



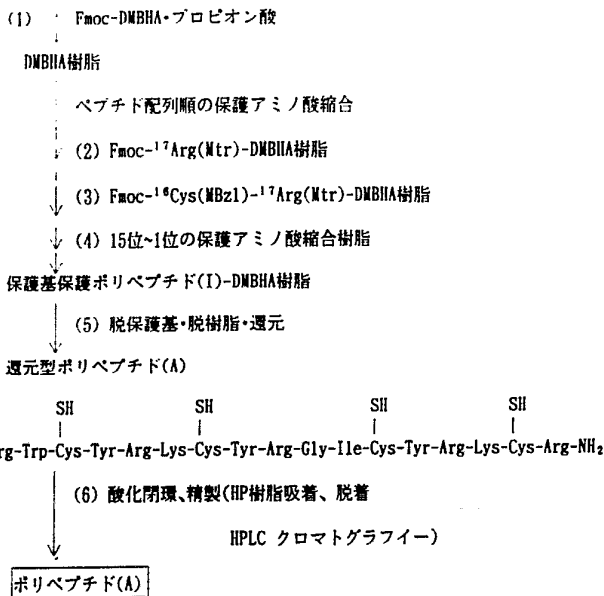
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07K 7/08, A61K 37/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 92/04374</p> <p>(43) 国際公開日 1992年3月19日 (19.03.1992)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01201 (22) 国際出願日 1991年9月10日(10. 09. 91)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平2/238922 1990年9月11日(11. 09. 90) JP</p> <p>(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 KOGYO CO., LTD.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 藤井信孝(FUJII, Nobutaka) [JP/JP] 〒573 大阪府枚方市中宮北町10-13-504 Osaka, (JP) 山本直樹(YAMAMOTO, Naoki) [JP/JP] 〒150 東京都渋谷区恵比寿南3-11 原町住宅501 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AT(欧州特許), AU, BE(欧州特許), BF(OAPI特許), BG, BJ(OAPI特許), BR, CA, CF(OAPI特許), CG(OAPI特許), CH(欧州特許), CI(OAPI特許), CM(OAPI特許), CS, DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FI, FR(欧州特許), GA(OAPI特許), GB(欧州特許), GI(OAPI特許), GR(欧州特許), HU, IT(欧州特許), JP, KR, LU(欧州特許), ML(OAPI特許), MR(OAPI特許), NL(欧州特許), NO, PL, RO, SD, SE(欧州特許), SN(OAPI特許), SU, TD(OAPI特許), TG(OAPI特許), US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

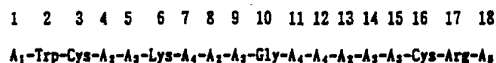
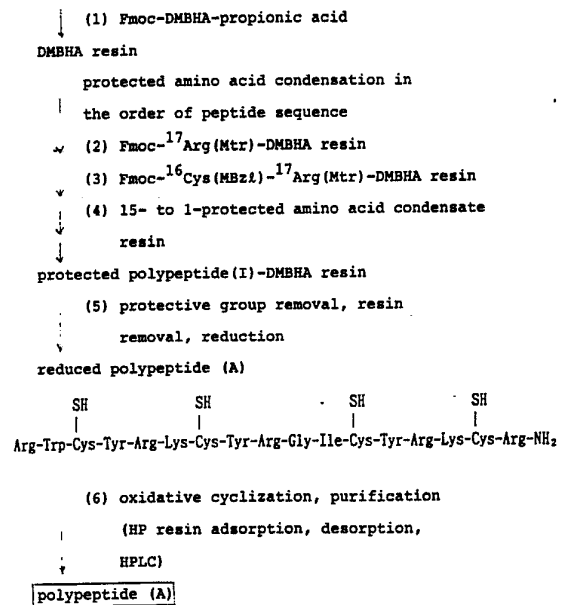
(54) Title : NOVEL POLYPEPTIDE AND ANTI-HIV DRUG PREPARED THEREFROM

(54) 発明の名称 新規ポリペプチドおよびこれを用いる抗HIV剤

アミノメチル樹脂



aminomethyl resin



(57) Abstract

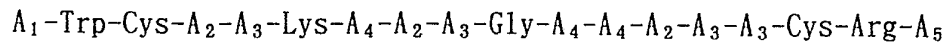
A novel polypeptide having an antiviral activity against human immunodeficiency virus (HIV), represented by the above formula (I), a pharmaceutically acceptable salt thereof, and an anti-HIV drug containing the same as the active ingredient.

+ SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソヴィエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

(57) 要約

下記式 (I)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



..... (I)

で表わされる新規ポリペプチドまたはその塩、およびこれを有効成分とする抗HIV剤。

本発明によれば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する抗ウイルス作用を有する新規ポリペプチド、その医薬として許容される塩、およびこれを有効成分とする抗HIV剤を提供できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU+	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

+SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソビエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

明 細 書

新規ポリペプチドおよびこれを用いる抗H I V剤

5 技術分野

本発明は新規ポリペプチドまたはその塩に関する。更に詳しくはリポ多糖類、殊にエンドトキシンに強い親和性を示し、改良された抗菌活性、抗ウイルス活性を有する新規ポリペプチド、その医薬として許容される塩、およびこれを有効成分とする抗H I V剤に関する。

10

背景技術

従来、下記文献に示されるように、中村、岩永、丹羽らによりカプトガニ由来のエンドトキシン親和性を示すポリペプチド（タキプレシン、ポリフェムシン）並びにこれらの薬学的性質が報告されている。

15 (i) J. Biol. Chem., 263, 16709~16713 (1988)

(ii) 公表特許公報 平2-500194

(iii) Chem. Pharm. Bull., 37, 2661~2664 (1989)

20 (iv) 特開平2-53799号公報

(v) 特開平2-152987号公報

(vi) 特開平2-16723号公報

(vii) J. Biochem., 106, 663~668 (1989)

(viii) 代謝、26, 301~311 (1989)

カブトガニ（Tachypleus属、Limulus属並びにCarcinoscopius属）から分離されたエンドキシン親和性のポリペプチドは、知られている限り、5種類の構造類縁体が存在し、そのいずれもが17または18個の天然アミノ酸からなる環構造を有するポリペプチドである。またこれらポリペプチドは、いずれも極めて類似した性質を示しており、このポリペプチドの存在は、カブトガニが生きた化石として太古より今日まで、外界の環境の変化に適応し、種の保存を可能とした鍵物質の1つとして興味深いことである。

一方、高度に分化したヒトの生存維持に関し、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の感染により引き起こされる後天性免疫不全症候群（AIDS）の発症に対し予防または治療効果の期待される薬剤が望まれている。

本発明者らは前記したカブトガニの強い種の保存性に係わると予測されるエンドトキシン親和性ポリペプチドに着目し、該物質の構造変換と抗ヒト免疫不全ウイルス（HIV）活性の相関につき研究した結果、カブトガニの既知エンドトキシン親和性ポリペプチドの共通構造と基本的に異なる新規ポリペプチドを見出し、驚くべきことに、この新規ポリペプチドはその抗HIV活性値が、既知エンドトキシン親和性ポリペプチドの値と比較して十倍以上の優れた効果を有することを確認した。

発明の開示

本発明は、かかる知見に基いて到達されたものであり、下記式（I）

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

A₁-Trp-Cys-A₂-A₃-Lys-A₄-A₂-A₃-Gly-A₄-A₄-A₂-A₃-A₃-Cys-Arg-A₅

..... (I)

[但し、式中

A₁は水素原子であるか或い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2個のアミノ酸残基を示し、

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は独立してアルギニンまたはリジン残基を示し、

A₄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、

A₅は-OH(カルボキシル基由来)または-NH₂(酸アミド基由来)
を示し、

Cysはシステイン残基を示し、

Glyはグリシン残基を示し、

Lysはリジン残基を示し、

Argはアルギニン残基を示し、

Trpはトリプトファン残基を示す；

ここで3位と16位のシステイン残基はジスルフィド結合(-S-S-)により連結していてもよく、また7位と12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(-S-S-)により連結していてもよい]

で表わされる新規ポリペプチドまたはその塩である。

この本発明の新規ポリペプチドは、前記カプトガニ由来の既知のポリペプチドにおいては、共通して6位のアミノ酸残基がバリン(Val)残基であるのに対し、その6位がバリン残基とは全く性質の異なる塩基性アミノ酸であるリジン(Lys)残基であることが基本的に重要な特徴で

ある。

以下さらに詳しく本発明の新規ポリペプチドまたはその塩について説明する。

本発明の新規ポリペプチドは、それ自体公知の方法、例えば固相合成法によって製造することができる。すなわちN-保護アルギニンのカルボキシル基を直接、或いは場合によりカルボキシル基と結合しうる官能基およびカルボキシル基を有するスペーサーを介して、アミノ基を有する不溶性樹脂に結合させて後、下記式 (I)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

10 A₁-Trp-Cys-A₂-A₃-Lys-A₄-A₂-A₃-Gly-A₄-A₄-A₂-A₃-A₃-Cys-Arg-A₅

..... (I)

[式中A₁、A₂、A₃、A₄、Cys、Gly、Lys、ArgおよびTrpの定義は前記式 (I) と同じ]

で示されるアミノ酸配列の16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、次いで不溶性樹脂およびアミノ酸の保護基を脱離させて、直鎖状の前記式 (I) の本発明のポリペプチドを得ることができる。この場合17位のアミノ酸残基のカルボキシル末端はフリー (A₅が-OHに相当) であることもできるし、あるいは酸アミド

(A₅が-NH₂に相当) に変換することもできる。さらに得られたポリペプチドは、その3位と16位の2つのシステインは、メルカプト基を介してジスルフィド結合 (-S-S-) を形成することができる。

また7位と12位が共にシステイン残基である場合には、これらのシステインは同様にジスルフィド結合を形成することができる。

これらのジスルフィド結合の形成は、例えば、空気酸化により2対と

も、又はAtherton, E.,ら; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1985, 2065の方法に準じ、あらかじめ3位と16位、7位と12位のいずれかの対のシステインのメルカプト基をt-BuS (t-ブチルチオ)、Acm (アセタミドメチル) の保護基で選択的に保護し、t-BuSの脱保護、部分酸化、次いでAcmを公知の方法に準じて脱保護するステップを経て、いずれか一对のジスルフィド結合を形成することができる。

前記固相合成法に使用される各アミノ酸は共通してL体であることもできるし、また共通してD体であることもできる。

本発明の新規ポリペプチドを合成する場合に使用される前記のアミノ基を有する不溶性樹脂としては、そのアミノ基を介してC末端のN-保護アルギニンのカルボキシル基又は場合によりこれに結合しているスペーサーのカルボキシル基と結合可能であり、かつ、その後脱離可能なものであれば如何なるものでもよい。

かかる不溶性樹脂としては、例えば、アミノメチル樹脂 (アミノメチル化スチレン-ジビニルベンゼン共重合体)、ベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチルフエノキシメチル樹脂及びこれらの誘導体等が挙げられる。ベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドリルアミン樹脂、ジメトキシベンズヒドリルアミン (DMBHA) 樹脂、アミノメチルフエノキシメチル樹脂を用いれば開裂によって直接アミドを与えるが、収率の点からはアミノメチル樹脂が好ましい。

前述のカルボキシル基と結合しうる官能基およびカルボキシル基を有するスペーサーとしては、例えばアルギニンのカルボキシル基をp-カルボキシメチルベンジルエステルに変換しうるものが挙げられるが特に

制限はない。

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。

本発明のポリペプチドを合成する場合には、以下に示す保護基のいずれかを選択するのが好ましい。まず、アミノ酸の α -アミノ基の保護基はBoc (t-ブチルオキシカルボニル) 又はFmoc (9-フルオレノルメチルオキシカルボニル) である。アルギニン (Arg) のグアニジノ基の保護基は、Tos (トシル)、NO₂ (ニトロ)、Mtr (4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル) 又はPmc (2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル) である。システイン (Cys) のメルカプト基の保護基としてはBzl (ベンジル)、MBzl (4-メトキシベンジル)、4-MeBzl (4-メチルベンジル)、Acm (アセタミドメチル)、Trt (トリチル)、Npys (3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル)、t-Bu (t-ブチル)、t-BuS (t-ブチルチオ) が挙げられるが、MBzl、4-MeBzl、Trt、Acm、Npysが好ましい。チロシン (Tyr) の水酸基の保護基は、Bzl、Cl₂·Bzl (2,6-ジクロロベンジル)、t-Buであるか、あるいは保護しなくてもよい。リジン (Lys) の ϵ -アミノ基の保護基は、Z (ベンジルオキシカルボニル)、Cl·Z (2-クロロベンジルオキシカルボニル)、Boc、Npysである。各保護基は、ペプチドの合成条件に応じ適当なもの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、通常縮合法、例えば、DCC (ジクロヘキシルカルボジイミド) 法、DIPCDI (ジイソプロピルカルボジイミド) 法 [Tartar, A.ら; J. Org. Chem., 44, 5000 (19

79)]、活性エステル法、混合あるいは対称酸無水物法、カルボニルジイミダゾール法、DCC-HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) 法 [Keonig, W.ら; Chem. Ber., 103, 788, 2024, 2034 (1970)]、ジフェニルホスホリルアジド法等に従って
5 行なうことができるが、DCC法、DCC-HOBt法、DIPCDI-HOBt法、対称酸無水物法が好ましい。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等の有機溶媒又はそれらの混合溶媒中で行なわれる。 α -アミノ基の保護基の脱離試薬としては、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/ジ
10 メチルホルムアミド等が用いられ、該保護基の種類により適宜選択する。また、合成の各段階における縮合反応の進行の程度はE. カイサーらの方法 [Anal. Biochem., 34, 595 (1970)] (ニンヒドリン反応法) によって検査される。

15 以上のようにして、所望のアミノ酸配列を有する保護ペプチド樹脂を得ることができる。

不溶性樹脂としてアミノメチル樹脂誘導体を用いた場合には、例えば適当な溶媒中においてアンモニアで処理することにより該樹脂を脱離させることができる。次いで、フッ化水素で処理することにより、前記式で示される、全ての保護基が脱離したポリペプチドアミドが得られる。

20 不溶性樹脂としてベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチルフェノキシメチル樹脂、DMBHA樹脂 [Funakoshi, S.ら; J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1988, 382] を用いた場合には、フッ化水素、TFMSA (トリフルオロメタンスルホン酸) [Academic Press発行、E. Gross編集、Yajima, H.

ら；“The Peptides” vol5、p65（1983）]、TMSOTf
（トリメチルシリルトリフラート）[Fujii, N.ら；J. Chem. Soc.,
Chem. Commun., 1987、274] またはTMSBr（トリメチルシ
リルブロミド）[Fujii、Nら；Chem. Pharm. Bull., 35, 38
5 80（1987）]などで処理することにより、該樹脂および保護基を
同時に脱離させることができる。

次いで、所望により、2-メルカプトエタノール、DTT（ジチオス
ライトール）などで還元することによりシステインのメルカプト基が還
元型となっていることを确实ならしめた後、酸化処理することにより本
10 発明に属する環状ポリペプチドを得ることができる。

この際の酸化処理は、公知の方法を用いることができ、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。

かくして得られたポリペプチドは、ポリペプチドのそれ自体知られた
15 手段、例えば、抽出、再結晶、各種クロマトグラフィー（ゲルろ過、イ
オン交換、分配、吸着、逆相）、電気泳動、向流分配等により単離精製
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。

本発明の前記式（I）で示されるポリペプチドの具体例としては、下
20 記式（1）～（22）のものを挙げることができる。

下記式（1）～（22）のポリペプチド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を示す。すなわち各記号は下記ア
ミノ酸の残基を示す。

A r g : 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

5 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

10 Met : メチオニン

Val : バリン

Ala : アラニン

15

20

- (1) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (2) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (3) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (4) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Met-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (5) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (6) Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (7) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (8) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (9) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (10) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Val-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (11) Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH₂
- (12) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH₂
- (13) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH₂
- (14) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ser-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH₂
- (15) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ala-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH₂
- (16) Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Typ-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (17) Arg-Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Typ-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (18) Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Phe-Lys-Lys-Gly-Ser-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (19) Arg-Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Phe-Lys-Lys-Gly-Ser-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (20) Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Ala-Tyr-Lys-Gly-Leu-Ala-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (21) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Ala-Tyr-Lys-Gly-Val-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂
- (22) Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Ser-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH₂

このようにして得られる本発明の、前記式 (I) で示されるポリペプチドは、カプトガニ由来の既知のポリペプチドと同様に、エンドトキシン結合能、抗菌活性、エンドトキシン感作血球溶血性、抗ウイルス活性を有しているが、殊にヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対して良好な抗ウイルス活性を呈し、その作用の程度は既知のポリペプチドの 1 種であるタキプレシン I に比べて 10 倍以上、高いものでは数千倍の高活性をしめす。

カプトガニ由来の既知のポリペプチドにおいては、その構造的特徴として、3、7、12、16 位に 4 個の C y s が存在することにより、9 位 10 位の部分が β ターンにより折り返し部位とする 3 位ないし 8 位までのペプチド部分と 11 位ないし 16 位までのペプチド部分が対位する β -シート構造をとり、3 位と 16 位、7 位と 12 位の 4 個の C y s がそれぞれ 2 対のジスルフィド結合 (-S-S-) により連結することが明確となっているが、本発明の化合物である 6 位 L y s 変換ポリペプチドの抗ウイルス活性発現のための構造的特徴は、³C y s ⁴A₂⁵A₃⁶L y s に対位する ¹³A₂¹⁴A₃¹⁵A₃¹⁶C y s のごとく、構成アミノ酸配列が極めて類似する構造部分の存在が活性発現に基本的に必要であり、²T r p、¹⁷A r g は不可欠である。この構造部分にさらに 1 位に A₁ に規定する塩基性アミノ酸が付加するに伴い、抗 H I V 活性が飛躍的に高く発現する構造となることが特徴づけられる。

本発明の、前記式 (I) で示されるポリペプチドは、構成するアミノ酸の特徴から塩基性を示す故に酸付加により塩を形成する。たとえば無機酸 (塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸など) または有機カルボン酸 (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)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)との塩を形成する。本発明の前記式(I)で示されるポリペプチドは、これらの医薬として許容しうる塩として用いることができる。

5 本発明による薬剤は、有効成分として、前記式(I)で示されるポリペプチドまたはその塩と、薬剤の投与方法および投与形態に応じて選択された薬学的に許容されうる担体とからなる医薬組成物として調製される。すなわち、本発明の薬剤は、生体内部ウイルス疾患あるいは、生体外
10 外部ウイルス感染部の治療又は消毒対象に応じて、経口的にある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、粉末、顆粒、注射用もしくは内服用液剤、錠剤、座剤、ペツサリー、軟膏、クリーム、エアゾールなどの製剤として調製することができる。

本発明の薬剤を、注射剤として直接、生体に投与する場合には、本発明のポリペプチドまたはその塩を、ヒト体重Kg/1日あたり10mgな
15 いし5000mgあて生理食塩液に溶解し点滴静注により連続的又は間欠的に投与することができる。

図面の簡単な説明

20 図面は、本発明の新規ポリペプチドを合成するための工程概略図の1例を示すものである。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例を掲げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定を受けるものではない。

なお以下の実施例において、使用された装置および試薬は、下記のとおりである。

HPLC装置：ウオーターズ社（米国）600型

同装置のカラム：アサヒパックODP-90（アサヒケミカル工業）

5 Fmocアミノ酸：国産化学製

アミノ樹脂および縮合剤：（株）ペプチド研究所製

FAB-MS（FAB-質量分析機）：VG社（米国）、ZAB-SE型

実施例 1

下記式のポリペプチド（A）の合成

10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-
15 15 16 17 18
Lys-Cys-Arg-NH₂ (A)

15 上記式（A）中、Arg、Trp、Cys、Tyr、Lys、GlyおよびIleは前記したアミノ酸残基を示し、3, 16位および7, 12位のCys間はジスルフィド結合で連結している。

（1）アミノメチル樹脂へのFmoc-DMBHA-CH₂CH₂COOH

[(3-(α-Fmoc-アミノ-4-メトキシベンジル)-4-メトキシフェニル)プロピオン酸]の導入；

20 アミノメチル樹脂（0.74 meq/g）270 mg（0.2 mmole）とFmoc-DMBHA-CH₂CH₂COOH（MW537）268.5 mg（0.5 mmole、2.5 eq）を固相合成用カラムに入れGuo, L.らの方法 [Chem. Pharm. Bull., 36, 4989（1988）] に従いDMF中DIPCDI-HOBt法により2時間縮合反応を行った。

縮合反応終了後、フリーのアミノ基を保護するための無水酢酸を用いてカップリングを行った（DMBHA樹脂）。

(2) DMBHA樹脂への17位アルギニンの導入；

(1) で調製したDMBHA樹脂のFmoc基を20%ピペリジン/DMFで除去後、DMBHA樹脂に対しFmoc-Arg(Mtr)-OHの2.5 eqを加えDMF中、DIPCDI-HOBt法によって縮合反応を行った。

縮合反応の進行の程度はKaiser, E. ら [Anal. Biochem., 34, 595 (1970)] のニンヒドリンの試験により測定して行った。

(3) 16位システインの導入；

(2) で調製したアルギニン導入DMBHA樹脂のFmoc基を20%ピペリジン/DMFで除去後DMBHA樹脂に対しFmoc-Cys(MBzl)-OHの2.5 eqを加え、DMF中DIPCDI-HOBt法によって縮合反応を行った。縮合反応の進行の程度は(2)と同様にニンヒドリン試験により測定して行った。

(4) 15位～1位のアミノ酸の導入；

以下同様にしてC端アミノ酸からの配列に従い順次Lys(Boc)、Arg(Mtr)、Tyr(t-Bu)、Cys(MBzl)、Ile、Gly、Arg(Mtr)、Tyr(t-Bu)、Cys(MBzl)、Lys(Boc)、Arg(Mtr)、Tyr(t-Bu)、Cys(MBzl)、Trp、Arg(Mtr)残基をDMBHA樹脂に導入して保護基保護化ペプチド(A)-樹脂を得た。

なお、固相合成に於ける各アミノ酸縮合反応は次表の操作条件に従って行った。

表 1

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

(5) 脱保護基並びに脱樹脂操作と部分精製によるペプチド(A)の調製；

前記(1)～(4)の操作を経て調製した保護基保護化ペプチド(A)樹脂は、20%ピペリジン/DMF処理によりFmoc基を除去し、次いで該樹脂100mg当り1M TMSOTf-チオアニソール/TFA系(メクレゾール(100eq)、エタンジチオール(300eq)の存在するトリフルオロ酢酸10ml)で25℃、2時間反応させた。反応混合液から樹脂を濾別し、トリフルオロ酢酸1mlにて2回洗浄し、濾液、洗液を合せたものに氷冷乾燥エーテル100mlを加え、生じた沈殿物を遠心し、残渣をデカンテーションにより上清から分離した。得られた残渣を、冷エーテルで洗浄後、4N AcOH 10mlに溶解し830mg、80eqのジチオスライトールを加え、室温で一夜攪拌した。

反応液を遠心し、上清をSephadex G-10(3.7×50cm)で処理し、4N AcOHでゲル濾過し、素通り画分である主溶出部分を集

め、凍結乾燥して粉末状の部分精製未環化ポリペプチド (A) を得た。

(6) 空気酸化によるポリペプチド (A) の調製；

一方、Sephadexゲル濾過素通り画分の1/2量を濃アンモニア水にてpH 7.5に調整し、通気により空気酸化を行い環化反応を行った。

5 空気酸化終了後環化ペプチド (A) をダイアイオンHP-20樹脂10gに吸着せしめ、次いで60%CH₃CN (in 1N AcOH) を用いて脱着溶出し、該溶出液を室温下減圧濃縮してCH₃CNを除去し、さらに凍結乾燥により粉末化した。該粉末を少量の水に溶解し、その溶液をアサヒパックODP-90カラムにかけ、CH₃CNのグラディエント
10 溶出による高速液体クロマトグラフィー (ウオーターズ社製HPLC-600型) で精製し単一ピークのペプチド (A) を27%の収率 (保護基保護化ペプチド (A) 樹脂から計算した値) で得た。

(7) ポリペプチドの分析；

前記 (6) で精製されたポリペプチドのロイシンアミノペプチダーゼ
15 消化によるアミノ酸組成値は、前記式 (A) のアミノ酸配列による組成の計算値とよく一致した。

またFAB-MSによる分子量値は (M+H⁺) の計算値2309.786に対し実測値は2310.048であった。

得られたポリペプチドの比旋光度 [α]_D は+14.2° (C=0.3、
20 1N酢酸) であった。

実施例2および比較例1、2

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する抗ウイルス作用

実施例1により合成したポリペプチド (A) のHIVに対する抗ウイルス作用を以下の方法に従い試験し判定した。

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/穴(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°Cで5日間培養した後、生存細胞数をMTT法[Pauwelsら; J. Virol. Methods, 20, 309~321(1988)]で測定する。抗ウイルス活性は、HIV感染による細胞障害を50%抑制する濃度(EC50:50%effective concentration)で表わす。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と同様に、種々の濃度の試験物質と共に培養を行う。細胞毒性は試験物質による50%細胞障害濃度(CC50:50% cytotoxic concentration)で表わす。また、CC50とEC50の概略比(CC50/EC50)を有効率(SI)として表わした。

ポリペプチド(A)および比較のために用いた既存のエンドトキシン親和性ポリペプチドであるタキプレシンIおよび抗HIV剤であるアジドチミジンのEC50、CC50およびSIの値を表2に示す。

表2

	試験薬剤	CC50 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	SI
実施例1	ポリペプチド(A)	39	0.35	110
比較例1	タキプレシンI	49	18.1	3
比較例2	アジドチミジン(AZT)	0.80	0.00048	1700

上記表から明らかなように先に抗HIV作用が明らかとなつているタキプレシンIに比べて本発明のポリペプチド(A)は細胞毒性が若干強

いものの1/50の濃度で抗ウイルス作用を示した。アジドチミジンに比べるとEC50は高濃度であるもののCC50は60倍であり、細胞毒性は低い。

実施例3

5 実施例1に準じて調製して得た本発明のポリペプチド各種の構造式、物性及び実施例2に準じて試験し判定したHIVに対する抗ウイルス作用を表3に示す。

但し、上記表中の本実施例の化合物は、特に表示しない限り3、7、12、16位のCysは、3/16位、7/12位間でジスルフィド結合により連結していることを示す。

また、上記表中“AZT”はアジドチミジン（一般名ジドブジン）を示す。

産業上の利用可能性

15 本発明によれば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する抗ウイルス作用を有する新規ポリペプチドまたはその塩、およびこれを有効成分とする抗HIV剤を提供できる。

表3

記号	化合物	物性 $[\alpha]_D^{20\sim22}$	抗HIV作用	
			CC ₅₀	EC ₅₀ SI
(1)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+14.2° (C=0.3 1N AcOH)	207	6.9 30
(A)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	-9.0° (C=0.1 1N AcOH)	44.6	0.039 1144
(3)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+10.8° (C=0.1 1N AcOH)	49.5	0.009 5500
(7)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+3.8° (C=0.1 1N AcOH)	46.0	0.13 354
(8)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+25.8° (C=0.2 1N AcOH)	43.4	0.0023 18870
(12)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+5.4° (C=0.06 1N AcOH)	50.7	0.39 130
(13)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂		48.0	0.007 6860
(16)	Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂		46.6	0.18 259
(18)	Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Phe-Lys-Gly-Ser-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Arg-NH ₂		43.0	0.36 119
(3H)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂		52.0	0.01 5200
比較 例	AZT		6.8	0.00048 14200

(3H)は(3)の還元型

請求の範囲

(1) 下記式 (I)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

5 A_1 -Trp-Cys- A_2 - A_3 -Lys- A_4 - A_2 - A_3 -Gly- A_4 - A_4 - A_2 - A_3 - A_3 -Cys-Arg- A_5

..... (I)

[但し、式中

A_1 は水素原子であるか或い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2個のアミノ酸残基を示し、

10 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 は独立してアルギニンまたはリジン残基を示し、

A_4 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、

15 A_5 は-OH (カルボキシル基由来) または-NH₂ (酸アミド基由来)
を示し、

Cysはシステイン残基を示し、

Glyはグリシン残基を示し、

Lysはリジン残基を示し、

20 Argはアルギニン残基を示し、

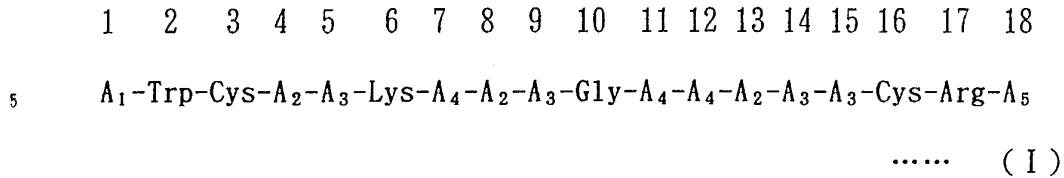
Trpはトリプトファン残基を示す；

ここで、3位と16位のシステイン残基はジスルフィド結合(-S-S-)により連結していてもよく、また7位と12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(-S-S-)により連結して

いてもよい]

で表わされる新規ポリペプチドまたはその塩。

(2) 下記式 (I)



[但し、式中

A_1 は水素原子であるか或い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2個のアミノ酸残基を示し、

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 は独立してアルギニンまたはリジン残基を示し、

A_4 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_5 は $-\text{OH}$ (カルボキシル基由来) または $-\text{NH}_2$ (酸アミド基由来)
を示し、

Cys はシステイン残基を示し、

Gly はグリシン残基を示し、

Lys はリジン残基を示し、

Arg はアルギニン残基を示し、

Trp はトリプトファン残基を示す；

ここで、3位と16位のシステイン残基はジスルフィド結合 ($-\text{S}-\text{S}-$)
により連結していてもよく、また7位と12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 ($-\text{S}-\text{S}-$) により連

結していてもよい]

で表わされる新規ポリペプチドまたはその医薬として許容される塩を有効成分として含有する抗H I V剤。

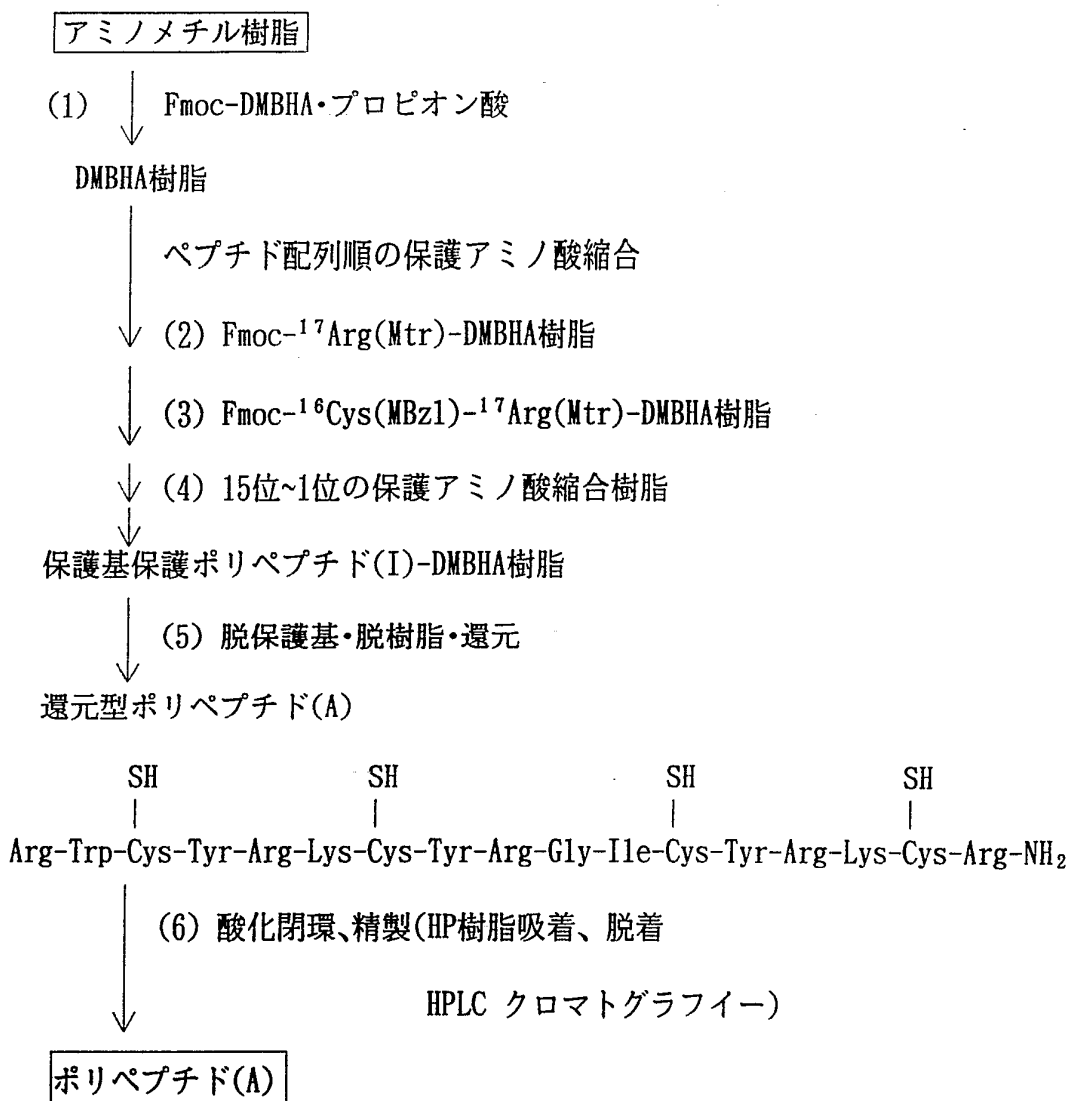
5

10

15

20

1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01201

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C07K7/08, A61K37/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K7/00, A61K37/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 02-167230 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.), June 27, 1990 (27. 06. 90), Pages 2 to 4 (Family: none)	1-2
A	JP, A, 02-500194 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.), January 25, 1990 (25. 01. 90), Pages 2 to 3 & WO, A, 89/1492 & EP, A, 343248	1-2
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
November 16, 1991 (16. 11. 91)	December 9, 1991 (09. 12. 91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 91 / 01201

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl.⁸ C07K7/08, A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K7/00, A61K37/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリ ※	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	請求の範囲の番号
A	JP, A, 02-167230 (生化学工業株式会社), 27. 6月. 1990 (27. 06. 90), 第2頁-第4頁 (ファミリーなし)	1-2
A	JP, A, 02-500194 (生化学工業株式会社), 25. 1月. 1990 (25. 01. 90), 第2頁-第3頁 &WO, A, 89/1492 & EP, A, 343248	1-2
<p>※引用文献のカテゴリ</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「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</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の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の文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	16. 11. 91	国際調査報告の発送日 09. 12. 91
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 前田 憲彦 ④	4 H 8 3 1 8