

201009018A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗HIV化学療法剤の開発
(H22-政策創薬-一般-005)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成23 (2011) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発 -----1 研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授） -----4 大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）	4
2. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長） -----13	13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授） -----17	17
2. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授） -----43 大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）	43
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長） -----119	119

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄

研究要旨

HIV/AIDS に対する化学療法において、薬剤耐性 HIV の出現は回避困難な問題である。そのため、新たな標的に作用する抗 HIV 剤は耐性 HIV の制御に必須である。本研究ではこれまでに同定した新規骨格を有する小分子抗 HIV 化合物の高活性化ならびに CXCR4 選択的阻害剤の開発研究を基に、多剤耐性 HIV にも効果を示す新規抗 HIV 剤の臨床応用を推し進め、現在の抗 HIV/AIDS 療法をより安全で確実な治療法へと発展させる。

A. 研究目的

HIV 感染症に対して、数種類の抗 HIV 薬を組み合わせて服用する多剤併用療法は、HIV 感染者・AIDS 患者の予後を著しく改善した。しかしながら、薬剤の服用が長期になるにつれ、薬剤耐性 HIV の出現や副作用などの問題が顕著になってきている。このため、既存の薬剤に耐性を示す HIV の制御が可能な新規標的に作用する阻害剤の同定や、より安全性の高い治療薬の開発などが急務となっている。そこで本研究課題では、新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発を目的とする。具体的には、(1) 我々がこれまでの研究により見出した新規骨格を有する複数の小分子化合物について、富士フイルム株式会社と京都大学の連携により、効率的な構造最適化研究および作用機序解析による新規抗 HIV 剤の開発研究、(2) CXCR4 選択的阻害剤について、耐性プロファイルの解析や高活性誘導体の開発を通して、CXCR4 阻害剤の実用化へ向けた研究を行う。これらの研究のうち、(1) では、すでにリード化合物 (PD 404182) を同定しており、本年度は、抗 HIV 活性の高活性化に必要な部分構造を同定した。また、標的分子の同定のために光アフィニティープローブの合成も成功した。また、(2) の研究では、従来の拮抗剤と比較して約 20 倍高活性な誘導体を作製し、さらには、経口投与可能な高活性 CXCR4 阻害剤の耐性プロファイルを解析した。これらの研究から、一連の新規標的に対する新規小分

子抗 HIV 薬の開発ならびに臨床応用を目指す。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5-LTR/beta-galactosidase (MAGI) 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清 (FCS)、0.2 mg/mL G418、0.2 mg/mL ハイグロマイシン、および、0.05 mg/mL ピューロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。

抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) assay を用いた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50% 阻害する濃度 (EC₅₀) を算出し評価した。

抗 HIV-1 活性を有する小分子化合物の誘導体作製

構造活性相関研究を行うため、PD 404182 の構造をヘテロ原子部位、ベンゼン環部位、アミジン環部位の 3 つに細分化し、種々の誘導体を作製した。

標的分子同定のための光プローブ合成

ベンゼン環部位から光感受性官能基とビオチンを導入したもの、及び、アミジン環から導入したものの 2 種類のプローブを作製した。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験

PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、X4 株である NL4-3 をウイルスとして用い、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070

の4薬剤のEC₅₀付近の濃度を初発濃度としてウイルス培養を開始し、薬剤耐性ウイルスの出現をCPEや培養上清中のp24濃度で判断して、添加する薬剤濃度を段階的に増加させる。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

抗 HIV-1 活性を有する小分子化合物の誘導体作製

ヘテロ原子部位を変換した化合物では、活性値が大きく減少した。また、ベンゼン環部位の8位に置換基を導入した場合や、9位に極性官能基を導入した場合においても活性が消失した。9位及び、10位に臭素原子を導入した化合物において、2倍程度の活性値の向上が認められた。

標的分子同定のための光プローブ合成

種々の合成法を用いて、光感受性官能基とビオチンを、抗 HIV 活性を示す小分子化合物に導入した。ベンゼン環部位から導入した化合物は、中程度の抗 HIV 活性 (EC₅₀ = 6.8 μM) を示した。また、アミジン環から導入した化合物でも中程度の抗 HIV 活性 (EC₅₀ = 5.1 μM) を示した。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験

PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、NL4-3 を親株とした薬剤耐性株誘導実験を開始した。実験開始時の薬剤濃度は EC₅₀ よりやや低い濃度に設定し、ほぼ4日おきに1:5に培養物を継代した。ウイルス感染によるCPEが培養全体に観察されるようになった時点で薬剤濃度を1.5倍上昇させた。なお、コントロールとして薬剤無添加での感染細胞の継代培養(この場合は、CPEでほぼ完全に細胞が死滅するので培養上清のみを継代した)も併行して行った。DNAを抽出した時点での薬剤濃度は、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070でそれぞれ15、750、3000、4500 nMである。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異の同定

4種のForward、Reverseのプライマーセットを用いて増幅したEnv領域断片の塩基配列を決定した結果、V3領域において一部共通した置換変異が認められた。いずれのCXCR4阻害剤耐性HIV-1においても、認められたV3領域の変異は、AMD3100耐性HIV-1株で報告されている変異と部分的にオーバーラップしていた。V4領域において、KRH-3148とAMD070に共通した5アミノ酸の欠失変異が認められた。

D. 考察

本課題では、新規標的に作用する新規小分子抗 HIV 薬の開発に焦点を当てて研究を行ってきた。抗 HIV-1 活性を有する新規小分子化合物に関する研究では、ヘテロ原子部位を置換した化合物では、抗 HIV 活性が低下したことから、この部位が標的分子と相互作用していることを示唆している。また、ベンゼン環部位の8位への置換基導入により抗 HIV 活性が低下したことは、標的分子との結合の際に、この付近に立体障害が生じることを示唆している。これらの知見は、さらなる高活性化誘導体の開発に非常に有益な情報である。また、標的分子同定のためのプローブ作製においては、非標識化合物と比較して抗 HIV 活性の減少が認められた。これは、プローブとして導入した官能基の導入が活性の低下を引き起こしていることが考えられる。しかしながら、活性は10 nM以下と、標的的同定に用いるために必要な活性を有していると考えられるため、今回作製したプローブを用いて標的分子の探索に取りかかる。

CXCR4 阻害剤の研究においては、得られた耐性プロファイルの解析から、KRH-3955とAMD3100、KRH-3148とAMD070のCXCR4への類似の作用機序が推測された。

以上の成果は、より高活性なCXCR4阻害剤の開発に大きく寄与する情報である。

E. 結論

今年度の研究から、新規小分子化合物の高活性化に必要な部位を同定した。作用機序

解析に用いることが可能な光プローブの合成に成功した。試験管内での CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 の誘導により、新規 CXCR4 阻害剤の耐性プロファイルや作用機序を解析し、今後の開発に繋がる成果が得られた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Nakamura S, Nakano H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, Matsuoka M, Kodama E. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Res* 87: 179-86, 2010.
2. Shimane K, Kodama EN, Nakase I, Futaki S, Sakurai Y, Sakagami Y, Li X, Hattori T, Sarafianos SG, Matsuoka M. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *Int J Biochem Cell Biol*. 42:1482-8, 2010.
3. Shimura K, Nameki D, Kajiwara K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically HIV-1 fusion inhibitors. *J Biol Chem*, 285: 39471-80, 2010.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

別添

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝
大石 真也

研究要旨 ピリミドベンゾチアジン骨格を有する新規低分子抗 HIV 活性化合物 (PD 404182) の構造最適化研究を展開し、強力な抗 HIV 活性に必要な部分構造を同定した。また、PD 404182 の標的分子を同定することを目的とした 2 種類の光アフィニティープローブを設計し化学合成を行った。CXCR4 拮抗剤 FC131 に新たな塩基性官能基を付与した誘導体を作成し、従来の拮抗剤と比較して約 20 倍強力な抗 HIV 活性を示す分子を見出した。

分担研究項目 1：抗 HIV 活性小分子化合物の構造最適化

A. 研究目的

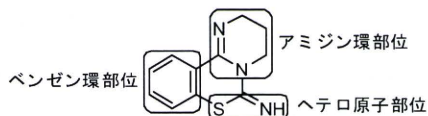
研究グループでは、新規抗 HIV 活性化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを行い、pyrimidobenzothiazin-6-imine 骨格を有する PD 404182 が抗 HIV 活性を示すことを見出している。昨年度の研究において確立した PD 404182 の 2 種類の合成法を用いることにより、強力な抗 HIV 活性を示す PD 404182 誘導体の探索を目的として、各種化合物の合成と抗 HIV 活性評価を行った。

B-C. 研究方法・結果

PD 404182 の誘導体合成

構造活性相関研究を行うために、PD 404182 の構造をヘテロ原子部位、ベンゼン環部位、アミジン環部位の 3 つに細分化した (Figure 1)。

Figure. 1 The segmentalized structure of PD 404182 (1).



まず、ベンゼン環部位に様々な置換基を有する化合物の合成を行った。必要な置換基を有するアルデヒド **2** に対して、酸化のアミジン化反応を行い、テトラヒドロピリミジン誘導体 **3** を合成した。化合物 **3** を二硫化炭素との芳香族求核置換反応により、化合物 **4** へと変換後、チオカルボニル基の

加水分解、続く臭化シアンとの反応により目的物である PD 404182 誘導体 **1a-f** を得た (Table 1)。

Table 1. Synthesis of PD 404182 Derivatives.

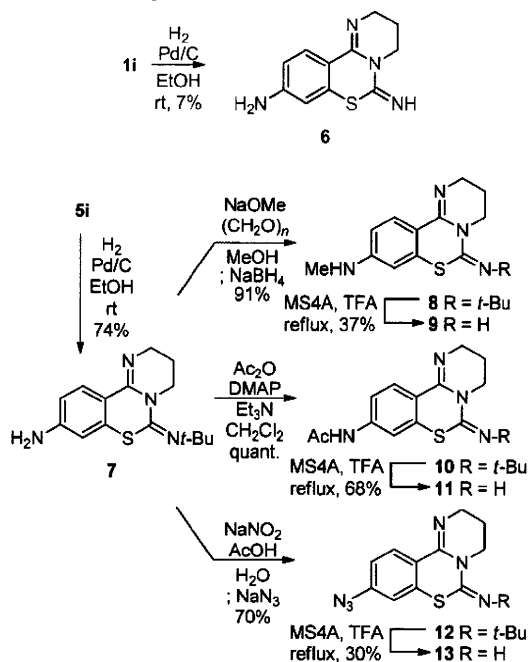
entry	yield of 3	yield of 4	yield of 1
1	3a: R=H, X=F (71%)	4a: R=H (86%)	1a: R=H (61%)
2	3b: R=OMe, X=F (67%)	4b: R=OMe (95%)	1b: R=OMe (61%)
3	3c: R=Me, X=Br (88%)	4c: R=Me (88%)	1c: R=Me (68%)
4	3d: R=F, X=Br (97%)	4d: R=F (76%)	1d: R=F (52%)
5	3e (90%)	4e (quant.)	1e (63%)
6	3f (95%)	4f (71%)	1f (32%)

上記と同様の操作により合成した、テトラヒドロピリミジン誘導体 **3** に対して、*tert*-ブチルイソチオシアネートとの芳香族求核置換反応を行った後、*tert*-ブチル基の脱保護を行い、目的物 **1a,1g-m** を得た (Table 2)。

Table 2. Synthesis of PD 404182 Derivatives.

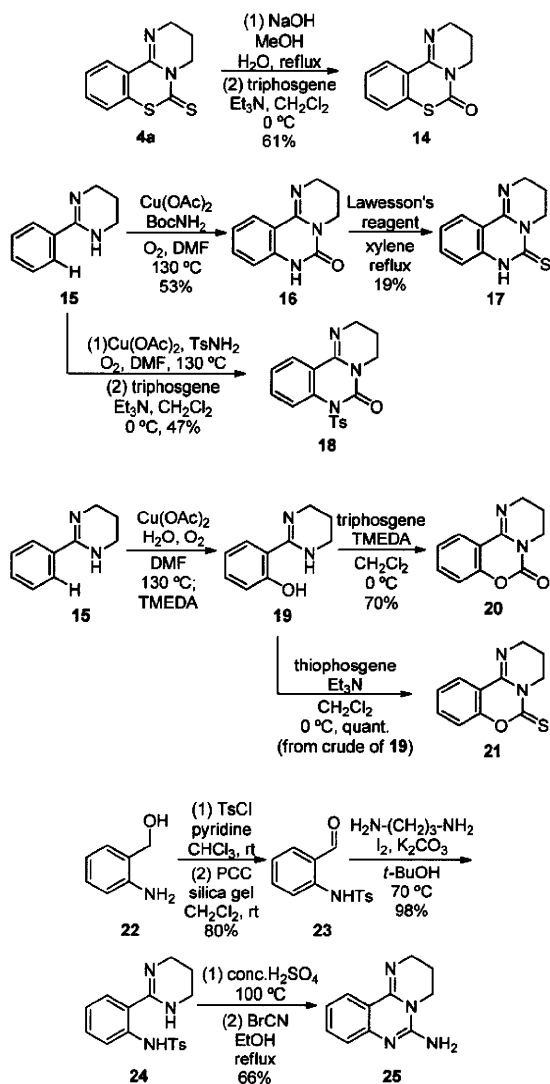
entry	yield of 3	yield of 5	yield of 1
1	3a: R=H, X=F (71%)	5a: R=H (62%)	1a: R=H (85%)
2	3g: R=4-Br, X=F (81%)	5g: R=9-Br (88%)	1g: R=9-Br (91%)
3	3h: R=4-CF ₃ , X=F (65%)	5h: R=9-CF ₃ (64%)	1h: R=9-CF ₃ (84%)
4	3i: R=4-NO ₂ , X=F (97%)	5i: R=9-NO ₂ (62%)	1i: R=9-NO ₂ (63%)
5	3j: R=3-Br, X=F (69%)	5j: R=8-Br (95%)	1j: R=8-Br (71%)
6	3k: R=5-Br, X=F (79%)	5k: R=10-Br (77%)	1k: R=10-Br (89%)
7	3l: R=6-F, X=F (78%)	5l: R=11-F (73%)	1l: R=11-F (90%)
8	3m: X=Br (68%)	5m (49%)	1m (57%)

Scheme 1. Synthesis of Derivatives Bearing Nitrogen Functional Group



アミノ化を行った後、*tert*-ブチル基の脱保護を行い、化合物 **9** を得た。また、化合物 **7** をアセチル化した後、*tert*-ブチル基の脱保護を行い、化合物 **11** を得た。化合物 **7** のアミノ基をザンドマイヤー反応により、アジド基に変換し、*tert*-ブチル基を脱保護することで、化合物 **13** を得た。

Scheme 2. Synthesis of the Compounds Containing Other Heteroatoms.



続いて、ヘテロ原子部位に酸素原子、窒素原子、硫黄原子のいずれかを異なった組み合わせで有する誘導体の合成を行った (Scheme 2)。まず、二硫化炭素との芳香族求核置換反応によって得た、化合物 **4a** に対し、チオカルボニル基の加水分解を行った後、トリホスゲンを用いたカルボニル化反応を行い、化合物 **14** を得た。

一方で、2-フェニルテトラヒドロピリミジン **15** を、銅触媒を用いた C-H 官能基化反応により BocNH₂ と反応させ、化合物 **16**

アミノ基を有する化合物 **6** は、ニトロ基を有する化合物 **1i** を接触還元することにより得た (Scheme 1)。また、**5i** を還元し、化合物 **7** を得た。化合物 **7** に対し、還元的

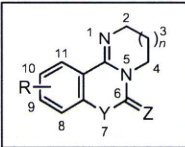
とし、Lawesson 試薬を作用させ、化合物 **17** を得た。また、TsNH₂ と反応させた後、トリホスゲンを用いてカルボニル化することで、トシル基を有する化合物 **18** を得た。また、**15** を C-H 官能基化反応により、水と反応させることで、化合物 **19** を得た後、トリホスゲンによるカルボニル化を行い、化合物 **20** を得た。一方、化合物 **19** をチオホスゲンと反応させることで、化合物 **21** を得た。

続いて、2-アミノベンジルアルコール **22** をトシル化、PCC 酸化により、化合物 **23** に変換後、酸化的アミジン化、トシル基の脱保護、臭化シアンとの反応により、化合物 **25** を得た。

合成した化合物の抗 HIV 活性評価

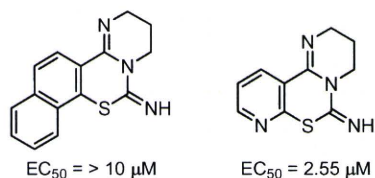
合成した化合物を、MAGI アッセイを用いて活性評価を行った (Table 3, Figure 2)。

Table 3. Anti-HIV Activity of PD 404182 and the Related Compounds.



entry	R	Y	Z	n	EC ₅₀ (μM)
1	H	S	NH	1	0.44
2	H	S	O	1	8.94
3	H	S	S	1	> 10
4	H	N	NH ₂	1	> 10
5	H	NH	S	1	> 10
6	H	NH	O	1	> 10
7	H	NTs	O	1	> 10
8	H	O	S	1	> 10
9	H	O	O	1	> 10
10	9-OMe	S	NH	1	0.57
11	9-Me	S	NH	1	0.49
12	9-F	S	NH	1	0.49
13	9-CF ₃	S	NH	1	0.53
14	9-NO ₂	S	NH	1	1.13
15	9-NHMe	S	NH	1	> 10
16	9-NH ₂	S	NH	1	> 10
17	9-NHAc	S	NH	1	> 10
18	9-N ₃	S	NH	1	0.43
19	9-Br	S	NH	1	0.25
20	8-Br	S	NH	1	> 10
21	10-Br	S	NH	1	0.23
22	11-F	S	NH	1	1.67
23	H	S	NH	0	> 10

Figure 2. Anti-HIV Activity of the Related Compounds.



ヘテロ原子部位を変換した化合物では、活性値が大きく減少した。また、ベンゼン環部位の 8 位に置換基を導入した場合や、9

位に極性官能基を導入した場合においても活性が消失した。9 位及び、10 位に臭素原子を導入した化合物において、2 倍程度の活性値の向上が認められた。

以上より、申請者らが開発した C-H 官能基化反応、及び芳香族求核置換反応を用いることで、さらに高い活性を有する PD 404182 誘導体を見出すことに成功した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

D. 考察

PD 404182 誘導体は以前に開発した C-H 官能基化反応や、芳香族求核置換反応を用いることで容易に合成が可能であった。

ヘテロ原子部位の変換により活性値が減少した事は、この部位が標的物質と相互作用している可能性を示唆している。また、8 位への置換基の導入により活性値が減少した事は、標的物質との結合の際に、この付近に立体障害が生じることを示唆している。また、9 位に親水性の置換基を導入した際に活性が消失した事は、この付近での疎水性相互作用が活性発現に重要であることを示唆している。

E. 結論

本研究では C-H 官能基化反応や芳香族求核置換反応を用いて、PD 404182 の誘導体の合成を行い、その抗 HIV 活性の評価を行った。その結果、PD 404182 の活性発現における重要な構造活性相関情報を取得した。今後は 9 位及び 10 位に様々な置換基の導入、または、アミジン環の検討を行い、さらなる高活性を有する化合物の探索を行う。

分担研究項目 2 : 抗 HIV 活性小分子化合物の光アフィニティープローブの合成と標的分子同定

A. 研究目的

構造活性相関情報を基に PD 404182 の標的分子を同定するための光アフィニティープローブを作成する。光感受性官能基としてベンゾフェノンをもつプローブを作成し、ピオチン等の標識基を付与する。これらの修飾化合物がもとの化合物と同等の抗 HIV 活性を示すことを常時確認しながら分

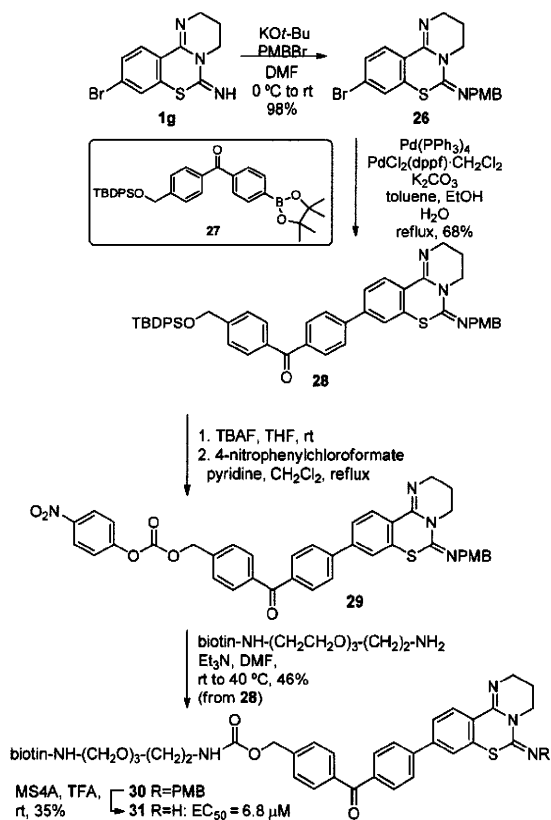
子設計と化学合成を展開する。

B-C. 研究方法・研究結果

ベンゼン環部位から光感受性官能基とビオチンを導入したもの、及び、アミジン環から導入したものの2種類のプローブを作成した。

まず、ベンゼン環部位から導入したプローブ **31** の合成を行った。化合物 **1g** のイミンの窒素原子を PMB で保護し、別途調製したボロン酸ピナコールエステル誘導体 **27** との鈴木カップリングにより、化合物 **28** を得た。続いて、TBDPS 基の脱保護、4-ニトロフェニルカルボニル化、ビオチンアミンとの反応を行い、化合物 **30** を得た後、PMB 基を脱保護することで、化合物 **31** を得た。化合物 **31** は中程度の抗 HIV 活性を示した ($EC_{50} = 6.8 \mu\text{M}$, MAGI アッセイ) (Scheme 1)。

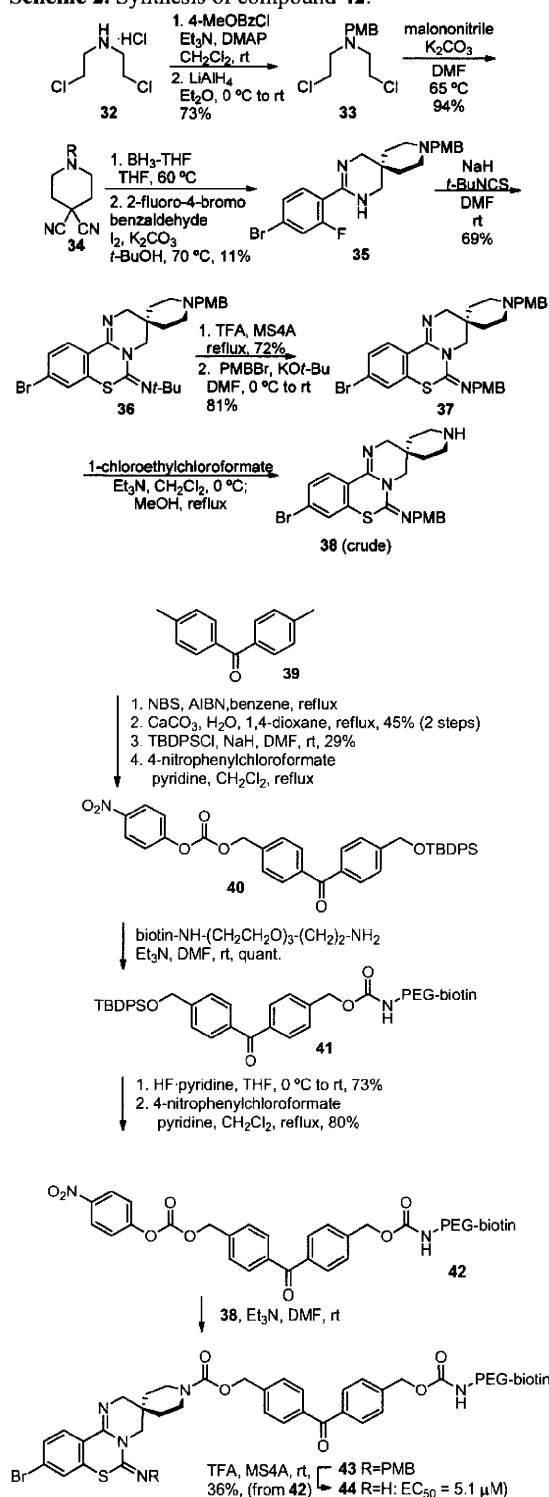
Scheme 1. Synthesis of compound **32**.



続いて、アミジン環から導入したプローブ **44** の合成を行った。ビス(2-クロロエチル)アミン塩酸塩 **32** を PMB 化して化合物 **33** とし、マロノニトリルを塩基性条件下作用させることで、化合物 **34** を得た。ニトリル基の還元が続いて、酸化的アミジン化反応を行い化合物 **35** とした後、*tert*-ブチルイ

ソチオシアネートを作用させ、化合物 **36** を得た。化合物 **36** のイミン窒素の保護基を PMB 基に変換し、二級アミンの PMB 基を選択的に脱保護する事で、スピロ環構造を有するアミン **38** を得た。

Scheme 2. Synthesis of compound **42**.



一方で、4, 4'-ジメチルベンゾフェノン **39** のベンジル位のブロモ化、加水分解、

TBDPS 化、4-ニトロフェニルオキシカルボニル化を行い、化合物 **40** を得た後、ビオチンアミンと反応させることで、化合物 **41** を得た。続いて、TBDPS 基の脱保護、4-ニトロフェニルオキシカルボニル化を行い、化合物 **42** を得た。

化合物 **38** と化合物 **42** を縮合させた後、PMB 基を脱保護することで、化合物 **44** ($EC_{50} = 5.1 \mu\text{M}$ MAGI) を得た (Scheme 2)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

D. 考察

得られたプローブでは、非標識化合物と比較して抗 HIV 活性の減少が認められた。プローブとして導入した官能基の導入が活性の低下を引き起こしていることが考えられるものの、活性は $10\mu\text{M}$ 以下と、標的同一に用いるためには十分な活性を有していると考えられる。

E. 結論

本研究では、ベンゼン環側から光感受性官能基とビオチンを導入したもの、及び、アミジン環側から導入したものの2種類を合成した。今後はこれらのプローブを用いて、標的同一研究を展開する。

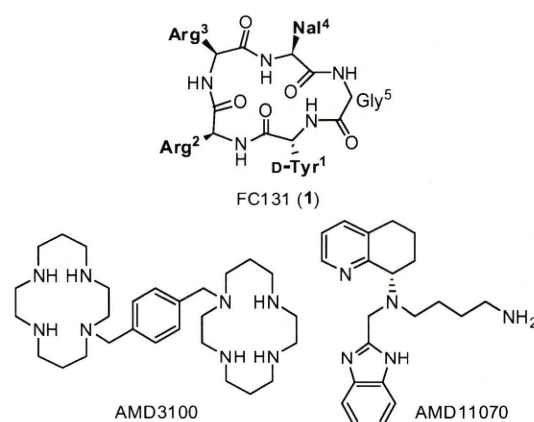
分担研究項目 3 : 新規 CXCR4 拮抗剤の合成

A. 研究目的

ケモカイン受容体 CXCR4 は HIV-1 の宿主細胞への侵入時のコレセプターであることから、CXCR4 拮抗剤は HIV 関連疾患の有力な治療薬になるものと期待されている。

研究グループではこれまでに、強力な CXCR4 拮抗活性を示す環状ペプチド FC131 (**1**)を開発し、種々のペプチドミメティクスを導入した誘導体による構造活性相関研究を展開してきた (Figure 1)。

Figure 1. Structures of Reported CXCR4 Antagonists.



一方、他グループが開発した低分子 CXCR4 拮抗剤 AMD3100 や AMD11070 等は分子内に3つ以上の塩基性官能基を有しており、これらの官能基が CXCR4 受容体内の酸性アミノ酸側鎖と相互作用し、活性の向上に寄与していることが示唆されている。

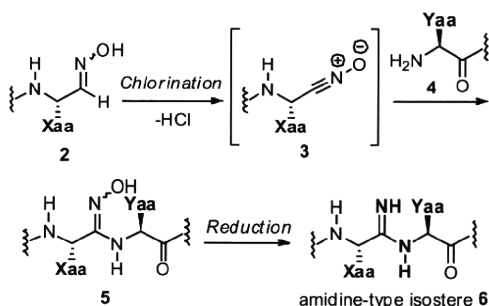
このような背景の下、研究グループは FC131 に新たな塩基性官能基を追加することで活性の向上が期待できると考えた。しかしながら、塩基性官能基である還元アミド型ペプチド結合等価体の FC131 への導入が活性の低下を招いたという過去の結果より、ペプチド結合の構造的特徴の維持が活性発現に必須であることが示唆されている。

そこで研究グループはアミジン型ペプチド結合等価体を含む FC131 誘導体をデザインした。アミジン型ペプチド結合等価体はペプチド結合のカルボニル基をイミノ基で置換した構造的相同性の高いイソスターであり、FC131 の構造的特徴を維持しつつ、塩基性官能基としての機能を追加できると期待される。

B. 研究方法

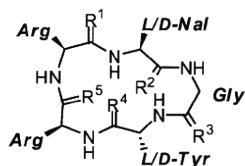
アミジン含有 FC131 誘導体の合成計画を Scheme 1 に示す。固相上で合成したペプチドアルドキシム **2** から系中で生成したニトリルオキシド **3** とペプチドアミノ基 **4** の反応により、鍵中間体である環状アミドキシム **5** を得た後、還元反応により目的とする環状アミジン **6** を合成することにした。

Scheme 1. Synthetic Scheme for Amidine-type Peptide Bond Isostere **6**.



合成対象物として、FC131 (**1**)のすべてのペプチド結合をそれぞれアミジンに変換した誘導体と、FC131のナフチルアラニン及びD-チロシン部位の立体異性体を合わせ、計7種の誘導体7の合成を計画した (Figure 2)。

Figure 2. FC131 Analogs 7 ($R^X = O$ or NH).



(倫理面への配慮)

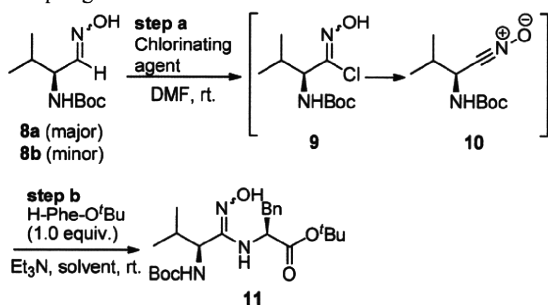
該当事項なし

C. 研究結果

① アミドキシム合成反応及びアミジンへの変換反応の条件検討

Bocバリンから誘導したアルドキシム**8**を単離精製し、それぞれの異性体を用いて条件検討を行った。その結果、クロロ化剤としてNCSを用いたところ、両方の異性体から良好な収率で目的物**11**を得ることが出来た (Table 1)。

Table 1. Optimization of the Aldoxime-Amino Acid Coupling Conditions.



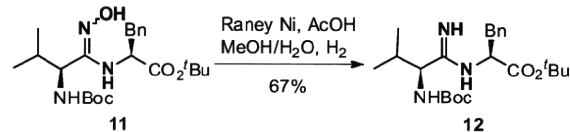
entry	substrate	method ^a	yield (%)
1	8a	A	77
2	8b	A	decomp.
3	8a	B	71 ^b
4	8b	B	81

^a method A: step a: NaOCl aq. (3.0 eq., 30% aqueous sol), Et₃N (3.0 eq.); step b: Et₃N (6.0 eq.)/DCM. method B: step a: NCS

(1.1 eq.); step b: Et₃N (4.0 eq.)/Et₂O. ^b When CHCl₃ was used as reaction solvent in step a, the starting material **8a** was recovered.

続いて、アミドキシムからアミジンへの変換を行った。酸性条件下、H₂/Raney Niを作用させたところ、目的とするアミジン型ジペプチドイソスター**12**を得ることが出来た (Scheme 2)。

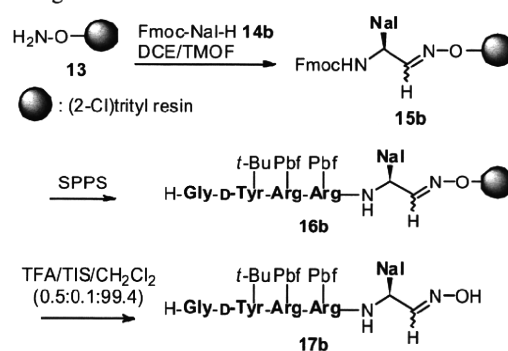
Scheme 2. Conversion of *N*-Hydroxyamidine **11** to Amidine **12**.

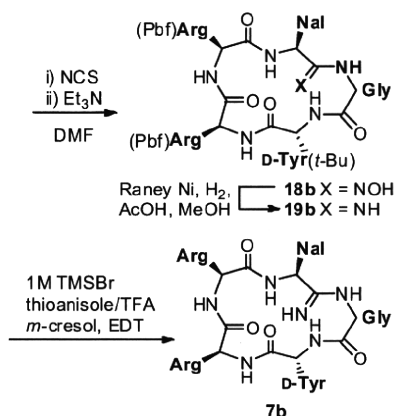


② アミジン含有 FC131 誘導体の合成

上記合成法を用いてアミジン含有 FC131 誘導体を合成した。ナフチルアラニン-グリシン (Nal- [C(=NH)-NH]-Gly) 型アミジン含有 FC131 誘導体**7b**の合成経路を Scheme 3 に示す。Fmoc ヒドロキシアミンを固相担体に結合させて得られたアミノオキシレジン**13**に対し、アルデヒド**14b**を作用させたところ、オキシムレジン**15b**を得ることが出来た。続く固相合成法によるペプチド鎖の伸長を経て、ペプチドアルドキシムレジン**16b**を得た。固相担体からの切断後、ニトリルオキシドを経由した環化反応、Raney Niを用いた還元反応、側鎖官能基の脱保護反応を経て、目的とする Nal- [C(=NH)-NH]-Gly 型 FC131 誘導体**7b**を得た。

Scheme 3. Synthesis of Amidine-containing FC131 Analogs **7b**.





他の部位にイソスターを有する誘導体も同様の反応条件を用いて合成した。最終生成物は HPLC にて単離精製し、総収率 2.1-6.7%にて 7 種のアミジン含有ペプチド **7a-g** が得られた。尚、懸念されたエピメリ化等の副反応は観察されなかった。

③ 活性評価

合成した FC131 誘導体 **7a-g** の CXCR4 に対する SDF-1 結合阻害活性を [¹²⁵I]-SDF-1 を用いて評価した (Table 2)。

Table 2. Inhibitory Activity of FC131 and the Derivatives **7a-g** against [¹²⁵I]-SDF-1 Binding to CXCR4.

peptide	sequence	IC ₅₀ (nM)
FC131 (1)	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)	126
FC122	cyclo(-D-Tyr-D-MeArg-Arg-Nal-Gly-)	37
7a	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-Ψ-)	9.4
7b	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Ψ-Gly-)	4.2
7c	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-D-Nal-Ψ-Gly-)	4.9
7d	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-Ψ-Nal-Gly-)	12
7e	cyclo(-D-Tyr-Arg-Ψ-Arg-Nal-Gly-)	16
7f	cyclo(-D-Tyr-Ψ-Arg-Arg-Nal-Gly-)	679
7g	cyclo(-Tyr-Ψ-Arg-Arg-Nal-Gly-)	334

^a Ψ indicates the ψ[-C(=NH)-NH-] substructure. ^b IC₅₀ values are the concentrations for 50% inhibition of the [¹²⁵I]-SDF-1α binding to CXCR4 transfectant of HEK293 cells.

その結果、5 種の誘導体が FC131 に比べて高い結合阻害活性を示した。中でも Nal-Gly 間をアミジンで置換した誘導体 **7b** は、これまでに報告されている FC131 誘導体類の中で最も高い活性を示した。また、受容体の酸性側鎖との相互作用が報告されている Gly-D-Tyr 間及び Arg-Arg 間のペプチド結合のアミジンへの変換が活性の向上に寄与したことから (Table 2, **7a** 及び **7e**)、アミジン部位が塩基性官能基として機能していることが示唆された。一方、Tyr-Arg 間へのアミジンの導入が活性の低下を招いたことから (Table 2, **7f** 及び **7g**)、Tyr-Arg

間のペプチド結合カルボニル基が活性発現に不可欠であることが示唆された。また、CXCR7 に対する結合阻害は観察されなかった。

続いて、抗 HIV-1 活性を評価した (Table 3)。CXCR4 感受性株である NL4-3 と IIIB を用いた際には強力な抗 HIV-1 活性を示し、その強さは、概ね SDF-1 阻害活性評価と同様の傾向にあった。一方、CCR5 感受性株である Ba-L に対しては活性を示さなかった。

Table 3. Anti-HIV Activity of FC131 and the Derivatives **7a-g**.

peptide	EC ₅₀ (nM) ^a		
	NL4-3	IIIB	Ba-L
FC131 (1)	21	21	- ^b
FC122	7.6	7.6	- ^b
7a	1.3	0.61	- ^b
7b	1.4	1.0	- ^b
7c	2.2	2.0	- ^b
7d	4.4	6.3	- ^b
7e	1.9	1.2	- ^b
7f	300	258	- ^b
7g	248	238	- ^b

^a EC₅₀ is the concentration that blocks HIV-1 infection by 50%. ^b No inhibitory activity was observed at 10 μM.

以上より、アミジン含有 FC131 誘導体が選択的 CXCR4 阻害剤であることが示された。

D. 考察

すべての誘導体が高活性を示し、そのうち 5 種の誘導体が既存の FC131 誘導体よりも高活性を示したことから、アミジンが、ペプチド結合等価体としての特性に加え、塩基性ファルマコフォアを付与する新たな構造的モチーフとして有用であることが示唆された。

また、Nal 及び Tyr の α 位の立体化学が活性に大きな影響を与えなかったことから、アミジン周辺の構造が比較的自由度が高いと考えられる。

E. 結論

研究グループはアルドキシムより系内で生成したニトリルオキシドを用いたアミジン型ペプチドイソスターの簡便な合成法を開発した。また、本合成法をアミジン含有 FC131 誘導体の合成に応用し、本合成法がアミジン含有ペプチドの合成に適していることを示した。

合成したアミジン含有 FC131 誘導体はすべて強力な選択的 CXCR4 拮抗活性を示し、本化合物群は新たな抗 HIV-1 剤のリード化

合物として有望であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K., Nakamura S., Nakano H., Shimura K., Sakagami Y., Oishi S., Uchiyama S., Ohkubo T., Kobayashi Y., Fujii N., Matsuoka M., Kodama E.N. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Res.* 87(2) 179-186 (2010)
2. Oishi S., Watanabe K., Ito S.; Tanaka M.; Nishikawa H.; Ohno H.; Shimane K.; Izumi K.; Sakagami Y.; Kodama E. N.; Matsuoka M.; Asai A.; Fujii N. Affinity selection and sequence-activity relationships of HIV-1 membrane fusion inhibitors directed at the drug-resistant variants. *Med. Chem. Commun.* 1(4) 276-281 (2010)
3. Omatsu Y., Sugiyama T., Kohara H., Kondoh G., Fujii N., Kohno K., Nagasawa T. The essential functions of adiposteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33(3) 387-399 (2010)
4. Mandawat A., Fiskus W., Buckley K.M., Robbins K., Rao R., Balusu R., Navenot J.M., Wang Z.X., Ustun C., Chong D.G., Atadja P., Fujii N., Peiper S.C., Bhalla K. Pan-histone deacetylase (HDAC) inhibitor panobinostat depletes CXCR4 levels and signaling and exerts synergistic anti-myeloid activity in combination with CXCR4 antagonists. *Blood*, 116(24) 5306-5315 (2010)
5. Martin S.K, Diamond P., Williams S.A., To L.B., Peet D.J., Fujii N., Gronthos S., Harris A.L., Zannettino A.C. Hypoxia-inducible factor-2 is a novel regulator of aberrant CXCL12 expression in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica*, 95(5) 776-784 (2010)
6. Gravel S., Malouf C., Boulais P.E., Berchiche Y.A., Oishi S., Fujii N., Leduc R., Sinnett D., Heveker N. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits β -arrestin to CXCR7 roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* 285(49) 37939-37943 (2010)
7. Shimura K., Nameki D., Kajiwara K., Watanabe K., Sakagami Y., Oishi S., Fujii N., Matsuoka M., Sarafianos S.G., Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically constrained HIV-1 fusion inhibitors. *J. Biol. Chem.* 285(50) 39471-39480 (2010)
8. Noda M., Omatsu Y., Sugiyama T., Oishi S., Fujii N., Nagasawa T. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK cell development in adult mice. *Blood*, 117(2) 451-458 (2011)
9. Inokuchi E., Yamada A., Hozumi K., Tomita K., Oishi S., Ohno H., Nomizu M., Fujii N. Design and synthesis of amidine-type peptide bond isostere: application of nitrile oxide derivatives as active ester equivalents to peptide and peptidomimetics synthesis. *Org. Biomol. Chem.* in press.
10. Xu C, Liu J, Chen L, Liang S, Fujii N, Tamamura H, Xiong H. HIV-1 gp120 enhances outward potassium current via CXCR4 and cAMP-dependent protein kinase a signaling in cultured rat microglia. *Glia*, in press.
11. Masuda R., Oishi S., Ohno H., Kimura H., Saji H., Fujii N. Concise site-specific synthesis of DTPA-peptide conjugates: application to imaging probes for the chemokine receptor CXCR4. *Bioorg. Med. Chem.* in press.
12. Inokuchi E., Oishi S., Kubo T., Ohno H., Shimura K., Matsuoka M., Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres. *ACS Med. Chem. Lett.* in press.

2. 学会発表

1. ○増田 亮、大石真也、棚原憲子、大野浩章、平澤 明、辻本豪三、矢野義明、松崎勝巳、藤井信孝 蛍光標識 CXCR4 受容体リガンドの創製と応用 第29回メディスナルケミストリーシンポジウム

2010年11月18日（京都）

2. ○Inokuchi, E., Tomita, K., Oishi, S., Ohno, H., Fujii, N. A novel approach to peptide synthesis using nitrile oxide components. 5th International Peptide Symposium（京都）平成22年12月8日
3. ○Kobayashi, K., Hayashi, R., Oishi, S., Tanahara, N., Ohno, H., Naito, T., Kodama, E., Matsuoka, M., Fujii, N. Synthesis of alkene-type dipeptide isosteres and its application to structure-activity relationship study on a CXCR4 antagonist FC131. 5th International Peptide Symposium（京都）平成22年12月8日
4. ○小林数也、林亮子、大石真也、久保達彦、大野浩章、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成と CXCR4 拮抗剤 FC131 の構造活性相関研究への応用 日本薬学会第131年会（静岡）平成23年3月29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特願 2011-044035：新規ケモカイン受容体拮抗剤
日本：出願（2011年3月1日）発明者：藤井信孝、大野浩章、大石真也、井ノ口恵利子、久保達彦、松岡雅雄、志村和也；出願者：京都大学

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡雅雄

研究分担者：国立感染症研究所エイズ研究センター 村上 努

研究要旨：本分担研究の目的は、新規 CXCR4 阻害剤 KRH-3955 を材料として試験管内で薬剤耐性誘導を行い、耐性変異のパターンや耐性機構を解析することにより、より耐性に出にくい薬剤を設計したり、耐性変異パターンを予測することである。KRH-3955 と KRH-3148（対照薬剤として、AMD3100 と AMD070）を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験（耐性誘導約 2 年）で得られた感染細胞から DNA を抽出し、HIV-1 Env 領域全体を PCR 法にて増幅し、この領域に蓄積された変異を解析した。得られた耐性 HIV-1 株の Env 領域中の V3, V4 領域に共通した変異が認められた。また、いずれの CXCR4 阻害剤から誘導された耐性 HIV-1 由来 Env 組換え株もすべての CXCR4 阻害剤に対して同時に耐性を獲得していた。

A. 研究目的

本研究の目的は、新しい作用機序を有する HIV 阻害剤として期待される CXCR4 阻害剤に対する耐性 HIV-1 を誘導し、その耐性変異のパターンや耐性機構を解析することによって、次世代の治療を考慮した耐性変異パターンの予測法を研究することである。材料としては、共同研究者（株）クレハが開発した経口吸収性を示す 2 種類の高活性 CXCR4 阻害剤 KRH-3955、KRH-3148 を、対照薬剤として AMD3100 と AMD070 使用した。標的細胞は、PM1/CCR5 細胞を、HIV-1 は NL4-3 株を使用した。

B. 研究方法

(1) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験：
PM1/CCR5 細胞(共同研究者 熊本大・前田先生分与)を標的細胞として、X4 株である NL4-3 をウイルスとして使い、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 の 4 薬剤について 2007 年 10 月に開始した。各薬剤の EC₅₀ 付近の濃度を初発濃度としてウイルス培養を開始し、薬剤耐性ウイルスの出現を CPE や培養上清中の p24 濃度で判断して、添加する薬剤濃度を段階的に増加させる。

(2) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異の検出：

2009 年 9 月 16 日に回収した感染細胞から DNA を抽出し、HIV-1 NL4-3 ENV 領域全長にわたって PCR 法にて増幅した。4 種の Forward, Reverse のプライマーセットを用いて増幅した Env 領域断片の塩基配列を決定した。

(3) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 の作製：

(2) で増幅した Env 領域を NL4-3 の対応する領域と入れ替えた Env 組換え NL4-3 の作製を pNL4-3 から作製したプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトして調製した。(倫理面での配慮)
本研究で使用を予定する複製可能な組換えウイルスは大臣確認を得ている(大 19-6 および大 17-23) ほか、組換え DNA 実験の申請は本研究所に機関承認されている(機 19-63 ほか)。

C. 研究結果

(1) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験：
PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、NL4-3 を親株とした薬剤耐性株誘導実験を 2007. 10.11 に開始した。実験開始時の薬剤濃度は EC₅₀ よりやや低い濃度に設定し、ほぼ 4 日おきに 1:5 に培養物を継代した。ウイルス感染による CPE が培養全体に観察されるようになった時点で薬剤濃度を 1.5 倍上昇させた。なお、コントロールとして薬剤無添加での感染細胞の継代培養(この場合は、CPE でほぼ

完全に細胞が死滅するので培養上清のみを継代した)も併行して行った(図1)。今回DNAを抽出した感染細胞を採取した2009年9月の時点での薬剤濃度は、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070でそれぞれ15、750、3000、4500 nMである。

(2) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異の同定：

4種のForward, Reverseのプライマーセットを用いて増幅したEnv領域断片の塩基配列を決定した結果、V3領域において一部共通した置換変異が認められた(図2)。いずれのCXCR4阻害剤耐性HIV-1においても、認められたV3領域の変異は、AMD3100耐性HIV-1株で報告されている変異と部分的にオーバーラップしていた(図2)。V4領域において、KRH-3148とAMD070に共通した5アミノ酸の欠失変異が認められた(図3)。

(3) 作製したCXCR4阻害剤耐性HIV-1株由来のEnv組換えNL4-3のCXCR4阻害剤感受性：

いずれのCXCR4阻害剤から誘導されたCXCR4阻害剤耐性HIV-1由来のEnv組換えNL4-3も4種すべてのCXCR4阻害剤に対して同時に薬剤耐性を獲得していた(表1)。

D. 考察

今回得られたCXCR4阻害剤耐性HIV-1株のEnv領域の変異のパターンから、KRH-3955とAMD3100、KRH-3148とAMD070のCXCR4への作用機序が似ていることが示唆された。

E. 結論

今回検討している4種のCXCR4阻害剤耐性HIV-1株のEnv領域中のV3, V4領域に共通した変異が認められた。また、いずれのCXCR4阻害剤から誘導された耐性HIV-1由来Env組換え株もすべてのCXCR4阻害剤に対して同時に耐性を獲得しており、作用機序の近似が推察された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Murakami, T and N. Yamamoto. The role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target (Review). *Future Microbiology*, 5 (7): 1025-1039, 2010.

2) Nakahara, T., W. Nomura, K. Ohba, A. Ohya, T. Tanaka, C. Hashimoto, T. Narumi, T. Murakami, N. Yamamoto and H. Tamamura. 2010. Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins Leads to Synthetic Antigen Molecules Inducing Neutralizing Antibodies. *Bioconjugate Chem.*, 21(4):709-714, 2010.

3) Aoki, T., S. Shimizu, E. Urano, Y. Futahashi, M. Hamatake, H. Tamamura, K. Terashima, T. Murakami, N. Yamamoto, and J. Komano. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag. *Gene Therapy*, 17:1124-1133, 2010.

4) Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hosino. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* 19:816-825, 2011.

5) Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists. *Chem. Med. Chem.*, In press.

2. 学会発表

1) 小森谷真央、村上 努、鈴木慎太郎、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和。HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出第5回ケミカルバイオロジー学会年会、横浜、2010年5月18-19日

2) 竹村太地郎、川又美弥子、村上 努。CypA非依存的に増殖するHIV-1変異株の分離第58回日本ウイルス学会学術集会・総会、徳島、2010年11月7-9日

3) 村上 努、小森谷真央、鈴木慎太郎、橋本智恵、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和。細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを用いた新規抗 HIV-1 ペプチドの探索と創出 第 5 8 回日本ウイルス学会学術集会・総会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日

4) 竹村太地郎、村上 努、Kewal Ramani Vineet。HIV-1 感染における CypA の機能解析第 2 4 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月 24-26 日

5) 小森谷真央、村上 努、鈴木慎太郎、橋本知恵、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和。HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出第 2 4 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月 24-26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし

図1. CXCR4阻害剤耐性HIV-1の誘導方法

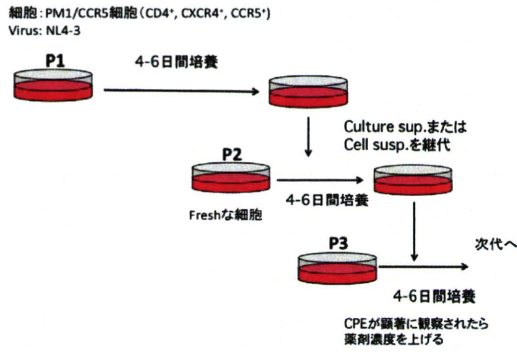


表1. Env組換えHIV-1株の各CXCR4阻害剤に対する耐性度

Virus	EC50 (nM)				
	KRH-3955 (fold increase)	KRH-3148	AMD3100	AMD070	AZT
NL4-3	4.4 (1.0)	7.9 (1.0)	49 (1.0)	54 (1.0)	178 (1.0)
NL4-3 (passage control)	4.9 (1.1)	10 (1.3)	49 (1.0)	60 (1.1)	187 (1.1)
KRH-3955 ^R	17 (3.8)	71 (9.0)	278 (5.7)	402 (7.4)	194 (1.1)
KRH-3148 ^R	15 (3.4)	40 (5.1)	176 (3.6)	303 (5.6)	36 (0.20)
AMD3100 ^R	13 (3.0)	41 (5.2)	171 (3.5)	254 (4.7)	221 (1.2)
AMD070 ^R	18 (4.1)	76 (9.6)	280 (5.7)	379 (7.0)	21 (0.11)

図2. CXCR4阻害剤耐性HIV-1株のV3 loop配列

NL4-3 CTRPN-NNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHC

NL4-3
(Passage Control) -----

KRH-3955^R -----I--R--H-----D-----

KRH-3148^R -----I--R-----T-----T--

AMD3100^R -----R-----T-----D-----

AMD070^R -----R-----T-----T--

AMD3100^R -----YES-T-R--H-----V--H--T--
(JVI, 70, 689, 1996)

図3. CXCR4阻害剤耐性HIV-1株のV4 loop配列

NL4-3 CNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTBGSDTITLPC

NL4-3
(Passage Control) -----

KRH-3955^R -----

KRH-3148^R -----*****-----

AMD3100^R -----

AMD070^R -----*****-----

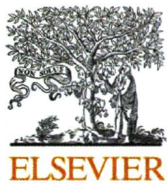
AMD3100^R -----*****-----
(JVI, 70, 689, 1996)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

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
Izumi K, Nakamura S, Nakanoh H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, <u>Matsuoka M</u> , Kodama E.	Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat.	Antiviral Res	87	179-186	2010
Shimane K, Kodama EN, Nakase I, Futaki S, Sakurai Y, Sakagami Y, Li X, Hattori T, Sarafianos SG, <u>Matsuoka M</u> .	Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4.	Int J Biochem Cell Biol	42	1482-1488	2010
Shimura K, Nameki D, Kajiwara K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, <u>Matsuoka M</u> , Sarafianos SG, Kodama E.	Resistance profiles of novel electrostatically HIV-1 fusion inhibitors.	J Biol Chem	285	39471-39480	2010



Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino-terminal heptad repeat

Kazuki Izumi^a, Shota Nakamura^{b,1}, Hiroaki Nakano^{b,2}, Kazuya Shimura^a, Yasuko Sakagami^a, Shinya Oishi^c, Susumu Uchiyama^{b,3}, Tadayasu Ohkubo^b, Yuji Kobayashi^{b,4}, Nobutaka Fujii^c, Masao Matsuoka^a, Eiichi N. Kodama^{a,d,*}

^a Laboratory of Virus Control, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Kawaramachi Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

^c Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

^d Division of Emerging Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai 980-8575, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2010

Received in revised form 22 April 2010

Accepted 23 April 2010

Keywords:

HIV-1

Fusion

Amino-terminus

gp41

Resistance

ABSTRACT

A transmembrane glycoprotein of HIV-1, gp41, plays a central role in membrane fusion of HIV-1 and host cells. Peptides derived from the amino- and carboxyl-terminal heptad repeat (N-HR and C-HR, respectively) of gp41 inhibit this fusion. The mechanism of resistance to enfuvirtide, a C-HR-derived peptide, is well defined; however the mechanism of resistance to N-HR-derived peptides remains unclear. We characterized an HIV-1 isolate resistant to the N-HR-derived peptide, N36. This HIV-1 acquired a total of four amino acid substitutions, D36G, N126K and E137Q in gp41, and P183Q in gp120. Among these substitutions, N126K and/or E137Q conferred resistance to not only N36, but also C34, which is the corresponding C-HR-derived peptide fusion inhibitor. We performed crystallographic and biochemical analysis of the 6-helix bundle formed by synthetic gp41-derived peptides containing the N126K/E137Q substitutions. The structure of the 6-helix bundle with N126K/E137Q was identical to that in wild-type HIV-1 except for the presence of a new hydrogen bond. Denaturing experiments revealed that the stability of the 6-helix bundle of N126K/E137Q is greater than in the wild-type. These results suggest that the stabilizing effect of N126K/E137Q provides resistance to N36 and C34.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

An envelope glycoprotein (Env) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), gp120, interacts with CD4 and co-receptors, such as CCR5. This induces conformational changes of gp120 to activate gp41, which mediates viral membrane fusion to the host membrane (Eckert and Kim, 2001b). Briefly, after the fusion domain located in the N-terminal end of gp41 penetrates into the host cell

membrane, the interaction of a trimer of the amino-terminal heptad repeat (N-HR) with the carboxyl-terminal HR (C-HR) of gp41, results in the formation of a 6-helix bundle in which the N- and C-HRs are arranged in a three-hairpin structure. Alternatively, the three N-HRs form a coiled-coil, and the three C-HRs are packed in an antiparallel manner into highly conserved, hydrophobic grooves on the surface of the coiled-coil (Chan et al., 1997). Peptides derived from the N- and C-HR regions inhibit fusion by blocking the interaction between the N- and C-HRs and preventing the formation of the 6-helix bundle fusogenic state of gp41 (Chan et al., 1998; Wild et al., 1993, 1992). One of the C-HR-derived peptides, enfuvirtide (T-20), effectively suppresses HIV-1 replication *in vivo* (Kilby et al., 1998; Lalezari et al., 2003; Lazzarin et al., 2003). Another C-HR-derived peptide, C34, which contains the four amino acids, W117, W120, D121, and I124, required to dock into a hydrophobic pocket termed the “deep pocket” of the trimer of the N-HR also exerts strong inhibition of HIV-1 fusion *in vitro* (Chan et al., 1997). In addition to peptides derived from the HIV-1 gp41 consensus amino acid sequence, several modified peptides have also been developed, including T-1249 (Eron et al., 2004), T-2635 (Dwyer et al., 2007), SC34EK (Nishikawa et al., 2009) and T-20_{S138A} (Izumi et al., 2009).

* Corresponding author at: Division of Emerging Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Building 1, Room 515, 2-1 Seiryō, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan. Tel.: +81 22 717 7199; fax: +81 22 717 7199.

E-mail addresses: kodama515@m.tains.tohoku.ac.jp, ekodama@virus.kyoto-u.ac.jp, kodama515@med.tohoku.ac.jp (E.N. Kodama).

¹ Present address: Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan.

² Present address: School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences, Minatojima, Kobe 650-8530, Japan.

³ Present address: Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan.

⁴ Present address: Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan.