ (Th2応答) である。OM-294-DPのアジュバント効果の評価は、OM-294-DPの存在下に組換え型Heliobacter pyloriのウレアーゼBサブユニット (UreB) を鼻噴投与で1週間間隔で4回投与して免疫化したBALB/cハツカネズミ (n=6) で行った。対照のBALB/cハツカネズミはOM-294-DPアジュバントのみで免疫化した。最後のブースタ後2週目に各ハツカネズミから血液をサンプリングし、エリサ (全 IgG、IgG1およびIgG2a) によって血清抗UreB Igを分析した。

20

【0116】

手順

動物: BALB/c/Ola/HsDハツカネズミ (ハーランド、ホルスト、オランダ): 24匹のハツカネズミ

抗原: 上記方法 (Michetti達、Gastroenterology、107: (1994) 1002) で大腸菌 (M15株、Qiagen、Hilden、GFR) で発現させた組換え型蛋白HpUreB 1-569

30

アジュバント: OM-294-DP (2.2mg/ml原液)

免疫化規則:

各々が6匹のハツカネズミを含む下記の4つのグループを作った:

グループA: 6匹のBALB/cハツカネズミに週一回、4週間の間、OM-294-DPのみを25 µg鼻噴投与して (各服用時に25 µl) 免疫化した。

グループB: 6匹のBALB/cハツカネズミに週一回、4週間の間、50 µgのUre B1-569 + 25 µgのOM-294-DP (各服用時に25 µl) を鼻噴投与して免疫化した。

最後の経鼻免疫化してから2週間後にグループA及びBの各ハツカネズミの尾から血液のサンプルを採った。

40

【0117】

血清IgGのアッセイ:

被覆用緩衝剤 (pH 9.6): 1リットル当たりNa₂CO₃ (1.59g、15mM)、NaHCO₃ (2.93g、34.8mM)、チメロサル (0.01%)、PBS-トウイーン緩衝剤pH 7.4: 1リットル当たり、NaCl (8.0g、137mM)、KH₂PO₄ (0.2g、1.5mM)、Na₂HPO₄ (1.15g、8.0mM)、KCl (0.2g、2.7mM)、トウイーン20 (0.1% 1ml)、シトレート/リン酸緩衝液pH 5.0: 1リットル当たり、クエン酸 (9.32g、44.4mM)、Na₂HPO₄ (14.6g、103mM)、基質溶液10x (O-phenyldiamine = OPD) (10倍濃縮): (シトレート緩衝剤の10mg/ml)、アジ化ナトリウム溶液: 1%、停止溶液: シトレート/リン酸緩衝液0.01%アジ化ナトリウム0.1M、pH 5.0

【0118】

50

方法： 抗原溶液（1999年5月26日に調整したUreB 1-569、0.5mg/ml原液）は被覆用緩衝剤pH9.6中に5 µg/ml濃度で調製した（50mlの緩衝剤に対してUreB溶液500 µl）。100 µlを3つの96-ウエル丸底プレートの各ウエルへピペットで移した（各ウエル当たり0.5 µgのUreB）。プレートを37 °Cで2時間培養した。上澄はプレートから捨てる。100 µlのPBS-0.1%トウイーン溶液 + 5%粉乳を加えてウエルをブロックした。プレートを37 °Cで30分間培養した。ブロック溶液を捨て、ウエルを100 µlのPBS-トウイーンで3回洗浄した。上澄を捨てた。テストする各ハツカネズミ血清の1：200希釈液をPBS-0.1%のトウイーン緩衝剤（1mlのPBS-トウイーン中に血清5 µl）中に調製した。漿液（100 µl）を3枚のプレートに分ける（全免疫IgGを検出するためのプレート1、IgG1を検出するためのプレート1およびIgG2aを検出するためのプレート1）。

10

培養は4 °Cで一晩実行する。ウエルを100 µlのPBS-トウイーンで3回洗浄した。PBS-トウイーン緩衝剤中に希釈した1：500 ビオチン-結合抗IgG全抗体 (Amersham、Cat # RPN 1177)、抗IgG1抗体 (Amersham Cat # RPN 1180) および抗IgG2a抗体 (Pharmingen Cat #02012D) 溶液を調製した。100 µlの抗-IgG全抗体溶液のプレートN°1に加え、プレートN°2に100 µlの抗-IgG1溶液、そして、プレートN°3に100 µlの抗-IgG2a抗体溶液を加えた。培養は37 °Cで1時間実行した。ウエルをPBS-トウイーンで3回洗浄した。PBS-トウイーン緩衝剤中にストレプトアビジン-HRP (Dako、Cat# p03977) の1：1000希釈液を調製し、各ウエルに100 µlの溶液を加えた。培養は37 °Cで1時間行った。ウエルはPBS-トウイーン緩衝剤で3回洗浄した。0.1%のMシトラート/リン酸緩衝液中にOPD溶液を10倍希釈することによって基質溶液（10x）を調製した。希釈したOPD溶液に1 µlのH₂O₂を加えた。各ウエルに50 µlの基質溶液を加えた。10～20分発色させる。反応は50 µlの停止緩衝剤を加えることで終了させる。吸光度はブランクとして負の対照を用いて492ナノメートルで読んだ（標準は620ナノメートルで読んだ）。

20

統計解析： データは平均 ± SD (n=6) を表す。p値はt-学生試験から誘導いた。有意データ水準はp < 0.05にした。

【 0 1 1 9 】

結果

経鼻投与で予めUreB-1-569+ OM-294-DPで免疫化したハツカネズミで抗UreB体液免疫を作り出す：抗-UreB 1-569 IgG1は血液中に存在する。

ハツカネズミ血清中のHpのUreBに対する抗体の存在をエリサで測定する。UreB（0.5 µg/ウエル）を炭素塩緩衝剤pH 9.6で丸底の96-ウエルプレートに分配する。特異抗体をウサギ抗IgG全抗体、抗IgG1、IgG2a抗体によって検出する。結果は492ナノメートルで読んだ光学濃度（OD）で示した。自然のハツカネズミの血清の測定値より3倍以上大きなODを正とみなした。OM-294-DPのみで免疫化したハツカネズミの血清には抗UreB抗体は検出されなかった。Ure+OM-294-DPで免疫化されたマウスも抗UreB IgG全抗体 (OD = 0.274 ± 0.130、p < 0.05) および抗UreB IgG1 (OD = 0.212 ± 0.128、p < 0.05) を生じるが、抗UreB IgG2a抗体は生じない (OD = 0.008 ± 0.005、有意差なし)。

30

鼻噴投与 (UreB) + OM-294-DPによる *Helicobacter pylori* のウレアーゼBサブユニットで免疫化したBALB/cハツカネズミは主としてIgG1タイプの抗UreB体液性応答を生じる。従って、OM-294-DPは経鼻投与によるアジュバントとして働き、Th2タイプの体液性免疫の発達を促進する。

40

【 0 1 2 0 】

12. OM-294-MP、OM-294-DPとH1N1との抗原との組合せ：ハツカネズミに1回ま2回皮下投与した後に生じる特異抗体の決定

手順

この研究は風邪抗原H1N1（262195A/B、北京ヘムアグルチニン、Solvay Duphar、Weesp、NL）に対するOM-294-MPおよびOM-294-DPのアジュバント効果を示すためのものである。この目的のために60匹のBALB/cハツカネズミ（雌、処置開始時に8週齢）を6つのグループに次のように分けた：

【 0 1 2 1 】

50

【表 10】

グループ	抗原 最終濃度 25 μ g/動物/注射	アジュバント 最終濃度 50 μ g/動物/注射	NaCl (0.9%)	注射容積
A : NaCl	—	—	150 μ l	150 μ l
B : H1N1	H1N1 (100 μ l)	—	50 μ l	150 μ l
C : H1N1+OM-294-MP	H1N1 (100 μ l)	OM-294-MP (50 μ l)	—	150 μ l
D : H1N1+ OM-294-DP	H1N1 (100 μ l)	OM-294-MP (50 μ l)	100 μ l	150 μ l
E : OM-294-MP	—	OM-284-MP (50 μ l)	100 μ l	150 μ l
F : OM-294-DP	—	OM-284-DP (50 μ l)	100 μ l	150 μ l

10

【 0 1 2 2 】

抗原 : H1N1原液は0.9% NaCl中に25 μ g/mlの濃度で調製した。

アジュバント : OM-294-DPおよびOM-294-MPの原液は注射水の1mg/ml濃度に調製し、OM-294-MPには0.1%トリエタノールアミンを加えた。負の対照は抗原を含まない0.9% NaCl溶液から成る。

20

抗原-アジュバント混合物 : アジュバントを37 で20分間放置した後、3分間攪拌した。それから、上記表の通り、抗原とNaCl (0.9%)を加えた。抗原-アジュバント混合物を簡単に攪拌した後、ロータリ攪拌機で室温で15分間攪拌し、最後に全部の混合物を3分間攪拌した。

【 0 1 2 3 】

免疫規則 : 0日と14日に注射した。上記の表に示した混合物を皮下投与した(各動物に75 μ lを側に、全部で150 μ l)。採血法は14日および18日にした(眼窩穿刺)。

抗H1N1 Igのアッセイ : 以下のH1N1用血清免疫グロブリンをエリサで2回分析した : IgG1、IgG2aおよびIgM。簡単にいうと、マイクロタイタープレート(NUNC、Immunoplate Roskilde、DK)を重炭酸塩緩衝剤pH 9.6中で4 で100 μ lのH1N1 (0.5 μ g)と一緒に(一晩被覆)培養した。0.5%トウイン-20(メルク Hohenbrunn、D)で洗浄した後に、漿液を50-、200-、800-倍に希釈した(希釈溶液 : リン酸緩衝生理食塩水(PBS)1%+ウシ血清アルブミン(BSA、シグマ、セントルイス、MO、USA)0.02%+トウイン-20)。希釈した各血清サンプルの100 μ lをウエルに加えた。培養は37 で45分間行った。

30

【 0 1 2 4 】

第2の洗浄後、H1N1に対するIgG1、IgG2aおよびIgMを、予めPBS/BSA/トウイン緩衝剤(250-、1000-、500倍に希釈)に希釈した100 μ lの抗IgG1抗体(抗マウス・ラット抗体) - ペルオキシダーゼ接合体(Serotec、オックスフォード、UK)、IgG2a-ペルオキシダーゼ接合体(Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA)およびIgM-ピオチン複合体(Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA)と一緒に37 で30分間培養した。IgMの場合にはさらに洗浄した後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体(Dako、Glostrup、DK)の1 : 100希釈液と一緒に37 で30分間第3回目の培養をする必要がある。

40

【 0 1 2 5 】

洗浄ステップ後、ペルオキシダーゼに結合した抗IgG1および抗IgG2二次性抗体を検出するために、100 μ lのフェニレン1,2-ジアミン溶液(OPD、メルク、ダルムシュタット、GFR)を加えた(IgMの場合には3',3',5',5'-テトラメチルベンジジン(TMB、シグマ、セントルイス、MO、USA)を用いる)。室温で20分間培養した後、100 μ lの2N H₂SO₄を加えて反応を停止させる。吸光度値はバイオ-ラド3550モデルのプレートリーダーで490ナノメートルで読みとる。

50

結果

490ナノメートルで読んだ各読取り結果はml当たりの任意単位 (A.U.) で示してある。これは各サンプルを28日にグループB (H1N1のみを注射した動物) から集めたサンプルプールの各種希釈液から調製した標準品と比較することで行った。サンプルプールの50-倍希釈液は1000A.U./ml濃度に対応する。各結果は対応する希釈比 (50、200または800回) に対して修正した。ここでは各グループの平均値とおよび標準偏差 (SD) のみを報告する。

【 0 1 2 6 】

【表 1 1】

表 a) IgG1 サブクラスの H1N1 に対する免疫グロブリン
(任意単位/ml ±SD、** p < 0.01 (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14 日目	28 日目
A : NaCl	3 ± 5	0 ± 0
B : H1N1	11161 ± 5755	53950 ± 23403
C : H1N1 + OM-294-MP	34411 ± 13719	228467** ± 109123
D : H1N1 + OM-294-DP	30101 ± 19061	382325** ± 201314
E : OM-294-MP	69 ± 34	59 ± 31
F : OM-294-DP	59 ± 21	38 ± 25

10

20

【 0 1 2 7 】

【表 1 2】

表 b) IgG2 サブクラスの H1N1 に対する免疫グロブリン
(任意単位/ml ±SD、** p < 0.01 (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14 日目	28 日目
A : NaCl	3 ± 5	0 ± 0
B : H1N1	11161 ± 5755	53950 ± 23403
C : H1N1 + OM-294-MP	0 ± 0	0 ± 0
D : H1N1 + OM-294-DP	26883 ± 20779	50352 ± 30846
E : OM-294-MP	179344** ± 139781	1622722** ± 986195
F : OM-294-DP	103630 ± 96257	681441 ± 1072710

30

【 0 1 2 8 】

【表 1 3】

40

表 c) IgGMサブクラスのH1N1に対する免疫グロブリン

(任意単位/ml ±SD, *p < 0.05 及び**p < 0.01 (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14 日目	28 日目
A : NaCl	22102 ± 5862	21531 ± 3693
B : H1N1	37787 ± 15001	57306 ± 26886
C : H1N1 + OM-294-MP	67936** ± 21334	95108 ± 38669
D : H1N1 + OM-294-DP	598100* ± 18324	92920 ± 26971
E : OM-294-MP	19065 ± 4069	18018 ± 1016
F : OM-294-DP	20756 ± 7160	20944 ± 9065

10

【 0 1 2 9 】

これらの結果はOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントが実験したモデルにおいて有効であることをしている。すなわち、両方とも1、2の注射の後に免疫グロブリンのサブクラス (IgG1a、IgG2a、IgM) とは無関係にハツカネズミのH1N1に対する抗体滴定量が大幅に上昇する (図22、23、24を参照)。

【 0 1 3 0 】

20

13. OM-294-OMおよびOM-294-DPとオバルブミン抗原との組合せ：1回または2回皮下投与後のハツカネズミの特異抗体の決定

手順

この研究はオバルブミン抗原 (Fluka Chemie, Buchs, スイス) に対するOM-294-MPおよびOM-294-DPのアジュバント効果を示すことを目的にしている。そのために、50匹のBALB/cハツカネズミ (メス、処理開始時に8週齢) を以下の5つのグループに分けた：

【 0 1 3 1 】

【表 1 4】

グループ	抗原 最終濃度 50 μg/動物/注射	アジュバント 最終濃度 50 μg/動物/注射	NaCl	注射容積
A : NaCl	—	—	150 μl	150 μl
B : Ova	Ova (100 μl)	—	50 μl	150 μl
C : Ova + OM-294-MP	Ova (100 μl)	OM-294-MP (50 μl)	—	150 μl
D : Ova + OM-294-DP	Ova (100 μl)	OM-294-MP (50 μl)	—	150 μl
E : OM-294-MP	—	OM-284-MP (50 μl)	100 μl	150 μl

30

40

【 0 1 3 2 】

抗原： オバルブミン原液は0.9% NaCl中に0.5mg/ml濃度で調製した。

アジュバント： OM-294-DPおよびOM-294-MPの原液は注射水1mg/ml濃度で調製し、OM-294-MPの場合にはそれに0.1%トリエタノールアミンを加えた。負の対照は抗原を含まない0.9% NaCl溶液にした。

抗原-アジュバント混合物： アジュバントは37℃に20分間放置した後、3分間攪拌処理し、それから上記の表に示すように抗原と(0.9%) NaClとを加えらる。抗原/アジュバント混合物を簡単に攪拌した後、ロータリ攪拌機で室温で15分間攪拌し、全部の混合物を 3

50

分間攪拌した。

【0133】

免疫化規則： 注射は0日および14日に行った。表に記載の混合物を皮下に（75 μlを各側面、動物当たり全体で150 μl）投与した。採血法は14日および28日に行った（眼窩穿刺）。

抗オバルブミン免疫グロブリンのアッセイ： 以下のオバルブミンに対する血清免疫グロブリンを2回エリサで分析した：IgG1、IgG2a、IgM。簡単に説明すると、マイクロタイタープレート（NUNC、Immunoplate Roskilde、DK）を重炭酸塩緩衝剤pH 9.6中で4で100 μlオバルブミン（0.5 μg）と一緒に（一晚被覆）培養した。0.5%トゥイーン-20（メルク Hohenbrunn、D）で洗浄した後に、漿液を50-、200-、800-倍に希釈した（希釈溶液：リン酸緩衝生理食塩水（PBS）1%+ウシ血清アルブミン（BSA、シグマ、セントルイス、MO、USA）0.02%+トゥイーン-20）。希釈した各血清サンプルの100 μlをウエルに加えた。培養は37で45分間行った。

10

第2の洗浄後、オバルブミンに対するIgG1、IgG2aおよびIgMを、予めPBS/BSA/トゥイーン緩衝剤（250-、1000-、500倍に希釈）に希釈した100 μlの抗IgG1抗体（抗マウス・ラット抗体）-ペルオキシダーゼ接合体（Serotec、オックスフォード、UK）、IgG2a-ペルオキシダーゼ接合体（Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA）およびIgM-ビオチン複合体（Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA）と一緒に37で30分間培養した。IgMの場合にはさらに洗浄した後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体（Dako、Glostrup、DK）の1：100希釈液と一緒に37で30分間第3回目の培養をする必要がある。

20

【0134】

洗浄ステップ後、ペルオキシダーゼに結合した抗IgG1および抗IgG2二次性抗体を検出するために、100 μlのフェニレン1,2-ジアミン溶液（OPD、メルク、ダルムシュタット、GFR）を加えた（IgMの場合には3',3',5',5'-テトラメチルベンジジン（TMB、シグマ、セントルイス、MO、USA）を用いる）。室温で20分間培養した後、100 μlの2N H₂SO₄を加えて反応を停止させる。吸光度値はバイオ-ラド3550モデルのプレートリーダーで490ナノメートルで読みとる。

結果

490ナノメートルで読んだ各読み取り結果はml当たりの任意単位（A.U.）で示してある。これは各サンプルを28日にグループB（オバルブミンのみを注射した動物）から集めたサンプルプールの各種希釈液から調製した標準品と比較することで行った。サンプルプールの50-倍希釈液は1000A.U./ml濃度に対応する。各結果は対応する希釈比（50、200または800回）に対して修正した。ここでは各グループの平均値とおよび標準偏差（SD）のみを報告する。

30

【0135】

【表15】

表 a) IgG1 サブクラスのオバルブミンに対する免疫グロブリン
(任意単位/ml ±SD、** p < 0.01 (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14日目	28日目
A : NaCl	6 ± 6	16 ± 12
B : ova	728 ± 589	47743 ± 46294
C : ova + OM-294-MP	4361** ± 2513	284121** ± 164822
D : ova + OM-294-DP	3240** ± 1794	277025** ± 173737
E : OM-294-MP	19 ± 8	40 ± 69

40

【0136】

【表16】

50

表 b) IgG1 サブクラスのおバルブミンに対する免疫グロブリン
 (任意単位/ml ±SD、*p < 0.05 の** p < 0.01 (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14 日目	28 日目
A : NaCl	2996 ± 898	5414 ± 1554
B : ova	5201 ± 1880	73162 ± 107954
C : ova + OM-294-MP	9524 ± 6809	625663* ± 681232
D : ova + OM-294-DP	18108** ± 14958	601434** ± 624166
E : OM-294-MP	11253 ± 12169	4192 ± 2104

10

【 0 1 3 7 】

【 表 1 7 】

表 c) IgGM サブクラスのおバルブミンに対する免疫グロブリン
 (任意単位/ml ±SD)

グループ	14 日目	28 日目
A : NaCl	14009 ± 6158	12288 ± 7136
B : ova	19423 ± 13778	47998 ± 34035
C : ova + OM-294-MP	21652 ± 9524	38240 ± 8822
D : ova + OM-294-DP	25762 ± 10975	74399 ± 119781
E : OM-294-MP	19742 ± 5667	9827 ± 2021

20

【 0 1 3 8 】

これらの結果はOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントが実験したモデルにおいて有効であることをしている。すなわち、両方とも1、2の注射の後に免疫グロブリンのサブクラス(IgG1a、IgG2a、IgM)とは無関係にハツカネズミのおバルブミンに対する抗体滴定量が大幅に上昇する(図25、26、27を参照)。

30

【 0 1 3 9 】

14. OM-294-MPおよびOM-294-DPとTT抗原(Tetanosトキソイド)との組合せ:1回または2回皮下投与後のハツカネズミの特異抗体の決定

手順

この研究はTT抗原(Massachussetts Biologic Laboratoires、ママ、USA)に対するOM-294-MPおよびOM-294-DPのアジュバント効果を示すことを目的にしている。そのために、40匹のBALB/cハツカネズミ(メス、処理開始時に8週齢)を以下の4つのグループに分けた:

40

【 0 1 4 0 】

【 表 1 8 】

グループ	抗原 最終濃度 50 μ g/動物/注射	アジュバント 最終濃度 50 μ g/動物/注射	NaCl (0.9%)	注射容積
A : NaCl	—	—	150 μ l	150 μ l
B : TT	TT (100 μ l)	—	50 μ l	150 μ l
C : TT +OM-294-MP	TT (100 μ l)	OM-294-MP (50 μ l)	—	150 μ l
D : TT + OM-294-DP	TT (100 μ l)	OM-294-MP (50 μ l)	—	150 μ l

10

【0141】

抗原： TT原液は0.9% NaCl中に0.2mg/ml濃度で調製した。

アジュバント： OM-294-DPおよびOM-294-MPの原液は注射水1mg/ml濃度で調製し、OM-294-MPの場合にはそれに0.1%トリエタノールアミンを加えた。負の対照は抗原を含まない0.9% NaCl溶液にした。

抗原-アジュバント混合物： アジュバントは37℃に20分間放置した後、3分間攪拌処理し、それから上記の表に示すように抗原と(0.9%)NaClとを加えらる。抗原/アジュバント混合物を簡単に攪拌した後、ロータリ攪拌機で室温で15分間攪拌し、全部の混合物を3分間攪拌した。

20

免疫化規則： 注射は0日および14日に行った。表に記載の混合物を皮下に(75 μ lを各側面、動物当たり全体で150 μ l)投与した。採血法は14日および28日に行った(眼窩穿刺)。

【0142】

抗TT免疫グロブリンのアッセイ： 以下のTTに対する血清免疫グロブリンを2回エリサで分析した：IgG1、IgG2a、IgM。簡単に説明すると、マイクロタイタープレート(NUNC、Immunoplate Roskilde、DK)を重炭酸塩緩衝剤pH 9.6中で4℃で100 μ lのTT(0.5 μ g)と一緒に(一晚被覆)培養した。0.5%トゥイーン-20(メルク Hohenbrunn、D)で洗浄した後に、漿液を50-、200-、800-倍に希釈した(希釈溶液：リン酸緩衝生理食塩水(PBS)1%+ウシ血清アルブミン(BSA、シグマ、セントルイス、MO、USA)0.02%+トゥイーン-20)。希釈した各血清サンプルの100 μ lをウエルに加えた。培養は37℃で45分間行った。

30

第2の洗浄後、オバルブミンに対するIgG1、IgG2aおよびIgMを、予めPBS/BSA/トゥイーン緩衝剤(250-、1000-、500倍に希釈)に希釈した100 μ lの抗IgG1抗体(抗マウス・ラット抗体)-ペルオキシダーゼ接合体(Serotec、オックスフォード、UK)、IgG2a-ペルオキシダーゼ接合体(Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA)およびIgM-ビオチン複合体(Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA)と一緒に37℃で30分間培養した。IgMの場合にはさらに洗浄した後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体(Dako、Glostrup、DK)の1:100希釈液と一緒に37℃で30分間第3回目の培養をする必要がある。

【0143】

40

洗浄ステップ後、ペルオキシダーゼに結合した抗IgG1および抗IgG2二次性抗体を検出するために、100 μ lのフェニレン1,2-ジアミン溶液(OPD、メルク、ダルムシュタット、GFR)を加えた(IgMの場合には3',3',5',5'-テトラメチルベンジジン(TMB、シグマ、セントルイス、MO、USA)を用いる)。室温で20分間培養した後、100 μ lの2N H₂SO₄を加えて反応を停止させる。吸光度値はバイオ-ラド3550モデルのプレートリーダーで490ナノメートルで読みとる。

結果

490ナノメートルで読んだIgG1およびIgG2aの読取り結果はml当たりの任意単位(A.U.)で示してある。これは各サンプルを28日にグループB(TTのみを注射した動物)から集めたサンプルプールの各種希釈液から調製した標準品と比較することで行った。サンプルプー

50

ルの50-倍希釈液は1000A.U./ml濃度に対応する。各結果は対応する希釈比（50、200または800回）に対して修正した。ここでは各グループの平均値とおよび標準偏差（SD）のみを報告する。

【0144】

TTに対するIgMのアッセイでは、アッセイのバックグラウンドノイズが高いため、上記の実施例で行ったようなIgG1およびIgG2aに対する特異的IgMの測定法ではグループB（TT単独）とグループC、D（アジュバントとTT）の間には明確なカット差は見られない。従って、ここでは特異的IgMの滴定量は各サンプルの連続的に希釈し（上記のA.U.の代わりに）、各サンプルに対してグループA（NaCl）に対する平均吸光度 $\pm 3SD$ よりも高い吸光度を与える最大希釈度を結果に記録する。こうして得られた滴定量はバックグラウンドノイズレベルと区別できなくなる吸光度になる前の血清サンプルの希釈回数を示す。表（c）には以下で説明するIgMに対する最終希釈度が記載してある。

【0145】

【表19】

表(a) IgG1 サブクラスのTTに対する免疫グロブリン

(任意単位/ml $\pm SD$ 、** $p < 0.01$ (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14日目	28日目
A : NaCl	1 \pm 2	0 \pm 1
B : TT	2871 \pm 1633	34367 \pm 15018
C : TT+OM-294-MP	8502** \pm 2020	78506** \pm 21660
D : TT+OM-294-DP	11620** \pm 2348	136463** \pm 41025

【0146】

【表20】

表(b) IgG1 サブクラスのTTに対する免疫グロブリン

(任意単位/ml $\pm SD$ 、** $p < 0.01$ (Anova & Dunnetts 試験))

グループ	14日目	28日目
A : NaCl	351 \pm 506	536 \pm 1046
B : TT	2547 \pm 2539	61387 \pm 82269
C : TT+OM-294-MP	8869 \pm 6979	65881 \pm 46635
D : TT+OM-294-DP	21969** \pm 25067	148365 \pm 134196

【0147】

【表21】

表 (c) IgM サブクラスの TT にあてる I g の滴定量
(490 ナノメートルでグループ A のサンプル希釈に対する
平均値±3SD より大きい信号を出す各サンプルの希釈度)

グループ	14 日目	28 日目
A : NaCl	標準	標準
B : TT	9 匹の動物 < 251 1 匹の動物 < 50	10 匹の動物 < 25
C : TT+OM-294-MP	9 匹の動物 < 25 1 匹の動物 > 1600	7 匹の動物 < 25 1 匹の動物 < 100 2 匹の動物 > 1600
D : TT+OM-294-DP	7 匹の動物 < 25 1 匹の動物 < 200 2 匹の動物 > 1600	10 匹の動物 < 25

【 0 1 4 8 】

これらの結果はOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントが実験したモデルにおいて有効であることをしている。すなわち、両方とも1、2の注射の後にハツカネズミのTTに対しするIgG1a、IgG2a抗体の滴定量が大幅に上昇する(図28、29を参照)。反対に、TTに対する特異的IgMを産生する動物はほんのわずかしかない。

【 0 1 4 9 】

15. ライシエマニア (Leishmania) gp63抗原の皮下投与によるCBAハツカネズミ免疫化モデルでのOM-294-MPアジュバントの評価

手順

CBAマウスの尾部に皮下注射で8日間隔で2回、2 μgの投与量でgp63を投与した。アジュバントOM-294-MPは抗原の2回の投与量に混ぜ、BCGは最初の投与量にだけを混ぜた。各ハツカネズミには2 × 50 μgのOM-294-MPか、200 μgのBCGを投与した。対照群にはアジュバントなしで抗原だけを注射した。第2回目の注射後から10日目に鼠径および大動脈周囲のリンパ節細胞を培養し(各グループの3匹のハツカネズミ)、³H-TdR)チミジンテークアップを測定して精製したgp63抗原に対する増殖応答を分析した。また、インビボでgp63抗原で再免疫化したリンパ節リンパ球から分泌されるIFNおよびIL-4としてのサイトカイン産生を³H-Td添加前にリンパ節リンパ球培養の各上澄サンプルのエリサで決定した(MIF100IFN M4000 IL-4キット、R & Dsystems, Europe Ltd. Abingdon, UK)。

【 0 1 5 0 】

表に示した³H-TdRテークアップの値は各cpmで発現された算術平均 ± 標準偏差(三重)を表し、上澄液のサイトカインに関する値はmlあたりにpgで発現された算術平均 ± 標準偏差(三重)に対応する。

抗原 : gp63原液は0.9% NaCl中の40 μg/ml濃度で調製した。

アジュバント : OM-294-MPの原液は0.1%トリエタノールアミンを加えた注射水の1mg/ml濃度で調製した。負の対照は抗原を含まないPBS溶液から成る。

抗原-アジュバント混合物 : アジュバントは37 °Cで10分間放置してから3分間攪拌処理し、それから、抗原(1体積)とアジュバント(1体積)とを混ぜ、簡単に攪拌した。その後、37 °Cで20分間の培養し、最後に全部の混合物を3分間攪拌した。

【 0 1 5 1 】

結果

gp63抗原で免疫化したハツカネズミにおいてOM-294-MPアジュバントはBCGより良くリンパ

球増殖応答を誘導する(表(a)および図30(a))。事実、アジュバントなしで免疫化した動物からの培養液に関して、OM-294-MP製品では3.1~6倍の増殖率で増加するが、BCGでは3.5倍を超えない(2.6~3.5)。

これらのリンパ球培養液では、サイトカイン産生が上澄液中に測定される(表(b)および図30(b))。gp63抗原がアジュバントとしてのOM-294-MPまたはBCGで処置されたハツカネズミと量的に同じIFNの分泌を誘導する点が注目される。これに対して、OM-294-MPアジュバントは(抗gp63)免疫リンパ球による実質的な量のIL-4の分泌に好ましいと思われる、BCGで処置したネズミのリンパ球はサイトカインをわずかにしか分泌しないか、分泌が検知できない。

【0152】

【表22】

表(a) インビトロで gp63 抗原に対するネズミの
Tリンパ球増殖の応答で計った gp63 抗原に対する
OM-294-MP アジュバントの免疫応答効果

インビトロ gp63 ($\mu\text{g/ml}$)	アジュバントなし (cpm $\times 10^3/\text{ml}$)	OM-294-MP (cpm $\times 10^3/\text{ml}$)	BCG (cpm $\times 10^3/\text{ml}$)
0	1.4 \pm 0.4	2.8 \pm 0.7	5.3 \pm 1.1
0.16	18 \pm 5	65 \pm 11	47 \pm 9
0.31	17 \pm 5	92 \pm 11	57 \pm 17
0.62	16 \pm 4	93 \pm 13	54 \pm 13
1.25	13 \pm 2	39 \pm 7	44 \pm 9

表(a)に記載の値は算術平均テークアップ \pm 標準偏差(3つの培養液)

【0153】

【表23】

表(b) リンパ節リンパ球によりサイトカインの
インビトロ産生における gp63 抗原との結合における
インビボで投与した OM-294-MP アジュバントの効果

γ IFN 濃度 (pg/ml)			
インビトロ gp63	アジュバントなし	294-MP	BCG
0	< 9	< 9	27
0.3	78	135	200
0.6	38	120	105
IL-4 濃度 (pg/ml)			
インビトロ gp63	アジュバントなし	294-MP	BCG
0	< 8	< 8	< 8
0.3	< 15	125	15
0.6	< 8	83	< 8

【0154】

OM-294-MPアジュバントは、リンパ球増殖および抗原-誘導性IFNおよびIL-4産生で分析した時に、gp63(Leishmania parasiteの両性抗原)で免疫化されたCBAハツカネズミの特異的インビトロT応答を強化する。

【0155】

16. Leishmania mexicana LmCPb抗原を経皮下投与した時のCBAハツカネズミの免疫化モ

10

20

30

40

50

デルに基づく抗LmCPb T-一次応答時のOM-294-MPアジュバントの効率

手順

CBAハツカネズミの尾部に2 µgのLmCPbを50 µgのOM-294-MPアジュバントと組合せてまたは単独で一回の注射で投与した。対照群には生理食塩緩衝剤を一回の注射で投与した（非免疫被検体）。11日後に鼠径および大動脈周囲のリンパ節細胞を培養し（各々グループから3匹のハツカネズミ）、トリチウムチミジンテークアップ（³HTdR）を測定することにより、精製後のLmCPb抗原、Leishmania mexicanaの全無べん毛体およびコンカンバリン（concanavalin）A（ConA）に対する増殖反応を評価した。Leishmania mexicana LmCPb抗原をインビトロで再抗原投与したリンパ節リンパ球が無べん毛体によるIFNおよびIL-4サイトカイン産生は、³H-TdR添加前にリンパ節リンパ球の各培養上清のサンプルを用いてエリサによっても決定した（MIF00 IFN及びM4000 IL-4キット、R & D systems Europe Ltd.、Abingdon、UK）。

10

【0156】

表に示した³H-TdRテークアップの値は各cpmで発現された算術平均±標準偏差（三重）を表し、上澄液のサイトカインに関する値はmlあたりにpgで発現された算術平均±標準偏差（三重）に対応する。

抗原： LmCPb原液はPBS（2x）中の40 µg/ml濃度で調製した。

アジュバント： OM-294-MPの原液は0.1%トリエタノールアミンを加えた注射水の1mg/ml濃度で調製した。負の対照は抗原を含まないPBS溶液から成る。

抗原-アジュバント混合物： アジュバントは37 °Cで10分間放置してから3分間攪拌処理し、それから、抗原（1体積）とアジュバント（1体積）とを混ぜ、簡単に攪拌した。その後、37 °Cで20分間の培養し、最後に全部の混合物を3分間攪拌した。

20

【0157】

結果

培地に刺激がないとOM-294-MPアジュバントはリンパ球の発達を促進し、自発的に増殖し（表(a)および図31(a)）、痕跡量のIFNを分泌する（表(b)および図31(b)）。この反応は培養液に精製したLmCPb抗原または全パラサイトのエキスを加えると著しく強くなる。この実験では、アジュバントが感作リンパ球（抗LmCPb）の誘導上の透明な影響を発揮するのを見られ、相当量のIL-4を分泌させることができる（表、b）および図31(b)）。

【0158】

【表24】

表(a) LmCPbによってインビボで免疫化したリンパ節細胞の
インビトロ増殖応答：OM-294-MPアジュバントの影響

抗原インビトロ	³ HTdR テークアップ (cpm×10 ⁻³ /ml)		
	免疫なし	アジュバントなし	OM-294-MP
刺激なし	0.9±0.3	2.2±0.7	11±2
LmCPb 0.6 µg/ml	0.8±0.4	1.7±0.1	19±4
LmCPb 1.7 µg/ml	0.9±0.1	4.6±1.6	40±4
LmCPb 5 µg/ml	1.3±0.8	7.2±0.6	80±5
LmCPb 15 µg/ml	2.6±0.4	16.2±2.1	140±10
無べん毛体 1.9×10 ⁻⁶ /ml	0.8±0.2	1.7±0.1	44±7
無べん毛体 6×10 ⁻⁶ /ml	1.5±0.2	4.6±0.6	79±6
無べん毛体 17×10 ⁻⁶ /ml	2.9±0.6	7.2±0.6	119±4
Con A 5 µg/ml	123+33	193+17	196+10

40

【0159】

【表25】

50

表 (b) LmCPb でインビボ免疫したリンパ節リンパ球による
サイトカインのインビトロ分泌：一次応答での
OM-294-MP アジュバントの影響

γ IFN 産生 (pg/ml)			
インビトロ刺激	免疫化なし	アジュバントなし	294-MP
刺激剤なし	< 9	< 9	25
LmCPb 15 μg/ml	< 9	46	480
無べん毛体 17×10 ⁻⁵ /ml	< 9	95	320
Con A 5 μg/ml	1800	>1800	>1800
IL-4 産生 (pg/ml)			
インビトロ刺激	免疫化なし	アジュバントなし	294-MP
刺激剤なし	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 μg/ml	< 8	< 8	130
無べん毛体 17×10 ⁻⁵ /ml	< 8	< 8	65
Con A 5 μg/ml	92	190	360

【 0 1 6 0 】

OM-294-MPアジュバントは一次T応答中も非常に効果的である(次に単一のワクチン注射)。この応答上のアジュバント効果(リンパ球増殖、サイトカイン産生の誘導)は2回のワクチン注射に対する応答時に観測されるものと類似している。

【 0 1 6 1 】

17. Leishmania mexicana LmCPb抗原の皮下投与によるCBAハツカネズミの免疫化モデル
に基づくOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントの評価：BCGとの比較手順

CBAハツカネズミ(各グループ8匹のハツカネズミ)の尾部に精製した3~5 μgのLmCPbを8日間隔で2回皮下注射で投与した。OM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントを両方の抗原投与量に混ぜ、BCGは最初のものにのみ混ぜた。各ハツカネズミに2×50 μgのOMアジュバントまたは200 μgのBCGを与えた。第2回目の注射後の8日後に大動脈周囲および鼠径のリンパ節(各グループにつき三匹のハツカネズミ)を除去し、細胞培養して精製したLmCPb抗原に対する増殖反応、または、*Leishmania mexicana*全調整品、無べん毛体またはコンカナバリンA(Con A)に対する増殖反応を分析した。増殖反応はトリチウムチミジンテークアップ(³HTdR)を測定することにより評価した。³H-TdR添加前にリンパ節リンパ球の各培養上清のサンプルを用いて*Leishmania mexicana*または無べん毛体またはCon AのLmCPb抗原によってインビトロで再抗原投与されたリンパ節リンパ球が産生するIFNおよびIL-4サイトカインをエリサで求めた(MIF00 IFN及びM4000 IL-4キット、R & D systems Europe Ltd., Abingdon, UK)。

【 0 1 6 2 】

表に示した³H-TdRテークアップの値は標準抗体価の%で表した算術平均±標準偏差、³H-TdRテークアップに対するcpmで表した算術平均±標準偏差(三重)、サイトカイン産生に対するmlで表した算術平均±標準偏差(三重)を表す。

抗原： LmCPb原液は0.9% NaCl中に60~100 μg/ml濃度で調製した。

アジュバント： OM-294-MPおよびOM-294-DPの原液は0.1%トリエタノールアミンを加えた注射水の1mg/ml濃度で調製した。負の対照は抗原を含まないPBS溶液から成る。

抗原-アジュバント混合物： アジュバントは37℃で10分間放置してから3分間攪拌処理し、それから、抗原(1体積)とアジュバント(1体積)とを混ぜ、簡単に攪拌した。その後、37℃で20分間の培養し、最後に全部の混合物を3分間攪拌した。

【 0 1 6 3 】

結果

LmCPb抗原で免疫化したハツカネズミ（表(a)および(b)、図32の(a)および(b)）において、OM-294-MPおよびOM-294-DP製品はgp63に対するハツカネズミで観測された免疫応答と同様な効果を出す。従って、LmCPb（15 μg/ml）の存在下で抗原にOM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントをプラスして免疫化したハツカネズミからの培養液の増殖は、抗原のみを投与した（アジュバントなし）ハツカネズミからの培養液よりも23倍、28倍高い。増殖増加度は単に11倍であるので、この条件でのBCGのインパクトは弱い。同様な効果はLeishmania parasiteの精製抗原または全抽出物を抗原投与した培養液およびテストした全ての抗原濃度で見られる。

LmCPb抗原に反応するIFNの産生はOM-294-DP製品を用いた方がBCGを用いた場合より少し高い（表(b)および図32(b)）。この実験では抗原が培地から加えられなかったとしてもリンパ球が増殖し、ある程度の量のIFNを分泌するという点に注意する必要がある。この場合、OM-294-DPアジュバントはBCGよりいくらか効果的な傾向にある。OM-294-MP、OM-294-DPおよびBCGアジュバント間の明確な相違は上記のようにIL-4を産生可能なリンパ球の成長に関して見られる。OM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントの影響で生じるIL-4の量はリンパ球に対する強力な非特異的刺激剤であるCon Aに曝されたリンパ球が分泌する量に相当するので有意である（表(a)および(b)を参照）。

【0164】

【表26】

表(a) インビボでLmCPbで免疫化されたハツカネズミに由来するリンパ節細胞に対するインビトロ増殖反応：各種アジュバントの効果

インビトロ刺激	³ HTdR テークアップ (cpm×10 ⁻³ /ml)			
	アジュバントなし	OM-294-DP	OM-294-MP	BCG
刺激なし	1.7±0.6	21.8±2.2	17.1±2.5	18.6±4.8
LmCPb 0.6 μg/ml	0.8±0.3	40.9±12.7	22.9±2.8	19.0±7.4
LmCPb 1.7 μg/ml	2.4±0.1	57.2±10.9	34.1±4.1	39.8±5.7
LmCPb 5 μg/ml	2.8±0.6	70.2±9.2	70.3±6.4	44.0±10.4
LmCPb 15 μg/ml	4.3±0.1	100.0±6.5	124.2±12.0	46.2±0.3
無べん毛型 2×10 ⁻⁶ /ml	2.4±0.6	61.0±1.7	28.4±8.3	24.4±4.3
無べん毛型 6×10 ⁻⁶ /ml	2.3±0.7	81.5±5.5	66.1±4.5	23.6±2.5
無べん毛型 17×10 ⁻⁶ /ml	1.7±0.4	78.2±7.8	68.7±2.3	23.4±4.0
Con A 5 μg/ml	188.1±21.0	135.9±3.7	151.4±3.7	119.7±28.5

この表の値はトレーサーテークアップでの算術平均±標準偏差を表す（3組の培養液）

【0165】

【表27】

表 (b) LmCPb 抗原でインビボ免疫化したハツカネズミからの
リンパ節リンパ球によるインビトロサイトカイン産生：
各種アジュバントの効果

γ IFN 濃度 (pg/ml)				
インビトロ刺激	アジュバントなし	OM-294-DP	OM-294-DP	BCG
刺激なし	< 9	460	240	280
LmCPb 15 μ g/ml	44	520	360	460
無べん毛型 17 \times 10 ⁻⁶ /ml	14	> 600	>600	480
Con A 5 μ g/ml	1200	1200	1900	>3000
IL-4 濃度 (pg/ml)				
インビトロ刺激	アジュバントなし	OM-294-DP	OM-294-DP	BCG
刺激なし	< 15	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 μ g/ml	< 15	110	88	36
無べん毛型 17 \times 10 ⁻⁶ /ml	< 8	130	110	29
Con A 5 μ g/ml	40	230	85	105

【 0 1 6 6 】

OM-294-MPおよびOM-294-DPアジュバントはライシエマニア (LmCPbプロテアーゼ) の可溶性抗原に対して効果的に免疫応答を強化する。これは有意量の IFNおよびIL-4産生の誘導とそれに続く増殖反応の増加によってインビトロで反映されている。

実施例VI

【 0 1 6 7 】

【表 2 8】

注射用水溶液

実施例 III の化合物	1g
ポリソルベート 80	0.2g
塩化ナトリウム	9g
注射 q. s. の蒸留水	1000ml

【 0 1 6 8 】

この溶液は0.1M HClでpH 7.5に調整され、0.22 μ m Steritop Epress 1000メンブランス膜で限界濾過して殺菌される (PES膜、90mm、SCGP T10RE、ミリポア会社、ベッドフォード、MA、USA)。無菌液は1mlの無菌アンプルに分ける。

【 0 1 6 9 】

【表 2 9】

凍結乾燥製品

実施例 IV の化合物	2g
ポリソルベート 80	0.2g
塩化ナトリウム	9g
マンニトール	10g
アスコルビン酸	0.1g
注射 q. s. の蒸留水	1000ml

10

20

30

40

50

【 0 1 7 0 】

この溶液は0.1M HClでpH 7.4に調整され、0.22 μ l Steritop Epress 1000メンブランス膜で限界濾過して殺菌される（PES膜、90mM、SCGP T10 RE、ミリポア会社、ベッドフォード、MA、USA）。無菌液はマルチ無菌アンプルに分け、冷凍乾燥した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 異なる細胞調整物で行った骨髄幹細胞増殖誘導に関する三つの独立的した代表的な実験の結果（実施例 V）。

【図 2】 異なる細胞標品で独立して行った鼠のマクロファージ細胞でのNOの誘導に関する三つ測定値から得られた代表的な実験結果（実施例 V）。

【図 3】 Dextran-FITC結合体の誘導に関する結果。

10

【図 4】 Dextran-FITC結合体の誘導に関する結果。

【図 5】 Dextran-FITC結合体の誘導に関する結果。

【図 6】 CD40共刺激表面マーカー発現結果。

【図 7】 CD86共刺激表面マーカー発現結果。

【図 8】 CD83共刺激表面マーカー発現結果。

【図 9】 CD80共刺激表面マーカー発現結果。

【図 10】 TNF産生におけるOM-294-MPおよびOM-294-DPの効果。

【図 11】 IL-12 p70産生におけるOM-294-MPおよびOM-294-DPの効果。

【図 12】 IL-12 p70産生におけるOM-294-MPの効果。

【図 13】 エリサ 2。

20

【図 14】 エリサ 3。

【図 15】 エリサ 4。

【図 16】 1, 2, 3回の免疫後の抗体価。

【図 17】 第2回免疫化処置後1週間後のPbCS245～252で刺激された鼠径部脾臓節のIFN- γ 産生リンパ球ELISPOT。

【図 18】 第2回免疫化処置後1週間後のPbCS245～252で刺激された鼠径部脾臓節のIFN- γ 産生リンパ球ELISPOT。

【図 19】 第2回免疫化処置後1週間後のPbCS245～252で刺激された鼠径部脾臓節のIFN- γ 産生リンパ球ELISPOT。

【図 20】 第3回免疫化処置後1週間後のPbCS245～252で刺激された鼠径部脾臓節のIFN- γ 産生リンパ球ELISPOT。

30

【図 21】 OM-294-DPの単独、Pb CS His₆-242-310抗原単独、PbCSHis6-242-310-OM-294-DP複合体の電気泳動図。

【図 22】 H1N1に対するIgG1特異抗体。

【図 23】 H1N1に対するIgG2特異抗体。

【図 24】 H1N1に対するIgM特異抗体。

【図 25】 オバルブミンに対するIgG1特異抗体。

【図 26】 オバルブミンに対するIgG2特異抗体。

【図 27】 H1N1に対するIgM特異抗体。

【図 28】 TTに対するIgG1特異抗体。

40

【図 29】 TTに対するIgG2特異抗体。

【図 30】 (a)および(b)はOM-294-MPアジュバントの作用下の抗gp63免疫応答の増加：BCGとの比較。

【図 31】 (a)および(b)はLmCPb抗原で予めインビト路免疫化されたハツカネズミに由来するインビトリンパ節リンパ球応答：一次応答時のOM-294-MPアジュバントの作用。

【図 32】 (a)および(b)はOM-294-MPアジュバント作用下の抗LrnCPb免疫応答の増加：BCGとの比較。

【図 33】 合成概要 1。

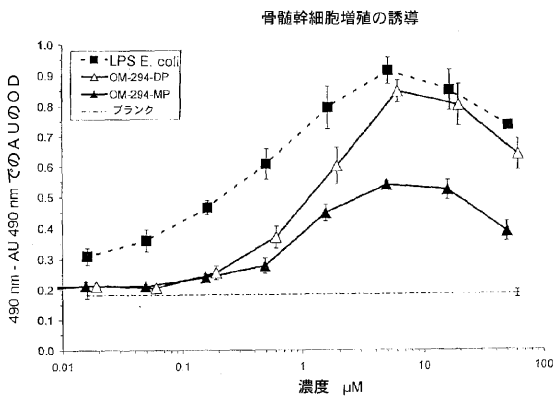
【図 34】 合成概要 2。

【図 35】 合成概要 3。

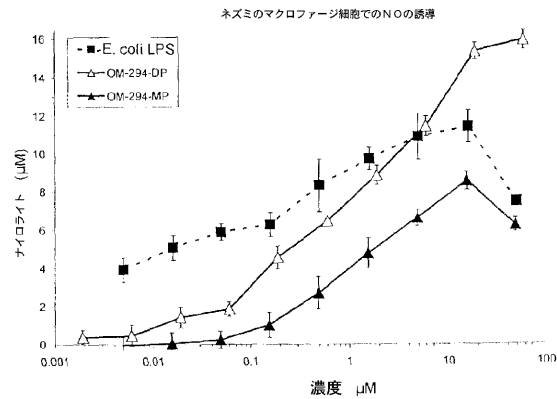
50

- 【図36】 合成概要4。
- 【図37】 合成概要5。
- 【図38】 合成概要6。
- 【図39】 スペクトル1。
- 【図40】 スペクトル2。
- 【図41】 スペクトル3。
- 【図42】 スペクトル4。
- 【図43】 スペクトル5。
- 【図44】 スペクトル6。
- 【図45】 スペクトル7。
- 【図46】 スペクトル8。
- 【図47】 スペクトル9。

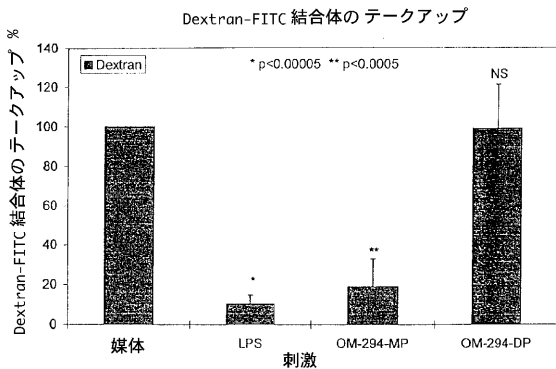
【図1】
骨髄幹細胞増殖の誘導



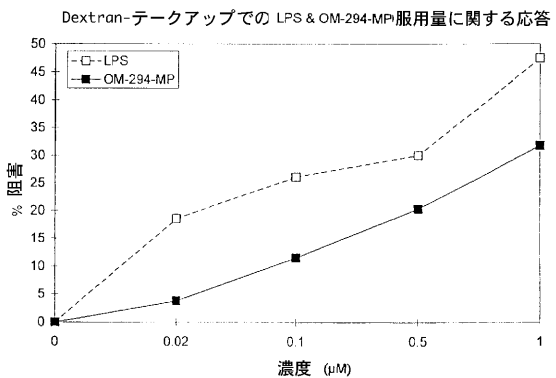
【図2】
ネズミのマクロファージ細胞でのNOの誘導



【図3】
Dextran-FITC 結合体の誘導

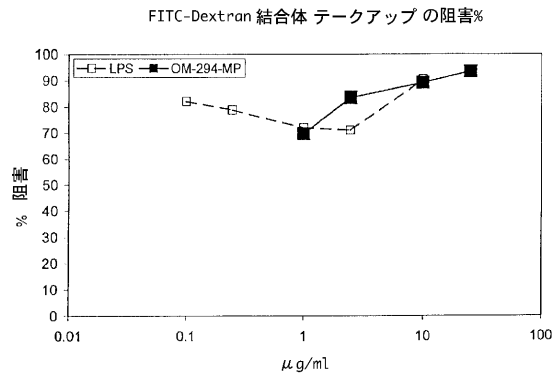


【図4】
Dextran-FITC 結合体の テークアップ：低濃度での服用量に関する効果



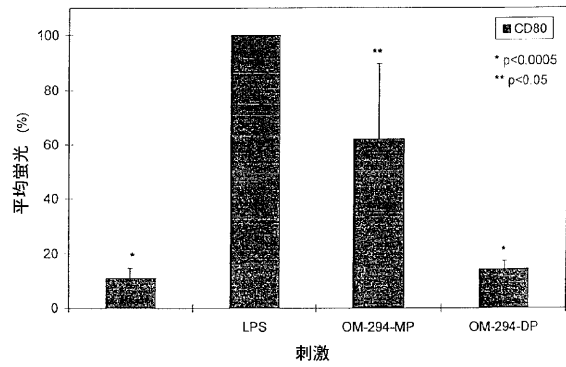
【図5】

高硬度でのDextran-FITC 結合体 テークアップでの服用量に関する効果



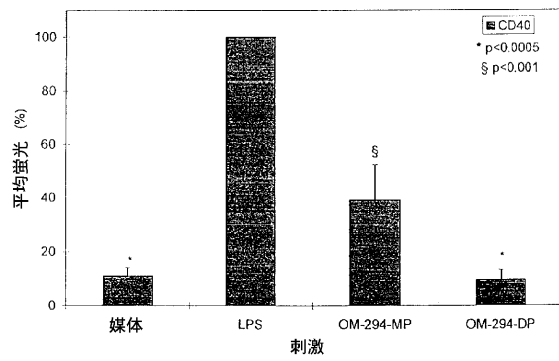
【図7】

CD86 共刺激マーカの発現



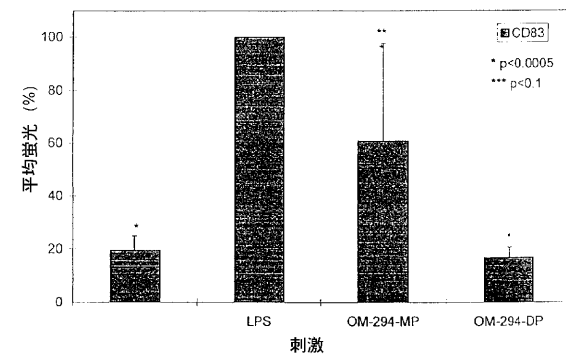
【図6】

CD40共刺激表面マーカー発現



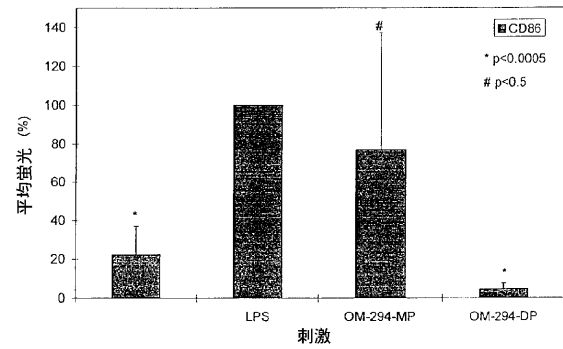
【図8】

CD86 共刺激マーカの発現



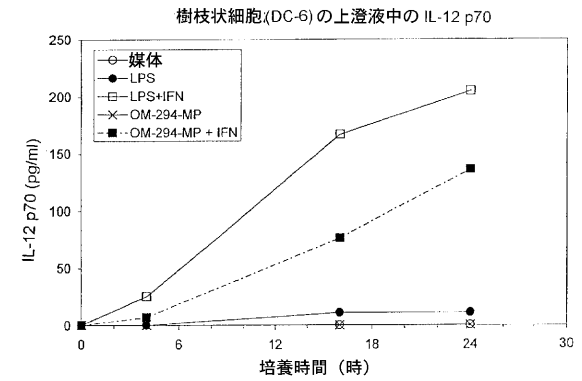
【図9】

CD80 共刺激マーカの発現



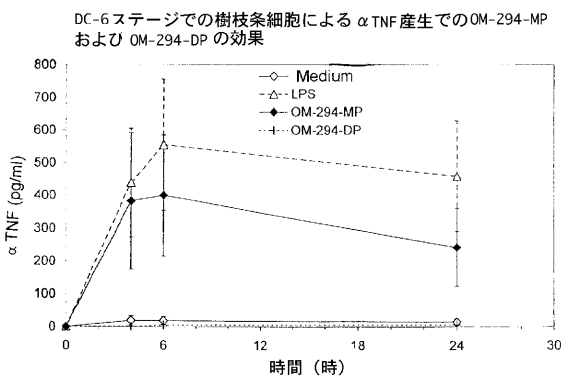
【図11】

DC-6 ステージで樹枝状細胞が産生する IL-12 p70 での OM-294-MP および OM-294-DP 生産物の効果 (IFN = γ IFN)



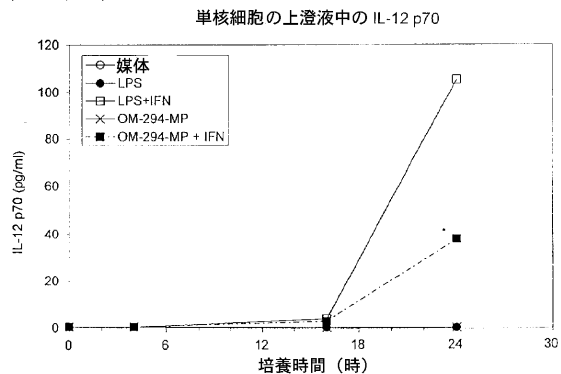
【図10】

DC-6 ステージでの樹枝状細胞による α TNF 産生での OM-294-MP および OM-294-DP の効果



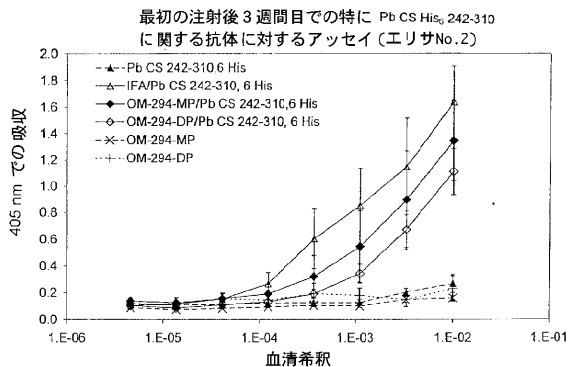
【図12】

単核細胞が産生するIL-12 p70 におけるOM-294-MP 生産物の効果 (IFN = γ IFN)



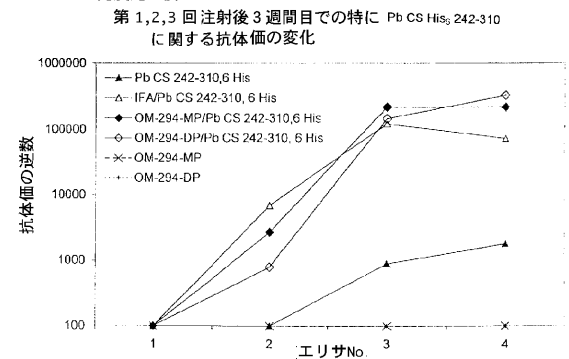
【図13】

最初の免疫処理後のエリサ2



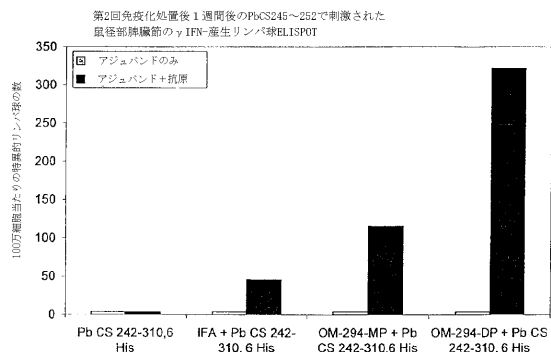
【図16】

第1,2,3 回免疫処理後の抗体価



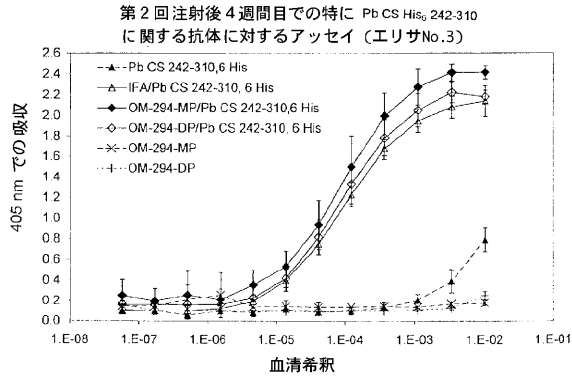
【図17】

第2回免疫化処置後1週間後のPbCS245~252で刺激された鼠脳部脾臓の γ IFN-産生リンパ球ELISPOT



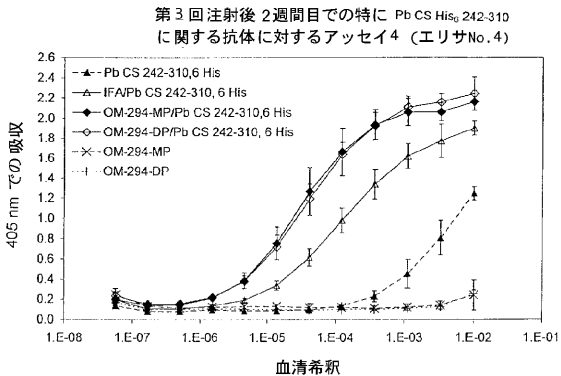
【図14】

第2回免疫処理後のエリサ3



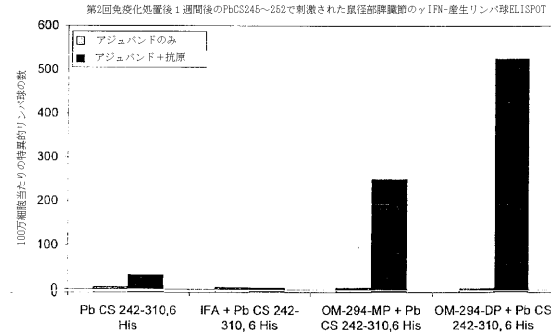
【図15】

第3回免疫処理後のエリサ4



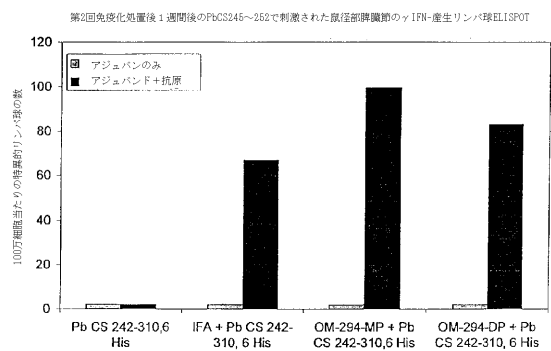
【図18】

第2回免疫化処置後1週間後のPbCS245~252で刺激された鼠脳部脾臓の γ IFN-産生リンパ球ELISPOT

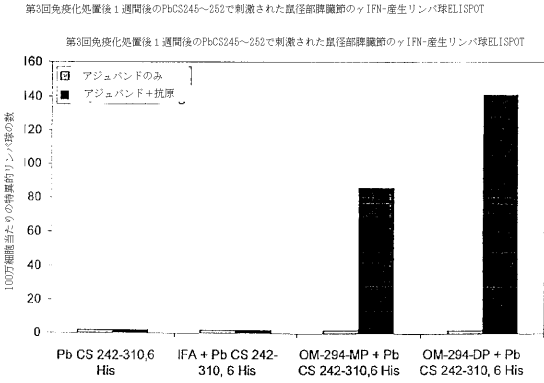


【図19】

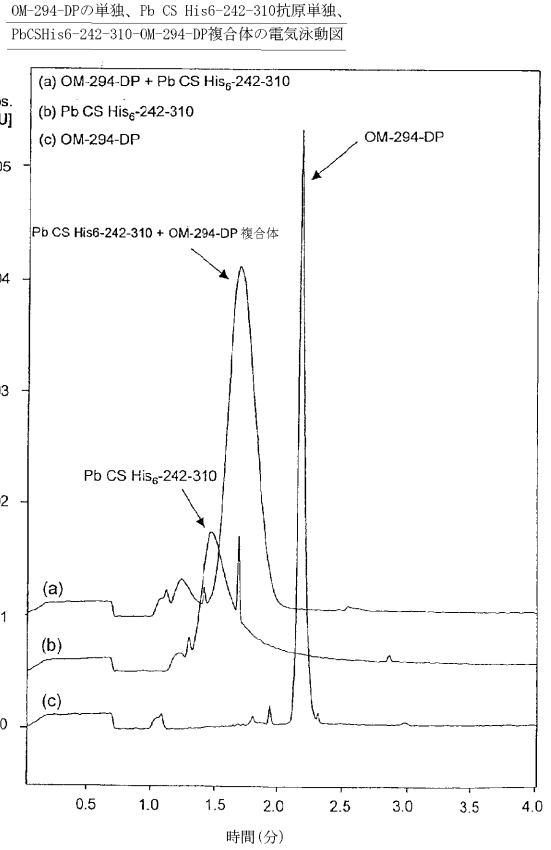
第2回免疫化処置後1週間後のPbCS245~252で刺激された鼠脳部脾臓の γ IFN-産生リンパ球ELISPOT



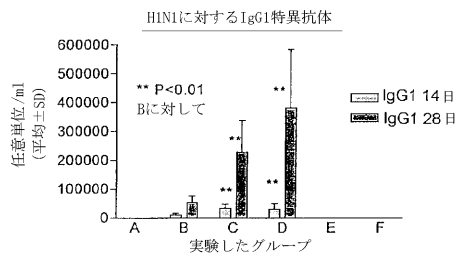
【 20 】



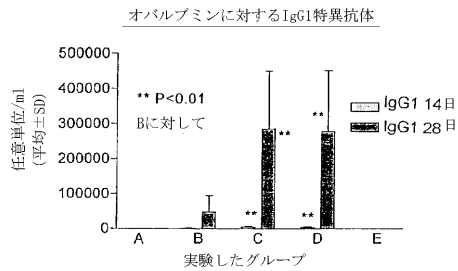
【 21 】



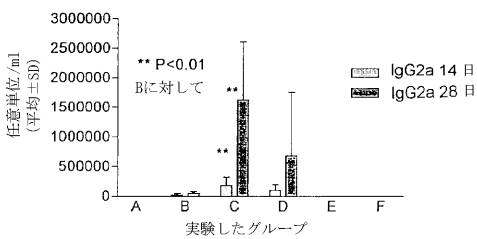
【 22 】



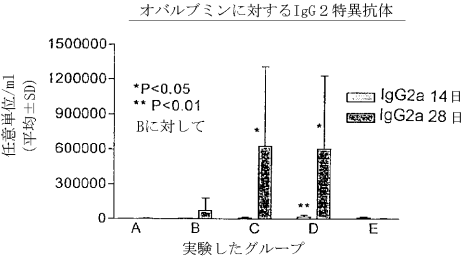
【 25 】



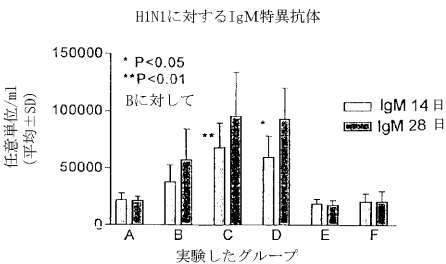
【 23 】



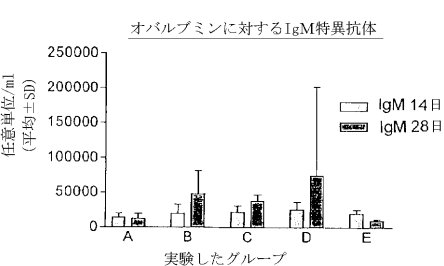
【 26 】



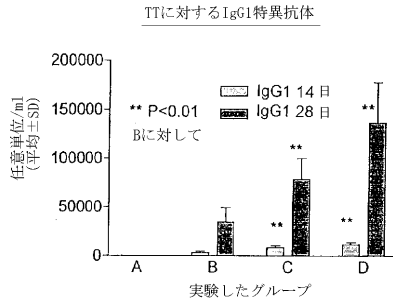
【 24 】



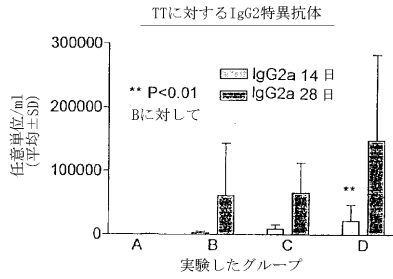
【 27 】



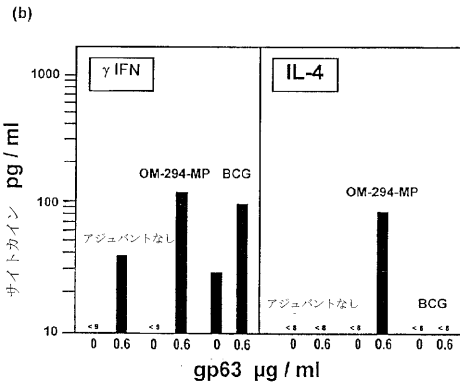
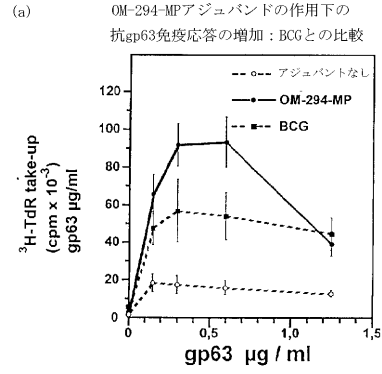
【 図 2 8 】



【 図 2 9 】

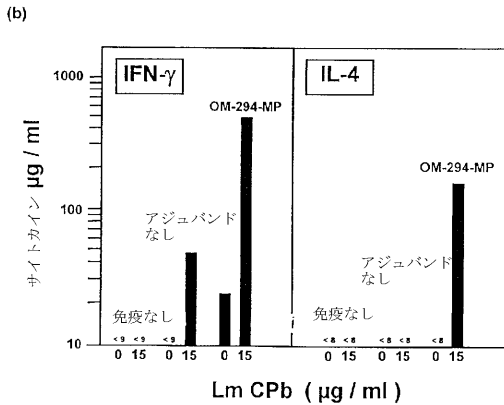
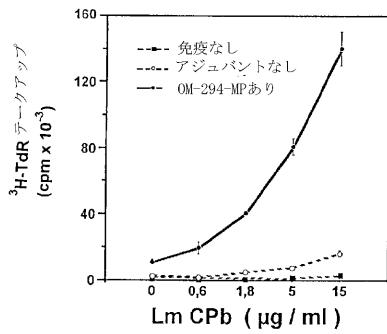


【 図 3 0 】



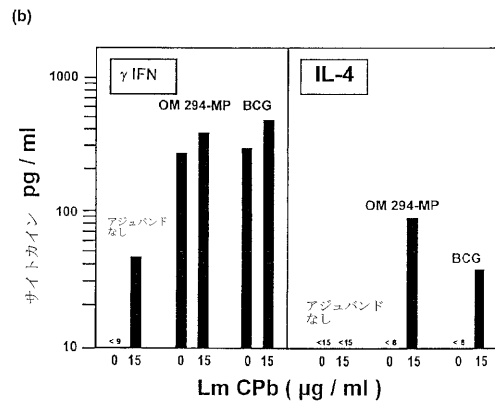
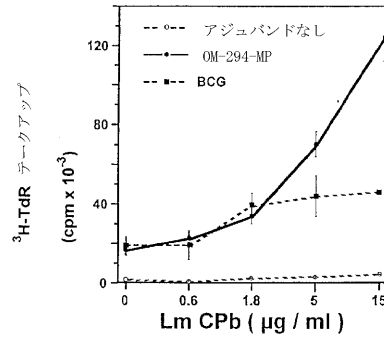
【 図 3 1 】

(a) LmCPb抗原で予めインビト路免疫化されたハツカネズミに由来するインビトリンパ節リンパ球応答: 一次応答時のOM-294-MPアジュバントの作用

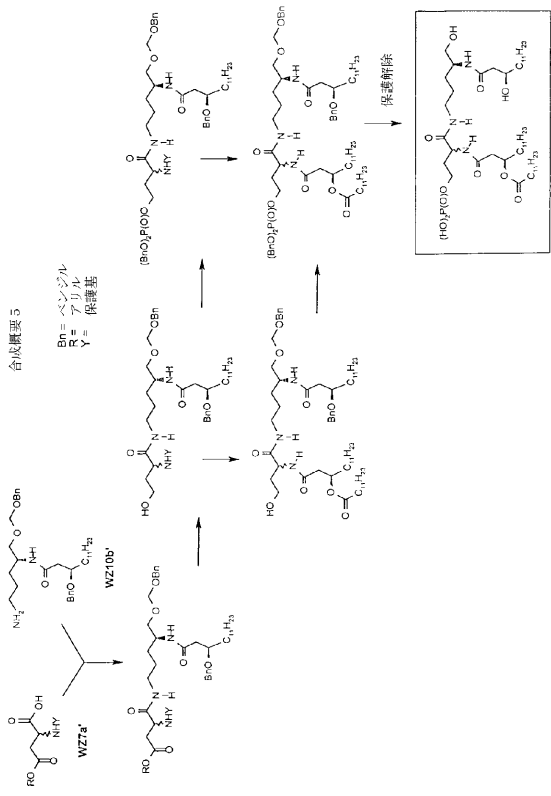


【 図 3 2 】

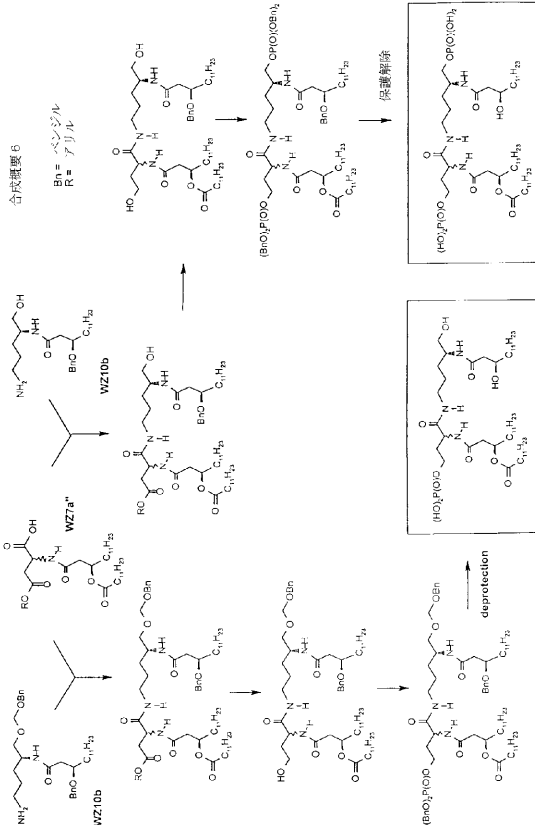
(a) OM-294-MPアジュバント作用下の抗LmCPb免疫応答の増加: BCGとの比較



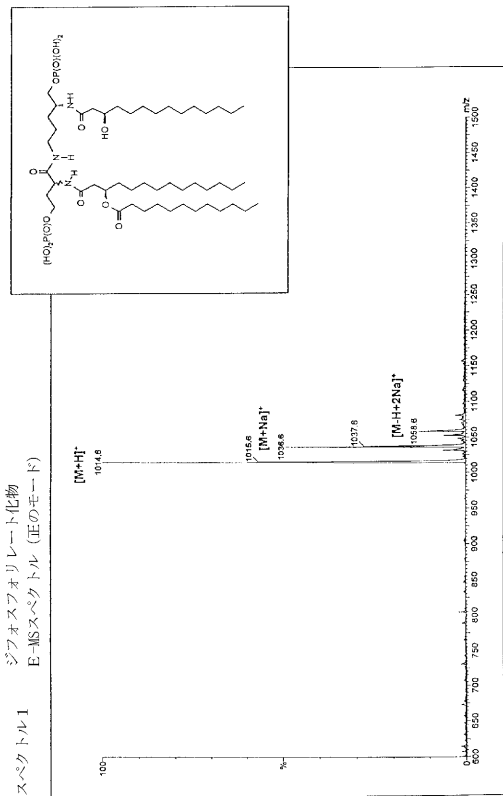
【 37 】



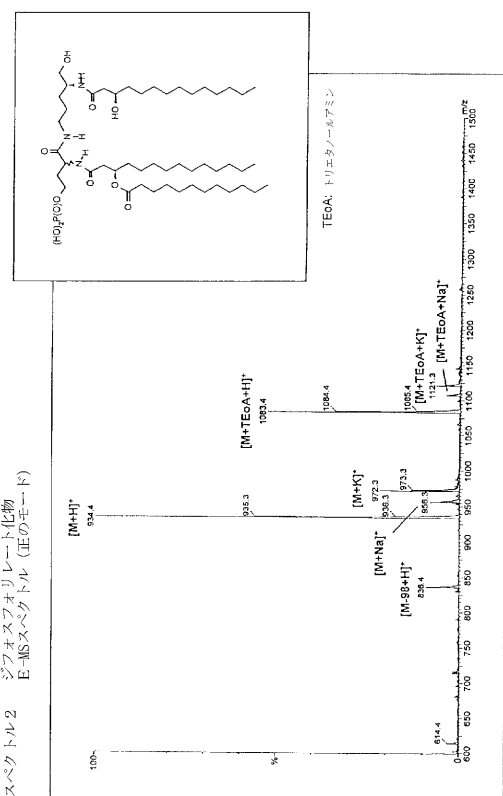
【 38 】



【 39 】

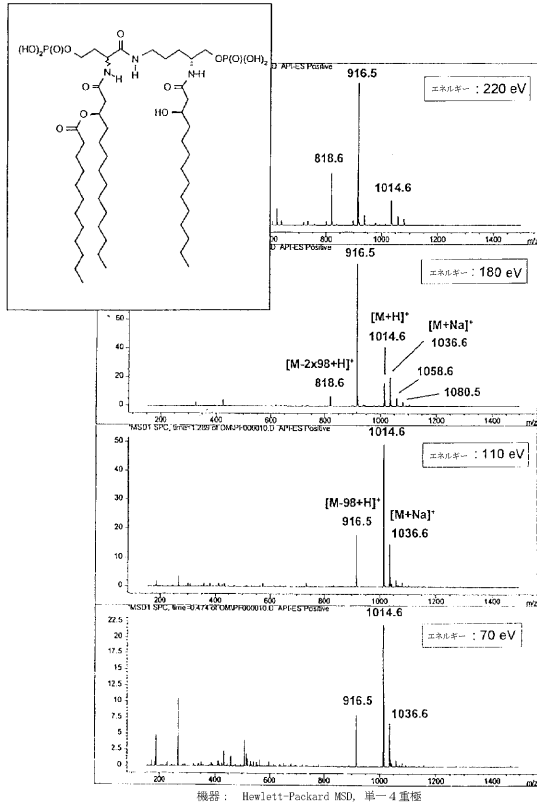


【 40 】



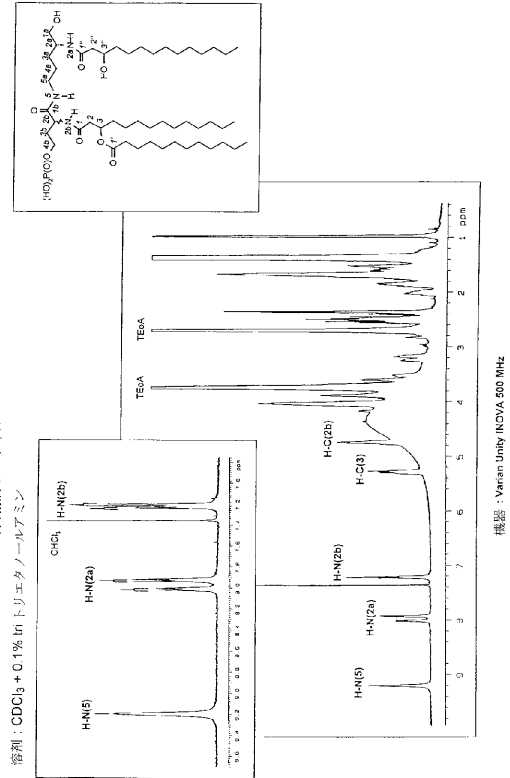
【 4 1 】

スペクトル3 ジフォスホオリレート化合物 E-MSスペクトル (正のモード)



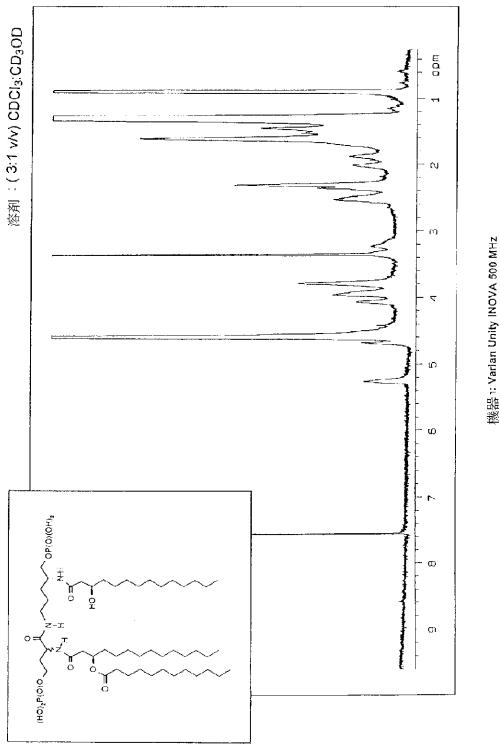
【 4 2 】

モノフォスホオリレート化合物 ¹H-NMR スペクトル
スペクトル4 溶剤: CDCl₃+0.1%トリエタノールアミン



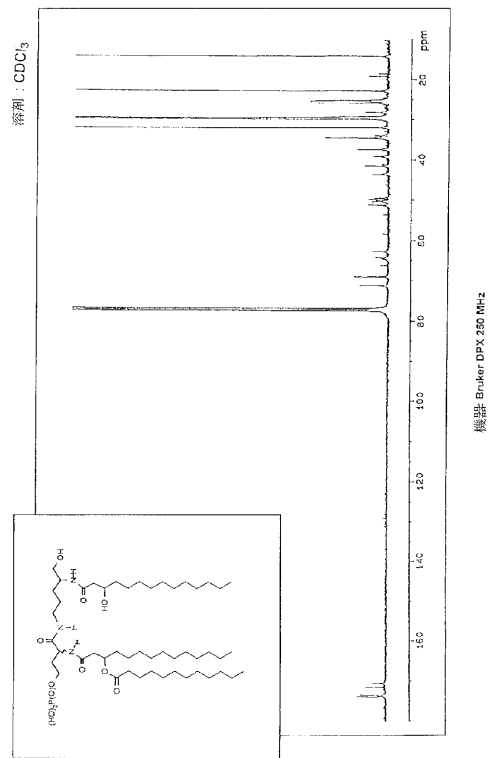
【 4 3 】

モノフォスホオリレート化合物 ¹H-NMR スペクトル
スペクトル5 溶剤: (3:1 v/v) CDCl₃:CD₃OD



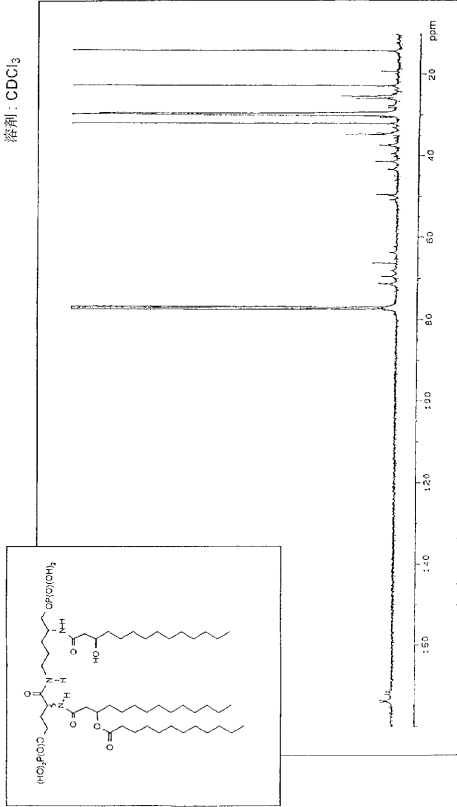
【 4 4 】

モノフォスホオリレート化合物 ¹³C-NMR スペクトル
スペクトル6 溶剤: CDCl₃



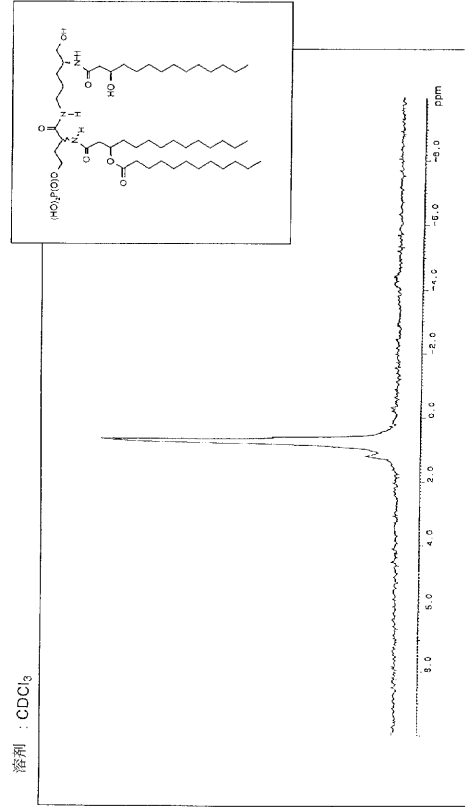
【 45 】

ジフオスフォオリレート化合物
13C-NMR スペクトル



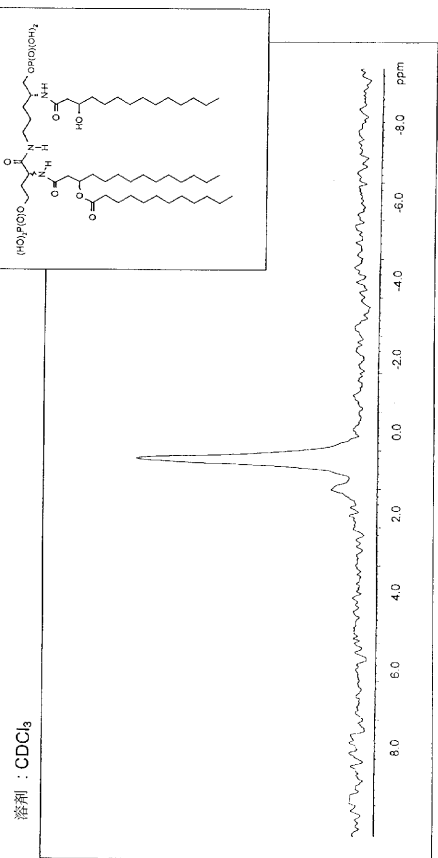
【 46 】

モノフオスフォオリレート化合物
31P-NMR スペクトル



【 47 】

ジフオスフォオリレート化合物
31P-NMR : スペクトル



機器 : Bruker DPX 300 MHz

機器 : Bruker DPX 300 MHz

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第94/005676(WO, A1)
特開平04-026662(JP, A)
特開昭61-227586(JP, A)
特表平09-505071(JP, A)
特開平06-206893(JP, A)
特開昭62-129292(JP, A)
Chem. Pharm. Bull., 1994年, Vol.42, No.12, p.2526-2531
Chem. Pharm. Bull., 1997年, Vol.45, No.2, p.312-320
Chem. Pharm. Bull., 1997年, Vol.45, No.6, p.1089-1093

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 237/22
A61K 31/66
A61P 35/00
A61P 37/02
C07F 9/09
CA/REGISTRY(STN)