

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成19年2月22日(2007.2.22)

【公表番号】特表2003-526614(P2003-526614A)

【公表日】平成15年9月9日(2003.9.9)

【出願番号】特願2000-598508(P2000-598508)

【国際特許分類】

**C 0 7 F 9/09 (2006.01)**

**A 6 1 K 31/661 (2006.01)**

**A 6 1 P 35/00 (2006.01)**

**C 0 7 F 9/12 (2006.01)**

【F I】

C 0 7 F 9/09 U

A 6 1 K 31/661

A 6 1 P 35/00

C 0 7 F 9/12

【手続補正書】

【提出日】平成18年12月25日(2006.12.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

胎児性タンパク質(AFP)は、N-アラキドノイルアミノエチルホスフェート(N-AAP)と結合して可逆的平衡複合体を形成する。このタンパク質は、N-AAPを分子300まで含有するミセルと可逆的に結合する(同じ本発明者による国際出願 PCT/EP99/04201参照)。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

2-シアノエチル・ホスフェートのバリウム塩をピリジン塩に、Dowex-50 樹脂カラムを通して変換した(ピリジン体)。溶出液を蒸発し、乾燥ピリジンの追加部分の蒸発を繰り返して塩を乾燥した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

実施例10：N-(シス-5,8,11,14-エイコサテトラエノイル)-0-ホスホ-L-チロシン(N-アラキドノイル-0-ホスホ-L-チロシン)(8)の合成

アラキドン酸(152 mg, 0.5 mmol)およびトリエチルアミン(52 mg, 0.51 mmol)を3 mlの乾燥アセトニトリルに溶解し、-15℃に冷やし、70 mg(0.51 mmol)のブチルクロロホルメートを加えた。30分後に、沈澱したトリエチルアミン塩酸塩を除いた混合物をチロシンメチルエステル塩酸塩(232 mg, 1 mmol)およびトリエチルアミン(0.14ml)のメタ

ノール液 1 ml にピペットで移し、15 分間 -15 で攪拌し、得た混合物を室温で温めた。2 時間後、0.5 M HCl を加え、混合物をエーテル (20 ml) で抽出した。抽出物を水で洗い、次いで Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、減圧で蒸発した。残渣を 2 ml のクロロホルムに溶解し、カラム (2x 2 cm) クロマトグラフィーで酸化アルミニウム上 (塩基性, Brockmann II) で精製した。カラムをクロロホルム-メタノール (9:1 v/v) で溶出し、適当なフラクションを蒸発すると、222 mg (95) の所望の N-アラキドノイル-L-チロシンメチルエステルを油状で得た。TLC (A系) R<sub>f</sub> 0.6。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 5】

注射 5 日後の AFC 相対量は、対照群で  $406.4 \pm 16.8$ 、化合物 4 の  $45.5 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で  $405.0 \pm 47.9$ 、 $p > 0.05$ 、化合物 4 の  $91 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で  $692.9 \pm 44.8$ 、 $p < 0.001$ 、化合物 4 の  $136.5 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で  $1354.3 \pm 99.9$ 、 $p < 0.001$ であった。全 AFC 量は、対照群で  $(60.4 \pm 3.9) \cdot 10^3$ 、化合物 4 の  $45.5 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で  $(55.0 \pm 6.7) \cdot 10^3$ 、 $p > 0.05$ 、化合物 4 の  $91 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で  $(87.6 \pm 4.3) \cdot 10^3$ 、 $p < 0.001$ 、化合物 4 の  $136.5 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で  $(138.9 \pm 10.0) \cdot 10^3$ 、 $p < 0.001$ であった。さらに、化合物 4 の  $136.5 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  で免疫マウスの血清において赤血球凝集力価の有意の増加があり、対照群では  $6.2 \pm 0.3$  なのに対し、化合物 4 の  $136.5 \mu\text{g}/\text{マウスの試験群}$  では  $7.5 \pm 0.2$ 、 $p < 0.01$ であった (表 6)。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 6】

実施例 3 2 : 化合物 1a の液素性免疫応答に対する作用

0.15 ml の化合物 1a を C57Bl/6 系の雌マウス 6 匹 (体重 18-22 g) に、用量による各試験群のために 1 匹につき用量 45.5、91、136.5  $\mu\text{g}$  で静脈投与した。同時に  $5 \cdot 10^7$  のヒツジ赤血球の懸濁液を腹腔内投与した (1 匹につき 0.2 ml)。対照群のマウスに同量の塩類液を静脈投与した。液素性免疫に対する化合物 1a の作用を、Cunningham による脾臓中の AFC 量の計量 ( $10^6$  脾臓細胞につき、および脾臓につき) および血清中の赤血球凝集抗体力価の検定の両方により分析した。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 4 1】

化合物 17 の免疫原活性は用量依存性である。化合物 17 は、用量 45.5  $\mu\text{g}$ /および 91  $\mu\text{g}/\text{マウス}$  で免疫原活性を示さないが、同時に化合物 17 は、用量 136.5  $\mu\text{g}/\text{マウス}$  でかなりの免疫促進作用を示す。そして、化合物 17 の注射 5 日後で、AFC の相対量の 3 1 の増加および全 AFC 量の 30 の増加が、ヒツジ赤血球のみで免疫したマウスの細胞量に比して見られた。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 6 1

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0161】

注射 5 日後の AFC 相対量は、対照群で  $622.3 \pm 19.1$ 、AFP 試験群で  $573.3 \pm 63.6$ 、 $p > 0.05$ 、化合物 14 試験群で  $645.8 \pm 64.4$ 、 $p > 0.05$ 、複合体試験群で  $967.3 \pm 44.7$ 、 $p < 0.05$ であった。全 AFC 量は、対照群で  $(71.9 \pm 12.0) \cdot 10^3$ 、AFP 試験群で  $(69.8 \pm 14.2) \cdot 10^3$ 、 $p > 0.05$ 、化合物 14 のみの試験群で  $(80.8 \pm 12.7) \cdot 10^3$ 、 $p > 0.05$ 、複合体試験群で  $(110.1 \pm 9.7) \cdot 10^3$ 、 $p < 0.05$ であった。

## 【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0169】

実施例 44：ラット AFP / 化合物 1 複合体 (1:100) の液素性免疫応答に対する作用

0.15 ml の AFP / 化合物 1 複合体を C57Bl/6 系の雌マウス 6 匹 (体重 18-22 g) に、1 匹につき用量、9  $\mu\text{g}$  の AFP および 91  $\mu\text{g}$  の化合物 1 で、静脈投与した。化合物 1 群では、45.5  $\mu\text{g}$  の化合物 1 のみを静注した。AFP 群では、9  $\mu\text{g}$  の AFP のみを静注した。対照群のマウスに同量の塩類液を静脈投与した。液素性免疫に対する複合体 AFP / 化合物 1 の作用を、Cunningham による脾臓中の AFC 量の計量 ( $10^6$  脾臓細胞につき、および脾臓につき) で分析した。