

厚生労働科学研究費補助金
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

新規 HIV 侵入阻害剤の前臨床試験と遺伝子発現制御型の新しい抗 HIV 剤
の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 直彦

平成15（2003）年 4月

目次

I. 総括研究報告書

新規 HIV 侵入阻害剤の前臨床試験と遺伝子発現制御型の新しい抗 HIV 剤
の開発に関する研究

山本直彦

II. 分担研究報告書

1. 金属錯体の構造活性相関の評価と新規合成に関する研究

塩谷光彦

2. 新規化合物における抗 HIV 活性の評価に関する研究

森下高行

3. 亜鉛錯体の抗 HIV-1 作用メカニズムについて

大竹徹

4. 芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体に対する耐性 HIV 株の
遺伝子解析

金田次弘

5. 新薬開発にむけての分析と評価

北里健二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

新規 HIV 侵入阻害剤の前臨床試験と遺伝子発現制御型の
新しい抗 HIV 剤の開発

主任研究者 山本 直彦 名古屋大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性の増強には、錯体の多核化と芳香族スペーサーの導入が不可欠であるというこれまでの研究成果から、本年度は、ナフタレンをスペーサーにもつペンダント型亜鉛錯体の二核体 (Hiro-02 Dimer) の合成を行い、その活性を検討したところ、AZT に匹敵する抗 HIV 活性がみられた。この Hiro-02 Dimer をリード化合物として、現在、大量合成を終了し、次年度に向けて、前臨床試験としての小動物における毒性試験を立案中である。なお、この化合物の作用点として、コレセプター-CXCR4 のアンタゴニストである可能性が強く示唆される結果を得た。また、従来の CXCR4 阻害剤とは性質を異にしている単核体 (Hiro-02) に対する耐性ウイルスの遺伝子解析から recombinant virus を作成し解析した結果、ENV-V3 領域 276 番目の AGA (R) が関与していることが示唆された。さらに、サイクレンを側鎖にもつアミノ酸を天然のペプチドに導入することができるようになったため、膜移行シグナルを持つペプチドをキャリアとして導入することによって、細胞内および核内で抗 HIV 活性を発揮するシステムを構築中である。

分担研究者

- (1) 塩谷光彦
東京大学大学院理科系研究科教授
- (2) 森下高行
愛知県衛生研究所主任研究員
- (3) 大竹徹
大阪府立公衆衛生研究所主任研究員
- (4) 金田次弘
国立名古屋病院臨床研究部室長
- (5) 北里健二・大鵬薬品工業株式会社
創薬センター化学研究所所長

とに、選択性の高い複核亜鉛サイクレン錯体を構築し、リード化合物を選定し、その作用メカニズムの詳細な検討を行いつつ、臨床応用に向けた前臨床試験として、動物における毒性試験を行ない、加えてこれら薬剤の生体内の環境における抗ウイルス活性を調べる。さらに、独自に開発した技術を用い、細胞内および核内において作用する遺伝子制御型の抗 HIV 剤の可能性を検討する。

B. 研究方法

I. 臨床応用に向けた前臨床試験

より有効な新しい抗エイズ薬リード化合物を選定し、小動物を用いて毒性や ADME (吸収・分布・代謝・排泄) 試験を行い、安全係数の高い化合物を選択して前臨床試験に移行する。すなわち、マウスを用いて皮下投与毒性試験 (一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、血液学検査、血液生化学検査ならびに病理学検査) を実施する。

A. 研究目的

本研究の目的は、金属錯体による核酸分子認識に関する研究過程で合成された亜鉛サイクレン錯体を様々に化学修飾し、HIV 増殖抑制作用との構造活性相関を検討し、より有効で新しい作用機序に基づく抗エイズ薬を開発することにある。すなわち、これまでの本研究事業の研究成果によって得られた成果をも

II. 新規合成化合物の抗ウイルス活性試験とその作用機序

1) MT-4 細胞を用いた抗 HIV 活性試験:

新規合成化合物を 96 well microplate 上に triplicate で 5 段階希釈し、 2×10^5 /ml に調整した MT-4 細胞に Mock あるいは $100 \times \text{CCID}_{50}/\text{ml}$ の HIV-1(IIIB)を感染し、5 日間培養後、MTT ; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide を加え、生細胞がこの MTT を取り込み、発色した度合を ELISA で測定し、 EC_{50} (50% Effective Concentration ; 50%ウイルス増殖抑制濃度) および CC_{50} (50% Cytotoxic Concentraion; 50%細胞増殖抑制濃度) を測定した。

2) 逆転写酵素 (RT) に及ぼす影響:

マイクロプレートに固相化されたテンプレート・プライマー上で反応させる非放射性 RT 活性測定法 (旭化成) を応用し、RT 反応におよぼす薬剤の影響を測定した。RT としてはリコンビナントの HIV-1 RT を用いた。

3) 巨細胞形成に及ぼす影響:

HIV-1(LAI 株) に持続感染している MOLT-4 細胞と非感染の MOLT-4 細胞を混合培養した場合に起こる巨細胞形成におよぼす薬剤の影響を調べた。巨細胞形成による生細胞数の減少をマーカーとした。

4) 細胞の HIV レセプターへの影響:

細胞表面の CXCR4 分子とそれに対するモノクロナル抗体の結合に及ぼす薬剤の影響をフローサイトメーターを用いて調べた。抗 CXCR4 抗体には 12G5 を、細胞は MOLT-4 細胞を用いた。

5) HIV-1 の ENV 蛋白への影響:

HIV-1 の gp120 の V3 領域に対するモノクロナル抗体 (0.5 β) と、HIV-1(LAI) に持続感染し gp120 を細胞表面に表出している MOLT-4 細胞との反応に及ぼす影響を、フローサイトメーターを用いて調べた。

6) 単核ペンダント型亜鉛サイクレン錯体 (Hiro-02) に対する耐性 HIV 株の遺伝子解析:

recombinant virus の作成は、サブタイプ B に属する HXB2 のプロウイルスが組込まれた感染性 HIV-1 クローン pPMN2 を鋳型として用いた。DNA 合成酵素は、Pyrobest DNA polymerase (Takara, Osaka, Japan) を用いた。PCR のプログラムは、1 cycle of pre-PCR (45sec at 94°C), 15 cycle of PCR (15sec at 94°C, 40sec at 50°C, and 120sec at 72°C) で構成した。それぞれの PCR 産物を Sal I と BsmBI、または、Oli I と BsmBI を用いて制限酵素処理した後、この DNA 断片を pPMN2 の Sal I と Oli I 部位に組み込んだ。得られたプラスミドに目的の変異が導入されていることと目的以外の変異が生じていないことをシーケンシングにより確認した。

感染性クローンの発現は発現実験前夜に 24 穴プレートに MT-2 細胞を $1 \times 10^5/\text{well}$ 培養し、翌日、精製した感染性クローン DNA を、1 well あたり 500ng をリポフェクタミンを用いてトランスフェクションした。2~3 日間培養し、ウイルス液を回収し、MTT 法で抗 HIV 活性を調べた。

III. 新技術を用いた、細胞内および核内において作用する遺伝子制御型抗 HIV 剤の開発:

新規亜鉛錯体や亜鉛イオンキャリア分子を合成し、溶液内構造や亜鉛イオン捕捉能について核磁気共鳴スペクトル法や pH 滴定法により検討した。また、新たな人工核酸塩基を設計・合成し、各種 DNA ポリメラーゼへの取り込みを検討し、抗 HIV 活性化合物の設計にフィードバックさせた。

(倫理面への配慮)

本研究における前臨床試験は、臨床第1相試験開始までの非臨床試験であるので、研究対象者に対する倫理面には問題なく、実験動物に対して愛護上の配慮が必要となる。これに関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律(法律第105号)」「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(総理府告示第6号)」および大鵬薬品工業内の動物倫理規定、名古屋大学動物実験指針を遵守して研究にあたることとする。また、ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守する。

C. 研究成果

I. 臨床応用に向けた前臨床試験

ペンダント型亜鉛サイクレン錯体のうち、今年度は新たにナフタレンをスペーサーとする二核錯体(Hiro-02 Dimer)に高い抗HIV活性が見い出されたため、このHiro-02 Dimerをリード化合物として、次年度、小動物を対象に毒性およびADME(吸収・分布・代謝・排泄)試験を行う目的で、動物実験に必要なHiro-02 Dimerの大量合成を行った。

II. 新規合成化合物の抗ウイルス活性試験とその作用機序

1) MT-4細胞による抗HIV活性試験

(森下分担報告書 Table 1~5)

分担研究者である塩谷光彦博士(東京大学大学院理学系研究科)および北里健二博士(大鵬薬品工業)において新規に合成された金属錯体、核酸塩基部分を化学修飾した人工DNA、その他化合物、計190種類について、抗HIV活性を検討した結果、ペンダント型亜鉛サイクレン錯体のうち、ナフタレンをスペーサーとする二核錯体

(Hiro-02 Dimer)に高い抗HIV活性が見られた(森下分担報告書 Figure 1, Table 5)。すなわち EC_{50} : $0.18 \mu\text{g/ml}$, CC_{50} : $458.7 \mu\text{g/ml}$, Selectivity Index: 2548倍と単核のHiro-02に比して、約10倍の抗HIV活性を示した。

2) 逆転写酵素(RT)に及ぼす影響: Hiro-02 DimerはHiro-02と同様、in vitroにおいて逆転写酵素RT活性を全く抑制しなかった。(大竹分担報告書 Table 1)

3) 巨細胞形成に及ぼす影響: Hiro-02 Dimerは比較的強い巨細胞形成抑制活性を示し、Hiro-02よりも低い濃度で効果を示した。(大竹分担報告書 Table 1)

4) 細胞のHIVレセプターに及ぼす影響: Hiro-02 DimerはHIV感受性細胞の表面に表出しているコレセプターCXCR4に対する特異抗体12G5の結合を、CXCR4アンタゴニストであるバイサイクラム(AMD3100)と同様に強く抑制した。(大竹分担報告書 Fig.1)

5) HIV-1のエンベロープ蛋白に及ぼす影響: Hiro-02 DimerはHIV-1のエンベロープ蛋白gp120とそのV3ループ領域に対する特異抗体0.5 β の結合には、ほとんど影響を及ぼさなかった。(大竹分担報告書 Fig.2)

6) 単核ペンダント型亜鉛サイクレン錯体(Hiro Compounds)に対する耐性HIV株の遺伝子解析: Hiro-02のHIV-1野生株に対する抗HIV活性(EC_{50})は $0.8 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、recombinant virusに対する EC_{50} は $3.5 \mu\text{g/ml}$ と約4倍の耐性を獲得していた。

III. 新技術を用いた細胞内および核内において作用する遺伝子制御型抗HIV剤の開発:
亜鉛サイクレン錯体の多核化および芳香族リンカーの導入が抗HIV活性を増強することが本研究グループにより明らかにされてお

り、本年度はナフタレンをスパーサーにもつ新規亜鉛二核錯体(Hiro-02 Dimer)の合成に成功し、臨床応用に向けた動物実験のための大量合成を行った。また、亜鉛サイクレンを側鎖にもつ新規人工アミノ酸の合成に成功し、ペプチドに導入するための合成中間体の調製準備が完了した。また、亜鉛イオンを細胞内に移行することが知られている金属配位子の合成を終了した。

また、核酸関連酵素反応をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA を種々合成し、DNA および RNA ポリメラーゼ活性の阻害効果を検討した結果、カテコール基およびフェノール基をもつ人工ヌクレオシドおよびその誘導体が阻害活性を示すことが見つかった。また、これらの人工 DNA を天然 DNA に導入することにより、位置選択的に DNA 加水分解酵素を阻害することを見出した。この結果は、これら誘導体がウイルスが関連する諸過程に阻害的な効果を及ぼす可能性を秘めていることを示している。

この他、種々の金属配位子や金属錯体の HIV 増殖抑制作用を検討したが、残念ながらその中からは活性を示すものは見つからなかった。

D. 考察

今年度、新たに見い出された Hiro-02 Dimer は、抗 HIV 活性を示す亜鉛サイクレン錯体は単核よりも複核に強く、さらにスパーサーが meta の位置に架橋した複核亜鉛錯体により強い活性を示すことを明らかにしたこれまでの研究成果に基づくものである。今年度は、この Hiro-02 Dimer をリード化合物として、動物実験を行っていく予定であったが、今年度の研究事業採択決定（9月）からの期間が短く、動物実験に必要な化合物の大量合成を行うにとどまった。次年度、臨床応用に向けた前臨床試験として、小動物を対

象に毒性および ADME（吸収・分布・代謝・排泄）試験を行う予定である。

Hiro-02 の Dimer の作用点を検討した結果、HIV-1 による巨細胞形成を強く抑制したことから、その作用点はウイルスの細胞への吸着侵入過程であることが予測された。今回、この Hiro-02 Dimer は抗 CXCR4 抗体の CXCR4 への結合を極めて強く抑制し、ウイルスのエンベロープ蛋白と抗エンベロープ抗体の結合には影響を示さなかった。これらことから、Hiro-02 Dimer は細胞表面の HIV コレセプター CXCR4 に作用し、HIV の細胞侵入過程におけるウイルスエンベロープとコレセプターとの反応を阻止することにより抗ウイルス活性を示した可能性が強く示唆された。

なお、Hiro-02 は T-tropic の HIV に対してのみ増殖抑制効果を示すものの、CXCR4 に対する種々の monoclonal 抗体に対して何ら影響を与えず、従来報告されている CXCR4 阻害剤とは性質を異にしている。この化合物に対する耐性ウイルスを分離し、ENV 領域のアミノ酸配列を解析した結果、わずか 276 番目の AGA (R) が AAA (K) に置換されているのみであった(金田分担報告書、Table 1)。そこで、この点変異をもつ recombinant virus を作成し、抗 HIV 活性 (EC₅₀) を検討したところ、約 4 倍の耐性を獲得していた。この耐性度は、治療経過中に薬剤耐性を示した患者から得られたウイルスの耐性においても時にみられる程度である。この作用点における点変異をもつ recombinant virus の解析は他に例がなく、HIV 感染初期の巨細胞形成および細胞侵入過程における遺伝子レベルの解明に意義深いものであり、さらに、新たな化合物の化学修飾に有用となるので、今回の結果の有意性と意義について、今後、解析を繰り返し、慎重に検討していきたい。

これまで亜鉛サイクレン錯体の細胞内移行

のキャリアとしてピリチオンを用いたが、良好な効果が得られなかったため、新たにエチレンジアミンの窒素に四つのピリジルメチル基を導入した新しい亜鉛イオンキャリアを開発したので、これを用いて細胞内移行を試み、抗 HIV 活性を評価する予定である。

一方、サイクレンを側鎖にもつアミノ酸を天然のペプチドに導入することができるようになったため、膜移行シグナルを持つペプチドをキャリアとして導入することによって、細胞内および核内で抗 HIV 活性を発揮するシステムを現在構築中である。

E. 結論

今年度、これまでの研究成果に基づき、ナフタレンをペンダントに持つ亜鉛サイクレン錯体の2核体 (Hiro-02 Dimer) を合成し、その抗 HIV 活性と作用点を検討した。この Hiro-02 Dimer は単核に比して、およそ10倍の活性がみられ、AZT の抗 HIV 活性に匹敵するものである。すでに大量合成を終了したので、次年度、前臨床試験としての動物実験を予定している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

①Study of dose dependant-toxicity of m-Bis (Zn²⁺-cyclen) and p-tris (Zn²⁺-cyclen) in mice (preparation)

②Mechanism of action of Aromatic Pendant Zn-Cyclen Complex on HIV-1 Replication (preparation)

2. 学会発表

山本直彦、森下高行、佐藤克彦、大竹徹、森治代、川畑拓也、内海真、金田次弘、北里健二、塩谷光彦
『新規低分子化合物：ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性とその作用機序』

(第16回日本エイズ学会、2002年)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

金属錯体の構造活性相関の評価と新規合成に関する研究

分担研究者 塩谷 光彦 東京大学大学院理学系研究科

研究要旨

亜鉛サイクレン錯体の多核化および芳香族スパーサーの導入が抗 HIV 活性を増強することに注目し、本年度も昨年度に引き続き、ウイルス増殖抑制作用を有する多核亜鉛サイクレン錯体の再分子設計を行い、新規芳香環スパーサーや芳香族ペンダントを用いる多核亜鉛サイクレン錯体の高効率合成法の確立を図った。本年度は、ナフタレンをスパーサーにもつペンダント型亜鉛錯体の二核体の合成およびモノ置換型亜鉛サイクレン錯体の合成を行った。特にナフタレンをスパーサーにもつ亜鉛二核錯体は AZT に匹敵する抗 HIV 活性をもつことが判明した。次に、昨年度に合成予試験を行った亜鉛サイクレンを側鎖にもつ新規人工アミノ酸の合成ルートを確立した。また、亜鉛イオンを細胞内に移行することが知られている金属配位子の合成を終了した。

また、核酸関連酵素をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA を種々合成した。酵素反応に及ぼす効果について検討した結果、カテコール基をもつ人工ヌクレオシドおよびその誘導体が、DNA ポリメラーゼ反応、RNA ポリメラーゼ反応、DNA 加水分解酵素反応の阻害効果を示すことがわかった。この他、新しい抗エイズ薬のリード化合物を探索すべく、種々の金属配位子や金属錯体の HIV ウイルス増殖抑制作用を検討した。

研究目的

本年度は、ウイルス増殖抑制作用を有する多核亜鉛サイクレン錯体の再分子設計を行い、多核亜鉛サイクレン錯体の高効率合成法および大量合成法の確立を目指した。また、人工核酸が核酸関連酵素反応に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

研究方法

新規亜鉛錯体や亜鉛イオンキャリア分子を合成し、溶液内構造や亜鉛イオン捕捉能について核磁気共鳴スペクトル法や pH 滴定法により検討した。また、新たな人工核酸塩基を設計・合成し、各種 DNA(RNA)ポリメラーゼへの取り込み、DNA 加水分解酵素反応に及ぼす効果を検討し、抗 HIV 活性化合物の設計にフィードバックさせた。

(倫理面への配慮)

本研究は化合物の合成が目的であり、人お

および動物を研究対象としていないため、倫理面に問題ない。

研究結果

亜鉛サイクレン錯体の多核化および芳香族リンカーの導入が抗 HIV 活性を増強することが本研究グループにより明らかにされており、本年度はナフタレンをスパーサーにもつ新規亜鉛二核錯体の合成に成功した。この二核錯体は単核に比して、約 10 倍の抗 HIV 活性を示しその Selectivity Index : 2548 倍は、対照として用いた AZT の 3485 倍に匹敵するものである。今後この Hiro-02 Dimer の大量合成も行ったので、次年度は臨床応用に向けて、動物実験を行っていく予定である。また、亜鉛サイクレンを側鎖にもつ新規人工アミノ酸の合成に成功し、ペプチドに導入するための合成中間体の調製準備が完了した。また、亜鉛イオンを細胞内に移行することが

知られている金属配位子の合成を終了した。

また、核酸関連酵素反応をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA を種々合成し、DNA および RNA ポリメラーゼ活性の阻害効果を検討した結果、カテコール基およびフェノール基をもつ人工ヌクレオシドおよびその誘導体が阻害活性を示すことが見つかった。また、これらの人工 DNA を天然 DNA に導入することにより、位置選択的に DNA 加水分解酵素を阻害することを見出した。この結果は、これら誘導体がウイルスが関連する諸過程に阻害的な効果を及ぼす可能性を秘めていることを示している。

この他、種々の金属配位子や金属錯体の HIV ウイルス増殖抑制作用を検討したが、残念ながらその中からは活性を示すものは見つからなかった。

尚、これらのサンプルの抗 HIV ウイルス活性の検討および作用機序の評価については分担研究者の森下らに依頼した（森下分担報告書：Table 1, 2）。大量合成したサンプルについては、動物実験を依頼した。

考察

ナフタレンペンダント亜鉛サイクレン、および芳香族スペーサーをもつ亜鉛二核錯体が強いウイルス侵入阻害作用を示すことが以前の研究で明らかになっていたので、今回はそれに基づいて、ナフタレンをスペーサーとする亜鉛二核錯体を合成した。ウイルス侵入阻害作用は近い将来検討する予定だが、双方の相乗効果が期待できる。サイクレンを側鎖にもつアミノ酸は、天然のペプチドに導入することができる。したがって、核内に取り込まれることが知られているペプチドをキャリアとしてサイクレンを核内に移行させることが可能になる。例えば、核局在（核移行）シグナルとして最近発見された P r o - A r g - L y s - L y s - A r g - P r o - A r g

というアミノ酸配列を我々のサイクレンを側鎖にもつアミノ酸を導入すれば、核に移行しやすくなると考えられ、現在その準備を行っている。さらに、その構造体に HIV-1 の特異的な塩基配列に対応する peptide nucleic acid（15-20 ベースで特異性が確保できる）をつなぐ事ができれば核内の HIV-1 プロウイルスに結合して機能を発揮することが期待される。

核酸関連酵素をターゲットとする新規人工核酸ユニットの開発の一環として、今回初めて DNA(RNA)ポリメラーゼおよび DNA 加水分解酵素反応の活性を強く阻害する人工 DNA を見出すことができた。参照化合物との比較で構造活性相関を行うことにより、これら誘導体が、ウイルスが関連するどの過程に阻害的な効果を及ぼすか、そして次どのような分子設計をすればよいかについて重要な指針を与えることが期待される。

研究発表

1. 論文発表

(1) An Extended Network via Hydrogen Bond Linkage of Linear Coordination Polymer $[Cd(\mu-dptz)(NO_3)_2]_n$. (Dptz = 3,6-di-2-pyridyl-1,2,4,5-tetrazine)
M. Du, X.-H. Bu, K. Biradha, and M. Shionoya
J. Chem. Res. 247-249 (2002).

(2) New Mononuclear, Cyclic Tetranuclear and 1-D Helical-Chain Cu(II) Complexes Formed by Metal-assisted Hydrolysis of 3,6-Di-2-pyridyl-1,2,4,5-tetrazine (DPTZ): Crystal Structures and Magnetic Properties. X.-H. Bu, H. Liu, M. Du, L. Zhang, Y.-M. Guo, M. Shionoya, and J. Ribas
Inorg. Chem. 41, 1855-1861 (2002).

(3) Metal Assisted Rearrangement of 2,2'-Pyridil with $M(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ($M = Co^{II}, Ni^{II}$)

- and Cu^{II}): Syntheses, Characterization and Crystal Structures. M. Du, X.-H. Bu, M. Shionoya, and M. Shiro
J. Mol. Struct. 607, 155–161 (2002).
- (4) Toward Nano-Assembly of Metals through Engineered DNAs K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, and M. Shionoya
Supramol. Chem. 14, 255–261 (2002).
- (5) Synthesis of Nucleic Acid Mimics Designed for Metal-Induced Strand Formation on DNA A. Hatano, K. Tanaka, M. Shiro, and M. Shionoya
Tetrahedron 58, 2965–2972 (2002).
- (6) A Novel Two Dimensional Non-interpenetrating Coordination Polymer [Ag_{2.5}L(NO₃)_{2.5}]_n with Three Different Coordination Modes of Ag^I (L = diquinoxalino [2,3-a:2',3'-c]phenazine) M. Du, X.-H. Bu, K. Biradha, and M. Shionoya
J. Chem. Res. (10), 493–495 (2002).
- (7) Formation of Silver (I)-Mediated DNA Duplex and Triplex through an Alternative Base Pair of Pyridine Nucleobases K. Tanaka, Y. Yamada, and M. Shionoya
J. Am. Chem. Soc. 124, 8802–8803 (2002).
- (8) [5-Amino-6,8-dichloro-2,3-bis(2-pyridyl)-quinoxaline]dichlorozinc(II) D.-L. An, M. Du, X.-H. Bu, K. Biradha, and M. Shionoya
Acta Cryst. E58, m436–m438 (2002).
- (9) Syntheses and Structure-Activity Relationships of Nonnatural β-C-Nucleoside 5'-Triphosphates Bearing an Aromatic Nucleobase with Phenolic Hydroxy Groups: Inhibitory Activities against DNA Polymerases S. Aketani, K. Tanaka, K. Yamamoto, A. Ishihama, H. Cao, Tengeiji, B. S. Hiraoka, M. Shiro, and M. Shionoya
J. Med. Chem. 45, 5594–5603 (2002).
- (10) Efficient Incorporation of A Copper Hydroxypyridone Base Pair in DNA K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, and M. Shionoya
J. Am. Chem. Soc. 124, 12494–12498 (2002).
- (11) Triangular and Tetrahedral Array of Silver (I) Ions by a Novel Disk-Shaped Tridentate Ligand: Dynamic Control Of Coordination Equilibrium of the Silver(I) Complexes S. Hiraoka, T. Yi, M. Shiro, and M. Shionoya
J. Am. Chem. Soc. 124, 14510–14511 (2002).
- (12) Artificial Nucleosides Possessing Metal Binding Sites at the 3'- and 5'-Positions of the Deoxyribose Moieties J. Chiba, K. Tanaka, Y. Ohshiro, R. Miyake, S. Hiraoka, M. Shiro, and M. Shionoya
J. Org. Chem. 68, 331–338 (2003).
- (13) A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, and M. Shionoya
Science 299, 1212–1213 (2003).
- (14) Synthetic Receptors Prepared by Organized Assembly of Organic Molecules T. Takeuchi and M. Shionoya
IEEE Engineering in Medicine and Biology, in press.
- 日本語総説・新聞掲載など
- (1) イオン性液体－開発の最前線と未来－（分担執筆、監修：大野弘幸）；塩谷光彦，平岡秀一，シーエムシー出版，90–98 (2003).
- (2) 「DNA の中心に金属 東大グループ、合成に初成功 - ナノ電線開発に道」毎日新聞，2003.2.21.
- (3) 「銅イオン並べた人工 DNA 東大が合成に成功 ナノテクに応用へ」日刊工業新聞，2003.2.21.
- (4) 「DNA の中に銅のひも 東大、ナノテク

に新技術」共同通信関連新聞数社，2003.2.21.
(5) 「DNA strings along metal ions」
nanotechweb.org, 2003.2.21.

知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
特になし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

新規化合物における抗 HIV 活性の評価に関する研究

分担研究者 森下 高行（愛知県衛生研究所）
研究協力者 佐藤 克彦（愛知県衛生研究所）

研究要旨

今年度新規に合成された化合物の抗 HIV 活性を検討した結果、ナフタレンペンダント型亜鉛サイクレン錯体（Hiro-02）の二核錯体（Hiro-02 Dimer）に、単核に比して、約10倍の高い活性がみられた。この Hiro-02 Dimer の Selectivity Index : 2548 倍は、対照として用いた AZT の 3485 倍に匹敵するもので、今後この Hiro-02 Dimer をリード化合物として、臨床応用に向けて、動物実験を行っていく予定である。

研究目的

分担研究者である塩谷光彦博士（東京大学大学院理学系研究科）および北里健二博士（大鵬薬品工業）において新規に合成された金属錯体、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA、その他化合物、計190種類についてエイズウイルス増殖抑制作用の有無を評価する。

研究方法

新規合成化合物を 96 well microplate 上に triplicate で5段階希釈し、 2×10^5 /ml に調整した MT-4 細胞に Mock あるいは $100 \times \text{CCID}_{50}/\text{ml}$ の HIV-1(IIIB)を感染し、5日間培養後、MTT ; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide を加え、生細胞がこの MTT を取り込み、発色した度合を ELISA で測定し、 EC_{50} （50% Effective Concentration ; 50%ウイルス増殖抑制濃度）および CC_{50} （50% Cytotoxic Concentration; 50%細胞増殖抑制濃度）を測定した。

研究結果

上記新規化合物の抗 HIV 活性を検討した結果（Table 1~4）、ペンダント型亜鉛サイクレン錯体のうち、ナフタレンをスペーサーとする二核錯体（Hiro-02 Dimer）に高い抗 HIV 活性が見られた（Figure 1, Table 5）。すなわち EC_{50} : $0.18 \mu\text{g}/\text{ml}$, CC_{50} : $458.7 \mu\text{g}/\text{ml}$,

Selectivity Index : 2548 倍 と単核の Hiro-02 に比して、約10倍の抗 HIV 活性を示した。

考察

これまでの研究結果により、抗 HIV 活性を示す亜鉛サイクレン錯体は単核よりも複核に強く、さらにスペーサーが meta の位置に架橋した複核亜鉛錯体により強い活性を示すことが明らかとなっている。今年度は、この成果に基づき、昨年度見い出されたナフタレンペンダント型亜鉛サイクレン錯体（Hiro-02）の二核錯体（Hiro-02 Dimer）を新たに合成し、抗 HIV 活性を検討したところ、単核に比して、約10倍の高い活性がみられた。この Hiro-02 Dimer の Selectivity Index : 2548 倍は、対照として用いた AZT の 3485 倍に匹敵するものである。今後この Hiro-02 Dimer をリード化合物として、臨床応用に向けて、動物実験を行っていく予定である。

研究発表

学会発表

山本直彦、森下高行、佐藤克彦、大竹徹、森治代、川畑拓也、内海真、金田次弘、北里健二、塩谷光彦『新規低分子化合物：ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性とその作用機序』

（第16回日本エイズ学会、2002年）

Table 1

| Compounds | CC ₅₀ (μ g/ml) | EC ₅₀ (μ g/ml) | Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₅₀) | Compounds | CC ₅₀ (μ g/ml) | EC ₅₀ (μ g/ml) | Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₅₀) |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| SH1 | 95 | >95 | <1 | SH31 | 130 | >130 | <1 |
| SH2 | 43 | >43 | <1 | SH32 | >200 | >200 | ><1 |
| SH3 | 104 | >104 | <1 | SH33 | 211 | >211 | <1 |
| SH4 | 89 | >89 | <1 | SH34 | >200 | >200 | ><1 |
| SH5 | >200 | >200 | ><1 | SH35 | >200 | >200 | ><1 |
| SH6 | >200 | >200 | ><1 | SH36 | 143 | >143 | <1 |
| SH7 | >200 | >200 | ><1 | SH37 | >200 | >200 | ><1 |
| SH8 | 118 | >118 | <1 | SH38 | 126 | >126 | <1 |
| SH9 | >200 | >200 | ><1 | SH39 | >200 | >200 | ><1 |
| SH10 | 90 | >90 | <1 | SH40 | >200 | >200 | ><1 |
| SH11 | 21 | >21 | <1 | SH41 | 96 | >96 | <1 |
| SH12 | >200 | >200 | ><1 | SH42 | >200 | >200 | ><1 |
| SH13 | >200 | >200 | ><1 | SH43 | 103 | >103 | <1 |
| SH14 | >200 | >200 | ><1 | SH44 | 131 | >131 | <1 |
| SH15 | 125 | >125 | <1 | SH45 | 192 | >192 | <1 |
| SH16 | 110 | >110 | <1 | SH49 | >200 | >200 | ><1 |
| SH17 | >200 | >200 | ><1 | Sa01 | >200 | >200 | ><1 |
| SH18 | >200 | >200 | ><1 | Sa02 | 22 | >22 | <1 |
| SH19 | >200 | >200 | ><1 | TST14 | 30 | >30 | <1 |
| SH20 | 19 | >19 | <1 | TST15 | 113 | >113 | <1 |
| SH21 | >200 | >200 | ><1 | YY1 | 25 | >25 | <1 |
| SH22 | >200 | >200 | ><1 | YY3 | 0.8 | >0.8 | <1 |
| SH23 | >200 | >200 | ><1 | YY4 | 109 | >109 | <1 |
| SH24 | 136 | >136 | <1 | 01A | 52 | >52 | <1 |
| SH25 | 99 | >99 | <1 | 02A | 18 | >18 | <1 |
| SH26 | 124 | >124 | <1 | 03A | 26 | >26 | <1 |
| SH27 | >200 | >200 | ><1 | 04A | 140 | >140 | <1 |
| SH28 | >200 | >200 | ><1 | 05A | 28 | >28 | <1 |
| SH29 | 141 | >141 | <1 | 06A | 7.6 | >7.6 | <1 |
| SH30 | >200 | >200 | ><1 | 07A | 123 | >123 | <1 |
| | | | | AZT | 6.1 | 0.0005 | 12200 |

Cells: 2×10^5 /ml of MT-4 cell

Virus: HIV-1(IIIB) at 100 times CCID₅₀/ml

CC₅₀: 50% Cytotoxic Concentraion

EC₅₀: 50% Effective Concentration

Table 2

| Compounds | CC ₅₀ (μ g/ml) | EC ₅₀ (μ g/ml) | Selectivity Index | Compounds | CC ₅₀ (μ g/ml) | EC ₅₀ (μ g/ml) | Selectivity Index |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| TZ003 | 126.3 | 41.6 | 3.1 | A11 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ021 | >200 | >200 | ><1 | A12 | 93.8 | >93.8 | <1 |
| TZ031 | >200 | >200 | ><1 | A13 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ032 | 37.4 | >37.4 | <1 | A15 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ033 | 116.6 | >116.6 | <1 | A16 | 5.3 | >5.3 | <1 |
| TZ034 | 93.8 | >93.8 | <1 | A17 | 88.1 | >88.1 | <1 |
| TZ035 | 194.7 | >194.7 | <1 | A18 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ036 | 5.3 | 1.6 | 3.3 | A19 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ050 | 7.5 | >7.5 | <1 | A20 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ201 | 23.8 | 7.8 | 3.1 | A21 | 7.6 | >7.6 | <1 |
| TZ202 | >200 | >200 | ><1 | A22 | >200 | >200 | ><1 |
| TZ203 | 4.3 | 1.5 | 2.9 | A23 | 109.7 | >109.7 | <1 |
| TZ204 | >200 | >200 | ><1 | A24 | 21.4 | >21.4 | <1 |
| | | | | | | | |
| mt316 | >200 | >200 | ><1 | TZN005 | 189 | >189 | <1 |
| mt336 | >200 | >200 | ><1 | TZN006 | 184 | >184 | <1 |
| mt350 | 21.5 | >21.5 | <1 | TZN009 | >200 | >200 | ><1 |
| mt387 | 96.6 | >96.6 | <1 | TZN010 | 23.6 | >23.6 | <1 |
| mt396 | >200 | >200 | ><1 | TZN011 | 93.3 | >93.3 | <1 |
| mt457 | 104.9 | >104.9 | <1 | TZN012 | 74.6 | >74.6 | <1 |
| mt552 | 5.3 | >5.3 | <1 | TZN014 | 124.7 | >124.7 | <1 |
| mt568 | 193.1 | >193.1 | <1 | TZN017 | 189 | >189 | <1 |
| | | | | | | | |
| Ks004 | 0.13 | >0.13 | <1 | HSKT001 | >200 | >200 | ><1 |
| Ks010 | 0.19 | >0.19 | <1 | HSKT002 | >200 | >200 | ><1 |
| Ks012 | 1463.6 | 42.1 | 34.8 | HSKT003 | 98.1 | >98.1 | <1 |
| Ks013 | 98.2 | >98.2 | <1 | HSKT006 | >200 | >200 | ><1 |
| Ks014 | 110.3 | >110.3 | <1 | HSKT007 | >200 | >200 | ><1 |
| Ks015 | 96.8 | 38.1 | 2.5 | HSKT008 | >200 | >200 | ><1 |
| Ks016 | 104.6 | 41.9 | 2.5 | HSKT009 | >200 | >200 | ><1 |
| Ks017 | 24.4 | >24.4 | <1 | HSKT010 | 20.6 | >20.6 | <1 |
| Ks018 | 98.7 | >98.7 | <1 | HSKT011 | >200 | >200 | ><1 |
| | | | | HSKT012 | 89.7 | >89.7 | <1 |
| AH31 | 83.4 | >83.4 | <1 | HSKT013 | 84.2 | >84.2 | <1 |
| AH32 | 130.2 | >130.2 | <1 | HSKT014 | 120.3 | >120.3 | <1 |
| AH33 | >200 | >200 | ><1 | HSKT015 | 39.5 | >39.5 | <1 |
| AH34 | 196.1 | >196.1 | <1 | HSKT016 | 109.2 | 40.3 | 2.7 |
| AH35 | >200 | >200 | ><1 | HSKT017 | >200 | >200 | ><1 |
| AH37 | 24.6 | >24.6 | <1 | HSKT018 | >200 | >200 | ><1 |
| AH38 | >200 | >200 | ><1 | HSKT019 | >200 | >200 | ><1 |
| AH39 | >200 | >200 | ><1 | HSKT020 | >200 | >200 | ><1 |
| AH40 | 1.4 | >1.4 | <1 | HSKT021 | 5.4 | >5.4 | <1 |
| AH41 | >200 | >200 | ><1 | | | | |
| AH42 | 0.29 | >0.29 | <1 | AZT | 2.9 | 0.0002 | 14500 |

Table 3

| Compounds | CC ₅₀ (μ g/ml) | EC ₅₀ (μ g/ml) | Selectivity Index |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| #1 | >200 | >200 | ><1 |
| #2 | >200 | >200 | ><1 |
| #3 | >200 | >200 | ><1 |
| #4 | 0.91 | >0.91 | <1 |
| #5 | >200 | >200 | ><1 |
| #6 | 0.74 | >0.74 | <1 |
| #7 | >200 | >200 | ><1 |
| #8 | 94.3 | >94.3 | <1 |
| #9 | >200 | >200 | ><1 |
| #10 | >200 | >200 | ><1 |
| #11 | >200 | >200 | ><1 |
| #12 | 76.6 | >76.6 | <1 |
| #13 | 24.4 | >24.4 | <1 |
| #14 | 69.2 | >69.2 | <1 |
| #15 | >200 | >200 | ><1 |
| #16 | 43 | >43 | <1 |
| #17 | >200 | >200 | ><1 |
| #18 | 0.13 | >0.13 | <1 |
| #19 | >24 | 24 | <1 |
| #20 | >200 | >200 | ><1 |
| #21 | 120 | >120 | <1 |
| #22 | 40 | >40 | <1 |
| #23 | 120 | >120 | <1 |
| #24 | 3 | >3 | <1 |
| #25 | >200 | >200 | ><1 |
| AZT | 4.6 | 0.0003 | 15333 |

Cells: 2×10^5 /ml of MT-4 cell

Virus: HIV-1 (IIIB) at 100 times CCID₅₀/ml

CC₅₀: 50% Cytotoxic Concentraion

EC₅₀: 50% Effective Concentration

Table 4

| Compounds | CC ₅₀ (μ g/ml) | EC ₅₀ (μ g/ml) | Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₅₀) |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| 2-1172 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-1428 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-1444 | 120 | >120 | <1 |
| 2-1543 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-1545 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-1579 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-1583 | 145 | >145 | ><1 |
| 2-1616 | 0.9 | >0.9 | <1 |
| 2-1619 | 204 | >204 | <1 |
| 2-1661 | 132 | >132 | <1 |
| 2-1908 | 4.2 | >4.2 | <1 |
| 2-2038 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-2048 | 104 | >104 | <1 |
| 2-2056 | 24 | >24 | <1 |
| 2-2079 | 121 | >121 | <1 |
| 2-2080 | 115 | >115 | <1 |
| 2-2085 | 94 | >94 | <1 |
| 2-2091 | 4.8 | >4.8 | <1 |
| 2-2093 | 112 | >121 | <1 |
| 2-2095 | 38 | >24 | <1 |
| 2-2104 | 6.8 | >6.8 | <1 |
| 2-2139 | >200 | >200 | ><1 |
| 2-2140 | >200 | 21.5 | >9.3* |
| 2-2141 | >200 | 114 | >1.8* |
| AZT | 3.5 | 0.0003 | 11666 |

Cells: 2×10^5 /ml of MT-4 cell

Virus: HIV-1(IIIB) at 100 times CCID₅₀/ml

CC₅₀: 50% Cytotoxic Concentraion

EC₅₀: 50% Effective Concentration

Figure 1

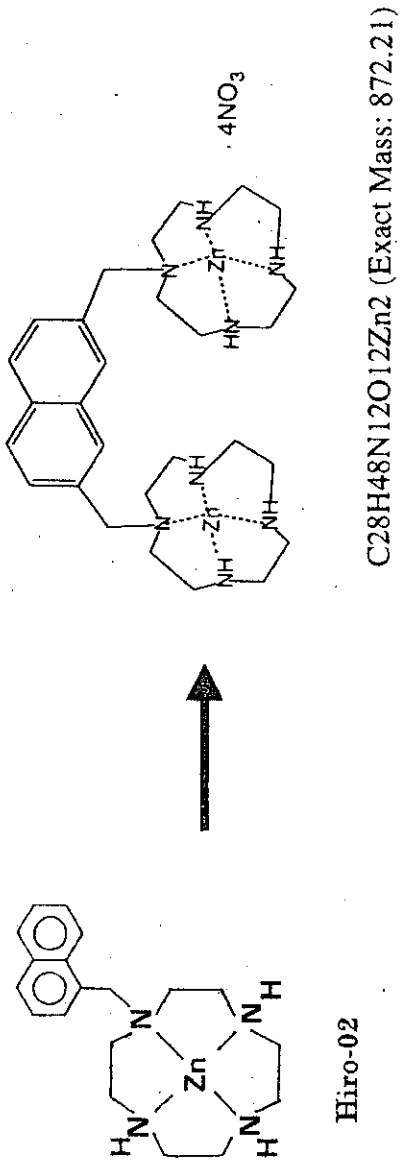


Table 5 Anti-HIV-1 activity of Hiro compounds in MT-4 cells as detected by MTT assay

| Compounds | M.W. | CC ₅₀ (μM) | HIV-1(LAI) | |
|-----------|-------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | EC ₅₀ (μM) | Selectivity index* |
| Hiro-02 | 501.9 | 796.8 | 1.59 | 502 |
| Dimer | 872.2 | 458.7 | 0.18 | 2548 |
| AZT | 267 | 6.97 | 0.002 | 3485 |

*the ratio CC₅₀/EC₅₀

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

亜鉛錯体の抗 HIV-1 作用メカニズムについて

分担研究者 大竹 徹（大阪府立公衆衛生研究所病理課）
研究協力者 川畑拓也 小島洋子 森 治代（同上）

研究要旨

芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体 Hiro-02 の誘導体(二量体)002 の抗 HIV 作用メカニズムを調べた結果、コレセプター-CXCR4 のアンタゴニストである可能性が強く示唆される結果を得た。

目的

高い抗 HIV 活性が見られた芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体(Hiro-02)の誘導体(Dimer:002)の抗ウイルス作用メカニズムについて解明する。

方法

(1) 逆転写酵素 (RT) に及ぼす影響：マイクロプレートに固相化されたテンプレート・プライマー上で反応させる非放射性 RT 活性測定法（旭化成）を応用し、RT 反応におよぼす薬剤の影響を測定した。RT としてはリコンビナントの HIV-1 RT を用いた。

(2) 巨細胞形成に及ぼす影響：HIV-1(LAI 株)に持続感染している MOLT-4 細胞と非感染の MOLT-4 細胞を混合培養した場合に起こる巨細胞形成におよぼす薬剤の影響を調べた。巨細胞形成による生細胞数の減少をマーカーとした。

(3) 細胞の HIV レセプターに及ぼす影響：細胞表面の CXCR4 分子とそれに対するモノクロナル抗体の結合に及ぼす薬剤の影響をフローサイトメーターを用いて調べた。抗 CXCR4 抗体には 12G5 を、細胞は MOLT-4 細胞を用いた。

(4) HIV-1 のエンベロープ蛋白に及ぼす影響：HIV-1 の gp120 の V3 領域に対するモノクロナル抗体(0.5 β)と、HIV-1(LAI)に持続感染し gp120 を細胞表面に表出している MOLT-4 細胞との反応に及ぼす影響を、フローサイトメーターを用いて調べた。

結果

(1) 逆転写酵素 (RT) に及ぼす影響：Dimer002 は Hiro-02 と同様、in vitro において逆転写酵素 RT 活性を全く抑制しなかった。(Table 1)

(2) 巨細胞形成に及ぼす影響：Dimer002 は比較的強い巨細胞形成抑制活性を示し、Hiro-02 よりも低い濃度で効果を示した。(Table 1)

(3) 細胞の HIV レセプターに及ぼす影響：Dimer002 は HIV 感受性細胞の表面に表出しているコレセプター-CXCR4 に対する特異抗体 12G5 の結合を、CXCR4 アンタゴニストであるバイサイクラム(AMD3100)と同様に強く抑制した。(Fig.1)

(4) HIV-1 のエンベロープ蛋白に及ぼす影響：Dimer002 は HIV-1 のエンベロープ蛋白 gp120 とその V3 ループ領域に対する特

異抗体 0.5 β の結合には、ほとんど影響を及ぼさなかった。(Fig.2)

考察

Hiro-02 の Dimer 002 は、in vitro において強く HIV-1 の増殖を抑制し、HIV-1 による巨細胞形成を強く抑制したことから、その作用点はウイルスの細胞への吸着侵入過程であることが予測された。今回 Dimer002 は抗 CXCR4 抗体の CXCR4 への結合を極めて強く抑制し、ウイルスのエンベロープ蛋白と抗エンベロープ抗体の結合には影響を示さなかった。これらのことから、Dimer002 は細胞表面の HIV コレセプターCXCR4 に作用し、HIV の細胞侵入過程におけるウイルスエンベロープとコレセプターとの反応を阻止することにより抗ウイルス活性を示した可能性が強く示唆された。また、Dimer002 は Hiro-02 と比較して抗 HIV 活性も高く、また細胞毒性も低いことから、抗 HIV 剤のリード化合物として非常に有望であると思われる。

発表論文

1. Komoto S, Kinomoto M, Ibrahim M S, Zhong Q, Auwanit W, Ayuthaya P I N, Otake T, Mori H, Oishi I, Kurosu T, Takahashi H, Mukai T, Ikuta K, Low or no antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 Nef in infected carriers with subtype E, in contrast to sbtype B that showed antibodies preferentially recognizing subtype-specific Nef epitopes, *Vaccine*, 19, 3019-3032, 2001
2. Ohyama M, Otake T, Morinaga K, Effect of size of man-made and natural mineral fibers on chemiluminescent response in human monocyte-derived macrophages, *Environmental Health Perspectives*, 109, 1033-1038, 2001
3. Min B S, Kim Y H, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T, Hattori M, Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activity, *Phytotherapy Research*, 15, 481-486, 2001
4. Horikoshi H, Kinomoto M, Kurosu T, Komoto S, Shiraga M, Otake T, Mukai T, Ikuta K, Resting CD4+ T cells with CD38+CD62L+ produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1, *Virology*, 293, 94-102, 2002
5. El-Mekkawy S, Meselhy M R, Abdel-Hafez A A M, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus type-1 by various phorbol derivatives, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 523-529, 2002
6. Komoto S, Kinomoto M, Horikoshi H, Shiraga M, Kurosu T, Mukai T, Auwanit W, Otake T, Oishi I, Ikuta K, Ability to induce p53 and caspase-mediated apoptosis in primary CD4+ T cells is variable among primary isolates of human immunodeficiency virus type 1, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18, 435-446, 2002
7. Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, Hattori M, Komatsu K, Kawahata T, Otake T, Screening of Chinese and Mongolian herbal drugs for anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity, *Phytotherapy*

- Research, 16, 186-189, 2002
8. Ma C, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Inhibition effects of triterpene-azidothymidine conjugates on proliferation of human immunodeficiency virus type 1 and its protease, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 877-550, 2002
9. Kawahata T, Otake T, Mori H, Kojima Y, Oishi I, Oka S, Fukumori Y, Sano K, A novel substance purified from *Perilla frutescens* Britton inhibits an early stage of HIV-1 replication without blocking viral adsorption, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 13, 283-288, 2002

Table 1

The effects of Hiro-02 and Dimer002 on RT activity and Giant cell formation.

| Compounds (100µg/ml) | % inhibition RT | IC50(µg/ml) of Giant cell formation | EC50(µg/ml) of MTT assay |
|-------------------------|--------------------|--|-----------------------------|
| Hiro-02 | 0 | 16 | 0.8 |
| Dimer002 | 0 | 2 | 0.15 |
| DS8000 | 98.5 | 12 | 1.5 |