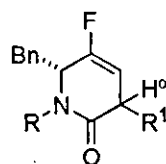


銅試薬の違いによるジアステレオ選択性の変化は観測されなかった (entries 5 and 6)。一方で、求電子剤として臭化ベンジルを作用させた場合には、メチル化の場合とは異なり、溶媒に関係なくトランス体 8d のみが優先的に生成した (entries 7 and 8)。今回メチル化の際に観測された、反応溶媒によるジアステレオ選択性の差異の原因は明確ではないが、一つの可能性としては、溶媒の異なる配位能による中間体メタルエノラート・溶媒複合体の構造の違いが起因するものと考えられる。立体的に嵩高いベンジル基の場合は、エノラートの構造に関係なく、基質の側鎖ベンジル基の立体障害のみによりジアステレオ選択性が決定されるため、トランス体が優先的に生成するものと考えられる。立体選択性発現機構の解明にはさらなる検討が必要である。

合成した α -アルキル体の立体配置は、 ^1H NMR における α -プロトンの化学シフトの違いに基づいて推定した (Table 4)。以前当研究室において合成したアルケン型ジケトピペラジンミメティクス⁹⁾においては、シス体の α -プロトンは対応するトランス体のそれに比べて低磁場に検出されることが確認されている。これに従い、8a-d をトランス体、9a-c をシス体とした。また、8d の α -プロトンはこれまでに観測されたシス体のそれに比べて明らかに高磁場に検出されていることから、8d をトランス体と推定した。

Table 4. Chemical shifts of H^α in obtained diketopiperazine mimetics.

	δ_{H^α} (ppm)	
	8 (<i>trans</i>)	9 (<i>cis</i>)
a	2.70	2.87
b	3.02	3.22
c	1.90	2.79
d	2.14	-



3. エノラートを経由する α -アルキル化反応の検討

還元的アルキル化反応との比較のため、 γ -フルオロ- β,γ -不飽和ラクタム 7c のエノラートを経由した α -アルキル化反応についても精査した (Table 5)。塩基として LDA, LHMDs および KHMDS を用いヨウ化メチルを作用させた場合は、収率に違いはあるものの、シス体 9c が優先的に生成した (entries 1-3)。一方で、NaHMDS を用いた場合は、シス体 8c とトランス体 9c が同程度生成した (entry 4)。そこで前述の還元的アルキル化の例にならって、溶媒に Et_2O を加え反応を行ったが、シス選択性の大幅な向上は認められなかった (entry 5)。これらの結果から、エノラートを形成

する金属の種類がメチル化のジアステレオ選択性に大きく影響を及ぼすことが示唆された。なお、ベンジル化については還元的アル

Table 5. Alkylation of γ -fluoro- β,γ -unsaturated- δ -lactams 7c.

entry	reagent ^a (equiv.)	solvent	yield ^b of 8+9 (%)		8 : 9
			8c (R ¹ = Me) 8d (R ¹ = Bn)	9c (R ¹ = Me) 9d (R ¹ = Bn)	
1	LDA (1 eq.), MeI (3 eq.)	THF : hexane = 10 : 1	51	3	3 : 7
2	LHMDS (1eq.), MeI (3eq.)	THF	67	4	4 : 6
3	KHMDS (1eq.), MeI (3eq.)	THF : toluene = 10 : 1	30	4	4 : 6
4	NaHMDS (1eq.), MeI (3eq.)	THF	80	5	5 : 5
5	NaHMDS (1eq.), MeI (3eq.)	THF : Et_2O = 1 : 4	58	4	4 : 6
6	LDA (1 eq.), BnBr (3 eq.)	THF : hexane = 10 : 1	60	0	10 : 0
7	LHMDS (1eq.), BnBr (3eq.)	THF	17	0	10 : 0
8	KHMDS (1eq.), BnBr (3eq.)	THF : toluene = 10 : 1	30	0	10 : 0
9	NaHMDS (1eq.), BnBr (3eq.)	THF	20	0	10 : 0

^a Treated with base at -78°C for 30 min, then $\text{R}^1\text{-X}$ at -78°C for 2 hr. ^b Isolated yield.

キル化と同様にトランス体 8d のみが優先的に生成した (entries 6-9)。還元的アルキル化と同様に、基質の側鎖の立体障害により選択性が支配されているものと考えられる。

4. S_N2' 型反応によるジケトピペラジンミメティクスの合成の試み

近年、岡田らは、 δ -ヒドロキシ- γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルに対し、有機アルミニウム・銅複合試薬を作用させると、フッ素を脱離基とする S_N2' 型反応が進行し、 α -アルキル- γ -フルオロ- β,γ -不飽和エステルが得られることを報告している⁷⁾。そこでこの例にならい、不飽和ラクタム6を基質とするジケトピペラジンミメティクスの合成について検討を行った (Table 6)。不飽和ラクタム6a に対して Me₃Al による処理を行った後、CuI・LiCl を作用させたところ、S_N2' 型反応は進行せず、還元体 7a が低収率で得られた (entry 1)。また、6b を基質とした場合も S_N2' 成績体は生成せず、還元体 7b と 1,4-付加体 12a が得られた (entry 2)。*i*-Bu₃Al を用いた場合も同様に還元体 7b と 1,4-付加体 12b が得られるのみで、期待する S_N2' 型反応は進行しなかった (entry 3)。

Table 6. Reaction of γ,γ -difluoro- α,β -unsaturated lactams 6a, b with organocopper-aluminium reagents.

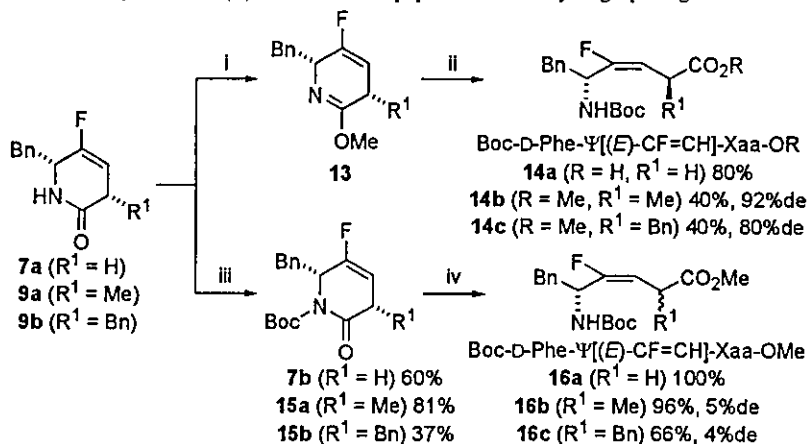
entry	substrate	reagent ^a (equiv.)	product (yield ^b , %)
1	6a	Me ₃ Al (5 eq.), CuI·LiCl (2.5 eq.)	6a (65), 7a (6)
2	6b	Me ₃ Al (5 eq.), CuI·LiCl (2.5 eq.)	7b (30), 12a (15)
3	6b	<i>i</i> -Bu ₃ Al (5 eq.), CuI·LiCl (2.5 eq.)	7b (72), 12b (14)

^a Aluminium reagent at 0 °C for 10 min, then 0.5 M CuI·LiCl for 1 hr. ^b Isolated yield.

5. ジケトピペラジンミメティクスから鎖状(E)-フルオロアルケン型イソスターへの誘導

得られたジケトピペラジンミメティクスのアミド結合を切断することにより、鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターへの誘導を試みた (Scheme 2)。ジケトピペラジンミメティクスを Me₃O·BF₄ 処理により、ラクチムエーテル 13 とし、酸加水分解の後、Boc 保護することで鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスター 14 を得た。しかし、開環の際に α -アルキル基を有する化合物では 4-10%程度の α 位のエピメリ化が確認された。また、アミド窒素を Boc 化し、メタノール中炭酸ナトリウムで処理することによっても、開環反応が効率的に進行することを明らかにした。この場合も、 α -置換体では α 位のエピメリ化が起り、ほぼ 1:1 のジアステレオ混合

Scheme 2. Synthesis of (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres by ring-opening reaction.



Reagents: i) Me₃O·BF₄, CH₂Cl₂; ii) 0.5 M HCl aq.-THF, then (Boc)₂O, DIPEA, DMF; iii) (Boc)₂O, DMAP, MeCN; iv) Na₂CO₃, MeOH.

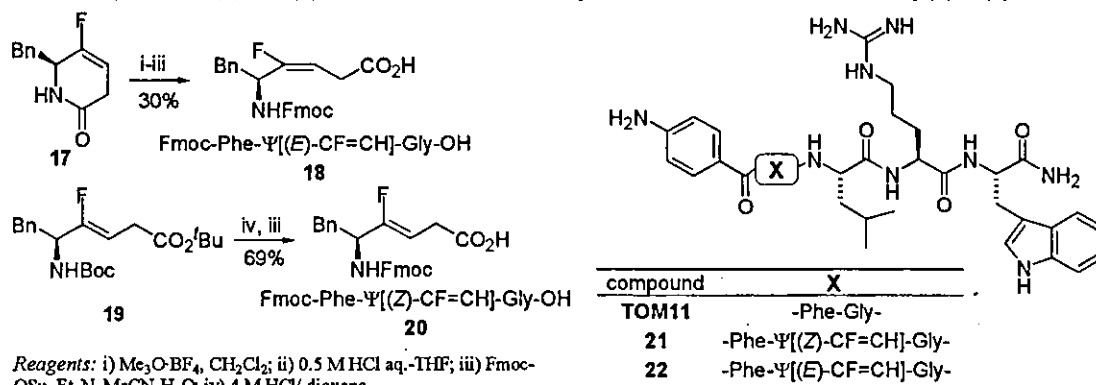
物が得られた。トランス体 8a, b についても同様に開環反応を検討したが、同様に α 位のエピメリ化が確認された。

開環体 14a-c, 16a-c のカップリング定数 ($^3J_{HF} = 20.0-20.8$ Hz)は、(E)型の α -フルオロビニル基のカップリング定数 ($^3J_{HF} = 18-22$ Hz)^{1a)}と一致したことから、得られた化合物は (E)型のフルオロアルケンイソスターであると判断した。

6. フルオロアルケン型イソスターの生理活性ペプチドへの導入

近年、癌転移への関与が示唆されている G 蛋白質共役型受容体 hOT7T175 に作用する内因性アゴニストとして、癌転移抑制遺伝子 *Kiss-1* の転写産物断片である 54 残基のペプチド (メタスチン)が発見された⁸⁾。我々は、このメタスチンを基にして、hOT7T175 に高い親和性を有する低分子誘導體 TOM11 を見いだしている (Figure 3)。そこで、フルオロアルケン型イソスターのペプ

Scheme 3. Synthesis of (E)- and (Z)-F-alkene units 18, 20. Figure 3. Metastin derivatives containing (E) or (Z)-F-alkene units.



Reagents: i) Me_3O-BF_4 , CH_2Cl_2 ; ii) 0.5 M HCl aq.-THF; iii) Fmoc-OSu, Et_3N , MeCN- H_2O ; iv) 4 M HCl/dioxane.

チドミメティクスとしての有用性を検証する目的で、(E), (Z)-フルオロアルケンユニットを TOM11 の Phe-Gly 位 (X)へ導入することとした。(E)型のフルオロアルケンイソスター 18 は、前述の方法に従い合成した、L-Phe-Gly 型のジケトピペラジンミメティクス 17 のラクタム環の開環を行った後、Fmoc 保護を行うことで合成した (Scheme 3)。また、(Z)型のフルオロアルケンユニット 19 は既知の方法²⁾により合成し、Fmoc 保護体 20 へと変換した。得られたイソスター 18, 20 をビルディングブロックとして、Fmoc 固相合成を行うことにより、フルオロアルケンイソスター含有メタスチン誘導體を合成することができた (Figure 3. 21 and 22)。合成したメタスチン誘導體の生理活性は評価中であるが、ペプチド結合をフルオロアルケンで置換したことによる効果、ならびにシス・トランスの固定化による影響について今後調査を行う予定である。さらに、本ペプチドへの適用から得られる情報をもとに、ペプチド性 HIV 膜融合阻害剤の非ペプチド化へ応用する。

【まとめ】

有機銅試薬と求電子剤による還元的アルキル化反応を利用した、(E)-フルオロアルケン含有ジケトピペラジンミメティクスの効率的な合成法を開発した。さらに、得られたジケトピペラジンミメティクスはラクタム環を開環することにより、シス型ペプチド結合に対応する鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターへと誘導することが可能であることを示した。本研究は、(E)-フルオロア

ルケン含有ペプチドミメティクスの合成法の確立に有益な知見を与えるものと考えられる。

【実験の部】

有機銅試薬による還元反応の一般法:

γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和ラクタム 6 α から、 γ -フルオロ- β,γ -不飽和ラクタム 7 α の合成

アルゴン雰囲気下、CuI (85.7 mg, 0.45 mmol)の無水 THF 懸濁液 (1.5 mL)中に MeLi-LiBr 錯体の 1.5 M エーテル溶液 (893 μ L, 1.34 mmol)を-78 °Cで加えた。反応溶液の温度を 0 °Cに昇温し、10 分間攪拌した。 γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和ラクタム 6 α (40 mg, 0.18 mmol)の無水 THF 溶液 (1.5 mL)を -78 °Cで滴下し、同温にて 30 分間攪拌した。1 : 1 の飽和 NH₄Cl-28% NH₄OH 溶液 (2 mL)を-78 °Cで加えた後、室温で攪拌し、青色を呈したところでエーテル抽出した。有機層を水洗後、無水 MgSO₄ で乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1)で精製し、 γ -フルオロ- β,γ -不飽和ラクタム 7 α (27.4 mg, 70%)を得た。7 α (white crystal): mp 142 °C; $[\alpha]_D^{24} +78.43$ (*c* 0.051, CHCl₃); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 2.81 (dd, *J* = 11.5, 13.9Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 13.9, 3.2Hz, 1H), 3.97-4.08 (m, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.19-6.21 (m, 1H), 6.59-6.64 (m, 1H), 7.23-7.40 (m, 5H); Anal. Calcd. for C₁₂H₁₁F₂NO: C, 64.57; H, 4.97; N, 6.27; Found: C, 64.57; H, 5.06; N, 6.25.

有機銅試薬による還元的アルキル化の一般法:

不飽和ラクタム 6c から α -アルキル体 8c, 9c の合成

アルゴン雰囲気下、CuI (74.6 mg, 0.39 mmol)の無水 THF 懸濁液 (1.5 mL)中に MeLi-LiBr 錯体の 1.5 M エーテル溶液 (783 μ L, 1.18 mmol)を-78 °Cで加えた。反応溶液の温度を 0 °Cに昇温し、10 分間攪拌した。不飽和ラクタム 6c (43.7 mg, 0.18 mmol)の無水 THF 溶液 (1.5 mL)を-78 °Cで滴下し、同温にて 30 分間攪拌した。MeI (97.5 μ L, 1.57 mmol)を-78 °Cで滴下した後、0 °Cで 2 時間攪拌した。1 : 1 の飽和 NH₄Cl-28% NH₄OH 溶液 (2 mL)を 0 °Cで加えた後、室温で攪拌し、青色を呈したところでエーテル抽出した。有機層を水洗後、無水 MgSO₄ で乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2)で精製し、溶出順に 8c (12.9 mg, 29%)、9c (13.4 mg, 31%)を得た。8c (colorless oil): $[\alpha]_D^{25} +44.44$ (*c* 0.045, CHCl₃); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.10 (d, *J* = 7.6Hz, 3H), 1.87-1.92 (m, 1H), 2.92-2.95 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.15 (dd, *J* = 14.2, 4.2Hz, 1H), 4.17-4.20 (m, 1H), 5.05 (dd, *J* = 2.4, 14.2Hz, 1H), 7.05-7.26 (m, 5H); LRMS (FAB) *m/z*, 234 (MH⁺), 142, 91 (base peak); HRMS (FAB) *m/z*, calcd for C₁₄H₁₇FNO (MH⁺) 234.1294; found: 234.1291. 9c (colorless oil): $[\alpha]_D^{25} +21.73$ (*c* 0.046, CHCl₃); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 0.35 (d, *J* = 7.6Hz, 3H), 2.75-2.81 (m, 1H), 2.96-3.01 (m, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.11-3.15 (m, 1H), 4.19-4.22 (m, 1H), 5.16 (dd, *J* = 14.6, 4.4Hz, 1H), 7.04-7.30 (m, 5H); LRMS (FAB) *m/z*, 234 (MH⁺), 142, 91 (base peak); HRMS (FAB) *m/z*, calcd. for C₁₄H₁₇FNO (MH⁺) 234.1294; found: 234.1299.

還元体からのエノラートを經由するアルキル化の一般法:

不飽和ラクタム 7c から、 α -アルキル体 8c, 9c の合成

アルゴン雰囲気下、LHMDS の無水 THF 溶液 (74 μ L, 0.12 mmol) に不飽和ラクタム 7c (26 mg, 0.12 mmol) の無水 THF 溶液 (1 mL) を -78 $^{\circ}$ C で滴下し、同温にて 30 分間攪拌した。MeI (22 μ L, 0.36 mmol) を -78 $^{\circ}$ C で滴下した後、同温で 2 時間攪拌した。飽和 NH_4Cl 溶液 (2 mL) を -78 $^{\circ}$ C で加えた後、室温で攪拌し、エーテル抽出した。有機層を水洗後、無水 MgSO_4 で乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2) で精製し、溶出順に 8c (8.1 mg, 29%)、9c (10.4 mg, 38%) を得た。

【参考文献】

- 1) (a) Allmendinger, T.; Furet, P.; Hungerbühler, E. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 7297; (b) Allmendinger, T.; Felder, E.; Hungerbühler, E.; *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 7301.
- 2) (a) Otaka, A.; Watanabe, J.; Yukimasa, A.; Sasaki, Y.; Watanabe, H.; Kinoshita, T.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 1634; (b) Otaka, A.; Watanabe, H.; Yukimasa, A.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 5443.
- 3) Honda, T.; Wakabayashi, H.; Kanai, K.; *Chem. Pharm. Bull.* 2002, 50, 307.
- 4) Ando, K.; Oishi, T.; Hiramata, M.; Ohno, H.; Ibuka, T. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 4745.
- 5) Ashby, E. C.; Watkins, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 5312.
- 6) Niida, A.; Oishi, S.; Sasaki, Y.; Mizumoto, M.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Otaka, A. submitted.
- 7) Okada, M.; Nakamura, Y.; Saito, A.; Sato, A.; Horikawa, H.; Taguchi, T. *Chem. Lett.* 2002, 31, 28.
- 8) Ohtaki, T.; Shintani, Y.; Honda, S.; Matsumoto, H.; Hori, A.; Kanehashi, K.; Terao, Y.; Kumano, S.; Takatsu, Y.; Masuda, Y.; Ishibashi, Y.; Watanabe, T.; Asada, M.; Yamada, T.; Suenaga, M.; Kitada, C.; Usuki, S.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Nishimura, O.; Fujino, M. *Nature* 2001, 411, 613.

(倫理面への配慮)

一連の誘導体から多剤耐性克服型 HIV-1 膜融合阻害剤として臨床の場で役に立つ化合物の創出を目指しているが、臨床応用の前に、実験小動物を用いる in vivo 検定を行う予定である。動物愛護の観点から、実験小動物での有効性評価に関しては入念な in vitro 検定を行った後に、出来るだけ小数のマウスモデルを用いて正確な評価が行えるように注意をはらう計画である。

C. 考察

多剤耐性型 HIV-1 の地球規模での蔓延はグローバルな視点から大きな問題となっており、と

りわけ近未来に於ける東南アジア地域 HIV-1 対策の重点研究項目として位置づけられる。日本においても若年層の HIV-1 感染者に多剤耐性型ウイルスの感染が頻繁に観察されるようになってきたことから必ずしも“対岸の火事的”対応策に甘んじているわけにはいかない。この問題を解決するために現在臨床で用いられている既存の抗 HIV-1 剤と異なる作用機序の薬剤を開発し、現行の HARRT 療法の新しいレセピーヘントリーする必要がある。この観点から有効な HIV-1 侵入阻害剤の開発は大きな期待を集めている。侵入阻害剤の一つのカテゴリーとして、HIV-1 第二受容体を標的とした CCR5拮抗剤および CXCR4拮抗剤が開発中であり、CCR5拮抗剤の中には Phase2 臨床試験において HIV-1 の血中濃度を著しく低下した例が報告されているが、耐性株の出現の早さは今後の検討課題である。CXCR4拮抗剤の方はまだ臨床有効性に関する報告がなされていない。一方、当該研究項目と関連のある gp-41 標的型 HIV-1 膜融合阻害剤、T20(Fuseon)、が Trimeris-Roche 社の共同開発により臨床応用されたが、Non-responder およびこれに対する耐性株の出現がすでに問題になっている。

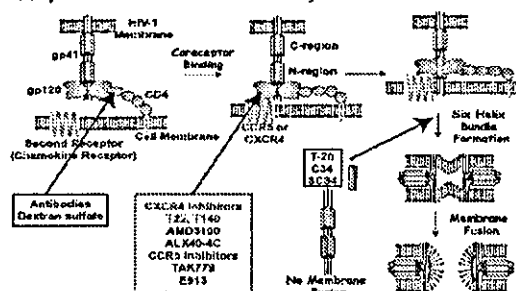
我々は、1)CXCR4拮抗剤の開発と抗 HIV-1 剤としての応用研究、2)X-EE-XX-KK 分子設計概念を基盤にした gp41-標的型膜融合阻害剤の開発研究、に取り組んできた(Chart 1)。前者においては世界に先駆けて強力かつ特異的な拮抗剤を見だし、ペプチド性リード化合物を基にした一連の化学構造の異なる低分子誘導体を創出し、生体内安定型誘導体を用いて固形癌の転移抑制や血液癌の増殖抑制、慢性関節リウマ等の実験小動物モデルにおいて in vivo 有効性を確認しているが、残念ながら X4-ウイルスの hu-SCID マウスモデルでは CXCR4拮抗剤の抗 HIV 剤としての有効性を確認するには至っていない。しかしながら同様なモデルを用いて、当該研究事業において我々が開発中の SC35EK を用いた場合極めて低濃度で HIV-1 の増殖を完全に抑制することを確認した(Chart 2)。

SC34EK は Trimeris-Roche 社の Fuseon(T20)耐性 HIV-1 株に対してもサブナノモラーの極めて低濃度有効に作用することを明らかにしており、次年度以降の研究において医薬品としての適合化研究を計ることの意義は大きいと判断する。

当該研究事業は標的細胞との膜融合というウイルスにとって非常に重要な現象に着目しているが、この現象はウイルスゲノム解読の進行、構造生物学的な視点からもウイルスの種類を問わず比較的類似したタンパク質相互作用によって成立していることが明らかとなりつつある。このことは、膜融合といった共通性の高い段階を標的とする創薬研究は、ある特定のウイルスに対する薬剤開発に寄与するのみならず、多種

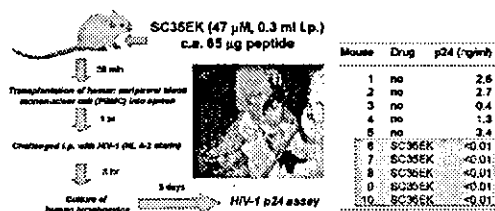
Chart 1. HIV-1 侵入阻害剤の開発状況

Proposed Mechanism of HIV-Entry and Several Inhibitors



N. Fujii, et al.; Expert Opinion Invest. Drug, 12, 185 (2003)

Chart 2. HIV-1 / hu-PBL-SCID mice系にSC35EKの効果



多様なウイルスに対する抗ウイルス剤開発において普遍性の高い革新的方法論を提供すると考えられる。

D. 結論

本年度は、N36 との相互作用に必須でないと推測されたペプチド性 HIV-1 膜融合阻害剤、SC35EK、の C 端側残基を除去することにより HIV 膜融合阻害性ペプチドの低分子化に成功した。さらに、低分子化したペプチドをリード化合物として EE-XX-KK ユニットの部分的非ペプチド化を試み、高い抗 HIV 活性を保持する誘導体を見いだした。また、構造活性相関研究の結果から、 α -helix 形成能が誘導体の活性を左右することを再確認するとともに、SC ペプチドの C 端の EE-XX-KK ユニットの isoster へ変換できる可能性が高いという知見を得ることができた。これらの知見はさらなる低分子化及び非ペプチド化研究において有用な情報となりうると考えられる。

また、ペプチド性 HIV-1 膜融合阻害剤の非ペプチド化、低分子化研究を推進することを目的として、有機銅試薬と求電子剤による還元的アルキル化反応を利用した、(E)-フルオロアルケン含有ジケトピペラジンミメティクスの効率的な合成法を開拓した。さらに、得られたジケトピペラジンミメティクスは、cis 型ペプチド結合に対応する鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターへと変換が可能であることを示した。本研究は、(E)-フルオロアルケン含有ペプチドミメティクスの合成に有益な知見を与えるものと考えられる。これにより(Z)-、および(E)-両方のフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの選択的な合成が可能となった。次年度以降は、ペプチド性膜融合阻害剤の非ペプチド化の方法論として、また非ペプチド性膜融合阻害剤のビルディングブロックとして活用する。

E. 健康危険情報

該当事項無し

F. 研究発表(学会発表、講演等)

1. Otaka, N. Yamamoto, E. Kodama, H. Tamamura, M. Matsuoka, N. Yamamoto, N. Fujii, A General Strategy for Development of Anti-Virus Peptides Based on X-EE-XX-KK Concept for the Alpha-helical Env Sequence: Practice in AIDS and SARS, *3rd International and 28th European Peptide Symposium*, Sep 5-10, 2004, Prague, Czech Republic
2. H. Tamamura, K Hiramatsu, T. Araki, S. Mizokami, S. Oishi, S. Ueda, Z. Wang, S.C. Peiper, J.O. Trent, Low Molecular Weight CXCR4 Antagonists Based on T140 Analogs That Were Identified as Triple-Functional Agents Having Inhibitory Activities against HIV Infection, Cancer, Metastasis and Rheumatoid Arthritis, *3rd International and 28th European Peptide Symposium*, Sep 5-10, 2004, Prague, Czech Republic
3. N. Fujii, Medicinal Chemistry beyond Genomics and Proteomics, *Pharmaceutical Sciences World Congress(PSWC2004)*, May 30-June 4, 2004, Kyoto, Japan
4. N. Fujii, Peptide-lead Drug Templates for Genome-lead Drug Discovery, *6th*

Australia–Japan Symposium on Drug Design and Development, June 27–30, 2004, Sydney, Australia

5. Otaka, S. Ueda, N. Fujii, Synthetic Studies on Membrane Proteins Using Lipid Bilayer-assisted Membrane Peptide Ligation, *Akabori Conference*, April 20–22, 2004, Awaji, Japan
6. N. Fujii, A. Otaka, H. Tamamura, S. Oishi, T. Araki, A. Niida, Peptide-lead Conformationally Restricted Templates for Genome-lead Drug Discovery, *Akabori Conference*, April 20–22, 2004, Awaji, Japan

G. 論文発表

1. Y Zhong, Y Yoshinaka, T Takeda, N Shimizu, S Toshizaki, Y Inagaki, S Matsuda, G Honda, N Fujii, N Yamamoto, Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton, *Antiviral Research*, in press (2005)
2. Tamamura H, Araki T, Ueda S, Wang Z, Oishi S, Esaka A, Trent JO, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Otaka A, Fujii N., Identification of Novel Low Molecular Weight CXCR4 Antagonists by Structural Tuning of Cyclic Tetrapeptide Scaffolds. *J Med Chem* 48(9), 3280–3289 (2005).
3. J.B. Bhonsle, Z. Wang, H. Tamamura, N. Fujii, S.C. Peiper & J.O. Trent, A simple, automated quasi-4D-QSAR, quasi-multi way PLS approach to develop highly predictive QSAR Models for highly flexible CXCR4 inhibitor cyclic peptide ligands using scripted common molecular modeling tools. *QSAR and Combinatorial*, in press (2005)
4. Ichikawa N, Kasai S, Suzuki N, Nishi N, Oishi S, Fujii N, Kadoya Y, Hatori K, Mizuno Y, Nomizu M, Arikawa–Hirasawa E., Identification of Neurite Outgrowth Active Sites on the Laminin alpha4 Chain G Domain. *Biochemistry*, 44(15), 5755–5762 (2005).
5. Percherancier Y, Berchiche Y, Slight I, Volkmer–Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, Heveker N., Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 280(11), 9895–9903 (2005).
6. Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M., Mutations Conferring Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion Inhibitors Are Restricted by gp41 and Rev-Responsive Element Functions. *J Virol* 79(2), 764–770 (2005).
7. Zannettino AC, Farrugia AN, Kortessidis A, Manavis J, To LB, Martin SK, Diamond P, Tamamura H, Lapidot T, Fujii N, Gronthos S., Elevated serum levels of stromal-derived factor-1alpha are associated with increased osteoclast activity and osteolytic bone disease

- in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 65, 1700–9 (2005).
8. H. Tamamura, A. Otaka, and N. Fujii, Development of anti-HIV agents targeting dynamic supramolecular mechanism: Entry and fusion inhibitors based on CXCR4 antagonists and gp41-C34-remodeling peptides. *Current HIV Res.*, in press (2005).
 9. Tamamura H, Hiramatsu K, Ueda S, Wang Z, Kusano S, Terakubo S, Trent JO, Peiper SC, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N., Stereoselective synthesis of [L-Arg-L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-type (*E*)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudopeptide analogues of the CXCR4 antagonist FC131. *J Med Chem.*, 48(2), 380–91 (2005).
 10. Piovan E, Tosello V, Indraccolo S, Cabrelle A, Baesso I, Trentin L, Zamarchi R, Tamamura H, Fujii N, Semenzato G, Chieco-Bianchi L, Amadori A., Chemokine receptor expression in EBV-associated lymphoproliferation in hu/SCID mice: implications for CXCL12/CXCR4 axis in lymphoma generation. *Blood*, 105, 931–9 (2005).
 11. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG., Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunol.*, 5, 943–52 (2004).
 12. Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, Nishi N, Oishi S, Fujii N, Utani A, Kleinman HK, Nomizu M., Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides. *Biochemistry*, 43, 13590–7 (2004).
 13. A. Otaka, S. Ueda, K. Tomita, Y. Yano, H. Tamamura, K. Matsuzaki, and N. Fujii, Facile Synthesis of Membrane-embedded Peptides Utilizing Lipid Bilayer-assisted Chemical Ligation. *Chem. Commun.* 7(15), 1722–1723 (2004).
 14. H. Tamamura and N. Fujii, Two Orthogonal Approaches to Overcome Multi-Drug Resistant HIV-1s: Development of Protease Inhibitors and Entry Inhibitors Based on CXCR4 Antagonists. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 4(2), 103–110 (2004).
 15. N.Yamamoto, R.Yang, Y.Yoshinaka, S.Amari, T.Nakano, J.Cinatl, H.Rabenau, H.W. Doerr, G.Hunsmann, A.Otaka, H.Tamamura, N.Fujii, and N.Yamamoto, HIV protease inhibitor, nelfinavir, inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318(3), 719–725 (2004).
 16. H. Tamamura, M. Fujisawa, K. Hiramatsu, M. Mizumoto, H. Nakashima, N. Yamamoto, A. Otaka, and Fujii , Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett.*, 569(1–3), 99–104 (2004).
 17. H. Peng, Y. Huang, J. Rose, D. Erichsen, S.Herek, N. Fujii, H. Tamamura, J. Zheng , Stromal Cell-Derived Factor 1 Mediated CXCR4 Signaling in Rat and Human Cortical

- Neural Progenitor Cells. *Journal of Neuroscience Research.*, 76, 33-50 (2004)
18. M. Takenaga, H. Tamamura, K. Hiramatsu, N. Nakamura, Y. Yamaguchi, A. Kitagawa, S. Kawai, Y. Mizushima, H. Nakashima, N. Fujii, and R. Igarashi, A Single Treatment with Microcapsules Containing a CXCR4 Antagonist Suppressed Murine Pulmonary Metastasis of murine melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320(1), 226-232 (2004).
 19. A. Otaka, E. Mitsuyama, J. Watanabe, H. Watanabe, and N. Fujii, Synthesis of Fluorine-Containing Bioisosteres Corresponding to Phosphoamino Acids and Dipeptide Units. *Biopolymers*, 76, 140-149 (2004)
 20. W.B. Zhang, Z.X. Wang, J.L. Murphy, N. Fujii, J. Broach & S.C. Peiper, Functional Expression of CXCR4 in *S. cerevisiae*: Development of Tools for Mechanistic and Pharmacologic Studies. *Chemokine Roles in Immunoregulation and Disease*, ed by P.M. Murphy & R. Horuk, Springer, 45, 125-152 (2004)
 21. A. Otaka, J. Watanabe, A. Yukimasa, Y. Sasaki, H. Watanabe, T. Kinoshita, S. Oishi, H. Tamamura, and N. Fujii, SmI₂-mediated Reduction of γ,γ -Difluoro- α,β -enoates and Its Application to the Synthesis of (*Z*)-Fluoroalkene-type Dipeptide Isosteres. *J. Org. Chem.*, 69, 1634-1645 (2004)
 22. T. Mori, R. Doi, T. Masui, M. Koizumi, E. Toyoda, S. S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Masui, K. Fujimoto, H. Tamamura, K. Hiramatsu, N. Fujii, and M. Imamura, CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 29-37 (2004)
 23. T. Masui, R. Dori, T. Mori, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Koizumi, E. Toyoda, S.S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Kuhara, N. Fujii, S. Oishi, A. Niida, S.C. Peiper, J. R. Braoch, and M. Imamura, Metastin and Its variant Forms Suppress Migration of Pancreatic Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315(1), 85-92 (2004).
 24. H. Ohno, Y. Takemoto, N. Fujii, T. Tanaka, and T. Ibuka, Stereodivergent Synthesis of Chiral 2-Alkenylaziridines: Palladium(0)-Catalyzed 2,3-*cis*-Selective Aziridination and Base-Mediated 2,3-*trans*-Selective Aziridination. *Chem. Pharm. Bull.*, 52(1), 111-119 (2004).
 25. R. Yanada, Y. Koh, N. Nashimori, A. Matsumura, S. Obika, H. Mitsuya, N. Fujii, and Y. Takemoto, Indium-mediated Atom-transfer and Reductive Radical Cyclizations of Iodoalkynes: Synthesis and Biological Evaluation of HIV-Protease Inhibitors. *J. Org. Chem.*, 69(7), 2417-2422 (2004).
 26. H. Tamamura, M. Mizumoto, K. Hiramatsu, S. Kusano, S. Terakuba, N. Yamamoto, J. O. Trent, Z. Wang, S.C. Peiper, H. Nakashima, A. Otaka, and N. Fujii, Topochemical exploration of potent compounds using retro-enantiomer libraries of cyclic pentapeptides

Org. Biomol. Chem., 2(8), 1255–1257 (2004).

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し

I. 謝辞

Hu-PBL-SCID マウスを用いる各種薬物の抗 HIV 活性を評価していただいた、琉球大学、田中勇悦 教授に感謝します。

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

分担研究者：千葉 卓男 秋田工業高等専門学校・物質工学科・教授



研究要旨 抗菌剤サルファール剤；海洋生物に含まれるカルバモイルアミノ酸；抗 HIV 活性のあるナフトレンスルホン酸；抗 RS ウイルス活性のあるベンズイミダゾール；抗インフルエンザ薬アマンタジン等の生理活性化合物を出発原料として用い、それぞれの化学的性質を利用して化学修飾を行い 41 種類の誘導体を合成した。この中で 6 種類の誘導体が細胞レベルで抗 HIV 効果を示した (EC_{50} 0.24-43 $\mu\text{g/ml}$, CC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$)。また、アマンタジン誘導体を含む 13 種類はいずれも細胞毒性を示したが、残りの 22 種類は全く活性を示さなかった。

A. 研究目的

HIV-細胞融合阻害活性を有する小分子化合物を合成・同定し、その作用機序を明らかにする。

B. 研究方法

小分子化合物の合成に際し、生理活性を有する化合物（抗菌剤サルファール剤；海洋生物に含まれるカルバモイルアミノ酸；抗 HIV 活性のあるナフトレンスルホン酸；抗 RS ウイルス活性のあるベンズイミダゾール；抗インフルエンザ薬アマンタジン）を出発原料として用い、それぞれの化合物に含まれる官能基の性質を有効に利用して各種誘導体を化学合成した。

（倫理面への配慮）

毒性の強い化合物を扱っていないので特に無。

C. 研究結果

1) 抗菌剤サルファール剤の原料であるスルファニル酸を有するヒドラジノアセトアセチルアミノ酸誘導体を 5 種類合成した。この中で 1 種類のサンプル (D-フェニルアラニンと L-イソロイシンを有する化合物) が弱いながら活性を示した (EC_{50} 4.4 $\mu\text{g/ml}$, CC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$ on MTT)。

2) 海洋生物に含まれるカルバモイルアミノ酸を用いる核酸塩基類似体ジヒドロピリミドン誘導体を 8 種類合成した。この中に活性を示す化合物はなかった。

3) 抗 HIV 活性のあるナフトレンスルホン酸誘導体を応用したアゾ色素を 5 種類合成した (未発表)。いずれのサンプルも弱いながら活性を示した (EC_{50} 0.24-43 $\mu\text{g/ml}$, CC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$ on MTT, EC_{50} 0.46-20 $\mu\text{g/ml}$, CC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$ on MAGI)。

4) 抗 RS ウイルス活性のあるベンズイミダゾール誘導体の関連化合物を 10 種類合成した (未発表)。いずれのサンプルも細胞毒性を示した。

5) 抗インフルエンザ薬であるアマンタジンを出発原料としたアミノ基の化学修飾による誘導体を 13 種類合成した (未発表)。いずれのサンプルも細胞毒性を示した。

D. 考察

研究結果 1) で、部分構造としてスルフォニルイソロイシンが必須と考えられるので、活性向上のためにはアセトアセチル基部位のアミノ酸の種類を換える必要がある。

研究結果 2) で、カルバモイルアミノ酸のアミノ酸の種類を再検討する必要がある。

研究結果 3) で、活性を示したがアゾ色素であるため、薬剤として使用するには、化学修飾による活性の向上とともに副作用をどう抑えるかが課題である。

研究結果 4), 5) で、ベンズイミダゾール及びアマンタジン関連の化合物は細胞毒性を示したので、毒性の軽減化と抗 HIV 活性をどう引き出すのか、化学修飾が今後の課題である。

E. 結論

今回の研究では、弱いながら若干の抗 HIV 活性を示す化合物を数種類見出すことができたので、この知見から、原料となる生理活性化合物の種類を増やししながら、少量で活性の強い、小分子型の薬剤の開発を継続して行うことが必要と考えている。

F. 健康危険情報

特に無。

G. 研究発表

1) 沼山康紀, 千葉卓男 「スルフォニルアミノ酸を有するヒドラジノアセトアセチルアミノ酸の抗ウイルス剤への応用研究」平成16年度化学系学協会東北大会(盛岡)講演予稿集 p237 (2004年9月)

2) 井手口大輔, 千葉卓男 「抗ウイルス活性を指標としたカルバモイルアミノ酸を用いるジヒドロピリミジン誘導体の創製」平成16年度化学系学協会東北大会(盛岡)講演予稿集 p238 (2004年9月)

1. 論文発表

投稿準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

無。

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
 分担研究者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nameki D, <u>Kodama E</u> , Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, <u>Matsuoka M</u> .	Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions.	J Virol	79	764-770	2005
Naoyuki Masuda, Osamu Yamamoto, Masahiro Fujii, Tetsuro Ohgami, Jiro Fujiyasu, Toru Kontani, Ayako Morimoto, Masaya Orita, Hiroyuki Kurihara, Hironobu Koga, Shunji Kageyama, Mitsuaki Ohta, Hiroshi Inoue, Toshifumi Hatta, Masafumi Shintani, Hiroshi Suzuki, Kenji Sudo, Yasuaki Shimizu, <u>Eiichi Kodama</u> , <u>Masao Matsuoka</u> , Masaoshi Fujiwara, Tomoyuki Yokota, Shiro Shigeta and Masanori Baba.	Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: Synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonami de derivatives.	Bioorganic & Medical Chemistry	13	949-961	2005
Kitano K, Kohgo S, Yamada K, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Mitsuya H, Ohru H.	Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxypurine nucleosides as antiviral agents against HIV and HBV.	Antivir Chem Chemother	14	161-167	2004
Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Iwai Y, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Mitsuya H, Ohru H.	Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides.	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids	23	671-690	2004

Hachiya A, Gatanaga H, <u>Kodama E</u> , Ikeuchi M, <u>Matsuoka M</u> , Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S.	Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients.	Virology	327	215-224	2004
Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M.	Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidenebenzenesulfonamides.	Bioorg Med Chem	12	6171-6182	2004
Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, <u>Kodama E</u> , Mitsuya H, Ohru H.	Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1.	Antiviral Chem Chemother	15	169-187	2004
Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Nameki D, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Sugiura Y.	RNase S complex bearing arginine-rich peptide and anti-HIV activity.	J Mol Recognit	18	169-174	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者:京都大学薬学研究科 藤井信孝 大高 章

書籍

(該当事項なし)

雑誌

1. Y Zhong, Y Yoshinaka, T Takeda, N Shimizu, S Toshizaki, Y Inagaki, S Matsuda, G Honda, N Fujii, N Yamamoto, Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton *Antiviral Research in press* (2005)
2. Tamamura H, Araki T, Ueda S, Wang Z, Oishi S, Esaka A, Trent JO, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Otaka A, Fujii N., Identification of Novel Low Molecular Weight CXCR4 Antagonists by Structural Tuning of Cyclic Tetrapeptide Scaffolds. *J Med Chem* 48(9), 3280-3289 (2005).
3. J.B. Bhonslel, Z. Wang, H. Tamamura, N. Fujii, S.C. Peiper & J.O. Trent, A simple, automated quasi-4D-QSAR, quasi-multi way PLS approach to develop highly predictive QSAR Models for highly flexible CXCR4 inhibitor cyclic peptide ligands using scripted common molecular modeling tools. *QSAR and Combinatorial, in press* (2005)
4. Ichikawa N, Kasai S, Suzuki N, Nishi N, Oishi S, Fujii N, Kadoya Y, Hatori K, Mizuno Y, Nomizu M, Arikawa-Hirasawa E., Identification of Neurite Outgrowth Active Sites on the Laminin alpha4 Chain G Domain. *Biochemistry* 44(15), 5755-5762 (2005).
5. Percherancier Y, Berchiche Y, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, Heveker N., Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 280(11), 9895-9903 (2005).
6. Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M., Mutations Conferring Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion Inhibitors Are Restricted by gp41 and Rev-Responsive Element Functions. *J Virol* 79(2), 764-70 (2005).
7. Zannettino AC, Farrugia AN, Kortessidis A, Manavis J, To LB, Martin SK, Diamond P, Tamamura H, Lapidot T, Fujii N, Gronthos S., Elevated serum levels of stromal-derived factor-1alpha are associated with increased osteoclast activity and osteolytic bone disease in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 65, 1700-9 (2005).
8. H. Tamamura, A. Otaka, and N. Fujii, Development of anti-HIV agents targeting dynamic supramolecular mechanism: Entry and fusion inhibitors based on CXCR4 antagonists and gp41-C34-remodeling peptides *Current HIV Res., in press* (2005).

9. Tamamura H, Hiramatsu K, Ueda S, Wang Z, Kusano S, Terakubo S, Trent JO, Peiper SC, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N., Stereoselective synthesis of [L-Arg-L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-type (*E*)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudopeptide analogues of the CXCR4 antagonist FC131. *J Med Chem* 48(2), 380-91 (2005).
10. Piovano E, Tosello V, Indraccolo S, Cabrelle A, Baesso I, Trentin L, Zamarchi R, Tamamura H, Fujii N, Semenzato G, Chieco-Bianchi L, Amadori A., Chemokine receptor expression in EBV-associated lymphoproliferation in hu/SCID mice: implications for CXCL12/CXCR4 axis in lymphoma generation. *Blood* 105, 931-9 (2005).
11. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG., Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunol*, 5, 943-52 (2004).
12. Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, Nishi N, Oishi S, Fujii N, Utani A, Kleinman HK, Nomizu M., Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides. *Biochemistry* 43, 13590-7 (2004).
13. A. Otaka, S. Ueda, K. Tomita, Y. Yano, H. Tamamura, K. Matsuzaki, and N. Fujii, Facile Synthesis of Membrane-embedded Peptides Utilizing Lipid Bilayer-assisted Chemical Ligation. *Chem. Commun.* 7(15), 1722-1723 (2004).
14. H. Tamamura and N. Fujii, Two Orthogonal Approaches to Overcome Multi-Drug Resistant HIV-1s: Development of Protease Inhibitors and Entry Inhibitors Based on CXCR4 Antagonists. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 4(2), 103-110 (2004).
15. N. Yamamoto, R. Yang, Y. Yoshinaka, S. Amari, T. Nakano, J. Cinatl, H. Rabenau, H. W. Doerr, G. Hunsmann, A. Otaka, H. Tamamura, N. Fujii, and N. Yamamoto, HIV protease inhibitor, nelfinavir, inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318(3), 719-725 (2004).
16. H. Tamamura, M. Fujisawa, K. Hiramatsu, M. Mizumoto, H. Nakashima, N. Yamamoto, A. Otaka, and Fujii, Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett.*, 569(1-3), 99-104 (2004).
17. H. Peng, Y. Huang, J. Rose, D. Erichsen, S. Herek, N. Fujii, H. Tamamura, J. Zheng, Stromal Cell-Derived Factor 1 Mediated CXCR4 Signaling in Rat and Human Cortical Neural Progenitor Cells. *Journal of Neuroscience Research.*, 76, 33-50 (2004)
18. M. Takenaga, H. Tamamura, K. Hiramatsu, N. Nakamura, Y. Yamaguchi, A. Kitagawa, S. Kawai, Y. Mizushima, H. Nakashima, N. Fujii, and R. Igarashi, A Single Treatment with Microcapsules Containing a CXCR4 Antagonist Suppressed Murine Pulmonary Metastasis of murine melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320(1), 226-232 (2004).
19. A. Otaka, E. Mitsuyama, J. Watanabe, H. Watanabe, and N. Fujii, Synthesis of Fluorine-Containing Bioisosteres Corresponding to Phosphoamino Acids and Dipeptide Units *Biopolymers* 76, 140-149 (2004)
20. W.B. Zhang, Z.X. Wang, J.L. Murphy, N. Fujii, J. Broach & S.C. Peiper, Functional Expression of CXCR4 in *S. cerevisiae*: Development of Tools for Mechanistic and

- Pharmacologic Studies. *Chemokine Roles in Immunoregulation and Disease*, ed by P. M. Murphy & R. Horuk, Springer, 45, 125-152 (2004)
21. A. Otaka, J. Watanabe, A. Yukimasa, Y. Sasaki, H. Watanabe, T. Kinoshita, S. Oishi, H. Tamamura, and N. Fujii, SmI₂-mediated Reduction of γ,γ -Difluoro- α,β -enoates and Its Application to the Synthesis of (*Z*)-Fluoroalkene-type Dipeptide Isosteres. *J. Org. Chem.*, 69, 1634-1645 (2004)
 22. T. Mori, R. Doi, T. Masui, M. Koizumi, E. Toyoda, S. S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Masui, K. Fujimoto, H. Tamamura, K. Hiramatsu, N. Fujii, and M. Imamura, CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 29-37 (2004)
 23. T. Masui, R. Dori, T. Mori, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Koizumi, E. Toyoda, S.S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Kuhara, N. Fujii, S. Oishi, A. Niida, S.C. Peiper, J. R. Braoch, and M. Imamura, Metastin and Its variant Forms Suppress Migration of Pancreatic Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315(1), 85-92 (2004).
 24. H. Ohno, Y. Takemoto, N. Fujii, T. Tanaka, and T. Ibuka, Stereodivergent Synthesis of Chiral 2-Alkenylaziridines: Paladium(0)-Catalyzed 2,3-*cis*-Selective Aziridination and Base-Mediated 2,3-*trans*-Selective Aziridination. *Chem. Pharm. Bull.*, 52(1), 111-119 (2004).
 25. R. Yanada, Y. Koh, N. Nashimori, A. Matsumura, S. Obika, H. Mitsuya, N. Fujii, and Y. Takemoto, Indium-mediated Atom-transfer and Reductive Radical Cyclizations of Iodoalkynes: Synthesis and Biological Evaluation of HIV-Protease Inhibitors. *J. Org. Chem.*, 69(7), 2417-2422 (2004).
 26. H. Tamamura, M. Mizumoto, K. Hiramatsu, S. Kusano, S. Terakuba, N. Yamamoto, J. O. Trent, Z. Wang, S.C. Peiper, H. Nakashima, A. Otaka, and N. Fujii, Topochemical exploration of potent compounds using retro-enantiomer libraries of cyclic pentapeptides *Org. Biomol. Chem.*, 2(8), 1255-1257 (2004).

Mutations Conferring Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion Inhibitors Are Restricted by gp41 and Rev-Responsive Element Functions

Daisuke Nameki,¹ Eiichi Kodama,^{1*} Mieko Ikeuchi,¹ Naoto Mabuchi,² Akira Otaka,³ Hirokazu Tamamura,³ Mutsuhito Ohno,² Nobutaka Fujii,³ and Masao Matsuoka¹

Laboratory of Virus Immunology¹ and Laboratory of Biochemistry,² Institute for Virus Research, Graduate School of Pharmaceutical Science,³ Kyoto University, Kyoto, Japan

Received 24 May 2004/Accepted 27 August 2004

One of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope proteins, gp41, plays a key role in HIV fusion. A gp41-derived peptide, T-20, efficiently inhibits HIV fusion and is currently approved for treatment of HIV-infected individuals. Although resistant variants have been reported, the mechanism of the resistance remains to be defined. To elucidate the mechanism in detail, we generated variants resistant to C34, a peptide derived from the gp41 carboxyl terminus heptad repeat (C-HR) *in vitro*. The resistant variants had a 5-amino-acid deletion in gp120 and a total of seven amino acid substitutions in gp41. Binding assays revealed that an I37K substitution in the N-terminal heptad repeat (N-HR) impaired the binding of C34, whereas an N126K substitution in the C-HR enhanced the binding to mutated N-HR, indicating that both mutations were directly involved in resistance. On the other hand, substitutions for A30 and D36 seemed to be secondary mutations, located complementary to each other in the Rev-responsive element (RRE), and were mutated simultaneously to maintain the secondary structure of the RRE that was impaired by the mutations at I37. Thus, HIV acquired resistance to C34 by mutations in N-HR, which directly interacted with C34. However, since this region also encoded the RRE, additional mutations were required to maintain viral replication. These results suggest that HIV fusion is one of the attractive targets for HIV chemotherapy.

Peptide inhibitors that block human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion were first reported by Wild et al. (30). Recently, a peptide fusion inhibitor (T-20 or enfuvirtide) has been approved in the United States and Europe for treatment of HIV-infected individuals. The peptide sequence of T-20 is derived from the gp41 C terminus heptad repeat (C-HR) sequence, which corresponds to a linear region of 36 amino acids, and T-20 inhibits fusion by binding to the N-terminal heptad repeat (N-HR) of gp41 and preventing 6-helix bundle formation (4, 30). In HIV-infected patients, the effect of T-20 in combination with an antiretroviral regimen that was optimized with the aid of phenotypic and genotypic resistance testing (TORO 1 and 2) has been reported to suppress drug-resistant HIV replication more efficiently than the optimized regimen alone (17, 18).

The emergence of T-20-resistant HIV-1 was first reported in clinical patients receiving T-20 monotherapy in a phase I clinical trial (28) and subsequently in combined regimens employed in phase II and III trials of T-20 (23, 25). The T-20 susceptibility of recombinant HIV-1 containing the identified substitutions was examined *in vitro* and considered to be moderately resistant (5.4- to 6.3-fold) (28). However, the detailed mechanism of resistance of these variants still remains to be elucidated. On the other hand, Rimsky et al. revealed that three continuous amino acids in the N-HR (GIV at positions 36 to 38 of gp41) were crucial for the inhibition of HIV-1 entry

by T-20 and for efficient association between N-HR and T-20 *in vitro* (26). Fikkert et al. also reported that HIV-1 variants resistant to T-20 contained substitutions in gp41, L33S and N43K, and a deletion of 5 amino acids, FNSTW (Δ FNSTW), in the V4 region of gp120 (9). L33S and N43K contributed to T-20 resistance, whereas the 5-amino-acid deletion alone had little effect on T-20 sensitivity. These results suggest that substitutions in the N-HR directly affect T-20 binding. Although the baseline sensitivity of HIV-1 to T-20 is defined by amino acid substitutions in gp41, coreceptor specificity is influenced by substitutions in the V3 loop in gp120, affects the fusion kinetics, and modulates T-20 sensitivity (4, 5).

To elucidate the mechanism of resistance to the peptide fusion inhibitors, we generated and characterized HIV-1 variants resistant to C34, a gp41 C-HR-derived peptide (2, 22) (Fig. 1A). During the selection of C34-resistant variants, we observed a 5-amino-acid deletion in the gp120 V4 region and a total of seven amino acid substitutions in gp41. Among the deletion and the substitutions, I37K and N126K play a key role in the resistance to C-HR-derived peptides, including T-20. Other deletions or substitutions were considered to enhance C34 resistance and/or improve the impaired replication kinetics. A30V and D36G maintained the Rev-responsive element (RRE) structure destabilized by I37T and I37K, respectively. Thus, these results reveal that the deletions or substitutions conferring resistance are restricted by both gp41 and RRE functions, suggesting that HIV-1 fusion is one of the most ideal targets for chemotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. MT-2 and Cos-7 cells were grown in RPMI 1640- and Dulbecco's modified Eagle medium-based culture medium, respectively. HeLa-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Virus Immunology, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Shogoin Kawaramachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Phone 81-75-751-3986. Fax: 81-75-751-3986. E-mail: ekodama@virus.kyoto-u.ac.jp.

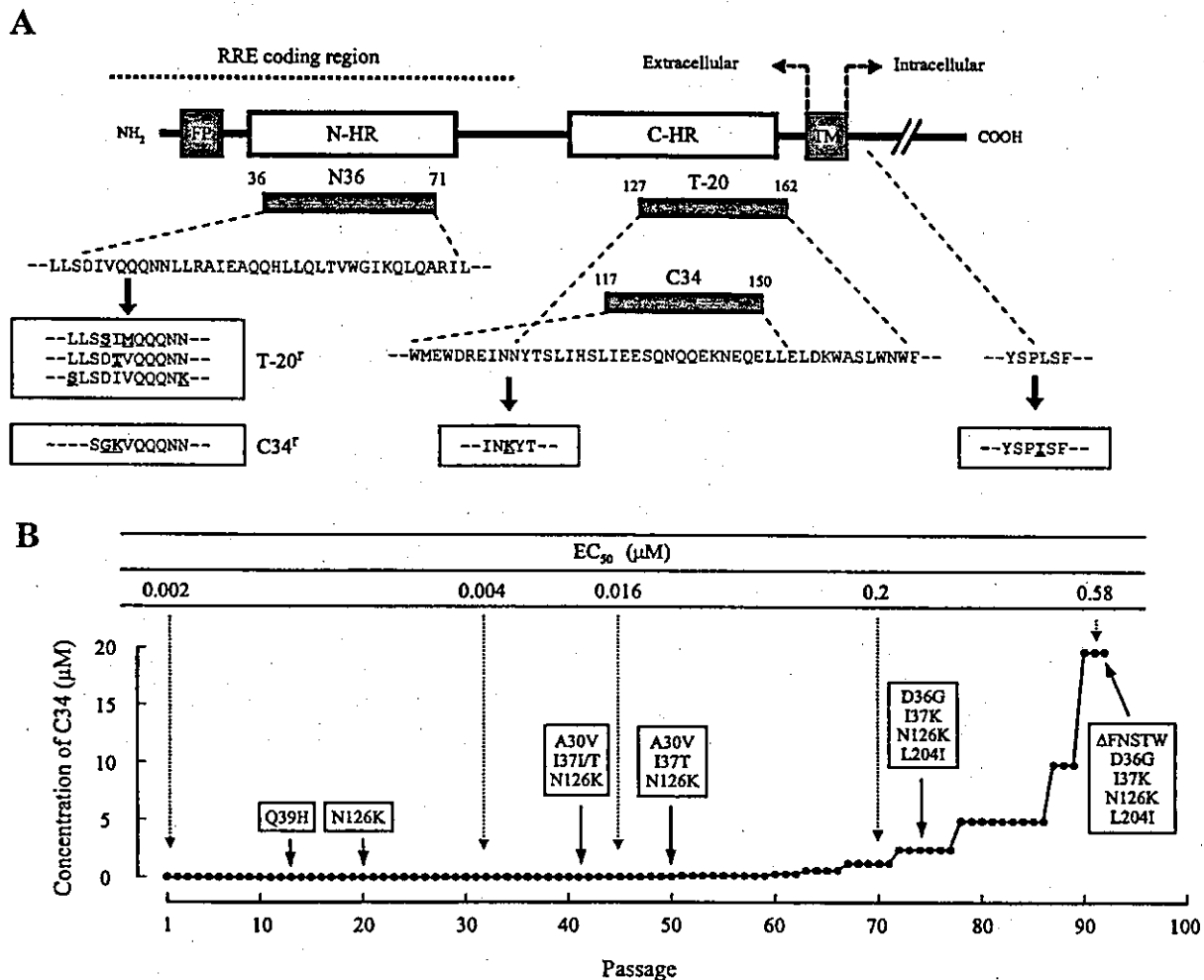


FIG. 1. Schematic view of HIV-1 gp41 (A) and induction of C34-resistant HIV-1 (B). The locations of the fusion peptide (FP), N-terminal heptad repeat region (N-HR), C-terminal heptad repeat region (C-HR), transmembrane domain (TM), various gp41-derived peptides, and the Rev-responsive element (RRE) coding region are shown (A). The residue numbers of each peptide correspond to their positions in gp41. The bold underlined letters in the boxes indicate the novel mutations that have been reported in T-20-resistant HIV-1 variants (T-20^f) in vitro (9, 26) and that have been observed in C34-resistant HIV-1 variants (C34^f). (B) HIV-1_{NL4-3} was passaged in the presence of increasing concentrations of C34 in MT-2 cells. The dose-escalating selection was carried out for a total of 93 passages, with compound concentrations ranging from 0.0001 to 20 µM. At the indicated passages, proviral DNAs from the lysates of infected cells were sequenced, and the EC₅₀s of the HIV-1 variants were determined with the MAGI assay.

CD4-LTR-β-gal cells were kindly provided by M. Emerman through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Disease (Bethesda, Md.), and used for the drug susceptibility assay (multinuclear activation of galactosidase indicator [MAGI] assay) as described previously (12, 14, 21). An HIV-1 infectious clone, pNL4-3, which was kindly provided by H. Sakai, Institute for Virus Research, Kyoto University (Kyoto, Japan), was used for constructions and the production of HIV-1 variants. A wild-type HIV-1, HIV-1_{WT}, was generated by transfection of pNL4-3 into Cos-7 cells.

Antiviral agents. The peptides used were N36, derived from the N-HR of gp41, and C34 and T-20, derived from the C-HR of gp41. The peptides were synthesized as described previously (24) and are depicted in Fig. 1A. 2',3'-Dideoxycytidine (ddC) was purchased from Sigma (St. Louis, Mo.).

Determination of drug susceptibility of HIV-1. The peptide sensitivity of infectious clones was determined by the MAGI assay with some modifications (14, 21). Briefly, the target cells (HeLa-CD4-LTR-β-gal; 10⁴ cells/well) were plated in 96-well flat microtiter culture plates. On the following day, the cells were inoculated with the HIV-1 clones (60 MAGI U/well, giving 60 blue cells after 48 h of incubation) and cultured in the presence of various concentrations of drugs in fresh medium. Forty-eight hours after viral exposure, all the blue cells

stained with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) were counted in each well. The activity of test compounds was determined as the concentration that blocked HIV-1 replication by 50% (50% effective concentration [EC₅₀]).

Construction of recombinant HIV-1 clones. Recombinant infectious HIV-1 clones carrying various mutations in gp120 and/or gp41 were generated by using pNL4-3. Briefly, the desired mutations were introduced into the NheI-BamHI region (1,220 bp) of pSLgp41_{WT}, which encoded nucleotides 7250 to 8469 of pNL4-3, by an oligonucleotide-based mutagenesis method (29). NheI-BamHI fragments were inserted into pNL4-3, generating various molecular clones with the desired mutations. Each molecular clone was transfected into Cos-7 cells (10⁵ cells/six-well culture plate). After 48 h, MT-2 cells (10⁵ cells/well) were added and cocultured with the Cos-7 cells for an additional 24 h. When an extensive cytopathic effect (CPE) was observed, the supernatants were harvested and stored at -80°C until use.

Generation of HIV-1 variants resistant to C34. MT-2 cells were exposed to HIV-1_{WT} and cultured in the presence of C34 at an initial concentration of 0.0001 µM. Cultures were incubated at 37°C until an extensive CPE was observed. The culture supernatants were used for further passages in MT-2 cells in the presence of twofold increasing concentrations of C34 when massive CPEs

were seen in the earlier periods. Such dose-escalating culture was performed until resistant variants were obtained. This selection was carried out for a total of 93 passages. At the indicated passages (Fig. 1B), the sequence of the *env* region was determined by direct sequencing of the proviral DNA extracted from the infected MT-2 cells.

Viral replication kinetics assay. MT-2 cells (10^5 cells/5 ml) were infected with each virus preparation (500 MAGI U) for 4 h. The infected cells were then washed and cultured in a final volume of 5 ml. The culture supernatants (100 μ l) were harvested on days 1, 2, 4, 6, and 8 after infection, and the p24 antigen amounts were determined.

For competitive HIV-1 replication assays (CHRA), two titrated infectious clones to be examined were mixed and added to MT-2 cells (10^5 cells/3 ml) as described previously (15) with some modifications. To ensure that the two infectious clones being compared were of approximately equal infectivity, a fixed amount (500 MAGI U) of one infectious clone was mixed with three different amounts (250, 500, and 1,000 MAGI U) of the other infectious clone. On day 1, one third of the infected MT-2 cells were harvested and washed twice with phosphate-buffered saline, and the cellular DNA was extracted. The purified DNA was subjected to nested PCR and then direct DNA sequencing. The HIV-1 coculture which best approximated a 50:50 mixture on day 1 was further propagated. Every 6 to 7 days, the cell-free supernatant of the virus coculture (1 ml) was transmitted to new uninfected MT-2 cells. The cells harvested at the end of each passage were subjected to direct sequencing, and the viral population change was determined.

Binding assay. Each peptide (40 μ M) was mixed with 10 mM phosphate-buffered saline–140 mM NaCl, pH 7.4, in an Aviv model 202 DS spectrometer equipped with a thermoelectric temperature controller. The thermal stability was assessed by monitoring the change in the circular dichroism signal at 222 nm. The midpoint of the thermal unfolding transition (melting temperature [T_m]) of each complex was determined as described previously (24).

Gel shift assay. RNA of the RRE region and recombinant Rev were prepared as described previously (10) with some modifications. Briefly, the RRE region of the variants (nucleotides 7748 to 8009 of pNL4-3) was introduced into pBlue-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.). In vitro RNA transcription was performed with T7 RNA polymerase and [32 P]UTP. Recombinant Rev was generated by use of the pGEX-6P-1/BL21 expression system (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.). The RNA and Rev were mixed at 25°C for 20 min in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 8% glycerol, 50 μ g of tRNA/ml, and 100 μ g of bovine serum albumin/ml) and subjected to native acrylamide gel electrophoresis.

RESULTS

Amino acid substitutions identified in the *env* region of C34-resistant HIV-1. At passage 14 (P-14) in the culture where HIV-1 was propagating in the presence of C34 (0.0032 μ M), one amino acid substitution, glutamine to histidine at position 39 (Q39H), in the N-HR of gp41 was transiently identified (Fig. 1B). At P-20 (0.0064 μ M), a substitution, N126K, was newly identified in the C-HR, whereas Q39H had returned to the original wild-type amino acid. At P-41 (0.026 μ M), two substitutions, A30V and I37I/T (mixture of I and T), were observed in the N-HR in addition to N126K, while at P-50 (0.077 μ M), definitive I37T was detected (A30V/I37T/N126K) (Fig. 1B). At P-75 (2.5 μ M), A30V had returned to the original wild-type amino acid, D36G was detected, I37T was substituted for I37K, and L204I, which was located in the cytoplasmic domain of gp41, was identified (D36G/I37K/N126K/L204I). At P-92 (20 μ M), a deletion of five amino acids, FNSTW, in the V4 loop of gp120 (Δ FNSTW) was observed together with the four substitutions (Δ FNSTW/D36G/I37K/N126K/L204I) (Fig. 1B). In addition to the *env* region, we also examined the Tat- and Rev-encoding regions but did not observe any substitutions. These results suggest that, in order to develop a higher resistance to C34, HIV-1 acquires not only multiple substitutions in gp41 but also the 5-amino-acid deletion in gp120.

Susceptibility of the different *env* recombinant viruses to fusion inhibitors. To clarify which substitutions among the identified changes were responsible for C34 resistance, we first generated infectious HIV-1 clones containing the deletion (Δ FNSTW) in gp120 or the single amino acid substitutions (A30V, D36G, I37T, I37K, Q39H, N126K, or L204I) in gp41 that were observed during the selection procedure (Fig. 1B). We also evaluated the activities of the gp41-derived peptides N36, T-20, and C34 and a reverse transcriptase inhibitor used as a control, ddC, against these strains with the MAGI assay (Table 1).

HIV-1 $_{\Delta$ FNSTW, HIV-1 $_{A30V}$, HIV-1 $_{Q39H}$, and HIV-1 $_{L204I}$ showed weak resistance to C34 compared with HIV-1 $_{WT}$ (less than fivefold). Interestingly, D36G, observed in the majority of HIV-1 strains (16), conferred an increased T-20 susceptibility to HIV-1 (10-fold), in agreement with previous reports (20, 26), whereas D36G did not contribute C34 resistance by itself (0.8-fold). Although I37T has also been reported as one of the T-20 resistance mutations in vitro, its detailed mechanism of resistance remains unknown (20, 26). In our experiments, I37T conferred T-20 and C34 resistance to HIV-1 (13- and 11-fold, respectively), and I38K also conferred both T-20 and C34 resistance (212- and 13-fold, respectively). HIV-1 $_{N126K}$ showed moderate resistance to C34 (6.8-fold). Neither the deletion in gp120 nor any of the substitutions in gp41 conferred resistance to N36 or ddC (Table 1).

Although the I37 substitutions appeared to be primarily responsible for C34 resistance, the C34 resistance levels of the I37 substitution variants were not comparable to that of the selected virus at P-93 (EC $_{50}$, 0.78 μ M). Therefore, we generated infectious HIV-1 clones containing the identified substitutions combined with I37T or I37K and determined their susceptibilities to the peptides (Table 1). The combination of I37K and N126K enhanced C34 resistance (13- to 28-fold), whereas HIV-1 $_{I37T}$, HIV-1 $_{I37T/N126K}$, and HIV-1 $_{A30V/I37T/N126K}$ showed comparable resistance levels to C34. Moreover, I37K/N126K combined with D36G (D36G/I37K/N126K) enhanced C34 resistance (72-fold), although the L204I substitution combined with D36G/I37K/N126K decreased the levels of resistance to both T-20 and C34 (10- and 54-fold, respectively). A clone containing the deletion in gp120 and four substitutions in gp41, HIV-1 $_{\Delta$ FNSTW/D36G/I37K/N126K/L204I, showed the highest resistance to C34 (83-fold) and cross-resistance to T-20 (64-fold). These results indicate that the I37K substitution is mainly responsible for C34 resistance, whereas the other substitutions enhance the resistance or improve the impaired viral replication kinetics.

Next, we generated a T-20-resistant molecular clone which had been previously reported (26), HIV-1 $_{D36S/V38M}$, and evaluated the susceptibility to N36, T-20, and C34. HIV-1 $_{D36S/V38M}$ showed moderate resistance to both T-20 and C34 (5.1- and 7.7-fold, respectively) (Table 1). We also generated HIV-1 variants that contained each of the single substitutions, HIV-1 $_{D36S}$ and HIV-1 $_{V38M}$. HIV-1 $_{D36S}$ did not contribute to the resistance, although HIV-1 $_{V38M}$ showed cross-resistance to T-20 and C34 (26- and 15-fold, respectively). Combined with the finding that I37K is the major mutation for resistance to C34, this region, positions 37 and 38 of gp41, appears to be involved in resistance to both T-20 and C34, while changes at position 36 appear to be largely restricted in their effects to T-20.