

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4703181号

(P4703181)

(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18日 (2011. 3. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/52 (2006. 01)

C O 7 K 14/52 Z N A

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/12 (2006. 01)

A 6 1 P 31/12

請求項の数 17 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-510444 (P2004-510444)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月28日 (2003. 5. 28)
 (65) 公表番号 特表2005-528451 (P2005-528451A)
 (43) 公表日 平成17年9月22日 (2005. 9. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2003/001613
 (87) 国際公開番号 W02003/102207
 (87) 国際公開日 平成15年12月11日 (2003. 12. 11)
 審査請求日 平成18年4月28日 (2006. 4. 28)
 (31) 優先権主張番号 02/06631
 (32) 優先日 平成14年5月30日 (2002. 5. 30)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 595040744
 サントル・ナショナル・ドウ・ラ・ルシェ
 ルシュ・シャンティフィク
 CENTRE NATIONAL DE
 LA RECHERCHE SCIENT
 IFIQUE
 フランス国、75794 パリ・セデック
 ス 16、リュ・ミシェル・アンジュ 3
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100141357
 弁理士 鈴木 音哉
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄

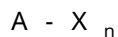
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な多量体分子、その製造方法及び医薬の製造のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多量体分子であって、該多量体分子が、下記の一般式

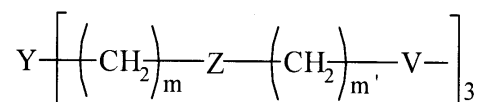


〔式中、

- n は 3 に等しく、

- A は下記一般式：

【化 1】



10

〔式中、

* m 及び m' は 1 ~ 5 の整数であり、

* V は X とアミド結合を形成する - NH - 又は - CO - 基を表し、

* Z は酸素原子又は CH₂ 基を表し、

* Y は窒素原子又は R - C - 基又は R - CONH - C - 基を表し、ここで R は 1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキル基、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルケニル基、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキニル基、5 ~ 12 個の炭素原子を有するアリール基、5 ~ 14 個の炭素原子を有するアラルキル基又は 1 ~ 10 個の炭素原子を有するヘテロアリー

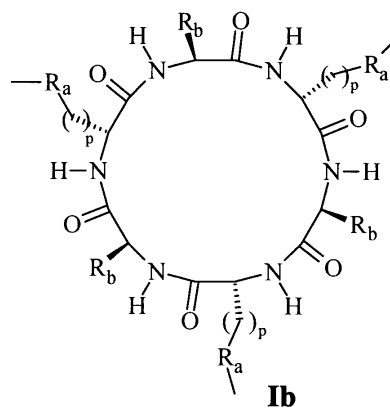
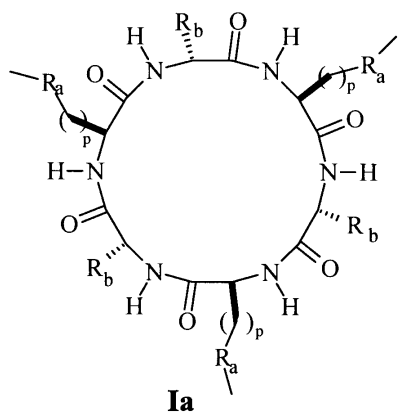
20

ル基であることができ、これらの基は置換されていなくてもよく又は -COOH、-NH₂、-CONH₂ 又はアルコキシ基から選ばれる 1～6 個の置換基により置換されていてもよい]

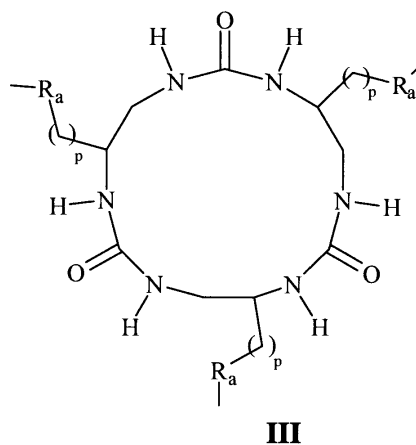
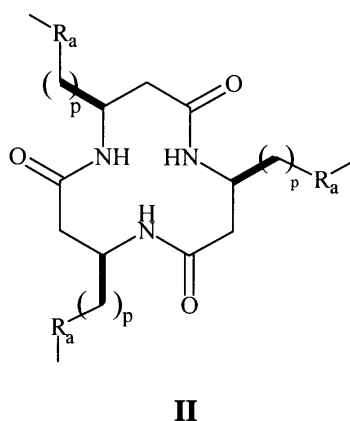
を有する C₃ 対称性を有する分岐状基であるか、

又は、A は下記一般式：

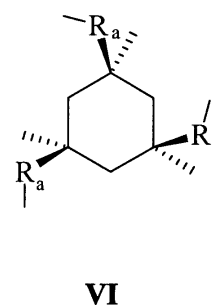
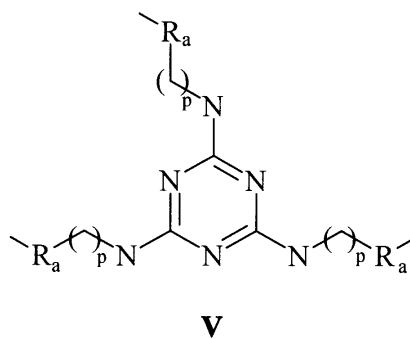
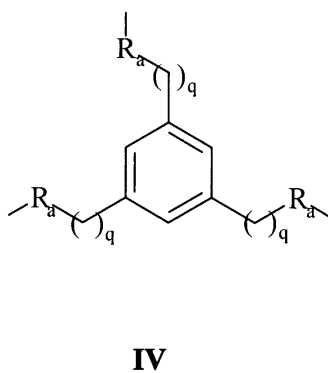
【化 2】



10

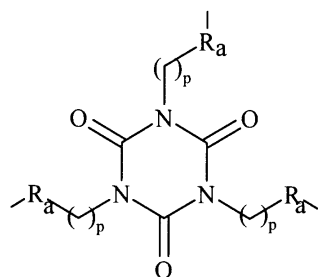
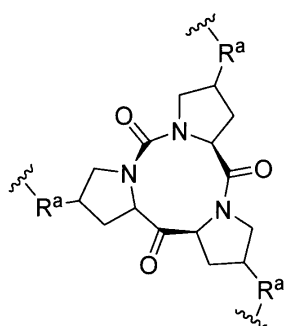
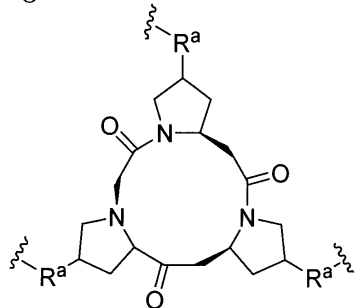
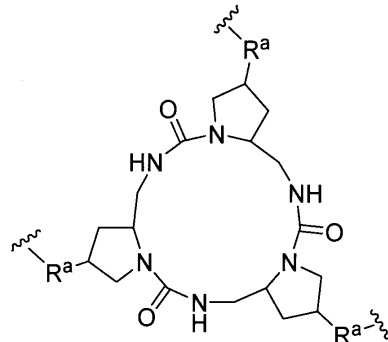


20



30

40

**VIa****VIb****VIc****VIId**

10

〔式中、

* RaはXとアミド結合を形成する - NH - 基又は - CO - 基のいずれかを表し、

* Rbはタンパク原性アミノ酸の側鎖を表し、

* pは1～4の整数であり、

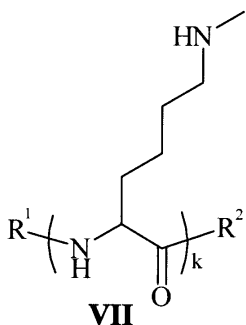
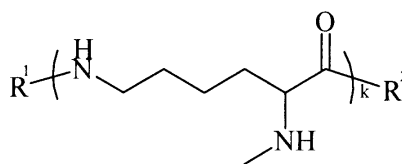
* qは0～4の整数である〕

の1つに相当する環状C₃基であるか、

又は、Aは下記一般式：

【化3】

20

**VII****VIII**

30

〔式中、

* kは3を表し、

* R¹は水素原子又はタンパク原性アミノ酸から選ばれるアミノ酸残基又はRCO - 、
ROCO - もしくはRNHCO - 基のいずれかを表し、ここでRは上記したとおりであり、

40

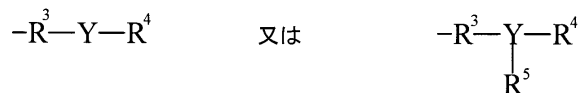
* R²は - NH₂ 基又は - NHR 基又はタンパク原性アミノ酸から選ばれるアミノ酸残基のいずれかを表し、Rは上記したとおりである〕

に相当する非対称性分岐状基であり、

- Xは - D、 - B - D 又は - B(D) - D' 基であり、ここで、

* Bは下記一般式：

【化 4】



〔式中、

* Y は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル鎖又はアルキニル、又はアルケニル又はアリール又はアラ
ルキル又はヘテロアリール基を表し、

* R^3 は、V もしくは R a が -CO- 基であるときは -NH- 基を表し又は V もしくは
R a が -NH- 基であるときは -CO- 基を表し、

* R^4 及び R^5 は互いに独立に -CO- 基又は -NH- 基を表す〕
の 1 つに相当し、

* -D 及び -D' はヒト又はネズミ CD40 受容体のリガンド (CD40L) 由来のペ
プチドを表し、該ペプチドは CD40L の一次配列に属しそしてそのアミノ酸の数は 3 ~
10 であり、該ペプチドはリガンド受容体との界面を形成する残基から選ばれるリガンド
由来の配列に相当し、該配列は該受容体と相互作用することができる〕
に相当することを特徴とする多量体分子。

【請求項 2】

ヒト又はネズミ CD40 受容体のリガンド (CD40L) 由来のペプチドが、下記の：

Lys^{1 4 3} - Gly - Tyr^{1 4 5}、Tyr^{1 4 5} - Gly - Lys^{1 4 3}、

Lys^{1 4 3} - Gly - Tyr - Tyr^{1 4 6}、

Tyr^{1 4 6} - Tyr - Gly - Lys^{1 4 3}、

Lys - Pro - Arg、H - Lys - Ψ (CH₂NH) Pro - Arg、

Arg^{2 0 0} - Phe - Glu - Arg - Ile - Leu - Leu - Arg^{2 0 7}、

Arg^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg - Glu - Phe - Arg^{2 0 0}、

Arg^{2 0 0} - Phe - Glu - Arg - Ile^{2 0 4}、

Ile^{2 0 4} - Arg - Glu - Phe - Arg^{2 0 0}、

Arg^{2 0 3} - Ile - Leu - Leu - Arg^{2 0 7}、

Arg^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg^{2 0 3}、

Cys^{2 1 8} - Gly - Gln - Gln - Ser - Ile^{2 2 3}、

Ile^{2 2 3} - Ser - Gln - Gln - Gly - Cys^{2 1 8}、

Gly^{2 0 0} - Ser - Glu - Arg - Ile - Leu - Leu - Lys^{2 0 7}、

Lys^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg - Glu - Ser - Gly^{2 0 0}、

Gly^{2 0 0} - Ser - Glu - Arg - Ile^{2 0 4}、

Ile^{2 0 4} - Arg - Glu - Ser - Gly^{2 0 0}、

Arg^{2 0 3} - Ile - Leu - Leu - Lys^{2 0 7}、

Lys^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg^{2 0 3}、

Cys^{2 1 8} - Glu - Gln - Gln - Ser - Val^{2 2 3}、

Val^{2 2 3} - Ser - Gln - Gln - Glu - Cys^{2 1 8}

又は上記した配列の 2 つの少なくとも 2 つの連続したアミノ酸により構成されるハイブ
リッドペプチド、

から選ばれ、これらのアミノ酸は同等に L 又は D 配置であることができる、
ことを特徴とする請求項 1 に記載の分子。

【請求項 3】

ハイブリッドペプチドが配列 Arg^{2 0 3} - Ile^{2 0 4} - Tyr^{1 4 5} - Tyr^{1 4}
⁶ 又は Arg^{2 0 3} - Ile^{2 0 4} - Tyr^{1 4 6} - Tyr^{1 4 5} - Gly^{1 4 4} - Lys^{1 4 3}
を有するペプチドの 2 つの少なくとも 2 つの連続したアミノ酸により構成される
、請求項 1 または 2 に記載の分子。

【請求項 4】

A が C₃ 対称性を有することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の多量体

10

20

30

40

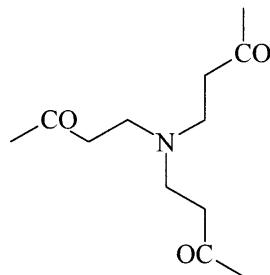
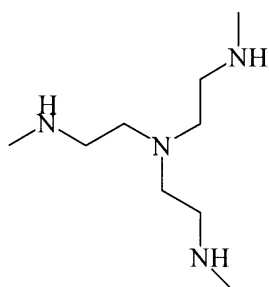
50

分子。

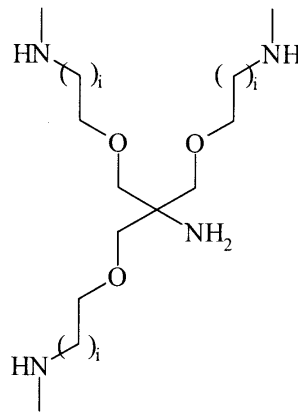
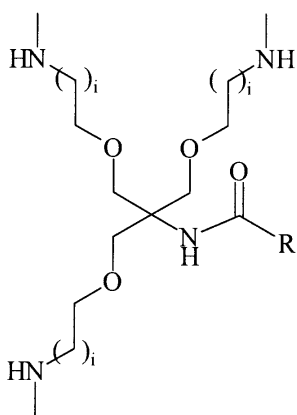
【請求項 5】

A が下記式：

【化 5】



10



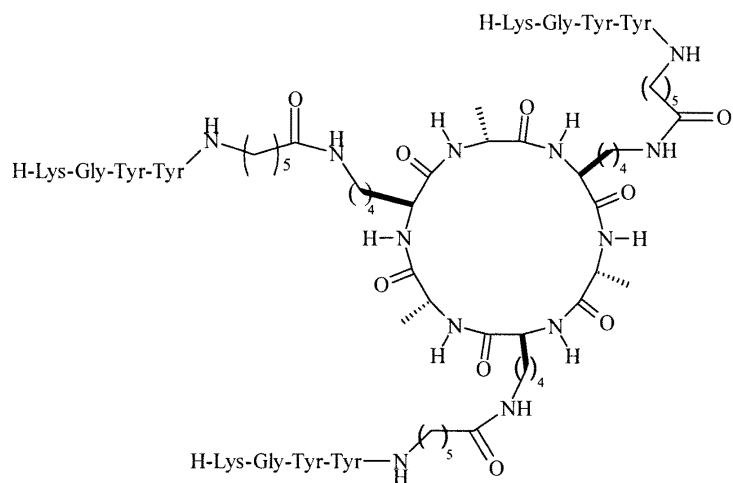
20

〔式中、i は 1 より大きい数又は 1 に等しい整数を表す〕
 の 1 つに相当することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の分子。

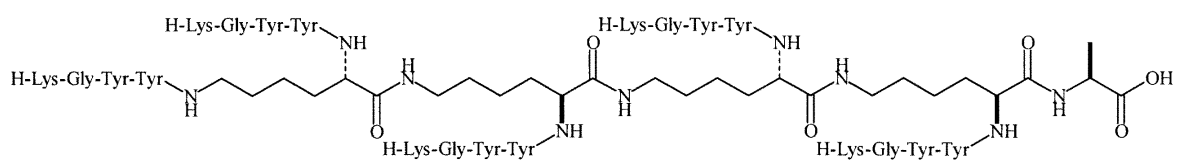
【請求項 6】

下記式

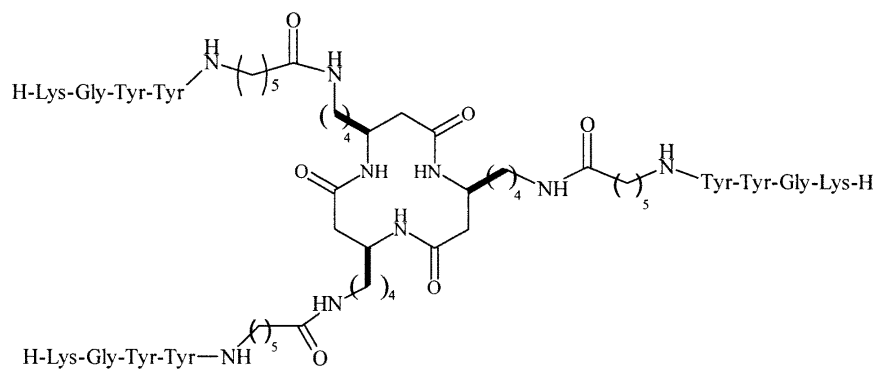
【化 6】



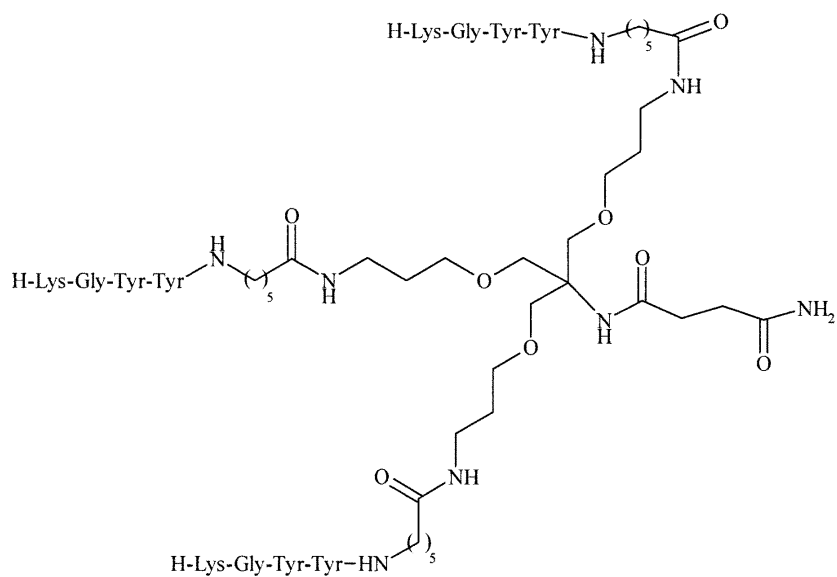
10



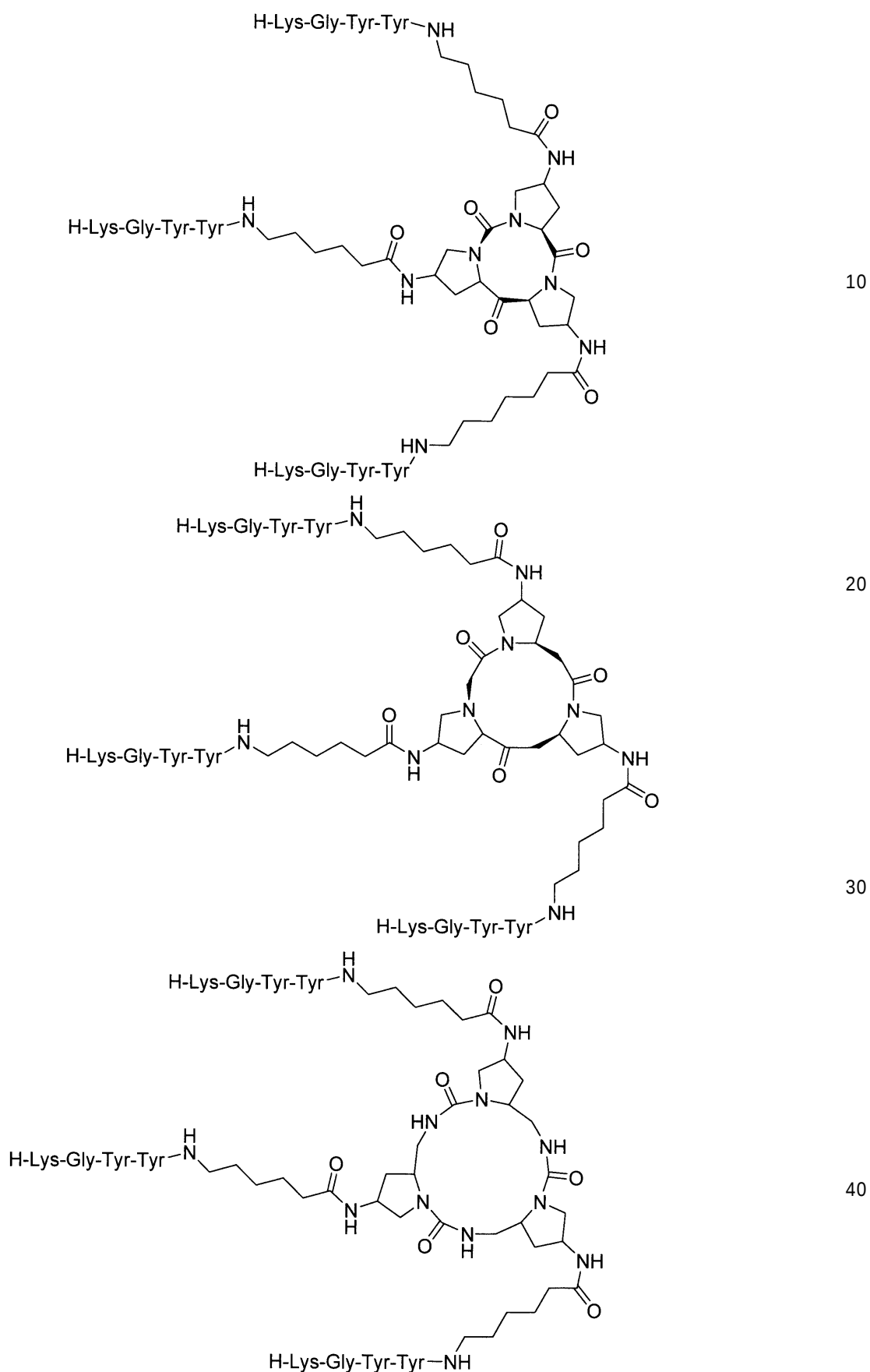
20



30



40



の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の分子。

【請求項 7】

医薬学的に許容できるベクターと組み合わせて請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子を活性成分として含むことを特徴とする医薬学的組成物。

【請求項 8】

医薬学的に許容できるアジュバントと組み合わせて請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子を活性成分として含むことを特徴とするワクチン組成物。

【請求項 9】

免疫応答の抑制又は活性化を含む、病理の処置を目的とした医薬の製造のための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子の使用。

【請求項 10】

免疫応答抑制を含む、病理の処置を目的とした医薬の製造のための請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

処置が移植片の拒絶又は自己免疫疾患の抑制を含む、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

免疫応答の増加を含む、病理の処置を目的とした医薬の製造のための請求項 9 に記載の使用。

【請求項 13】

医薬が癌又は寄生虫、バクテリアもしくはウイルス感染症の処置を目的とする、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

A が環状 C_3 基でありそして請求項 1 で記載された式 I a、I b、II、VI b、VI c 又は VI d の 1 つに相当する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子の固体支持体上での製造方法であって、該方法は、下記の工程：

- 成長するペプチド鎖を形成するアミノ酸配列により構成されている A の線状前駆体を形成（ここで、この線状前駆体は、N - 保護されたアミノ酸の残基の 3 つがアミン型の R a 基を有する N - 保護されたアミノ酸の残基と、成長するペプチド鎖のアミン官能基との連続したカップリングサイクル及び脱保護により合成されたものであり、その際最初のアミノ酸残基は固体支持体に結合されている）し、

- 上記保護された A の線状前駆体を環化し、
- 該保護基を開裂して保護されたアミン官能基を開放し、
- 3 つの開放されたアミン官能基を、N - 保護されたスペーサーアーム B とカップリングさせ、

- スペーサーアーム B を脱保護し、そしてスペーサーアーム B から開放されたアミン官能基を、既に形成されている D ペプチド又は D ペプチドに相当するアミノ酸残基を連続して結合させることによりその場で形成された D ペプチドとカップリングさせ、そして

- D ペプチドの官能化された側鎖上に存在するすべての保護基を除去した後、固体支持体から分子を開裂させて請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子を得る、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 15】

A が環状 C_3 基でありそして請求項 1 に記載された式 I a、I b、II、VI b、VI c 又は VI d の 1 つに相当する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子の溶液における製造方法であって、該方法は、下記の工程：

- 成長するペプチド鎖を形成するアミノ酸配列により構成されている A の線状前駆体を形成（ここで、この線状前駆体は、N - 保護されたアミノ酸残基の 3 つがアミン型 R a 基を有する N - 保護されたアミノ酸残基と、成長するペプチド鎖のアミン官能基との連続したカップリングサイクル及び脱保護により合成されたものである）し、

- 上記保護された A の線状前駆体を環化し、
- 該保護基を開裂して保護されたアミン官能基を開放し、
- 3 つの開放されたアミン官能基を、保護された D ペプチドに連結されたスペーサーアーム B に相当する - D - B ペプチドとカップリングさせ、

- D ペプチド上に存在する保護基を脱保護して、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子を得る、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 16】

A が分岐状 C_3 基でありそして請求項 1 に記載された式 IV、V、VI 又は VI a の 1 つに相当する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子の製造方法であって、該方法は、下記の工程：

- 式 IV、V、VI 又は VI a の基 A の 3 つのアミン官能基を保護されたスペーサーアーム B とカップリングさせ、

- スペーサーアーム B を脱保護し、

- 脱保護されたスペーサーアーム B を D ペプチドの構成に含まれた保護されたアミノ酸と、上記したアミノ酸のカップリング、精製及び脱保護の連続したサイクルにより結合させ、

- D ペプチドの構成に含まれた最後のアミノ酸を脱保護して、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子を得る、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 17】

A が請求項 1 に記載された式 VII 又は VIII の 1 つに相当する非対称性分岐状基である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の多量体分子の固体支持体上での製造方法であって、該方法が下記の工程：

- それぞれ位置 α 及び ε におけるリシンの 2 つのアミン官能基の各々がそれぞれ異なる且つ直交する保護基により保護されているリシンを固体支持体にグラフトさせ、

- リシンから形成されたペプチド鎖を、

- * 保護されたアミン官能基が位置 ε にある式 VII の基 A を得るために位置 α のアミン官能基のみを連続したカップリング及び脱保護すること、又は

- * 保護されたアミン官能基が位置 α にある式 VIII の基 A を得るために位置 ε のアミン官能基のみを連続したカップリング及び脱保護することのいずれかにより、
所望の長さに伸長させ、

- 式 VII の基 A の位置 ε 又は式 VIII の基 A の位置 α における脱保護されたアミン官能基を保護されたアーム B とカップリングさせ、

- 脱保護されたスペーサーアーム B を、既に形成されている D ペプチド又は D ペプチドに相当するアミノ酸残基の逐次的結合によりその場で形成された D ペプチドと結合させ、
そして

- このようにして得られた分子を、D ペプチドの官能化された側鎖上に存在するすべての保護基を除去した後、固体支持体から開裂させる、

を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の主題は、新規な多量体分子 (multimeric molecules)、それらの製造方法及び医薬の製造のためのそれらの使用である。

本発明の主題は免疫応答を活性化又は抑制することができる分子でもある。

【背景技術】

【0002】

免疫応答における CD40 / CD40L カップルの重要性は、治療の目的でこれらの 2 つの分子に対して指向された抗体を使用して、免疫系を抑制又は活性化するための多数のグループを導いた。抗 CD40L 抗体の投与は、自己免疫疾患、例えばネズミ実験アレルギー性脳脊髄膜炎 (ヒト多発性硬化症のモデル) の処置 (Howard et al., 1999) 又はサルにおける腎臓同種移植片の拒絶の処置 (Kirk et al., 19990003) において希望の持てる結果を与えた。これらの 2 つの場合に、抗体は免疫系の有害な活性を抑制した。反対に、アゴニスト抗 CD40 抗体の使用は、一方ではマウスにおけるペプチド抗腫瘍ワクチンに対する応答を強く増加させること (Diehl et al., 1999) 及び他方ではネズミ腫瘍の撲

10

20

30

40

50

滅におけるCD4⁺T細胞の有効性を増加させること(Sotomayor et al., 1999; Lode et al 2000)を可能とした。ネズミモデルにおける腫瘍の後退はCD40Lをコードするアデノウイルスにより形質転換された樹状細胞(DCs)の注入の後検出された(Kikuchi et al., 2000)。最後に、それらのCD40分子とCD40Lとの相互作用による樹状細胞の活性化は、寄生虫、クルーズトリパノソマ(*Trypanosoma Cruzi*)による感染からマウスを保護することができる(Chaussabel et al., 1999)。これらのすべての研究において、三量体の形態で結合してCD40と6価の複合体を形成するCD40L分子の特定の結合価(particular valency)は、CD40/CD40Lカップルの機能を妨げることができる機能的抗体を産生することを困難ならしめる。CD40Lをコードするアデノウイルスの開発は、この欠点に対する部分的応答である。しかしながら、それらの使用はヒトでは問題がなくはない。最後に、この系の特定の結合価はCD40/CD40L相互作用を妨げることができる合成分子を発見することを困難にする。

10

【発明の開示】

【0003】

本発明の目的は、タンパク質-タンパク質相互作用に干渉するようにデザインされた多量体リガンド(multimeric ligands)を提供することである。

【0004】

本発明の目的は、タンパク質-タンパク質多価相互作用に干渉することができる分子の製造でもある。

【0005】

20

本発明の目的は、TNF及びTNF-Rファミリーのメンバーの活性を調節すること(modulating)ができる分子の製造でもある。

【0006】

本発明の目的は、CD40/CD40L系に作用する合成分子を提供することである。

【0007】

本発明の目的は、アジュバント又は免疫抑制剤として作用することができる分子を提供することでもある。

【0008】

本発明は、アゴニスト又はアンタゴニスト活性を有する、天然のタンパク質多量体リガンドを模倣すること(mimicking)ができる多量体分子に関する。

30

【0009】

本発明は、病理学において有益であることができる、TNFファミリーに属する天然の多量体リガンドにより生じる効果とは異なる効果を生じることができる多量体分子にも関する。

【0010】

「アゴニスト活性を有するリガンドを模倣することができる分子」とは、天然のリガンドの機能の一部又はすべてを再現することができる分子を意味する。

【0011】

「アンタゴニスト活性を有するリガンドを模倣することができる分子」とは、天然のリガンドの機能の一部又はすべてを抑制することができる分子を意味する。

40

【0012】

「天然のタンパク質多量体リガンド」とは、非共有結合自己結合(non-covalent self-assembly)による多量体形態、即ち、ホモ二量体、ホモ三量体、ホモ四量体又はホモオリゴマーの形態にあるその受容体に対して活性ないかなるタンパク質も意味する。

【0013】

本発明は、TNFスーパーファミリーの受容体リガンドを模倣することができる、上記した多量体分子に関する。

【0014】

「TNFスーパーファミリー」は、TNFの構造的又は機能的特徴と同様な構造的又は機能的特徴を有する分子のファミリーを表し、これらの分子は本質的に免疫応答に関与し

50

ている。

【 0 0 1 5 】

本発明の有利な態様に従えば、本発明の多量体分子はリガンドが C D 4 0 分子のリガンドであることを特徴とする。

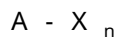
【 0 0 1 6 】

C D 4 0 分子は、「 T N F 受容体」スーパーファミリーに属する 4 8 k D a の膜貫通分子である。それは、抗原提示細胞、例えば、樹状細胞、単球及 B リンパ球により構成的に発現される。それは、活性化された T 細胞、白血球、(単球 / マクロファージ、N K 細胞、好塩基球、好酸球)、活性化された血小板及び非造血細胞 (平滑筋細胞、上皮細胞、内皮細胞) 上に発現された C D 4 0 L (C D 1 5 4) と三価で相互作用する。これらの異なる細胞の表面において、その発現は、一過性にすぎない活性化された T 細胞上でのその発現と違って、誘導性でありそして持続性である。C D 4 0 / C D 4 0 L 相互作用は体液性及び細胞性免疫応答の発生及び制御において中心的である。

10

【 0 0 1 7 】

本発明は、上記した多量体分子であって、該多量体分子が、下記の一般式



[式中、

- n は 3、4、5 又は 6 に等しく、
 - A は少なくとも 3 つのアミン官能基 (functions) 又は C O O H 官能基により官能化された化学的基であり、
 - X は - D、- B - D 又は - B (D) - D ' 基であり、ここで、
 - * B はスペーサーアームであり、
 - * - D 及び - D ' はリガンド受容体との界面を形成する残基から選ばれるリガンド由来の配列に相当するペプチド又は擬ペプチド (pseudopeptides) であり、該配列は該受容体と相互作用することができる]
- に相当することを特徴とする多量体分子に関する。

20

【 0 0 1 8 】

化学的基 A はそれが基 X との結合を可能とするように官能化された化学的基である。A は「コア分子」とも呼ばれる。

【 0 0 1 9 】

「コア分子」とは多量体分子の n 個の X 基の提示における中心的役割を有する化学的基を意味する。

30

【 0 0 2 0 】

「スペーサーアーム」とは A から所望の距離に D 基を移動させるのに使用される有機鎖を意味する。

【 0 0 2 1 】

「ペプチド又は擬ペプチド」とは、アミド結合により相互連結された天然又は非天然アミノ酸の残基の配列を意味する。擬ペプチドは性質が異なる化学結合によるペプチド中の 1 個又はそれより多くのアミド結合の置換により得られる。

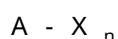
40

【 0 0 2 2 】

「リガンド受容体との界面を形成する残基から選ばれるリガンド由来の配列」とは、リガンドの一次配列に属するペプチド配列を意味し、そのアミノ酸の数は 3 ~ 1 0 でありそしてその構造的変異 (X 線回折、核磁気共鳴、分子模型化、定方向突然変異誘発 (directed mutagenesis)) は、それを構成するアミノ酸の少なくとも 1 つが受容体のアミノ酸残基と非共有結合相互作用 (水素結合、カチオン - π 相互作用 (cation- π interaction))、塩橋、疎水性相互作用及びファンデルワールス) していることを示した。

【 0 0 2 3 】

本発明は、多量体分子であって、該多量体分子が、下記の一般式



[式中、

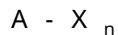
50

- nは3、4、5又は6に等しく、
 - Aは少なくとも3つのアミン官能基又はCOOH官能基又はSH官能基又はS - N p y s (S - ニトロ - ピリジンスルフェニル) 官能基又はS - P y s (S - ピリジンスルフェニル) 官能基により官能化された化学的基であり、そして特にタンパク質とは異なり、
 - Xは - D、 - B - D又は - B (D) - D ' 基であり、ここで、
 * Bはスパーサーアームであり、
 * - D及び - D ' はリガンド受容体との界面を形成する残基から選ばれるリガンド由来の配列に相当するペプチド又は擬ペプチドを表し、該配列は該受容体と相互作用することができ、該リガンドはTNFスーパーファミリーの受容体のリガンドから選ばれ、特に下記のリガンド：EDA、CD40L、FasL、OX40L、AITRL、CD30L、VEGI、LIGHT、4-1BBL、CD27L、LT α 、TNF、LT β 、TWEAK、APRIL、BLYS、RANKL及びTRAILから選ばれる）に相当することを特徴とする多量体分子にも関する。

10

【0024】

本発明は、多量体分子であって、該多量体分子が、下記の一般式：



〔式中、

- nは3、4、5又は6に等しく、
 - Aは少なくとも3つのアミン官能基又はCOOH官能基により官能化された化学的基であり、そして特にタンパク質とは異なり、
 - Xは - D、 - B - D又は - B (D) - D ' 基を表し、ここで、
 * Bはスパーサーアームであり、
 * - D及び - D ' はリガンド受容体との界面を形成する残基から選ばれるリガンド由来の配列に相当するペプチド又は擬ペプチドを表し、該配列は該受容体と相互作用することができ、該リガンドはTNFスーパーファミリーの受容体のリガンドから選ばれ、特に下記のリガンド：EDA、CD40L、FasL、OX40L、AITRL、CD30L、VEGI、LIGHT、4-1BBL、CD27L、LT α 、TNF、LT β 、TWEAK、APRIL、BLYS、RANKL及びTRAILから選ばれる）に相当することを特徴とする多量体分子にも関する。

20

【0025】

「 - D及び - D ' がリガンド由来の配列に相当し、該配列は該受容体と相互作用することができる」という表現は、下記のとおり定義することができる： - D及び - D ' 配列は対応する受容体との相互作用におけるそれらの関与について入手可能な構造的データ（X線回折又は分子模型化及び定方向突然変異誘発）に基づいて選ばれる。かくして、天然のタンパク質では、これらの配列のすべて又は一部が対応する受容体（1つ又は複数）の一部と相互作用する（水素結合、疎水性結合、H結合、カチオン - π 結合、塩橋、ファンデルワールス相互作用）。それにもかかわらず、単離されたペプチド - D又は - D ' は測定されるにはあまりにも弱すぎる受容体に対するアフィニティーを有することができる。アフィニティーの増加は本発明に記載の多量体化により与えられる。

30

【0026】

TNFスーパーファミリーのリガンドはLocksley et al. (2001)により与えられたリストから選ばれそして特に下記のものである：

40

【0027】

【表 1】

リガンドの名称	参考文献
EDA	Laurikkala J, <i>Development</i> (2002) May; 129 (10):2541-53
CD40L	J. Singh et al., <i>Protein Science</i> (1998), 7 , 1124-1135
FasL	Starling et al., <i>Biochemistry</i> (1998), 37 , 3723-3726
OX40L	Weinberg AD., <i>Trends Immunol</i> (2002) Feb; 23 (2):102-9 (review)
AITRL	Kwon B et al., <i>J Biol Chem</i> (1999) Mar 5; 274 (10):6056-61
CD30L	Opat S, Gaston JS. <i>Autoimmunity</i> (2000); 33 (1):45-60 (review)
VEGI (or TL1)	Migone TS et al., <i>Immunity</i> (2002) Mar; 16 (3):479-92
LIGHT	Wang J et al., <i>J Immunol</i> (2001) Nov 1; 167 (9):5099-105
4-1BBL	Kwon B, <i>Trends Immunol</i> (2002) Aug; 23 (8):378-80
CD27L	Jacquot S., <i>Immunol Res</i> (2000); 21 (1):23-30
LT α (TNFB)	Banner et al., <i>Cell</i> (1993), 73 , 431-445
TNF	Eck et al., <i>J. Biol. Chem.</i> (1989), 264 , 17595-17605
Lt β	Browning JL, <i>Cell</i> (1993) Mar 26; 72 (6):847-56
TWEAK	Chicheportiche Y et al., <i>J Biol Chem</i> (1997) Dec 19; 272 (51):32401-10
APRIL	Yu G et al., <i>Nat Immunol</i> (2000) Sep; 1 (3):252-6
BLYS	Liu Y et al., <i>Cell</i> (2002) Feb 8; 108 (3):383-94
RANKL	Ito S et al., <i>J Biol Chem</i> (2002) Feb 22; 277 (8):6631-6
TRAIL	Mongkolsapaya J et al., <i>Nat Struct Biol</i> (1999) Nov; 6 (11):1048-53

10

20

【 0 0 2 8 】

30

本発明の有利な態様に従えば、本発明の分子は、-D及び-D'がヒト又はネズミCD40受容体のリガンド(CD40L)由来のペプチドを表し、該ペプチドはCD40のCD40Lリガンドの一次配列に属しそしてそのアミノ酸の数は3～10を含む、ことを特徴とする。

【 0 0 2 9 】

本発明の有利な多量体分子は、AがC₃対称性(C₃ symmetry)を有することを特徴とする多量体分子である。

【 0 0 3 0 】

C₃対称性を有する分子は下記の如く定義される：分子が3のオーダー(order)の軸を有するならば、分子はC₃グループに属する(“Physical Chemistry”, PW Atkins, Oxford University Press, p430における定義参照)。

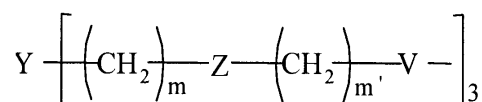
40

本発明は、上記した多量体分子であって、

- Aが下記一般式

【 0 0 3 1 】

【化 7】



50

【 0 0 3 2 】

[式中、

* m 及び m ' は 1 ~ 5 の整数であり、

* V は X とアミド結合を形成する - NH - 又は - CO - 基を表し、

* Z は酸素原子又は CH₂ 基を表し、

* Y は窒素原子又は R - C - 基又は R - CONH - C - 基のいずれかを表し、ここで R は 1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキル基、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルケニル基、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキニル基、5 ~ 12 個の炭素原子を有するアリール基、5 ~ 14 個の炭素原子を有するアラルキル基又は 1 ~ 10 個の炭素原子を有するヘテロアリール基であることができ、これらの基は置換されていなくてもよく又は - COOH、- NH₂、- CONH₂ 又はアルコキシ基から選ばれる 1 ~ 6 個の置換基により置換されていてもよい]

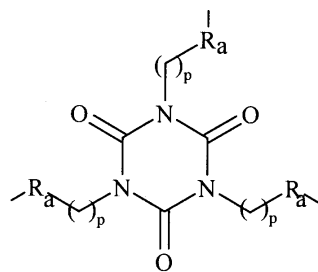
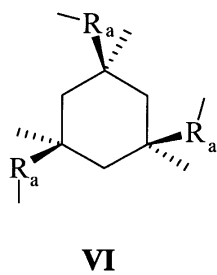
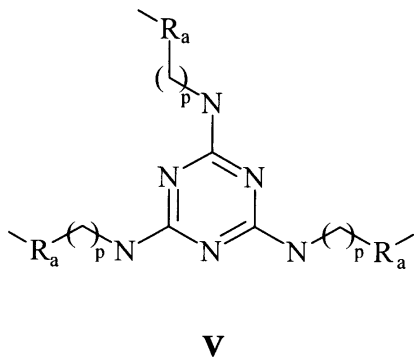
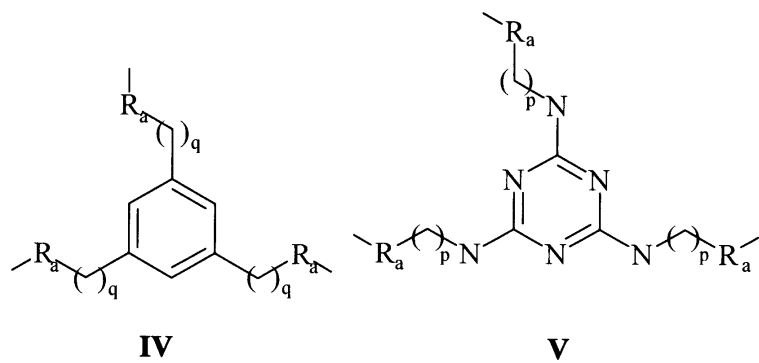
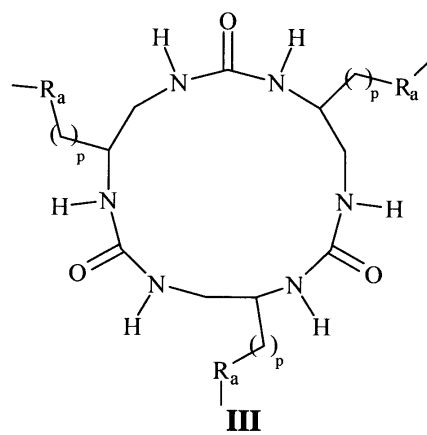
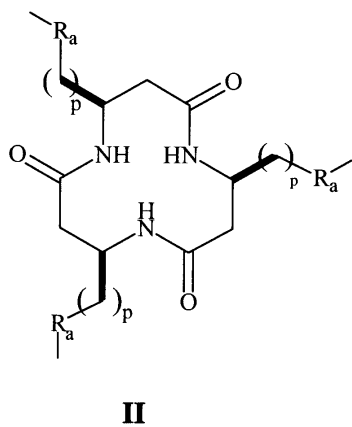
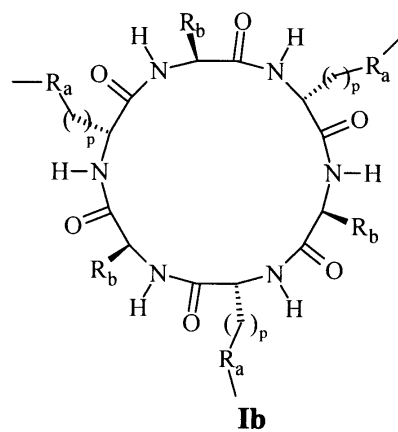
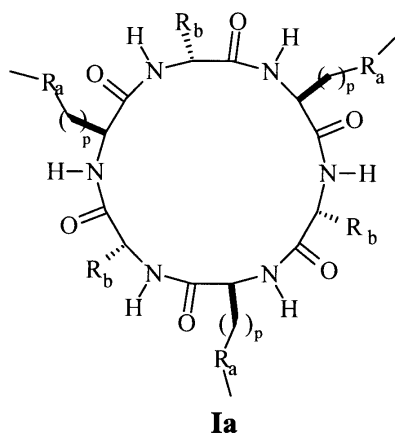
10

を有する C₃ 対称性を有する分岐状基であるか、

• 又は A が下記一般式：

【 0 0 3 3 】

【化 8】

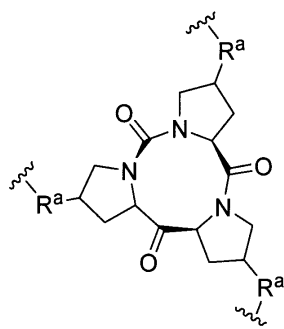


10

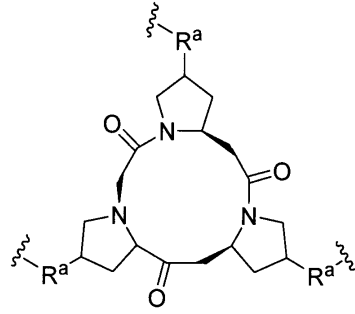
20

30

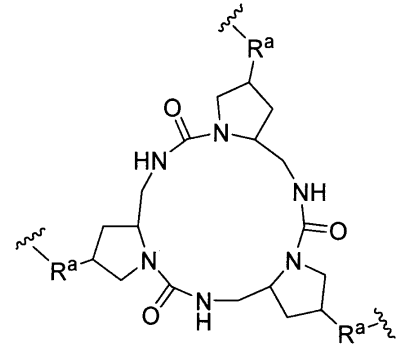
40



VIb



VIc



VIId

10

【 0 0 3 4 】

〔 式中、

- * R a は X とアミド結合を形成する - N H - 基又は - C O - 基のいずれかを表し、
- * R b はタンパク原性 (proteinogenic) アミノ酸の側鎖を表し、
- * p は 1 ~ 4 の整数であり、
- * q は 0 ~ 4 の整数である〕

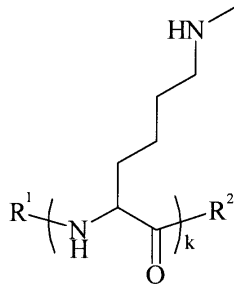
の 1 つに相当する環状 C₃ 基 (cyclic C₃ radical) であるか、

20

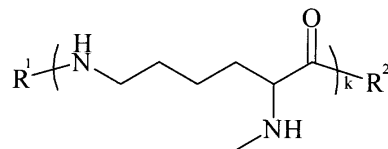
- 又は、A が下記一般式

【 0 0 3 5 】

【 化 9 】



VII



VIII

30

【 0 0 3 6 】

〔 式中、

- * k は 3、4、5 又は 6 を表し、
- * R¹ は水素原子又はタンパク原性アミノ酸から選ばれるアミノ酸残基又は RCO -、ROCO - もしくは RNHCO - 基のいずれかを表し、ここで R は上記したとおりであり、

* R² は - NH₂ 基又は - NHR 基又はタンパク原性アミノ酸から選ばれるアミノ酸残基のいずれかを表し、R は上記したとおりである〕

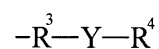
40

に相当する非対称性分岐状基であり、

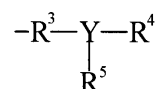
- B が下記一般式：

【 0 0 3 7 】

【 化 10 】



又は



【 0 0 3 8 】

50

式中、

* YはC₁ ~ C₁₀ アルキル鎖又はアルキニル、又はアルケニル又はアリール又はアラ
ルキル又はヘテロアリール基を表し、

* R³は、VもしくはRaが-CO-基であるときは-NH-基を、又はVもしくはR
aが-NH-基であるときは-CO-基のいずれかを表し、

* R⁴及びR⁵は互いに独立に-CO-基又は-NH-基を表す]
の1つに相当し、

-D及び-D'が受容体と相互作用するリガンド由来の配列に相当するペプチド又は擬
ペプチドである、

ことを特徴とする多量体分子に関する。

10

【0039】

本発明は、-D及び-D'が下記の：

Lys^{1 4 3} - Gly - Tyr^{1 4 5}、Tyr^{1 4 5} - Gly - Lys^{1 4 3}、
Lys^{1 4 3} - Gly - Tyr - Tyr^{1 4 6}
Tyr^{1 4 6} - Tyr - Gly - Lys^{1 4 3}、
Lys - Pro - Arg、Lys - Ψ(CH₂NH)Pro - Arg、
Arg^{2 0 0} - Phe - Glu - Arg - Ile - Leu - Leu - Arg^{2 0 7}、
Arg^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg - Glu - Phe - Arg^{2 0 0}、
Arg^{2 0 0} - Phe - Glu - Arg - Ile^{2 0 4}、
Ile^{2 0 4} - Arg - Glu - Phe - Arg^{2 0 0}、
Arg^{2 0 3} - Ile - Leu - Leu - Arg^{2 0 7}、
Arg^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg^{2 0 3}、
Cys^{2 1 8} - Gly - Gln - Gln - Ser - Ile^{2 2 3}、
Ile^{2 2 3} - Ser - Gln - Gln - Gly - Cys^{2 1 8}、
Gly^{2 0 0} - Ser - Glu - Arg - Ile - Leu - Leu - Lys^{2 0 7}、
Lys^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg - Glu - Ser - Gly^{2 0 0}、
Gly^{2 0 0} - Ser - Glu - Arg - Ile^{2 0 4}、
Ile^{2 0 4} - Arg - Glu - Ser - Gly^{2 0 0}、
Arg^{2 0 3} - Ile - Leu - Leu - Lys^{2 0 7}、
Lys^{2 0 7} - Leu - Leu - Ile - Arg^{2 0 3}、
Cys^{2 1 8} - Glu - Gln - Gln - Ser - Val^{2 2 3}、
Val^{2 2 3} - Ser - Gln - Gln - Glu - Cys^{2 1 8}

20

30

又は上記した配列の2つの少なくとも2つの連続したアミノ酸により構成されるハイブリ
ッドペプチド、特に配列

Arg^{2 0 3} - Ile^{2 0 4} - Tyr^{1 4 5} - Tyr^{1 4 6}又は
Arg^{2 0 3} - Ile^{2 0 4} - Tyr^{1 4 6} - Tyr^{1 4 5} - Gly^{1 4 4} - Lys^{1 4 3}

のペプチド、

又は上記配列の断片、

から選ばれるヒト又はネズミCD40受容体リガンド(CD40L)由来の残基を表し、
ここでアミノ酸は同等にL又はD配置であることができる、

40

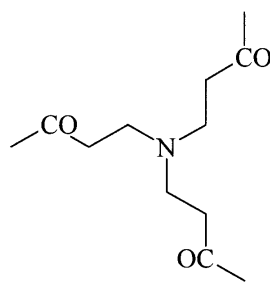
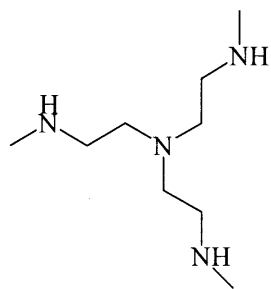
ことを特徴とする上記した分子にも関する。

【0040】

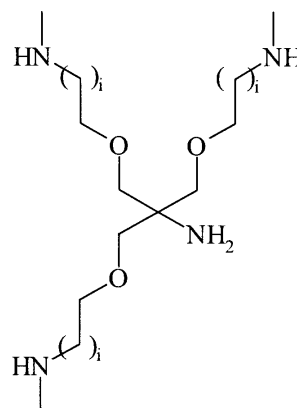
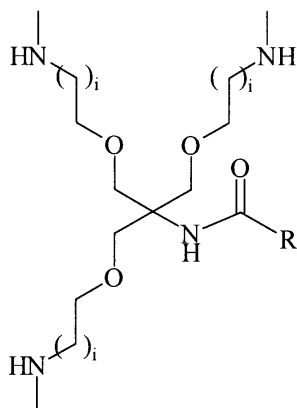
本発明の有利な態様に従えば、上記した分子は、Aが下記式

【0041】

【化 1 1】



10



20

【 0 0 4 2】

〔式中、i は 1 より大きい整数を表す〕
の 1 つに相当することを特徴とする。

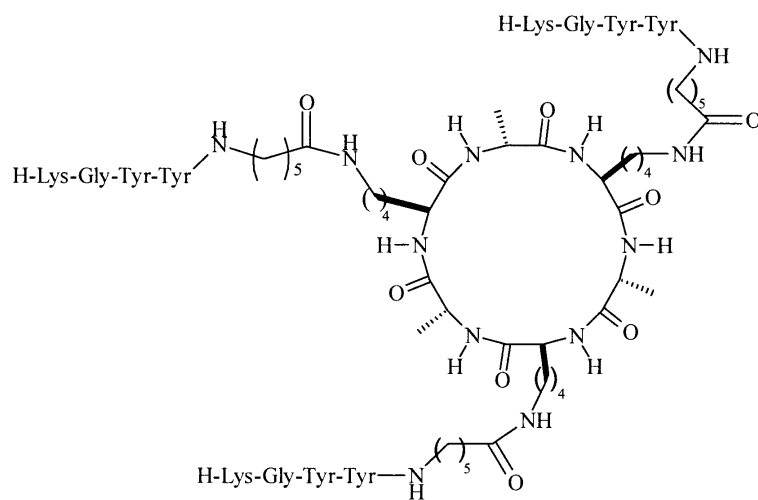
【 0 0 4 3】

本発明の有利な分子は、下記式

【 0 0 4 4】

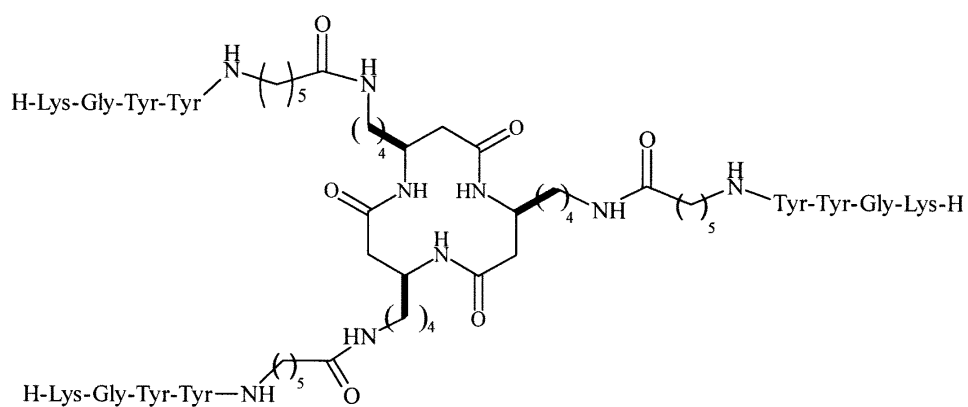
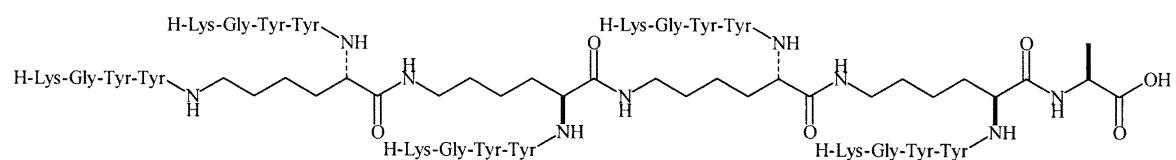
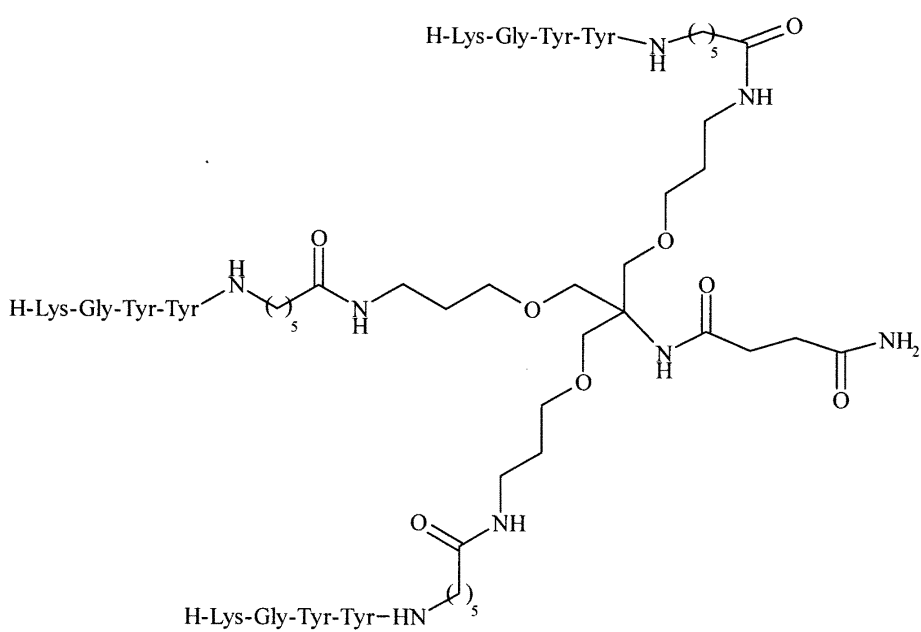
【化 1 2】

30



40

Ic

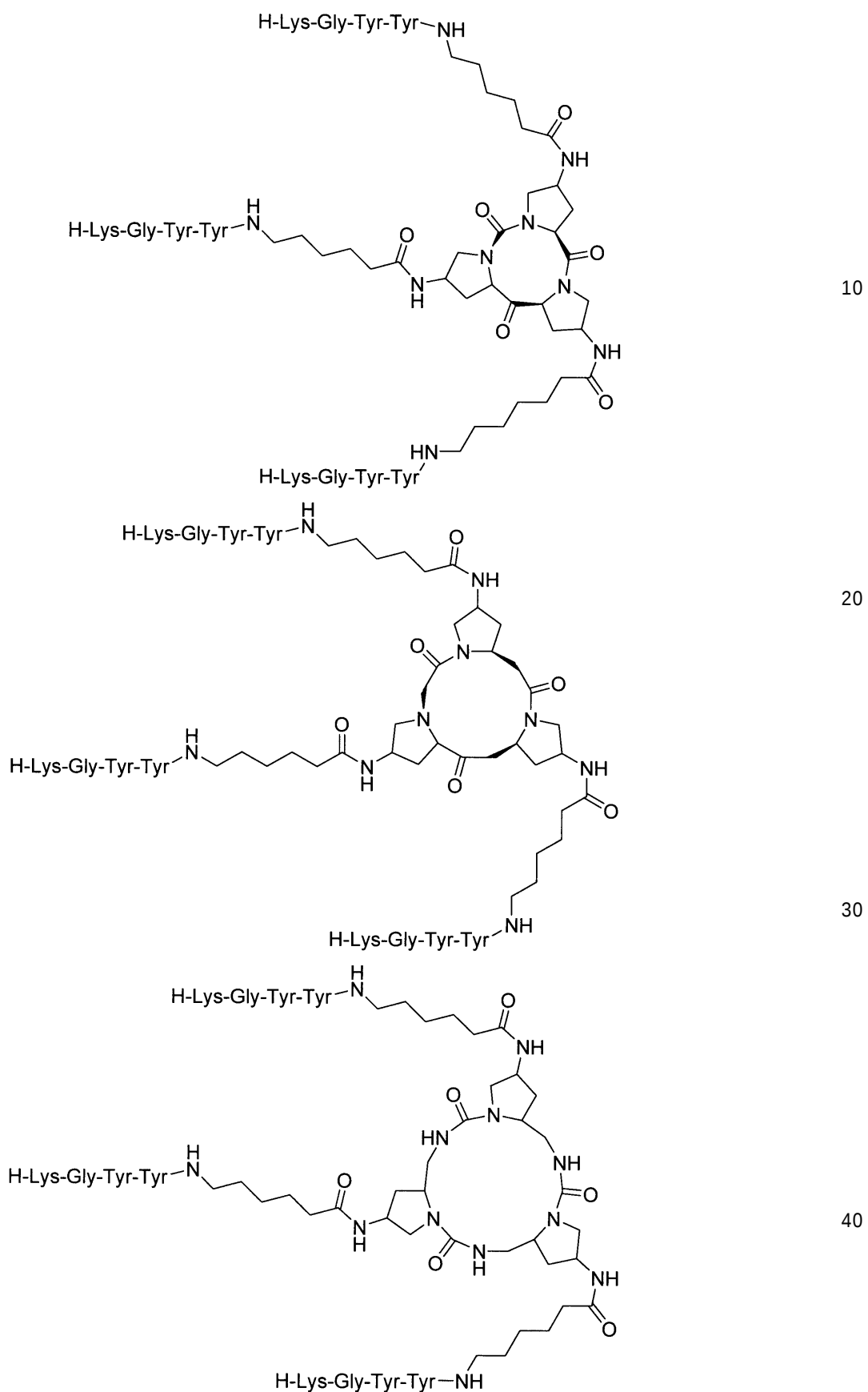
**IIa**

10

20

30

40



【 0 0 4 5 】
 の上記した分子である。

【 0 0 4 6 】

本発明は、医薬学的に許容できるベクターと組み合わせて上記した多量体分子を活性成

分として含むことを特徴とする医薬学的組成物にも関する。

【0047】

本発明は、医薬学的に許容できるアジュバントと組み合わせて上記した多量体分子を活性成分として含むことを特徴とするワクチン組成物にも関する。

【0048】

本発明は、免疫応答の抑制又は活性化を含む病理の処置を目的とした医薬の製造のための上記した多量体分子の使用にも関する。

【0049】

免疫応答は、炎症性疾患（炎症性リウマチ）、自己免疫疾患、一般に過敏症反応及び特にアレルギー、移植片拒絶、宿主に対する移植片の反応の間は抑制されなければならない。

10

【0050】

免疫応答は、一般にワクチン接種、癌免疫治療、免疫抑制を誘発するバクテリア又はウイルス疾患（はしか、AIDS、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス等）においては活性化されなければならない。

【0051】

本発明は、免疫応答の抑制を必要とする病理、例えば移植片拒絶又は自己免疫疾患の処置を目的とした医薬の製造のための上記した使用にも関する。

【0052】

免疫応答の抑制を必要とする疾患は、自己免疫疾患、例えば、糖尿病、多発性硬化症、播種性エリテマトーデス（disseminated lupes erythematosus）又は慢性関節リウマチ、移植片拒絶、特に同種移植片、異種移植片の状況における移植片拒絶又は宿主に対する移植片の反応、並びに過敏症反応、例えば、アレルギー、特にアレルギー性鼻炎及びアトピー性皮膚炎又は肉芽腫（granulomas）を含む。

20

【0053】

免疫応答の抑制の状況で使用される本発明に従う化合物は、静脈内経路、粘膜（口、気道、鼻、膣）経路、皮下経路、皮内経路又は上皮経路（epicutaneous route）により投与することができる。

【0054】

本発明は、医薬学的組成物が免疫応答の抑制を必要とする病理の処置のための本発明に従う化合物を含み、該化合物は、それが個体当たり1日当たり約100ng～約5mgの割合で投与されうような量で医薬学的組成物中に存在することを特徴とする医薬学的組成物にも関する。

30

【0055】

本発明は、免疫応答の増強を必要とする病理、例えば癌、又は寄生虫、バクテリアもしくはウイルス感染症の処置を目的とした医薬の製造のための上記した使用にも関する。

【0056】

免疫応答の活性化を必要とするケースは、一般にワクチン接種、特にインフルエンザ又は子供の病気に対するワクチン、特に黒色腫又は転移性の癌の状況における癌免疫治療、又は特にはしか、AIDS、ヘルペスウイルス又はサイトメガロウイルスの状況における免疫抑制を誘発するバクテリア又はウイルス疾患を含む。

40

【0057】

免疫応答の活性化の状況で使用される本発明に従う化合物は、静脈内経路、粘膜（口、気道、鼻、膣）経路、皮下、皮内または上皮経路により投与することができる。

【0058】

本発明は、医薬学的組成物が免疫応答の活性化を必要とする病理の処置のための本発明に従う化合物を含み、該化合物は、それが個体当たり1日当たり約100ng～約5mgの割合で投与されうような量で医薬学的組成物中に存在することを特徴とする医薬学的組成物にも関する。

【0059】

50

本発明は、免疫系に関連していない疾患、例えば、リンパ腫、アテローム性動脈硬化症又は血栓症の処置を目的とした医薬の製造のための上記した使用にも関する。

【0060】

本発明は、Aが環状C₃基でありそして上記した式I a、I b、II、VI b、VI c又はVI dの1つに相当する上記した多量体分子の固体支持体上での製造方法であって、該方法は、下記の工程：

- 成長するペプチド鎖を形成するアミノ酸配列により構成されているAの線状前駆体を形成（ここで、この線状前駆体は、N-保護されたアミノ酸残基の3つがアミン型のRa基を有するN-保護されたアミノ酸残基と、成長するペプチド鎖のアミン官能基との連続したカップリングサイクル及び脱保護により合成されたものであり、その際最初のアミノ酸残基は固体支持体に結合されている）し、

- 上記保護されたAの線状前駆体を環化し、
- 該保護基を開裂させて保護されたアミン官能基を開放し、
- 3つの開放されたアミン官能基をN-保護されたスペーサーアームBとカップリングさせ、

- スペーサーアームBを脱保護し、そしてスペーサーアームBから開放されたアミン官能基を、既に形成されているDペプチド又はDペプチドに相当するアミノ酸残基を連続して結合させることによりその場で（in situ）形成されたDペプチドとカップリングさせ、そして

- Dペプチドの官能化された側鎖上に存在するすべての保護基を除去した後、固体支持体から該分子を開裂させて本発明に従う多量体分子を得る、

段階を含むことを特徴とする方法に関する。

【0061】

C₃対称性を有しそして一般式I a、I b、II、VI b、VI c又はVI dに相当する環状基Aを含む化合物は、以下に記載する方法に従って固体支持体上での合成により得られる。基Aは、その線状前駆体の合成及び環化により最初に固体支持体上に構成される。かくして、その酸官能基が適当に保護されている（例えばアリルエステル）最初のアミノ酸残基を、アルデヒドにより官能化された樹脂（市販の樹脂）を使用することにより還元アミノ化反応により支持体に結合させる。次いで、N-保護されたアミノ酸（例えば、N-Fmoc-Xaa-OH、ここでXaaはアミノ酸又は成長しているペプチドを表す）との連続したカップリングサイクル（標準ペプチド合成方式）及び脱保護（Fmoc基の開裂のためのDMF中の20%ピペリジン）によりAの線状前駆体を合成する。樹脂洗浄及びろ過技術並びにFmoc基脱保護技術は固相ペプチド合成で普通に使用されるこれらの技術である。Ra鎖を有する3つのアミノ酸（式I a、I b又はII参照）はアミン官能基によりそれらの側鎖上で官能化され、アミン官能基は他に対して直交性の（orthogonal）保護基（例えばTEOC又はメチルトリチル）により保護される。合成の終わりに、最後のN-保護基を開裂させ（Fmoc基の場合にDMF中の20%ピペリジンの存在下に）そしてC-末端エステルの保護を開裂させる。次いで線状前駆体をカップリング剤（ペプチド合成における標準）及び第三級塩基例えばDIEA又は例えばコリジンの存在下に「頭-尾」で環化させる。環化反応の後比色試験、例えばKaiserの試験（Kaiser et al., 1970）を行うことができる。環化の終わりに、保護されたアミン官能基を有するアミノ酸の保護基を開裂させそして適当に保護されたスペーサーアーム（例えば、Fmoc-Ahx（6-アミノヘキサノ酸）-COOH）を3つの遊離アミン官能基にカップリング剤の存在下にカップリングさせる。このカップリングの終わりに、スペーサーアームの保護基を開裂させそしてDペプチドを標準ペプチド合成方法により合成する。合成の終わりにそして一旦最後の保護基が除去されると、分子を例えばトリフルオロ酢酸による処理により樹脂から開裂させ、エーテルによる沈殿の後凍結乾燥しそして例えばC18カラムで分取逆相HPLCにより精製する。

【0062】

本発明は、Aが環状C₃基でありそして上記した式I a、I b、II、VI b、VI c又はVI

10

20

30

40

50

dの1つに相当する上記した多量体分子の溶液中の製造方法であって、該方法は、下記の工程：

- 成長するペプチド鎖を形成するアミノ酸配列により構成されているAの線状前駆体を形成（ここで、この線状前駆体は、N-保護されたアミノ酸残基の3つがアミン型R_a基を有するN-保護されたアミノ酸残基と、成長するペプチド鎖のアミン官能基との連続したカップリングサイクル及び脱保護により合成されたものである）し、
 - 上記保護されたAの線状前駆体を環化し、
 - 該保護基を開裂させて保護されたアミン官能基を開放し、
 - 3つの開放されたアミン官能基を保護されたDペプチドに連結されたスペーサーアームBに相当する-D-Bペプチドとカップリングさせ、
 - Dペプチド上に存在する保護基を脱保護して、本発明に従う多量体分子を得る、
- 段階を含むことを特徴とする方法にも関する。

10

【0063】

本発明は、Aが分岐状C₃基でありそして上記した式IV、V、VI又はVI aの1つに相当する上記した多量体分子の製造方法であって、該方法は、下記の工程：

- 式IV、V、VI又はVI aの基Aの3つのアミン官能基を保護されたスペーサーアームBとカップリングさせ、
 - スペーサーアームBを脱保護し、
 - 脱保護されたスペーサーアームBをDペプチドの構成に含まれた保護されたアミノ酸と、上記したアミノ酸のカップリング、精製及び脱保護の連続したサイクルにより結合させ、
 - Dペプチドの構成に含まれた最後のアミノ酸を脱保護して、本発明に従う多量体分子を得る、
- 段階を含むことを特徴とする方法に関する。

20

【0064】

C₃対称性の分岐状基でありそして特に式IV、V、VI又はVI aに相当する基Aを含む本発明の化合物は、以後詳細に述べる方法に従って固相又は溶液中で合成することができる。

【0065】

基Aがアミン官能基により官能化されているとき、適当に保護されたスペーサーアーム（例えばBoc-Ahx-OH）は、Aの3つのアミン官能基にペプチド合成方法に従ってカップリング試薬の存在下にカップリングされる。その反応が薄層クロマトグラフィーにより監視されうるこのカップリングの終わりに、生成物を標準有機合成技術に従ってシリカカラム上で単離しそして精製する。次いでBoc基をトリフルオロ酢酸により開裂させそしてDペプチドをカップリング、精製及びBoc基の脱保護の連続した工程により溶液中で合成する。合成の終わりに、側鎖上の保護基を接触水素化により又はフッ化水素酸（HF）による処理により開裂させる。次いで三量体分子を例えばC18カラムでの分取逆相HPLCにより精製する。

30

【0066】

基Aがカルボン酸官能基により官能化されているとき、適当に保護されたスペーサーアーム（例えばBoc基によりモノ保護されたヘキサメチレンジアミン）をAの3つのカルボン酸官能基にペプチド合成方法に従ってカップリング試薬の存在下にカップリングさせる。その反応が薄層クロマトグラフィーにより監視されうるこのカップリングの終わりに、生成物を標準有機合成技術に従ってシリカカラム上で単離しそして精製する。次いでBoc基をトリフルオロ酢酸により開裂させそしてDペプチドをカップリング、精製及びBoc基の脱保護の連続した段階により溶液中で合成する。合成の終わりに、側鎖上の保護基を接触水素化により又はフッ化水素酸（HF）による処理により開裂させ。次いで三量体分子を例えばC18カラムでの分取逆相HPLCにより精製する。

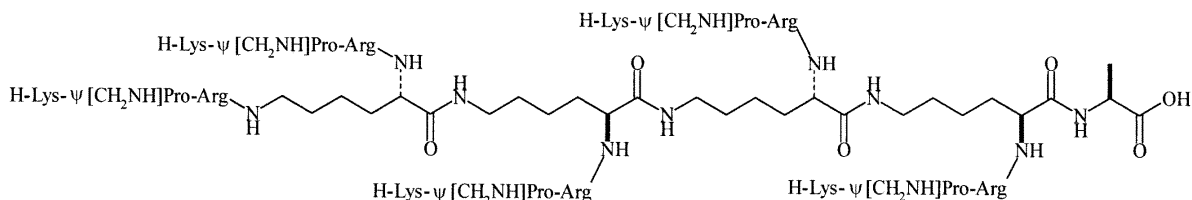
40

【0067】

本発明は、Aが上記した式VII又はVIIIの1つに相当する非対称性分岐状基である上記

50

【化 1 3】



に相当する。

【0072】

化合物 L 1 を 200 μモルのスケールで市販の Wang - Ala - Fmoc 樹脂上で固相で合成する。DMF (ジメチルホルムアミド) 中の 25 % ピペリジンによる Fmoc 基の開裂 (2 × 15 分) の後、DMF 中の Bop (ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (3 当量)、HOBT (1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール) (3 当量) 及び DIEA (ジイソプロピルエチルアミン) (9 当量) で活性化された Fmoc - Lys (Mtt) - OH アミノ酸 (3 当量) を樹脂にカップリングさせる (2 × 15 分)。樹脂洗浄及びろ過ならびに Fmoc 基の脱保護の技術は、固相ペプチド合成で普通に使用されるこれらの技術である。Mtt (4 - メチルトリチル) 基を 85 % DCM (ジクロロメタン)、10 % TIS (トリイソプロピルシラン)、5 % TFA (トリフルオロ酢酸) の溶液 (6 ml) により開裂させる (3 × 3 分)。第 2 及び第 3 の Fmoc - Lys (Mtt) - OH を同じストラテジー及び同じ量の上記試薬によりカップリングさせる。第 4 のリジンに Fmoc - Lys (Fmoc) - OH の形態でカップリングさせる。DMF 中の 25 % ピペリジンによる Fmoc 基の脱保護 (2 × 15 分) の後、DMF 中の Bop (15 当量)、HOBT (15 当量) 及び DIEA (45 当量) で活性化された Fmoc - Arg (Pbf) - OH 及び Fmoc - Pro - OH アミノ酸 (15 当量) を 15 分にわたりカップリングさせる (各カップリングを 2 回繰り返す)。1 % 酢酸を含有する DMF 中の NaBH₃CN (2.5 当量) の存在下に Boc - Lys (Boc) - CHO アルデヒド (2.5 当量) の還元アミノ化反応を使用して樹脂上に、リシンとプロリンとの間の還元されたアミド結合を形成させる。生成物を 80 % TFA、10 % DCM、10 % TIS の溶液 (5 ml) で 2 時間にわたり樹脂から開裂させる。冷エーテルからの沈殿の後、粗生成物を H₂O / アセトニトリル / 酢酸混合物 (80 / 15 / 5) 中において凍結乾燥させる。生成物を質量分光法 (MALDI - MS

(マトリックス支援式レーザー脱着イオン化質量分光法 (Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry)) 及び分析 HPLC によりチェックし、そして水中のアセトニトリルの勾配を使用して C 18 カラムでの分取 HPLC により精製する。

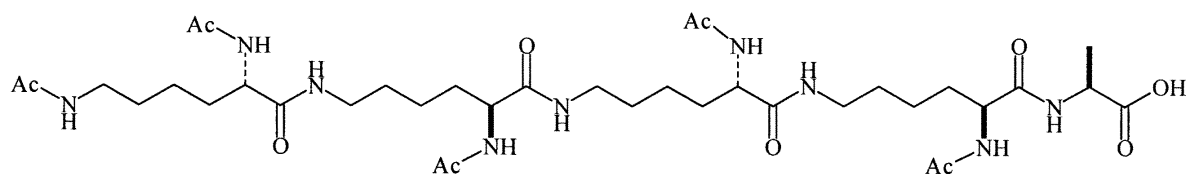
【0073】

B) 化合物 L 2 の製造

化合物 L 2 は下記式：

【0074】

【化 1 4】



10

20

30

40

50

に相当する。

【 0 0 7 5 】

化合物 L 2 を第 4 リジンまで L 1 と同じように合成する。DMF 中の 25 % ピペリジンによる Fmoc 基の脱保護 (2 × 15 分) の後、遊離アミン基を、DIEA (1 ml) の存在下に DCM (2 ml) 中の無水酢酸 (1 ml) の溶液でアセチル化する。生成物を 80 % TFA、10 % DCM、10 % TIS の溶液 (5 ml) で 2 時間にわたり樹脂から開裂させる。冷エーテルからの沈殿の後、粗生成物を H₂O / アセトニトリル / 酢酸混合物 (80 / 15 / 5) 中において凍結乾燥させる。生成物を質量分光法 (MALDI - MS) 及び分析 HPLC によりチェックし、そして水中のアセトニトリルの勾配を使用して C18 カラムでの分取 HPLC により精製する。

10

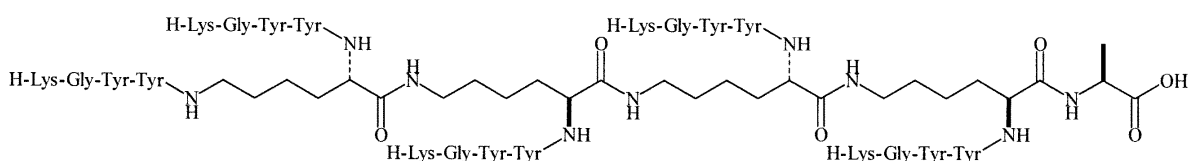
【 0 0 7 6 】

C) 化合物 L 3 の製造

化合物 L 3 は下記式：

【 0 0 7 7 】

【 化 1 5 】



20

に相当する。

【 0 0 7 8 】

化合物 L 3 を第 4 リジンまで L 1 と同じように合成する。DMF 中の 25 % ピペリジンによる Fmoc 基の脱保護 (2 × 15 分) の後、DMF 中の Bop (15 当量)、HOBT (15 当量) 及び DIEA (45 当量) で活性化された Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Gly - OH 及び Fmoc - Lys (Boc) - OH アミノ酸 (15 当量) を 15 分にわたりカップリングさせる (各カップリングを 2 回繰り返す)。生成物を 80 % TFA、10 % DCM、10 % TIS の溶液 (5 ml) で 2 時間にわたり樹脂から開裂させる。冷エーテルからの沈殿の後、粗生成物を H₂O / アセトニトリル / 酢酸混合物 (80 / 15 / 5) 中において凍結乾燥させる。生成物を質量分光法 (MALDI - MS) 及び分析 HPLC によりチェックし、そして水中のアセトニトリルの勾配を使用して C18 カラムでのプレパラティブ HPLC により精製する。

30

【 0 0 7 9 】

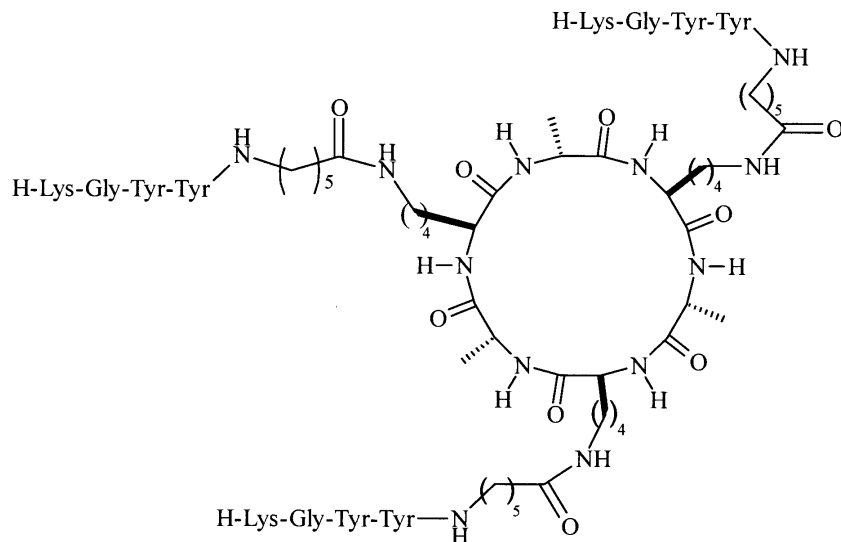
D) 化合物 L 4 及び L 4 a の製造

化合物 L 4 は下記式：

【 0 0 8 0 】

40

【化 16】



10

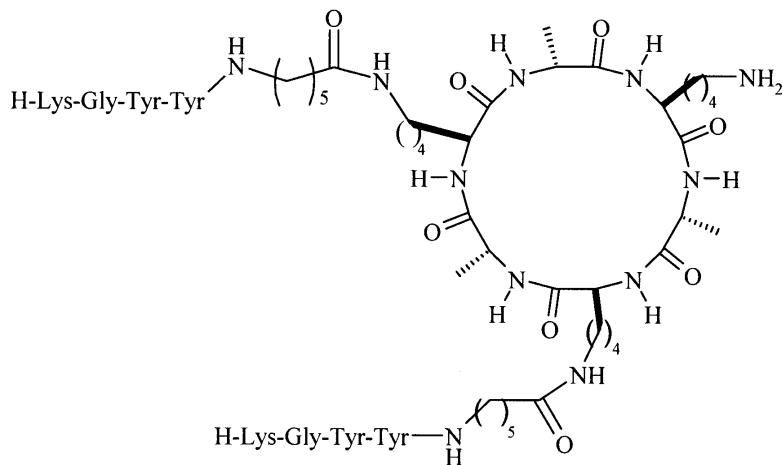
に相当する。

【0081】

化合物 L 4 a は下記式：

【0082】

【化 17】



30

に相当する。

【0083】

1) シントン (synthons) の製造

a) Boc-D-Ala-OAl1

Boc-D-Ala-OH アミノ酸 (1.89 g、10 ミリモル) を ACN (アセトニトリル) 70 ml に可溶化し、そして溶液を 0 に冷却する。DBU (1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデセン-7-エン) 1.5 ml (1.2 当量) を加えた後、アセトニトリル 10 ml 中の臭化アリル (0.72 ml、1 当量) の溶液を約 15 分間滴下により加える。反応を周囲の温度で 21 時間にわたり行い、次いで薄層クロマトグラフィー (TLC) にかける。アセトニトリルを蒸発させた後、粗生成物を酢酸エチルに溶解させそして有機溶液を 5% NaHCO₃、H₂O、1N の KHSO₄ 及び H₂O で洗浄する。Na₂SO₄ 上で乾燥しそして有機相を蒸発させた後、生成物を 73% の収率で油の形態で回収する。生成物を NMR 及び FT-IR 分光法により特徴付けそしてその後精製しないで次

40

50

の反応に使用する。

【0084】

b) $\text{HCl} \times \text{H} - (\text{D})\text{Ala} - \text{OAl}$

$\text{Boc} - (\text{D})\text{Ala} - \text{OAl}$ アミノ酸 (1.67 g; 7.3 ミリモル) をアルゴン雰囲気下にジオキサン中の HCl (4 M) 5 ml の溶液に 30 分間可溶化する。反応の後 TLC にかける。酸溶液を蒸発させた後、生成物が 90 % 収率で真空下に固体として得られる。生成物を NMR 及び FT - IR 分光法により特徴付けそしてその後精製しないで次の反応に使用する。

【0085】

c) $\text{Fmoc} - \text{Lys}(\text{Mtt}) - \text{OAl}$

$\text{Fmoc} - \text{Lys}(\text{Mtt}) - \text{OH}$ アミノ酸 (625 mg、1 ミリモル) を、 HOBt (1 当量) 及び $\text{EDC} \times \text{HCl}$ (EDC : 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドメチオジド (1.1 当量) の存在下にジクロロメタン (DCM) 5 ml に可溶化する。5 分後、アリルアルコール (1 当量) 及び DMAP (4 - ジメチルアミノピリジン) (0.1 当量) を加える。27 時間の後、 HOBt 、 $\text{EDC} \times \text{HCl}$ 、アリルアルコール 0.5 当量及び DAMP 0.1 当量を加える。全体で、反応を 44 時間にわたって行う。ジクロロメタンを蒸発させた後、粗生成物を酢酸エチルに溶解させそして有機溶液を 5 % NaHCO_3 、 H_2O 、1 N の KHSO_4 及び H_2O で洗浄する。 Na_2SO_4 上で乾燥しそして有機相を蒸発させた後、生成物を 94 % の収率で油の形態で回収する。生成物を NMR 及び FT - IR 分光法により特徴付けそしてその後精製しないで次の反応に使用する。

【0086】

d) $\text{H} - \text{Lys}(\text{Mtt}) - \text{OAl}$

$\text{Fmoc} - \text{Lys}(\text{Mtt}) - \text{OAl}$ (240 mg、0.36 ミリモル) を DCM (10 ml) 中の DEA (ジエチルアミン) 20 % 中に可溶化する。反応を、TLC により監視して、DEA 3 ml を更に加えた後 5 時間にわたり行う。溶液を蒸発させた後、粗生成物をジエチルエーテルに可溶化しそして 1 N の KHSO_4 溶液で抽出する。酸溶液を固体 NaHCO_3 で塩基性にしそして生成物を酢酸エチルで再抽出する。有機相を H_2O で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥しそして蒸発させる。生成物を定量的収率で油の形態で回収し、そして次の反応で使用する。

【0087】

2) 固体支持体上での還元アミノ化

市販の 2 - (3, 5 - ジメトキシ - 4 - ホルミルフェノキシ) エチルポリスチレン樹脂上で 62 μ モルのスケールで固相で還元アミノ化反応を行う。 $\text{HCl} \times \text{H} - \text{D} - \text{Ala} - \text{OAl}$ (10 当量) 及び NaBH_3CN (10 当量) を DMF 中に可溶化しそして樹脂に加える。反応を、FT - IR 分光法により監視して、攪拌下に 24 時間にわたって行う。

【0088】

3) 線状ジペプチド、L4 及び L4a の前駆体の製造

$\text{Fmoc} - \text{Lys}(\text{Mtt}) - \text{OH}$ アミノ酸 (5 当量) を、コリジン (14 当量) の存在下にジクロロメタン 1 ml に可溶化しそしてトリホスゲン (1.65 当量) で 1 分間活性化する。次いで溶液を樹脂 (62 μ モル) に加えそして 30 分間にわたってカップリング反応を行う。樹脂を DCM、DMF で徹底的に洗浄しそしてエーテルで乾燥する。

【0089】

4) 線状トリペプチド、L4 及び L4a の前駆体の製造

ジペプチド - 樹脂コンジュゲート (62 μ モル) を、 $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (2 当量) で処理し、1850 : 100 : 50 の割合の DCM : AcOH (酢酸) : NMM (N - メチルモルホリン) の溶液 2 ml 中でアルゴン下に 6 時間可溶化する。反応を FT - IR 分光法により監視する。次いで、 $\text{HATU}[\text{O} - (7 - \text{アザベンゾトリアゾール} - 1 - \text{イル}) - 1, 1, 3, 3 - \text{テトラメチルウラニウムヘキサフルオロホスファート}]$ (4 当量)、 HO

10

20

30

40

50

At (7 - アザベンゾトリアゾール) (4 当量)、CuCl₂ (0.5 当量) 及びコリジン (9 当量) を、DMF 1.5 ml 及び DCM 600 µl に可溶化された H - Lys (Mtt) - OAl₁₁ アミノ酸 (5.8 当量) に加える。溶液を樹脂 (62 µmol) に加えそしてカップリング反応を 2 時間行う。樹脂を DMF、DCM、メタノールで徹底的に洗浄し、エーテルで乾燥しそして FT - IR 分光法によりチェックする。

【0090】

5) 環状ヘキサペプチド L4 及び L4a の製造

DMF 中の 25% ピペリジンによる Fmoc 基の脱保護 (2 × 15 分) の後、DMF 中の Bop (5 当量)、HOBt (5 当量) 及び DIEA (15 当量) で活性化された Fmoc - D - Ala - OH、Fmoc - Lys (Mtt) - OH 及び Fmoc - D - Ala - OH アミノ酸 (5 当量) を 1 時間にわたりカップリングさせる (各カップリングを 2 回繰り返す)。アリル基を Pd (Ph₃)₄ (2 当量) で開裂させ、1850 : 100 : 50 の割合の DCM : AcOH : NMM の溶液 2 ml 中にアルゴン下に 6 時間可溶化する。Fmoc 基を DMF 中のピペリジンの 25% 溶液で開裂させる (2 × 15 分)。遊離 N - 末端及び C - 末端を有する線状ヘキサペプチド - 樹脂誘導体を DMF / DCM 5 : 2 (2.1 ml) の溶液で HOAt (4 当量)、DIC (ジイソプロピルカルボジイミド) (4.4 当量) の存在下に 3 時間にわたって環化させる。Mtt 基を 85% DCM、10% TIS、5% TFA の溶液 (2 ml) で開裂させる (3 × 2 分)。DMF 中の Bop (15 当量)、HOBt (15 当量) 及び DIEA (45 当量) で活性化された Fmoc - Ahx - OH (H - Ahx - OH : 6 - アミノヘキサン酸)、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Tyr (tBu) - OH、Fmoc - Gly (tBu) - OH 及び Fmoc - Lys (Boc) - OH アミノ酸 (15 当量) を 1 時間にわたりカップリングさせる (各カップリングを 2 回繰り返す)。環状ペプチドを 90% TFA、5% H₂O、5% TIS の溶液 (3 ml) で 2 時間にわたって樹脂から開裂させる。開裂を同じ条件下に 3 時間にわたって二回目を繰り返す。冷エーテルからの沈殿の後、生成物 L4 及び副生物 L4a の両方が得られ、次いでこれを H₂O / アセトニトリル / 酢酸混合物 (80 / 15 / 5) において凍結乾燥させる。生成物を質量分光法 (MALDI - MS) 及び分析 HPLC によりチェックし、そして水中のアセトニトリルの勾配を使用して C18 カラムでの分取 HPLC により精製しそして分離する。

【0091】

E) 化合物 L7 の製造

リガンド L7 は下記式 :

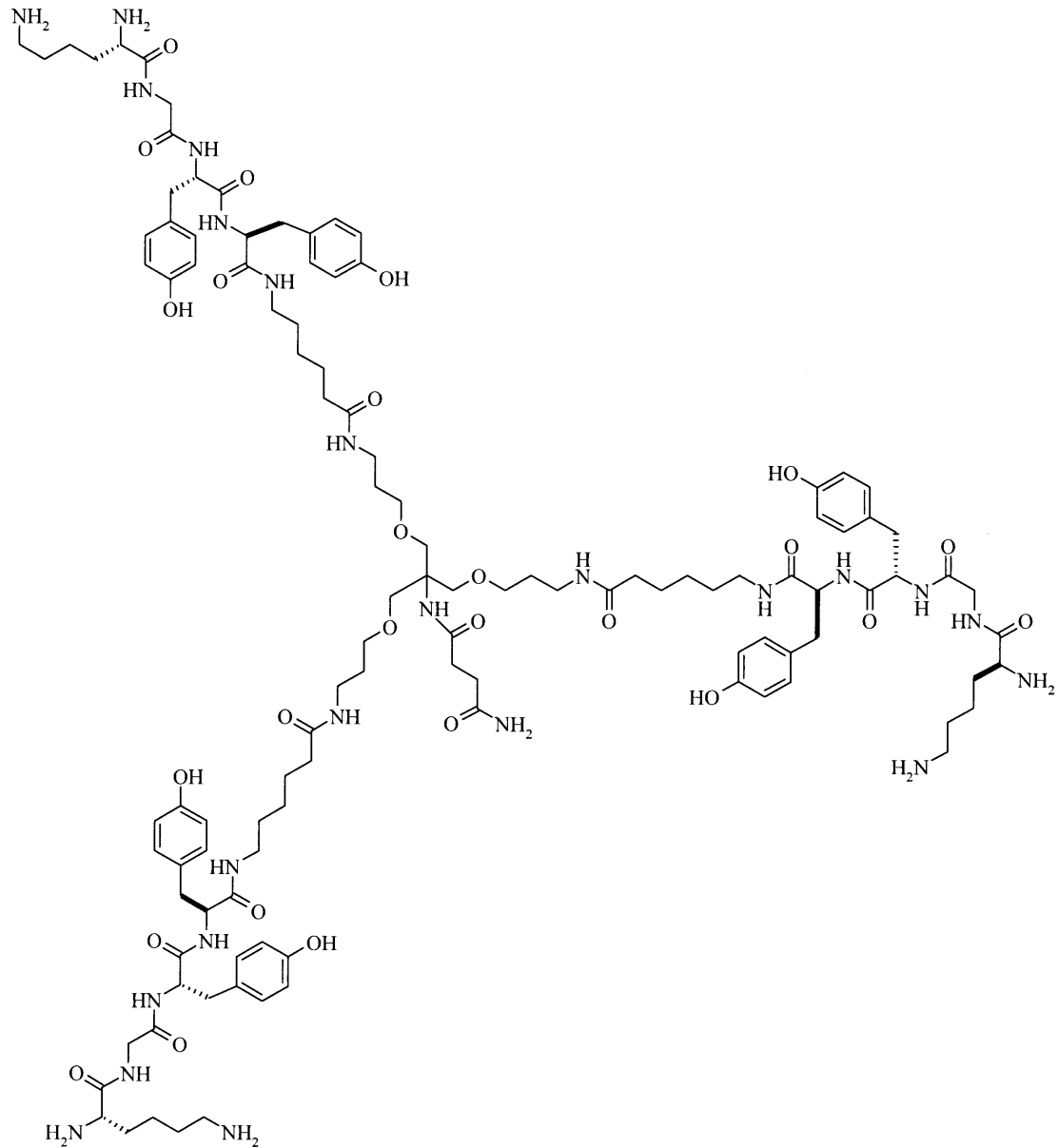
【0092】

10

20

30

【化 18】



10

20

30

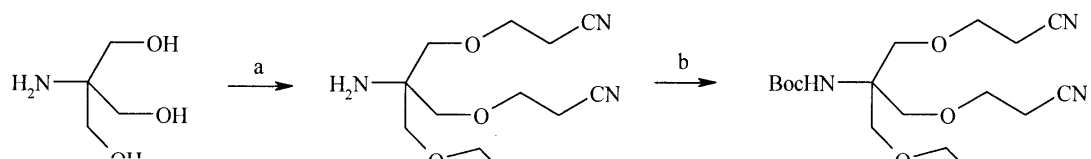
に相当する。

【0093】

反応略図：モノマー 6（中間生成物）の製造

【0094】

【化 19】



40

【0095】

a . 2 g (1 当量) のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 1 を攪拌下に T H F に溶解しそして 4 0 % 水性 K O H を加え、次いでアクリロニトリル 4 . 3 4 ml (4 当量) を加えた。反応混合物を攪拌しながら周囲の温度に 2 4 時間維持した。T H F の部分を蒸発させた後、水を加え、次いでジクロロメタン (D C M) により抽出を行い、次いで硫酸ナト

50

リウム上で乾燥した。溶媒を蒸発により除去した後、粗生成物 2 が得られた。それを次いでクロマトグラフィー（E A / H E X / M e O H = 3 . 5 / 3 . 5 / 1 ）により精製した。質量：2 . 5 g ；収率：5 4 %。

【 0 0 9 6 】

b . 2 g (1 当量) の化合物 2 を攪拌しながら T H F に溶解し、そして氷浴で冷却した。(B o c) ₂ O の 2 . 1 4 g (1 . 5 当量) を他のフラスコ中の T H F に溶解し、次いでこれを、反応媒体に D I E A の 2 . 3 m l (1 . 5 当量) を加えた後、反応媒体にゆっくりと加えた。反応媒体を攪拌しながら一夜周囲の温度に保った。T H F の部分を蒸発させた後、酢酸エチルを加え、次いで K H S O ₄ (1 N) H ₂ O 、 N a H C O ₃ (飽和 (s t)) 及び N a C l (飽和 (s t)) で逐次洗浄した。次いで生成物 3 をクロマトグラフィー (D C M / E A = 1 0 / 1) により精製した。重量：2 . 3 9 g ；収率：7 1 %。

10

【 0 0 9 7 】

c . 化合物 3 を M e O H / C H C l ₃ (5 5 / 1) に溶解した。1 0 % P t O ₂ を加え、次いでフラスコを水素でフラッシュしそして一夜水素雰囲気下に維持した。ろ過しそして溶媒を蒸発させた後、化合物 4 が得られそして真空下に乾燥した。

【 0 0 9 8 】

d . 化合物 4 を攪拌しながら水に溶解した。N a H C O ₃ の 6 当量を粉末の形態で加えた。F m o c O S u の 3 . 6 当量を T H F に溶解しそして反応混合物に加えた。反応を 4 時間続け、次いで T H F を蒸発させた。残りの混合物を D C M で抽出し、次いで有機相を 1 N の K H S O ₄ 溶液で洗浄した。硫酸ナトリウム上で乾燥した後、溶媒を蒸発により除去した。最終化合物をクロマトグラフィー（酢酸エチル / ヘキサン / 酢酸 = 3 / 7 / 0 . 5 ）により精製した。

20

【 0 0 9 9 】

e . 化合物 5 を 3 0 分間攪拌しながら純粋な T F A に溶解し、次いで T F A を蒸発により除去して化合物 6 (モノマー) を生成させた。最後の 2 つの工程の全体の収率は 7 3 . 3 % であった。

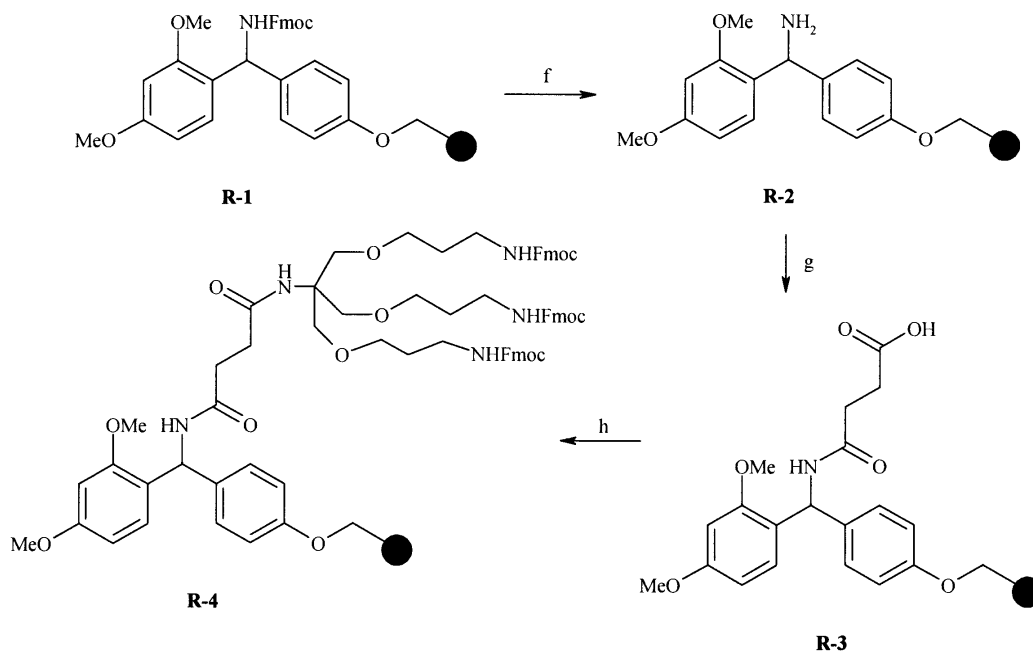
【 0 1 0 0 】

樹脂上での反応を攪拌しながら注射器で行った。

【 0 1 0 1 】

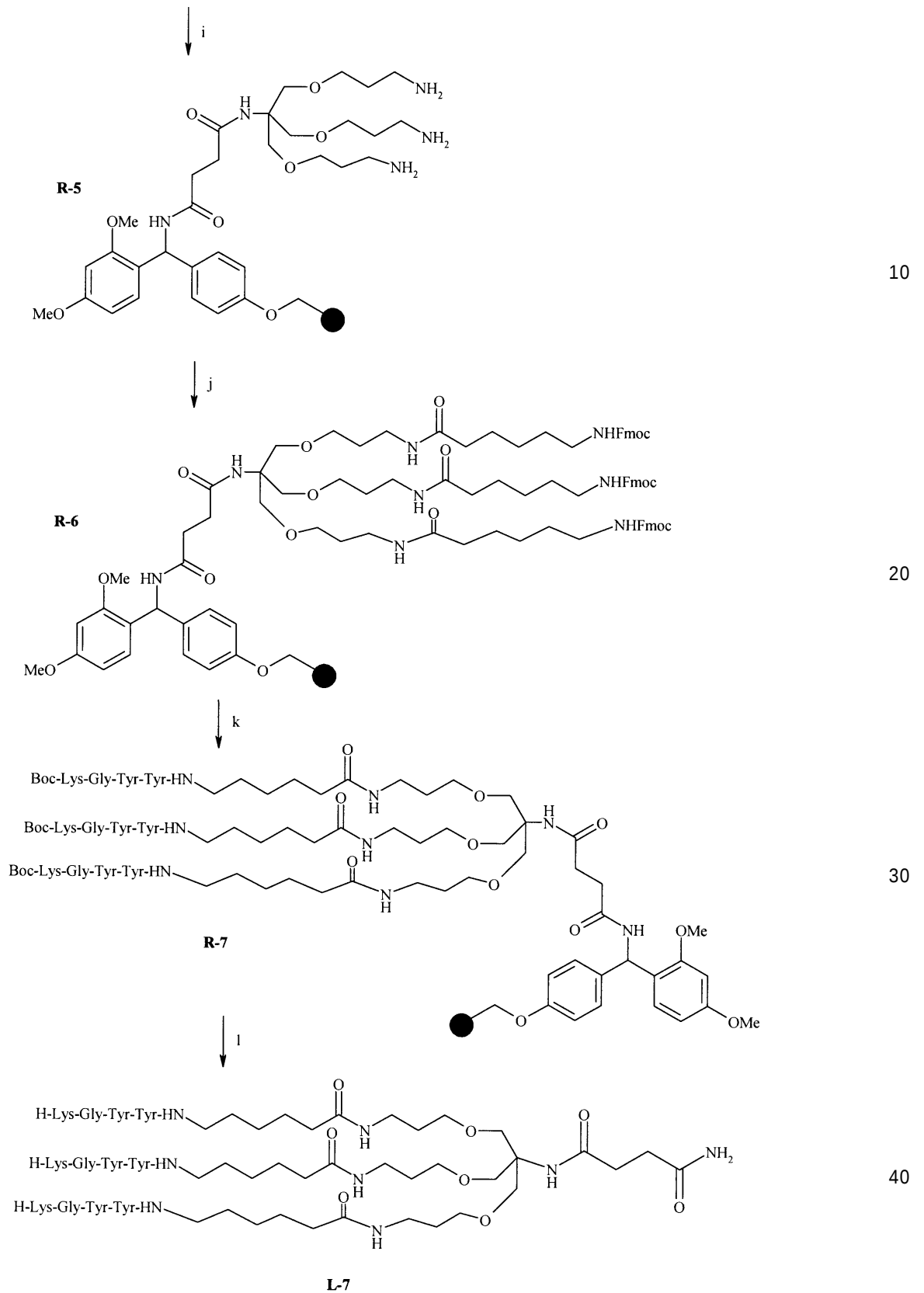
【 化 2 0 】

30



40

50



【 0 1 0 2 】

f . R i n k アミド樹脂 R - 1 を 0 . 6 2 ミリモル / g の添加量で、ジメチルホルムアミド (D M F) 中で膨潤させた。F m o c 基を 2 5 % ピペリジン / D M F により除去した。反応を各回 2 0 分で 2 回行った。

【 0 1 0 3 】

g . 樹脂 R - 2 を D C M 中で膨潤させ、そしてコハク酸 1 0 当量及びピリジン 1 当量を加

えた。ニンヒドリン試験がネガティブとなるまで反応を続けた。樹脂をろ過しそしてDCM及びDMFで洗浄した。

【0104】

h. 樹脂R-3をDMF中で膨潤させ、次いで化合物6（モノマー1）6当量、BOD（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスファート）5当量、Hobt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）5当量及びDIEA（ジイソプロピルエチルアミン）15当量を順次に加えた。6時間後、樹脂をろ過しそしてDME、DCM、エーテルで洗浄し、そして真空下に乾燥してR-4を生成させた。添加量はフルオレニル基の定量的紫外線アッセイの後0.24ミリモル/gであり、そして全体の転化率は84%である。

10

【0105】

i. Fmoc基を25%ピペリジン/DMFにより除去してR-5を生成させた。反応を各回20分で2回行った。

【0106】

j. 樹脂R-5をDMF中に膨潤させた。Fmoc-6-アミノカブロン酸の15当量、BOPの15当量、Hobtの15当量及びDIEAの60当量を加えそして4時間にわたってカップリングさせてR-6を生成させた。反応はニンヒドリン試験により確認された。

【0107】

k. Fmoc基を25%ピペリジン/DMFにより除去した。Fmoc-Xaa-OHの15当量、BOPの15当量及びHobtの15当量をDMFに溶解し、次いで溶液を、DIEAの60当量を加えた後、樹脂に加えた。各アミノ酸について、カップリング反応を各回30分で2回行った。最後に、樹脂R-7をニンヒドリン試験により確認した。

20

【0108】

l. 合成されたペプチドをTFA/H₂O（95/5）により30分間開裂させ、次いで樹脂をろ過した。溶液を回収しそして冷エーテルから沈殿させた。エーテルを除去した後、最終のペプチドL7を乾燥しそしてHPLCにより精製しそして質量分光法により分析した。

【0109】

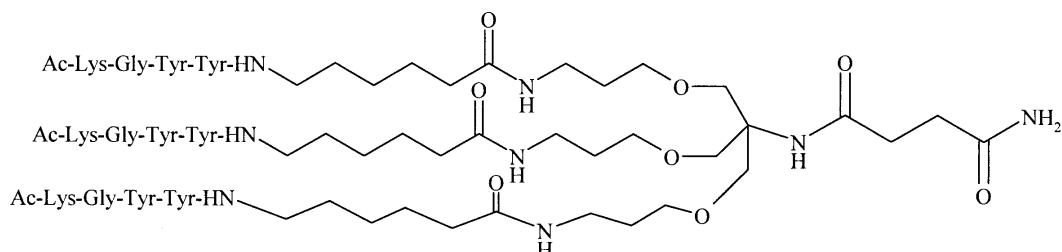
L-7類似体を同じ合成略図に従いしかしCD40との相互作用のためのペプチド配列を変えることにより合成した。

30

それは、構造L7-1

【0110】

【化21】

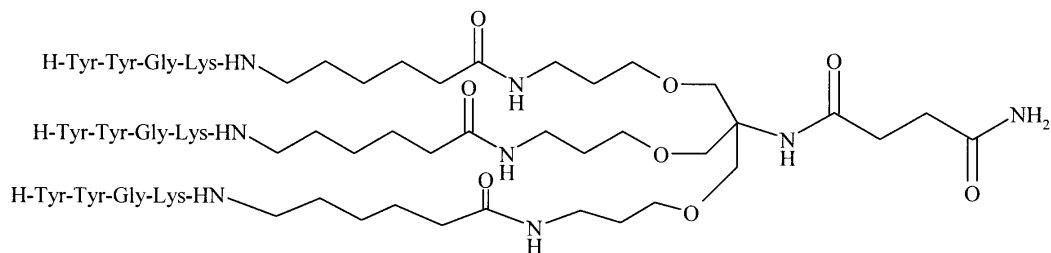


40

を生成するアセチル化された配列：Ac-Lys-Gly-Tyr-Tyr-であり、そして、構造L7-2

【0111】

【化 2 2】



【 0 1 1 2】

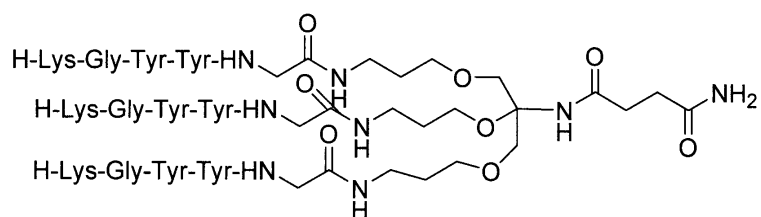
10

を生成する逆の配列：H - T y r - T y r - G l y - L y s - であり、

又はスペーサーアームの修飾：グリシンによるアミノヘキサン酸の置換：L 7 - 3

【 0 1 1 3】

【化 2 3】



L-7-3

20

【 0 1 1 4】

である。

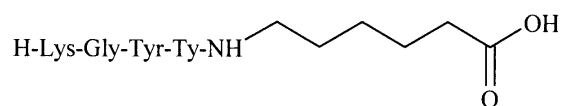
【 0 1 1 5】

F) 化合物 L 1 1 の製造

リガンド L 1 1 は下記式

【 0 1 1 6】

【化 2 4】



30

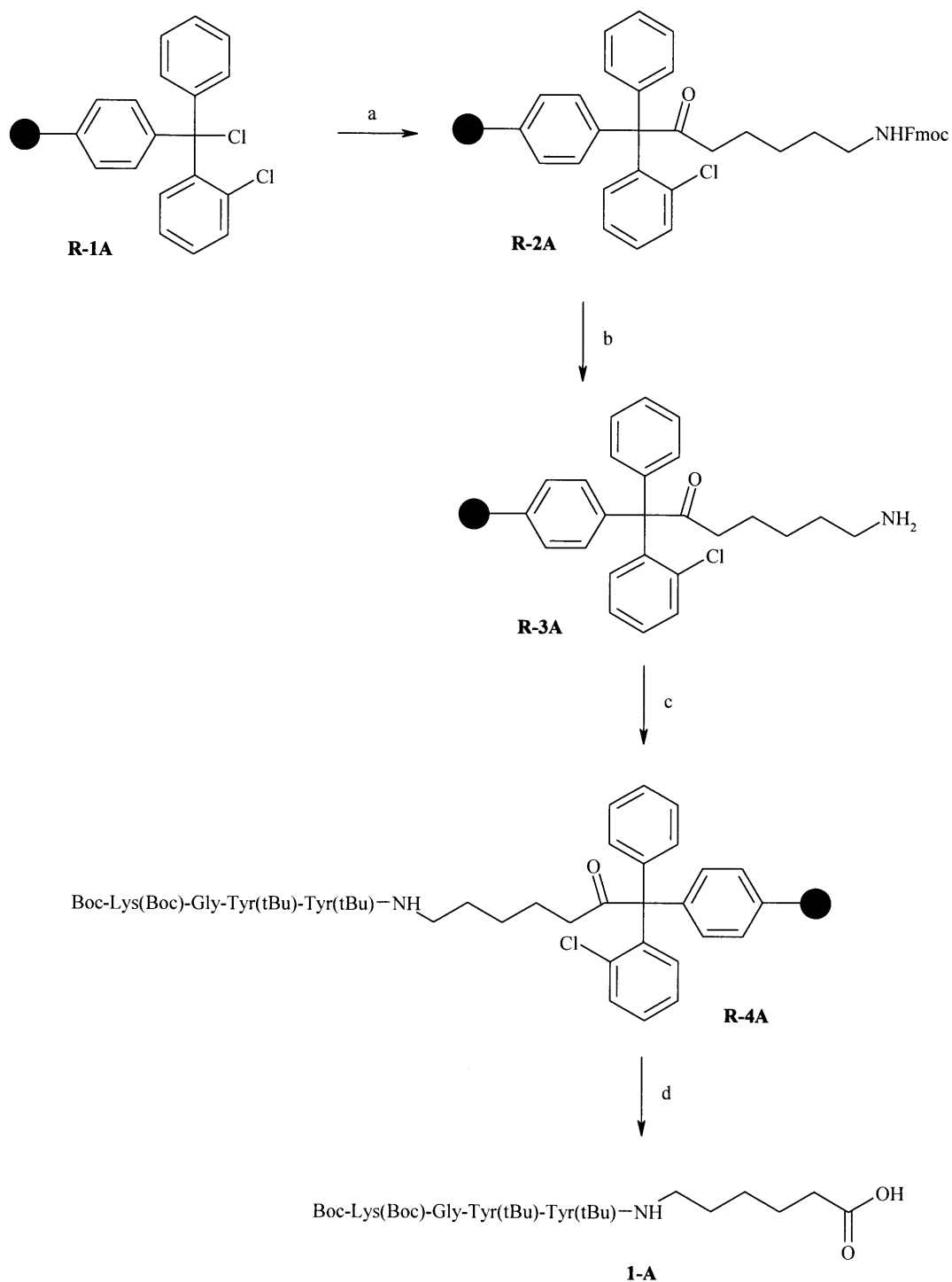
に対応する。

【 0 1 1 7】

反応略図

【 0 1 1 8】

【化 2 5】



【0119】

a) Fmoc-6-アミノカプロン酸、DIEA、DCM；b) 25%ピペリジン/DMF；c) Fmoc-Xaa-OH BOP、HoBt、DIEA、DMF；d) 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール/DCM (60/40)。

【0120】

1) 保護されたペントペプチド：Boc-Lys(Boc)-Gly-Tyr(tBu)-Tyr(tBu)-Ahx-OHの製造

樹脂上での反応を注射器中で攪拌しながら行った。

2-クロロトリチルクロリド樹脂(R1-A)(0.96ミリモル/g)1.5g(1当量)を注射器中で攪拌しながら蒸留されたDCMで2回洗浄した。DCM中のFmoc

10

20

30

40

50

- 6 - アミノカブロン酸 1.02 g (2 当量) 及び DIEA 1.5 ml (6 当量) の混合物を調製しそして樹脂に加えた。3 時間後、樹脂をろ過しそして DCM で洗浄した。それを再び攪拌しながら 1 時間メタノール中に膨潤させた。次いでそれをろ過しそして DMF、I p O H (イソプロパノール)、DCM、エーテルで洗浄した。次いでそれを真空下に乾燥して R - 2 A を生成させた。

【 0 1 2 1 】

樹脂 R - 2 A を 25 % ピペリジン / DMF の溶液で 20 分間処理し、次いで樹脂をろ過して R - 3 A を生成させそして溶液を回収した。反応を 2 回行った。樹脂 2 の添加量は回収された溶液の定量的紫外線アッセイにより 0.6 ミリモル / g でありそしてカップリング反応の転化率は 81 % であった。

10

【 0 1 2 2 】

アミノ酸のカップリングのための一般的方法：Fmoc - Xaa - OH の 5 当量、BOP の 5 当量及び HOBt の 5 当量を DMF に溶解し、次いで混合物を、DMF 中で予め膨潤された樹脂に加えた。DIEA の 15 当量を反応系に加えた。カップリング反応を各回 30 分間で 2 回行った。樹脂をニンヒドリン試験により試験した。

【 0 1 2 3 】

ペプチドの合成に必要なアミノ酸を用いてこれらの脱保護及びカップリングプロセスを繰り返したのち、樹脂 R - 4 A が得られた。

【 0 1 2 4 】

樹脂 R - 4 A を注射器に入れた。1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール及び DCM の混合物 (60 / 40) を樹脂に加えた。注射器を 2 時間攪拌下に維持し、次いで樹脂をろ過しそして溶液を回収した。溶媒を蒸発させた後、残りの生成物を冷エーテルから沈殿させ、次いで HPLC により精製して 1 - A を製造した。

20

【 0 1 2 5 】

2) ペプチド 1 - A を TEF で水及びトリイソプロピルシランの存在下に (95 : 5 : 5) 処理して L11 を生成させ、これを冷エーテルから沈殿させ、遠心し、凍結乾燥しそして逆相 HPLC (RP - HPLC) により精製した。

【 0 1 2 6 】

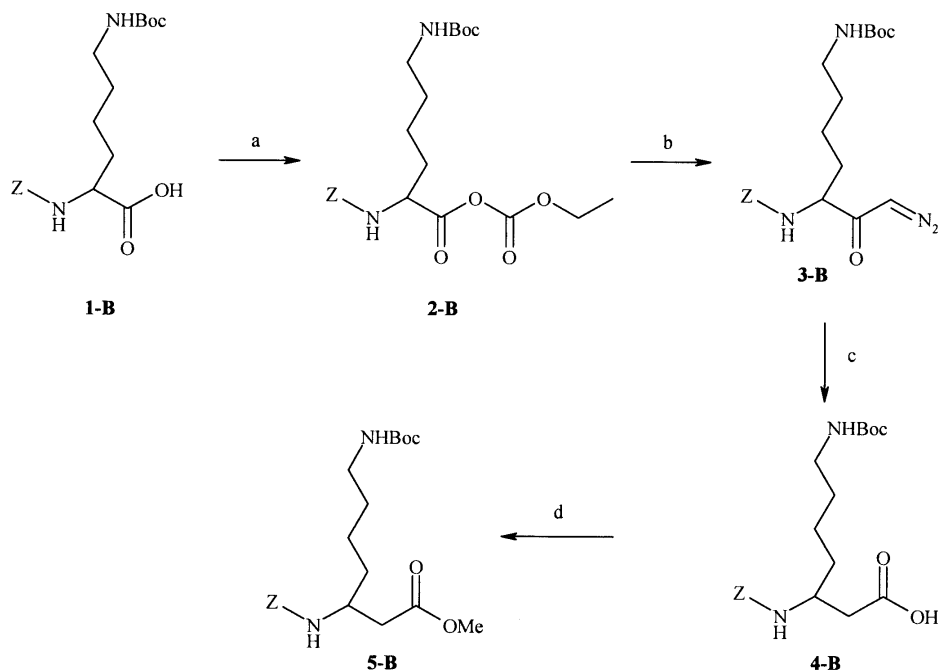
G) 化合物 L9 の製造

1) Z - β - Lys (Boc) - OH (4B) 及び Z - β - Lys (Boc) - OMe (5B) の製造

30

【 0 1 2 7 】

【化 26】



10

20

【0128】

a) EtOCOC1、NMM、THF; b) CH₂N₂/Et₂O; c) CF₃COOA
g、NMN、THF/10% H₂O d) ヨードメタン、K₂CO₃、アセトニトリル
a) Z-Lys(Boc)-OHの40ミリモル(1当量)を攪拌しながらTHFの100ml中に溶解した。NMNの5.27ml(1.2当量)を加え、次いで反応混合物を-20℃に冷却した。クロロギ酸エチルの4.59ml(1.2当量)をTHFの30mlに溶解し、次いで混合物を反応系に滴下により加えた。2-Bを含有する反応混合物を更に20分間冷たく保った。

【0129】

b) ジアゾメタンの製造

KOHの7.76gを水12.5ml、エーテル10ml及び2-(2-エトキシエトキシ)エタノール35mlの混合物中に攪拌しながら溶解し、次いで75℃で加熱した。ジアザルド(N-メチル-N-ニトロソ-p-トルエンスルホンアミド; Aldrich)15.52gをエーテル140mlに溶解しそして混合物を反応混合物に滴下により加えた。このようにして生成されたジアゾメタンをアセトン中の氷浴中で-75℃で凝縮させた。このようにして製造されたジアゾメタンのエーテル溶液を2-Bの反応溶液に加え、次いで反応混合物を一夜周囲の温度に維持した。エチルアミン(EA)1mlを加え、次いで多量のNaHCO₃(飽和(st))を加えた。有機相と水性相との分離の後、有機相をNaHCO₃で2回及びNaCl(飽和(st))で1回洗浄した。硫酸ナトリウム上で乾燥した後、溶媒を蒸発させ、そしてこのようにして製造されたジアゾケトン3-Bを真空下に乾燥した。質量: 15.4g; 収率: 95%。

30

40

【0130】

c) 転移反応

ジアゾケトン3-B、7g(1当量)をTHFの110mlと水18mlの混合物中に光の不存在下に攪拌しながら溶解し、そして混合物を-20℃に冷却した。安息香酸銀435mg(0.11当量)及びトリエチルアミン6.07ml(2.5当量)を加えた。反応混合物を暗所で一夜周囲の温度に維持した。THFの部分を蒸発させ、エーテル20mlを加え、それをNaHCO₃で数回抽出した。水性相と一緒にしそしてKHSO₄粉末によりpH3に酸性化した。溶液をDCMで抽出しそして硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を蒸発させた後、4最終生成物4-Bを真空下に乾燥した。質量: 5g; 収率: 73%。

50

【 0 1 3 1 】

d) 先に得られたβアミノ酸4-B 67 g (1当量)をアセトニトリルに溶解しそして混合物を氷浴により0℃に冷却した。1時間後ヨードメタン1.32 ml (5当量)を加えた。反応混合物を一夜周囲の温度に維持した。アセトニトリルを蒸発させそして酢酸エチルを加え、これをNaHCO₃ (飽和 (s t))、KHSO₄ (1 N) 及びNaCl (飽和 (s t)) により順次に洗浄した。有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥しそして溶媒を蒸発により除去して5-Bを製造した。質量: 1.53 g; 収率: 88%。

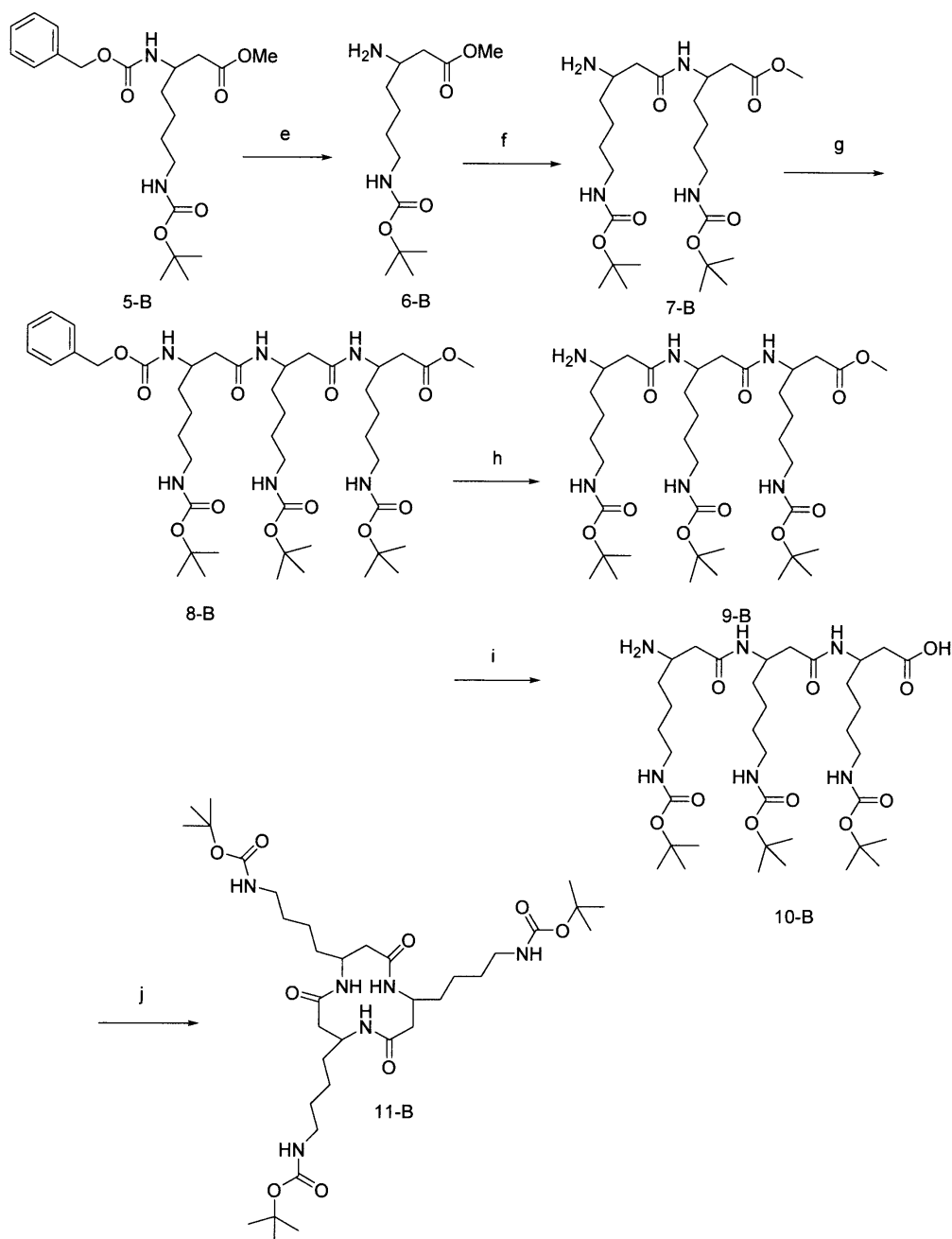
【 0 1 3 2 】

2) 保護されたコア分子の構成

反応略図

【 0 1 3 3 】

【 化 2 7 】



【 0 1 3 4 】

e) 化合物5-Bの765 mg (1当量)を攪拌しながらエタノール中に溶解し、そしてPd/Cの10% (重量)を加えた。フラスコを水素で3回フラッシュしそして水素雰囲気

10

20

30

40

50

下に2時間維持した。ろ過後、溶媒を蒸発により除去しそして残りの生成物6-Bを真空下に乾燥した。質量：400mg；収率：98%。

【0135】

f) 化合物4-Bの657mg(1当量)を攪拌しながらDMFの3mlに溶解し、次いで化合物6-Bの40mg(1.1当量)、BOPの738mg(1当量)及びDIEAの726μl(2.5当量)を順次に加えた。2時間後、反応混合物をNaHCO₃(飽和(st))から沈殿させた。ろ過後、固体をH₂O、KHSO₄及びNaCl(飽和(st))で洗浄し、次いで真空下に乾燥した。質量：1g；収率：84%。この化合物をMeOH中で水素化して定量的収率で7-Bを製造した。

【0136】

g) 化合物4-Bの1当量を攪拌しながらDMFの3mlに溶解し、次いで化合物7-Bの1.1当量、BOPの1当量、DIEAの2.5当量を順次に加えた。2時間後、反応混合物をNaHCO₃(飽和(st))から沈殿させた。ろ過後、固体をH₂O、KHSO₄、NaCl(飽和(st))で洗浄し、次いで真空下に乾燥して生成物8-Bを製造した。

【0137】

h) 化合物8-Bの100mgを攪拌しながらメタノールに溶解しそして10%のPd/C(重量)を加えた。フラスコを水素で3回フラッシュしそして水素雰囲気下に2時間維持した。ろ過後、溶媒を蒸発により除去しそして残りの生成物を真空下に乾燥して9-Bを製造した。質量：78mg；収率92%。

【0138】

i) 化合物9-Bの78mg(1当量)の化合物9-Bをメタノールに溶解し、次いで水性2N NaOHの10当量を加えた。反応を薄層クロマトグラフィーTLC(溶媒：酢酸エチル/ピリジン/酢酸/水)により監視した。反応の終わりに、メタノールを蒸発させそして水を加えた。混合物を酢酸によりpH3に酸性化しそして沈殿を形成した。固体をろ過により回収しそして真空下に乾燥して10-Bを製造した。質量：50mg；収率：65%。

【0139】

j) 化合物10-Bの50mg(1当量)をDMFの3mlに溶解しそしてDIEAの42μl(3.5当量)を加えた。BOPの36mg(1.2当量)を攪拌しながらDMFの3mlに溶解した。先に調製した溶液を滴下により加えた。反応混合物を2日間周囲の温度に維持し、次いでNaHCO₃(飽和(st))から沈殿させた。沈殿を回収しそしてH₂O/KHSO₄及びH₂Oで洗浄し、次いで真空下に乾燥して11-Bを製造した。質量：37mg；収率76%。

3) コア分子の脱保護及びL-9の合成

【0140】

反応略図

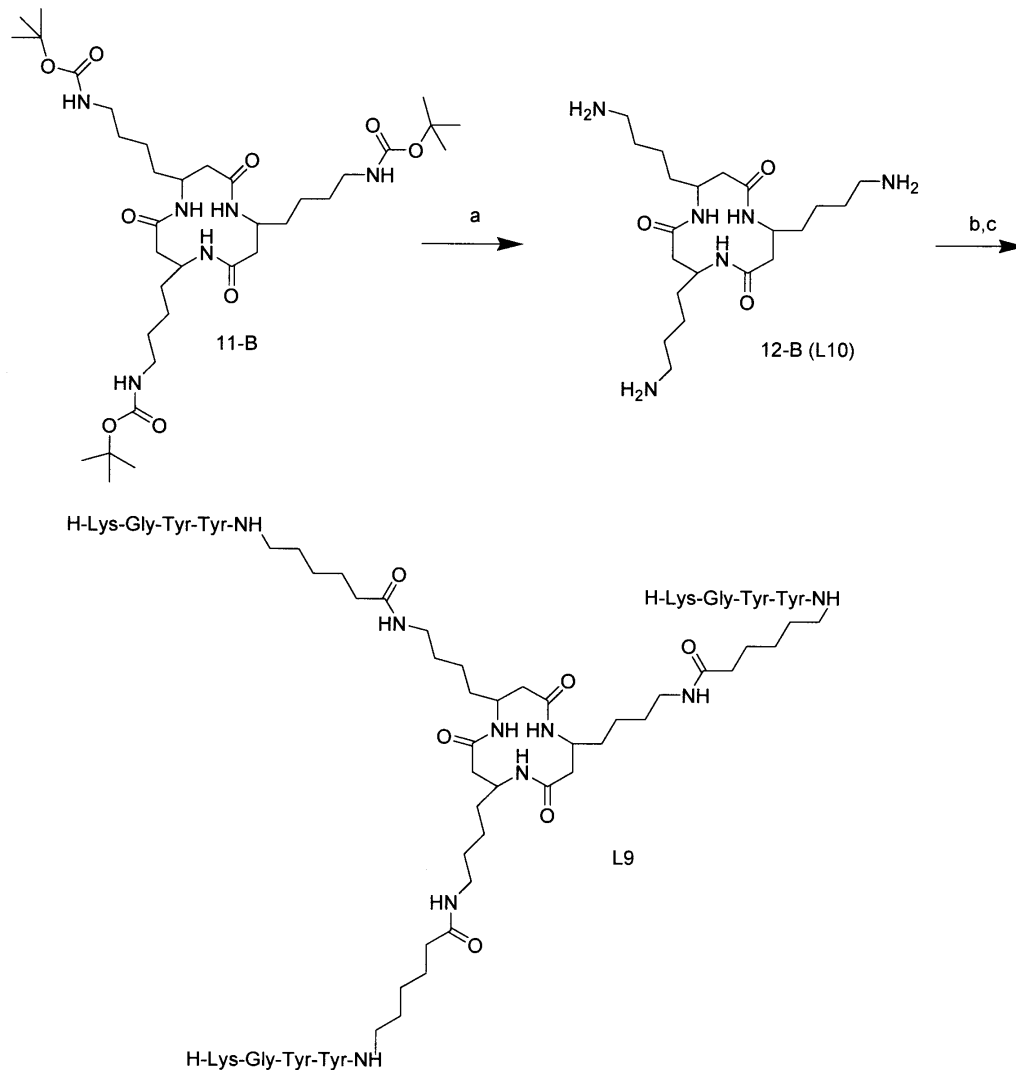
【0141】

10

20

30

【化 2 8】



10

20

30

【 0 1 4 2 】

a) 化合物 11-B の 50 mg (1 当量) を攪拌しながら 30 分間 TFA に溶解し、次いで TFA を蒸発により除去した。生成物を真空下に乾燥して 12-B (L-10 と呼ばれる) を製造した。

【 0 1 4 3 】

b) 化合物 12-B を攪拌しながら DMF に溶解した。上記した固相で合成されるペプチド 1-A の 217 mg (3.3 当量)、BOP の 100 mg (3.3 当量)、DIEA の 39.5 μ l (10 当量) を反応系に加えた。反応を 25 時間続け、次いで反応混合物を多量の NaHCO₃ (水性 (aq)) から沈殿させた。沈殿をろ過しそして H₂O / KHSO₄、H₂O 及びエチルアミン (EA) で洗浄した。固体を真空下に乾燥して 13-B を製造した。質量: 153 mg; 収率 69%。

40

【 0 1 4 4 】

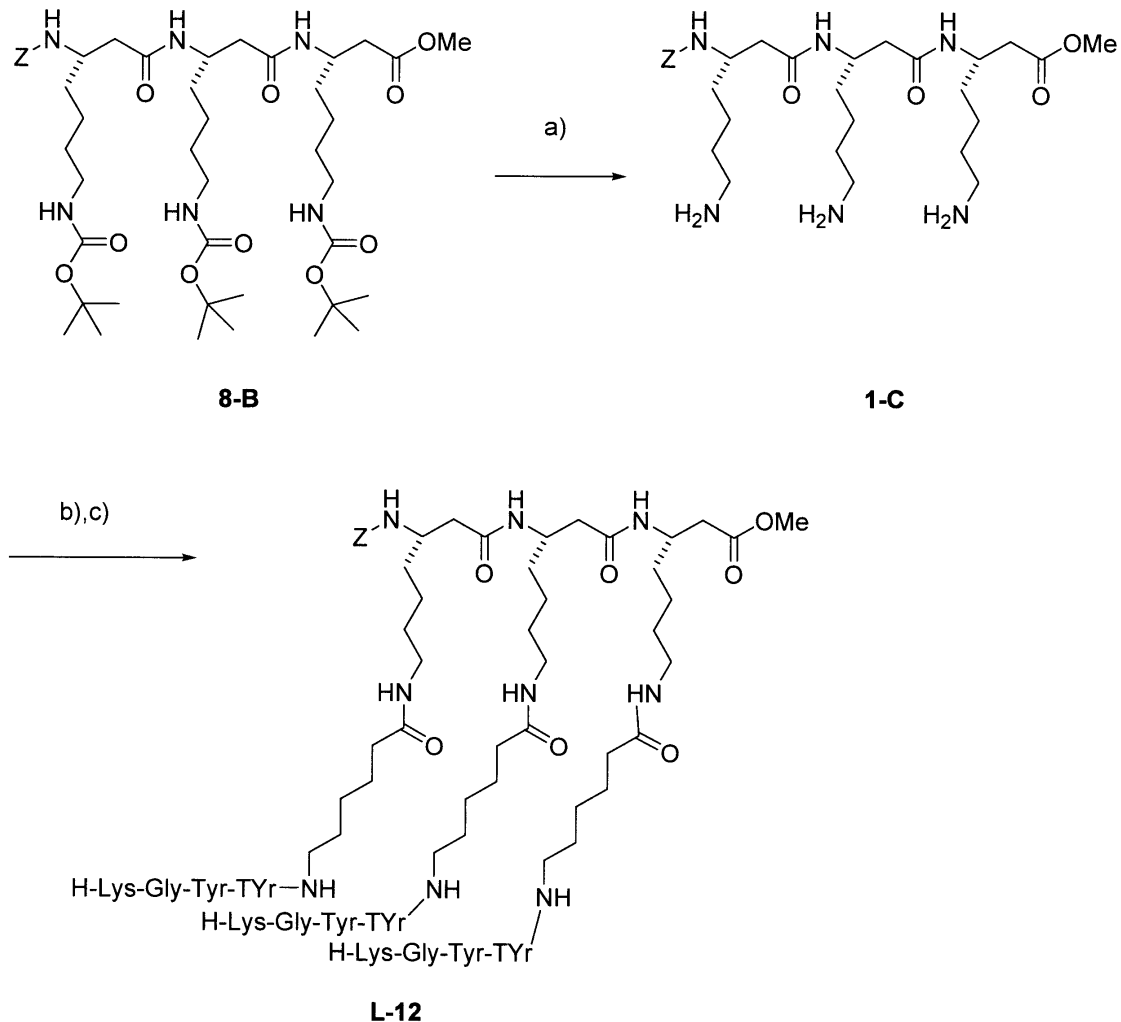
c) TFA により 13-B を処理して定量的収率で表題の化合物を製造した。純粋な化合物 L9 が RP-HPLC (逆相クロマトグラフィー) による精製により得られた。

【 0 1 4 5 】

H) L12 の製造

【 0 1 4 6 】

【化 2 9】



【 0 1 4 7】

a) 化合物 8 - B の 1 当量を攪拌しながら 30 分間 T F A に溶解し、次いで T F A を蒸発により除去した。生成物を真空中に乾燥して 1 - C を製造した。

【 0 1 4 8】

b) 化合物 1 C を攪拌しながら D M F に溶解した。上記した固相で合成されるペントペプチド 1 - A の 3 . 3 等量、B O P の 3 . 3 当量及び D I E A の 10 当量を反応系に加えた。反応を 25 時間続け、次いで反応混合物を多量の N a H C O ₃ (水性 (a q)) から沈殿させた。沈殿をろ過しそして H ₂ O / K H S O ₄、H ₂ O 及びエチルアミンで洗浄した。固体を真空中に乾燥して 2 - C を製造した。質量 : 153 mg ; 収率 69 %。

【 0 1 4 9】

c) 2 - C を T F A により処理して、定量的収率で化合物 L - 12 を生成させた。純粋な化合物 L - 12 が R P - H P L C クロマトグラフィーによる精製により得られた。

【 0 1 5 0】

生物学的試験

これらの試験を 3 つの段階で行う。最初に最も興味深いリガンドを簡単な試験により選び、次いでそれらの生理学的効果をインビトロ (i n v i t r o) で細胞活性化モデルにおいて試験する。最後に、最も興味深いリガンドをインビボ (i n v i v o) でネズミモデルで試験する。

【 0 1 5 1】

I - リガンドの選択

これらのリガンドの構造的完全性 (i n t e g r i t y) が分析されると、それらの結合を可溶

10

20

30

40

50

性又は膜CD40分子で試験する。これをするために、プラスチックに吸着されたCD40分子又は正常なもしくは形質転換されたB細胞（バーキットリンパ腫（Burkitt's lymphoma））により提示されたCD40分子に対する可溶性のCD40Lの結合の抑制。この段階はCD40/CD40L結合の可視化を可能とするELISA試験及びフローサイトメトリーラベリングを使用して評価する。

【0152】

次いで、CD40分子に対するこれらのリガンドのアフィニティをバイオセンサ（BIAcore登録商標）を使用して評価する。リガンドのアゴニスト又はアンタゴニスト効果を2つの簡単な生物学的試験を使用して試験した。最初に、形質転換されたB細胞（バーキットリンパ腫）による膜分子CD95の発現をCD40-CD40L相互作用による活性化（Schattner et al., 1996）の後調べる。このようなモデルにおいて、CD40Lパートナーをトランスフェクションされた繊維芽細胞（3T6-CD40L）（Buelens et al., 1997）上に発現させる。BL41バーキットリンパ腫細胞をトランスフェクションされていない3T6繊維芽細胞とインキュベーションする（図3A及び3C）か又はCD40Lによりトランスフェクションされた3T6繊維芽細胞とインキュベーションする（図3B及び3D）。48時間後、CD95の発現をフローサイトメトリーにより評価する。CD95の発現はCD40Lの存在下に誘発される（図3B）。市販の抗CD40L抗体はCD40-CD40L相互作用の結果を抑制する（図3D）。

【0153】

第2の試験は、膜CD40分子のブリッジング期間中増殖を停止しそしてアポトーシスに入るあるBリンパ腫の性質に基づいている（Tong et al., 1999）。この試験においては、BL41細胞をリガンドCD40とインキュベーションしそして24時間後これらの細胞の増殖の抑制を、トリチウム化されたチミジンの取り込みを調べることにより測定するか、又はアポトーシス細胞の百分率をフローサイトメトリー調査により測定する（図4A及び図4B）。

【0154】

リガンドのアゴニスト効果を、リガンドとB細胞のインキュベーションの後、又はフローサイトメトリーによるCD95の発現の測定、又は増殖の抑制の測定及び/又はアポトーシスによる死亡の増加の測定により評価する。

【0155】

異なる化学的リガンドの存在下におけるCD40Lにより誘発されたCD95の発現の減少の測定によりアンタゴニスト効果を評価する（表I）。これらの試験の助けにより、最も興味深いリガンドを選んで、より複雑なモデルにおいてインビボ及びインビトロでのそれらの活性を評価する。

【0156】

A) 生物学的試験の原理

1 - CD40Lにより誘発されるCD95の発現

リンパ腫B細胞は、それらが構成的方式で発現するCD40分子を介してシグナルを受け取るとき、CD95分子を発現する。このシグナルは他の細胞により発現されるCD40L（CD154）分子により一般に運ばれる。アンタゴニストリガンドはCD40Lに対するCD40の結合を抑制し、かくしてCD95の発現をまねる。アゴニストリガンドはCD40L分子を模倣しそしてCD40Lを発現する細胞の不存在下においてさえCD95の発現を誘発する。

【0157】

操作方法

BL41バーキットリンパ腫細胞（ 5×10^5 / ml）をCD40Lによりトランスフェクションされた3T6繊維芽細胞（ 10^5 / ml）（3T6-CD40L）又はCD40Lでトランスフェクションされていない3T6繊維芽細胞（3T6）の存在下に培養し、そしてマイトマイシンで処理してそれらの増殖を停止させる。リガンドを、選ばれた濃度で培養の開始時に加える。48時間の培養の後、CD95分子の発現をフローサイトメトリ

ーにより測定する。ＢＬ４１細胞は抗ＣＤ１９抗体（Ｂ細胞の特異的マーカー）を使用して繊維芽細胞から区別される。

【０１５８】

結果

３Ｔ６細胞の存在下に培養されたＢＬ４１細胞はＣＤ９５分子を発現しない（図３Ａ）。他方、ＣＤ９５の発現は３Ｔ６－ＣＤ４０Ｌ細胞の存在下にＢＬ４１細胞の表面で誘発される（図３Ｂ）。ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ相互作用をブロックする市販の抗ＣＤ４０Ｌ抗体は、３Ｔ６－ＣＤ４０Ｌ細胞の存在下にＢＬ４１細胞上に誘発されるＣＤ９５の発現を完全に抑制する（図３Ｄ）。

【０１５９】

ＣＤ９５の発現は１００及び５０μＭのリガンドＬ１により抑制される（表Ⅰ）。Ｌ１と同じコア構造を有するが異なるアミノ酸配列を有するリガンドＬ３は、１００～２５μＭでＣＤ４０Ｌにより誘発されるＣＤ９５の発現を大きく抑制する。リガンドＬ１及びＬ３のコア構造に相当するリガンドＬ２は、ＣＤ９５の発現に対する効果を持たない。Ｌ３と同じペプチド配列を有する分岐状コア構造により構成されたりガンドＬ７は、ＣＤ４０Ｌにより誘発されるＣＤ９５の発現に対する効果を持たない。他方、ＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ界面によく似たペプチド配列の３つの例を有する環状コア構造を有するリガンドＬ４は、５０～０．５μＭの濃度の範囲でＣＤ４０Ｌにより誘発されるＣＤ９５の発現を抑制する。ゆえに、その活性は、同じペプチドを有する線状リガンド（Ｌ３）の約１０倍大きい。１０μＭの濃度で最大の抑制が得られ、５０μＭの濃度は実質的な細胞死亡状態（cell mortality）を誘発することに留意することは興味深い（パート２参照）。同じコア分子により構成されているがＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ界面によく似たペプチド配列の２つの例しか有していないリガンドＬ４aは、ＣＤ４０Ｌにより誘発されるＣＤ９５の発現を極めて弱くしか抑制しない。

【０１６０】

【表２】

表Ⅰ

下記のリガンドによる処理の後ＣＤ４０Ｌにより誘発される
ＣＤ９５の発現の抑制の％

	L1	L2	L3	L4	L4a	L7
100 μM	60	0	60			
50 μM	43	0	62	22	13	0
25 μM	0	0	25			
10 μM			13	40		
5 μM			0	36	8	0
0,5 μM				19	0	0

【０１６１】

２－ＣＤ４０ＬによるＢリンパ腫のアポトーシスの誘発

ある種のＢリンパ腫は、それらのＣＤ４０分子が抗ＣＤ４０抗体又はＣＤ９５分子とは独立に可溶性のＣＤ４０Ｌによりブリッジされると、アポトーシスに入る。このアポトーシスの誘発は、トリチウム化されたチミジンの取り込みにより測定される増殖の減少として発現される。ＣＤ４０のアゴニストリガンドはアポトーシスの増加を誘発しそして結果としてトリチウム化されたチミジンの取り込みの減少を誘発するであろう。

【０１６２】

操作方法

B L 4 1 パーキットリンパ腫細胞 (4×10^5 / mL) を、選ばれた濃度の種々のリガンドの存在下に培養する。24 時間後、細胞をトリチウム化されたチミジン ($1 \mu\text{Ci}$ / ウエル) と 8 時間インキュベーションして増殖を測定するか、又はアネキシン V - F I T C 及びヨウ化プロピジウムで標識してフローサイトメトリーによりアポトーシス細胞の百分率を評価する。

【 0 1 6 3 】

結果

リガンド L 4 (環状構造コア + C D 4 0 - C D 4 0 L 界面によく似たペプチド配列の 3 つの例) は、可溶性 C D 4 0 L 分子と同様に B L 4 1 細胞の増殖を大きく抑制する。しかしながら、リガンド L 7 (L 4 と同じペプチド配列を有する分岐状コア構造) 及びその誘導体 L 7 - 1、L 7 - 2 及び L 7 - 3 は B L 4 1 細胞の増殖に対する少しの効果を持つか又は効果を持たない (図 4 A)。

【 0 1 6 4 】

この増殖の抑制は、リガンド L 4 ではアポトーシスの強い増加を伴うが、リガンド L 4 a (環状コア構造 + ペプチド配列の 2 つの例) は非常に弱いアポトーシスを誘発する。単一コア構造により構成されたリガンド L 8 及び単一ペプチド配列により構成されたリガンド L 11 は B L 4 1 細胞のアポトーシスによる死に対する効果を持たない (図 4 B)。

【 0 1 6 5 】

同じペプチド配列の 3 つの例を有するリガンド L 4 のコア構造とは異なる環状コア構造により構成されるリガンド L 9 はまさに強く B L 4 1 のアポトーシスを誘発する (図 4 B)。

【 0 1 6 6 】

結論として、リガンド L 4 及び L 9 はアゴニスト活性を有しておりそして C D 4 0 L によく似ている。

【 0 1 6 7 】

B) C D 4 0 及び C D 4 0 L 及びリガンド L 1 ~ L 12 間の相互作用の調査

方法の原理

B i a c o r e 3 0 0 0 は、表面プラズモン共鳴に基づいて 2 つの分子間の相互作用を調べることができる装置である。それはリアルタイムでの測定を可能とし、それゆえアナライト (注入された溶液である) とリガンド (測定を支持するマイクロチップに固定化された) の相互作用 (会合及び解離) の動力学を監視することを可能とする。アナライトの種々の濃度での動力学的測定はリガンドとアナライトとの相互作用のアフィニティ定数の計算を可能とする。マイクロチップは異なる測定のための 4 つのセルを含有し、これは、適切ではないが (調査されるリガンドとのアフィニティを持たないタンパク質) リガンドに類似したタンパク質が固定化されている参照セルと、リガンドが固定化されているセルとの直接の比較を可能とする。

【 0 1 6 8 】

操作方法

マウス免疫グロブリンの定常部に向けられたウサギ抗体をマイクロチップに固定化した。参照セルにおいては、40 nM のアイソタイプ I g G 2 a (L G 1 1 2) のモノクローナルマウス抗体が $5 \mu\text{L}$ / 分の流量で 2 分間固定化され; リガンドのセルでは、マウス I g G 2 a 重鎖の定常部と会合した組換え C D 4 0 (ヒト C D 4 0 m u I g 融合タンパク質、ANCELL Corporation, Bayport, MN) を同じ条件下に固定化させる。

【 0 1 6 9 】

2 つのセル (参照及びリガンド) において、種々の濃度の C D 4 0 L (ヒト C D 1 5 4 m u C D 8 融合タンパク質、ANCELL Corporation) 又は $1 \mu\text{M}$ もしくは 125 nM の濃度の C D 4 0 L を、種々の濃度のリガンドの存在下に、アナライトとして注入する。アナライトの存在下の流量は会合を調べるのには $10 \mu\text{L}$ / 分で 5 分間であり、そしてアナライト

10

20

30

40

50

の不存在下では、解離を調べるのに条件は同じである。

【0170】

セルを再生する（即ち、非共有結合で吸着されたすべてのタンパク質を除去する）ために、10mMのHClの溶液を5μL/分で1分間注入する。次いでセルを他の分析のために準備する。

【0171】

結果

CD40に対するCD40Lのアフィニティー定数を調べるために、62.5～500nMの4つの濃度のCD40Lを使用する。平衡定数を54nMで計算する。

【0172】

L1との会合を調べるために、アナライトを1μMのCD40L及び50μMのL1により構成した。相互作用の最初の数秒間は抑制が観察されるけれども、それは5分の会合期間中に消失し、L1の平衡定数の計算を不可能にする。ゆえに、これは50μMより大きい。

【0173】

L3の会合は125nMのCD40Lの存在下に調べた。2.5μMのL3の存在下の動力学的分析は10μMのL3の平衡定数を生じた。

【0174】

L4、L7（及びその誘導体の）、L8、L9、L11及びL12の会合を100nMのCD40Lの存在下に調べた。L4及びL9分子のみはCD40に結合しそしてCD40Lを追いだした。40及び80nMのL4の存在下の動力学的分析は、180nMのL4の平衡定数を生じた。リガンドL4は80nMでCD40Lの結合の50%を抑制した（IC50）。同じ条件下に試験されたリガンドL9は、50nMより小さいIC50を有し、ゆえにその平衡定数はL4の平衡定数より小さい。L9の線状バージョンである分子はCD40に結合しないことに留意することは興味深い。これらの結果は、活性なCD40リガンドの概念は、十分に堅固で（rigid）且つC3対称性を有するコア分子（一般式：A-X_nにおけるA）の使用を必要とすることを示唆する。

【0175】

II - インビトロでのモデルにおけるリガンドの試験

ヒト単球からインビトロで分化された未成熟樹状細胞は、それらの成熟を誘発するCD40Lに対して非常に感受性である。この成熟は、（i）深い表現型転移（profound phenotype rearrangements）、（ii）サイトカイン及びケモカインの分泌、（iii）CD95により媒介されるアポトーシスに対する抵抗（Koppi et al., 1997; Bjorck et al., 1997）、（iv）増加した樹状細胞寿命（Miga et al., 1997）及び（v）成熟樹状細胞の同種Tリンパ球を刺激する明らかに増加した能力を伴う。CDsに対するこれらのリガンドの効果を調べる。最初に、可能性のある（potential）アゴニストリガンドの未成熟CDsの表現型を修飾する能力をフローサイトメトリーにより調べる。この調査は、ELISA試験を使用して、アゴニストリガンドによるサイトカインの分泌の開始を証明することを追求することにより続けられる。最後に、この調査はアゴニスト分子の存在下に予備インキュベーションされたCDsの同種T細胞を刺激する能力を調べることにより完了する。アンタゴニストリガンドの効果は、アンタゴニスト分子の存在下にCDsを予備インキュベーションすることにより観察される、CD40Lにより普通に誘発される変化の減少の測定により評価される。リガンドの効果は、（i）サイトカインの存在下にCD40による扁桃腺のB細胞の活性化によりインビトロで模倣されうるBリンパ球のクラスのスイッチ及び（ii）CD40により活性化された樹状細胞及び前駆細胞障害性T細胞の共インキュベーションにより模倣されうる細胞障害性Tリンパ球の分化に関して試験することもできる。

【0176】

III - インビボでのモデルにおけるリガンドの試験

リガンドL4及びL9はアゴニストであることが示されたが、それらは我々の分子の治

10

20

30

40

50

療効果を試験するための興味深い結果を示す。全身性エリテマトーデスはCD40 - CD40L相互作用の重要性が十分に証明されている全身性自己免疫疾患である。アゴニスト抗CD40抗体による狼瘡性マウス (lupic mice) の処理は、狼瘡疾患を顕著に促進する。種々のリガンドのインビボでの効果を試験するために、我々はヒト全身性エリテマトーデスのような症状を示す狼瘡疾患を自然に発生するマウスにそれらを注入した。我々は疾患の発生に対するリガンドの効果を調べた。

【0177】

操作方法

プレ自己免疫 (preautoimmune) MRL - ^l P^r マウス (Koopman et al., 1988) (5週齢) に、リガンドL4の100 µgを含有するPBS又は含有しないPBSをマウス当り100 µLで静脈内経路により注入する。注入を2週間間隔で2回繰り返す。これらのマウスの血清を後方眼窩 (retro-orbital) 出血により定期的にサンプリングする。狼瘡疾患の発生は、尿中のタンパク尿の測定、ELISA試験による血清中の抗DNA抗体の存在の測定及びマウスの生存率により監視される。これらの2つのマーカーはMRL - ^l P^r マウスにおける狼瘡疾患の発生の特徴である。

【0178】

結果

リガンドL4で処理されたマウスはPBSで処理されたマウスより有意に ($p = 0.0101$) より速く死ぬ (図5A)。この死亡の促進は、血清中の抗DNAのより早期の出現を伴い (図5B) そして尿中のタンパク尿のより早期の出現 (図5C) を伴い、死亡は明白に狼瘡疾患の促進によることを示す。これらの結果はリガンドL4がインビボでアゴニスト効果を有することを明らかに示す。

【0179】

10

20

【表 3】

参考文献

- Bjorck, P., Banchereau, J., Flores-Romo, L. (1997) CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells, *Int Immunol.*, **9**: 365-72,
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Goldman, M., Willems, F. (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10, *Eur J Immunol.*, **27**: 1848-52, 10
- Chaussabel, D., Jacobs, F., de Jonge, J., de Veerman, M., Carlier, Y., Thielemans, K., Goldman, M., Vray, B. (1999) CD40 ligation prevents *Trypanosoma cruzi* infection through interleukin-12 upregulation, *Infect Immun.*, **67**: 1929-34,
- Diehl, L., den Boer, A.T., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Schumacher, T.N., Melief, C.J., Offringa, R., Toes, R.E. (1999) CD40 activation *in vivo* overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy, *Nat Med.*, **5**: 774-9, 20
- Howard, L.M., Miga, A.J., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., Laman, J.D., Noelle, R.J., Miller, S.D. (1999) Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis, *J Clin Invest.*, **103**: 281-90,
- Kaiser, E. et coll. (1970) *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598,
- Kikuchi, T., Moore, M.A., Crystal, R.G. (2000) Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors, *Blood*. **96**: 91-9, 30
- Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Jr., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., Swanson, S.J., Tadaki, D.K., TenHoor, C.N., White, L., Knechtle, S.J., Harlan, D.M. (1999) Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in non-human primates, *Nat Med.*, **5**: 686-93,
- Koopman W.J. and Gay, S. (1988) The MRL-*lpr/lpr* mouse. A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **75**, 284-289, 40
- Koppi, T.A., Tough-Bement, T., Lewinsohn, D.M., Lynch, D.H., Alderson, M.R. (1997) CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells, *Eur J Immunol.*, **27**: 3161-5,
- Locksley et al. (2001) *Cell*, **104**, 487-501,

- Lode, H.N., Xiang, R., Pertl, U., Forster, E., Schoenberger, S.P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (2000) Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4(+) T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction, *J Clin Invest.*, **105**: 1623-30,
- Miga, A.J., Masters, S.R., Durell, B.G., Gonzalez, M., Jenkins, M.K., Maliszewski, C., Kikutani, H., Wade, W.F., Noelle, R.J. (2001) Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions, *Eur J Immunol.*, **31**: 959-965, 10
- Schattner, E.J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D.H., Chadburn, A., Crow, M.K., Friedman, S.M. (1996) CD4⁺ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells, *Blood*, **88**: 1375-82,
- Sotomayor, E.M., Borrello, I., Tubb, E., Rattis, F.M., Bien, H., Lu, Z., Fein, S., Schoenberger, S., Levitsky, H.I. (1999) Conversion of tumor-specific CD4⁺ T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nat Med.*, **5**: 780-7,
- Tong, A. W., B. Seamour, J. Chen, D. Su, G. Ordonez, L. Frase, G. Netto, and M. J. Stone. 2000. CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma* **36**:543-558. 20

【図面の簡単な説明】

【 0 1 8 0 】

【図 1 A】三価 C D 4 0 - C D 4 0 L 複合体の分子モデルを示す。

【図 1 B】C D 4 0 との界面に位置しそして C D 4 0 との相互作用に必須である C D 4 0 L 残基を示す。星印を有する残基は界面を形成する第 2 C D 4 0 L サブユニットに属する。

【図 2】本発明の三量体リガンドの構造を示す。

【図 3 A】フローサイトメトリーにより測定された、C D 4 0 - C D 4 0 L 相互作用期間中の B L 4 1 バーキットリンパ腫細胞の表面における C D 9 5 の発現を示す。灰色の面は、イソタイプのコントロールを表わし、明灰色の曲線は細胞上で固定された抗 9 5 の量に比例した蛍光を表わす。図 3 A は、上記した B L 4 1 細胞 (5 . 1 0 ⁵ / ml) がトランスフェクションされていない 3 T 6 繊維芽細胞とインキュベーションされときの C D 9 5 の発現を示す。 30

【図 3 B】フローサイトメトリーにより測定された、C D 4 0 - C D 4 0 L 相互作用期間中の B L 4 1 バーキットリンパ腫細胞の表面における C D 9 5 の発現を示す。灰色の面は、イソタイプのコントロールを表わし、明灰色の曲線は細胞上で固定された抗 9 5 の量に比例した蛍光を表わす。図 3 B は、上記した B L 4 1 細胞 (5 . 1 0 ⁵ / ml) が C D 4 0 L によりトランスフェクションされた 3 T 6 繊維芽細胞とインキュベーションされときの C D 9 5 の発現を示す。 40

【図 3 C】フローサイトメトリーにより測定された、C D 4 0 - C D 4 0 L 相互作用期間中の B L 4 1 バーキットリンパ腫細胞の表面における C D 9 5 の発現を示す。灰色の面は、イソタイプのコントロールを表わし、明灰色の曲線は細胞上で固定された抗 9 5 の量に比例した蛍光を表わす。図 3 C は、上記した B L 4 1 細胞 (5 . 1 0 ⁵ / ml) が、抗 C D 4 0 L 抗体の存在下に、トランスフェクションされていない 3 T 6 繊維芽細胞とインキュベーションされときの C D 9 5 の発現を示す。

【図 3 D】フローサイトメトリーにより測定された、C D 4 0 - C D 4 0 L 相互作用期間中の B L 4 1 バーキットリンパ腫細胞の表面における C D 9 5 の発現を示す。灰色の面は、イソタイプのコントロールを表わし、明灰色の曲線は細胞上で固定された抗 9 5 の量に 50

比例した蛍光を表わす。図3Dは、上記したBL41細胞 (5×10^5 /ml) が、抗CD40L抗体の存在下に、CD40Lによりトランスフェクションされた3T6繊維芽細胞とインキュベーションされるときにCD95の発現を示す。

【図4A】種々の濃度のリガンド (L4、L7、L7-1、L7-2又はL7-3) 又は可溶性CD40L (sCD40L) の存在下に24時間の培養の後BL41パーキットリンパ腫細胞 (4×10^5 細胞/ml) のトリチウム化されたチミジンの取り込みの抑制を示す。黒の柱は50 μ Mに等しい濃度に相当し、水平ハッチングを有する柱は5 μ Mに等しい濃度に相当し、白色の柱は0.5 μ Mに等しい濃度に相当し、灰色の柱は100 nMに等しい濃度に相当し、そしてクロスハッチングされた柱は50 nMに等しい濃度に相当する。

トリチウム化チミジンを培養の最後の8時間に1 μ ci/ウエル (0.8×10^5 細胞/ウエル) の濃度に加えそしてトリチウム化チミジンの取り込みをガスシンチレーション β カウンターを使用して測定した。

【図4B】種々の濃度のリガンド (L4、L4a、L8、L7、L9及びL11) の存在下に24時間の培養の後BL41パーキットリンパ腫細胞 (4×10^5 細胞/ml) に特異的なアポトーシスの百分率を示す。黒の柱は50 μ Mに等しい濃度に相当し、白色の柱は25 μ Mに等しい濃度に相当し、水平ハッチングを有する柱は12.5 μ Mに等しい濃度に相当しそして、斜めのハッチングの柱は6 μ Mに等しい濃度に相当する。アポトーシスは、アネキシンV FITC及びヨウ化プロピジウムにより標識した後フローサイトメトリーにより測定する。アネキシンVのみ又はアネキシンV及びヨウ化プロピジウムで標識された細胞はアポトーシス性である (apoptotic) と考えられる。特異的なアポトーシスの百分率は、下記式 [(リガンドを用いた場合の%アポトーシス - リガンドなしの%アポトーシス) / (100 - リガンドなしの%アポトーシス)] $\times$ 100により計算される。

【図5A】リガンドL4、100 μ gを含有するPBS又は含有しないPBSをマウス当り100 μ Lを静脈内注入した後種々の齢で生きているMTL-¹prマウス (Koopman et al., 1998) の百分率を示す。注入は、7、9及び11週の齢で行った。実線曲線はリガンドL4なしのPBSの注入に相当しそして点線曲線はリガンドL4を有するPBSの注入に相当する。

【図5B】図5Aにおけると同じ処理の後種々の齢においてMTL-¹prマウスの血清中に抗DNA抗体 (ELISA試験により評価された) を有するMTL-¹prマウスの百分率を示す。白色の柱はリガンドL4なしのPBSの注入に相当しそして黒の柱はリガンドL4を有するPBSの注入に相当する。

【図5C】図5Aにおけると同じ処理の後種々の齢においてMTL-¹prマウスの尿中にポジティブなタンパク尿を有するMTL-¹prマウスの百分率を示す。白色の柱はリガンドL4なしのPBSの注入に相当しそして黒の柱はリガンドL4を有するPBSの注入に相当する。*リガンドL4で処理されたマウスのすべてが死亡した。

10

20

30

【図 1 A】



【図 1 B】

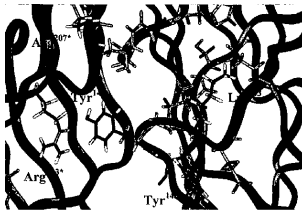
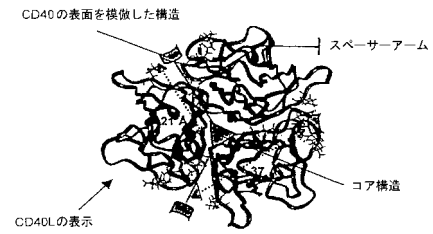
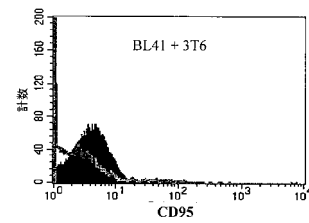


FIGURE 1B

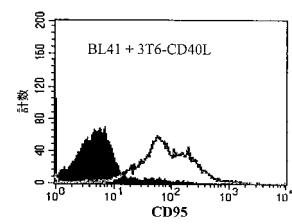
【図 2】



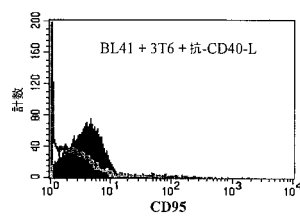
【図 3 A】



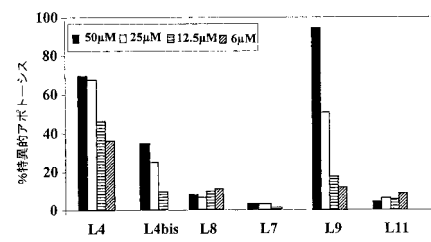
【図 3 B】



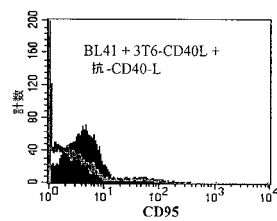
【図 3 C】



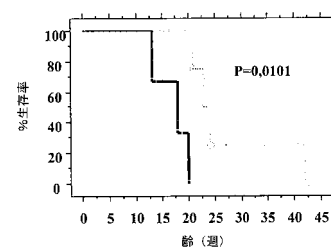
【図 4 B】



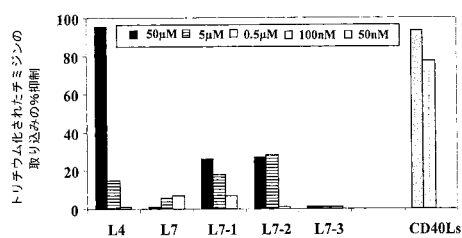
【図 3 D】



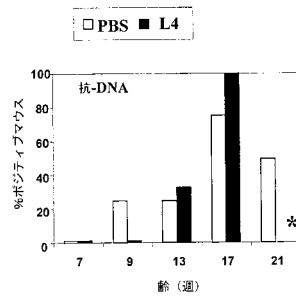
【図 5 A】



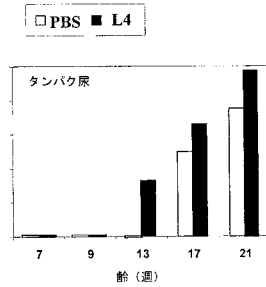
【図 4 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



【配列表】

0004703181000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
C 0 7 K 1/08	(2006.01)	C 0 7 K 1/08
C 0 7 K 7/02	(2006.01)	C 0 7 K 7/02
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 0 7 K 7/06

- (72)発明者 ギシャール, ジル・フランソワ・ロジェ
フランス国、エフ - 6 7 2 0 2 ヴォルフィスハイム、リュ・デュ・ミリュ、ラ・ルヴィエール 5
- (72)発明者 フルネ, シルビー・ヴィクトリーヌ・リュシエンヌ
フランス国、エフ - 6 7 2 0 0 ストラスブール、リュ・デ・ボルネ 1 1
- (72)発明者 ビアンコ, アルベルト
フランス国、エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール、リュ・サン・モーリス 5
- (72)発明者 オーベック, ヨハン・フェリシアン
フランス国、エフ - 6 7 3 0 0 シルティヒハイム、リュ・ドゥ・ラ・ガール 2 1
- (72)発明者 ミュレール, シルヴィアンヌ
フランス国、エフ - 6 7 6 0 0 ストラスブール、リュ・ベートーベン 1 1

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 1 1 5 6 9 (J P , A)
国際公開第 0 1 / 0 4 9 8 6 6 (WO , A 1)
国際公開第 0 2 / 0 0 0 8 9 3 (WO , A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
CA/REGISTRY(STN)
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)