

D.R. Science 320, p760-764,2008, Thomas C. Nature Med. 15 p855-859,2009)。NBD 誘導体の研究から、Env 三量体構造のメカニズムの解明が進めば、中和抗体誘導型ワクチンの作成が可能になり、我が国ばかりか、世界の保険、医療、福祉の向上に役立つ成果が期待できる。

F. 謝辞

抗体誘導の実験および抗ウイルス活性の測定実験に関して、熊本大学エイズ学研究センター、松下修三教授、吉村和久准教授、原田恵嘉博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. ChemMedChem., 2011, *in press*
- 2) Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H. Intense blue fluorescence in a leucine zipper assembly. ChemBioChem., 2011, *in press*
- 3) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. ChemBioChem, 2011, *in press*
- 4) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. Bioconjugate Chem., 22: 82-87, 2011.
- 5) Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV. Bioorg Med Chem Lett 20 : 354-358, 2010.
- 6) Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Ohya A, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies. Bioconjugate Chem 21(4): 709-714, 2010.

- 7) Melchionna R, Carlo AD, Mori RD, Cappuzzello C, Barberi L, Musarò A, Cencioni C, Fujii N, Tamamura H, Crescenzi M, Maurizio C, Napolitano CM, Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. Muscle Nerve 41(6): 828-835, 2010.
- 8) Yoshimura K, Harada S, Shibata J, Hatada M, Yamada Y, Ochiai C, Tamamura H, Matsushita S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. J Virol 84(15): 7558-7568, 2010.
- 9) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Wataru W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. J Med Chem 53 (14): 5356-5360, 2010.
- 10) Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: Structure-activity relationship studies. Bioorg Med Chem 18: 6771-6775, 2010.
- 11) Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Arai H, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. Bioorg Med Chem Lett 20: 5853-5858, 2010.
- 12) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Masuda A, Tamamura H. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of dimerization state in cells. J Am Chem Soc 132 (45): 15899-15901, 2010.
- 13) Nomura W, Mino T, Narumi T, Ohashi N, Masuda A, Hashimoto C, Tsutsumi H, Tamamura H. Development of Crosslink-Type Tag-Probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins. Biopolymers: Peptide Science, 94: 843-852, 2010.
- 14) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, Komano J. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag. Gene Ther 17(9): 1124-1133, 2010.

著書

- 1) 鳴海哲夫, 玉村啓和. ペプチドミメティックによる創薬研究, 生化学 特集号「ペプチド科学と生化学の接点」(日本生化学会 東京), 82(6): 515-523, 2010.
 - 2) 野村 渉, 増田朱美, 玉村啓和. エピジェネティックな遺伝子発現制御のための DNA メチル化酵素の創製, 生化学 ミニレビュー(日本生化学会 東京), 82(5): 393-397, 2010.
 - 3) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Yoshimura K, Matsushita S, Murakami T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. From Reverse to Forward Chemical Genomics: Development of Anti-HIV Agent. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 105-106, 2010.
 - 4) Ohya A, Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of Artificial Antigen Peptide Based on the Trimeric Form of HIV Fusion Protein. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 29-32, 2010.
 - 5) Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okubo Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T, Tamamura H. Caged DAG-Lactones for Study of Cellular Signaling in a Spatial-and Temporal Specific Manner. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 347-348, 2010.
 - 6) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Okubo Y, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-Based Orthogonal Sensing Methods for Double Evaluation in PKC Ligands Screening. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 353-354, 2010.
2. 学会発表
- 1) Tamamura H. Anti-HIV Inhibitors and AIDS Vaccines. International Summer Program 2010. Tokyo, Japan, Sep 6-8, 2010.
 - 2) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Elucidation of a Dimerization State of a Chemokine Receptor CXCR4 via Chemical Biology Approach Utilizing Novel Bivalent Ligands with Rigid Polyproline Linkers. The 13th Akabori Conference Leipzig 2010: Japanese-German Symposium on Peptide Science. Leipzig, Germany, Sep11-15, 2010.
 - 3) Tamamura H. Peptidic HIV Integrase Inhibitors Derived from HIV Gene Products. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 4) Hashimoto C, Maddali K, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV Integrase Inhibitors Derived from HIV Gene Products. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 5) Matsushita S, Mouri S, Harada S, Yamada Y, Tamamura H, Yoshimura K. Strategy to Overcome Neutralization Resistance of HIV-1 Primary Isolates. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 6) Ozaki T, Tanaka T, Narumi T, Arai H, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Structure-Activity Relationships of CXCR4 Antagonists Having the Dipicolylamine/Azamacro-Cyclic-Metal Complex Structures. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 7) Arai H, Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. Development of Small CD4 Mimic Molecules that Induce Conformational Changes in gp120. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 8) Masuda A, Nomura W, Urabe A, Tamamura H. Effects of DNA binding and linker length on recombination of artificial zinc-finger recombinase. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010. Yokohama, Japan, Nov10-12,2010.
 - 9) Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H. Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 10) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 11) Narumi T, Bode JW. α,α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 12) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of

- CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
- 13) Nomura W, Masuda A, Okuda T, Barbas III CF, Tamamura H.. Kinetic Analysis of Split DNA Methylase in DNA Recognition and Methylation. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010). Hawaii, USA, Dec 15-20, 2010.
 - 14) 玉村啓和. ペプチド化学を基盤としたケミカル&センシングバイオロジー. 第5回ケミカルバイオロジー・第2回センシングバイオロジーシンポジウム. 東京, 2010年2月23日.
 - 15) 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗HIV剤の創製. 創薬懇話会2010 in 蔵王. 次世代を担う若手のためのメディシナルケミストリーフォーラム. 宮城, 2010年11月12-13日.
 - 16) 野村 渉. Zinc Finger 融合酵素を用いた革新的ウイルスゲノム改変技術の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010年11月7-9日.
 - 17) 野村 渉, 中原 徹, 大矢亜紀, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 合成抗原ペプチドによる HIV-1 gp41 の三量体構造を認識する抗体の誘導. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 18) 鳴海哲夫, 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 原田恵嘉, 大橋南美, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 19) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 20) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, NE. Lewin, PM. Blumberg, 玉村啓和. 蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 21) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 二価型 CXCR4 リガンドの創製と二量体構造解析への応用. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 22) 橋本知恵, 野村 渉, 田中智博, 中原 徹, 鳴海哲夫, 大庭賢二, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. エイズワクチンを指向した宿主受容体 CXCR4 由来抗原分子の創製. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 23) 増田朱美, 野村 渉, 大庭賢二, 奥田 毅, Barbas, III Carlos F., 山本直樹, 玉村啓和. 標的配列特異的 DNA 組換え酵素の構築を目指した亜鉛フィンガータンパク質の応用. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 24) 野村 渉, 大橋南美, 養 友明, 森 あつみ, 鳴海哲夫, 増田朱美, 堤 浩, 玉村啓和. 新規蛍光イメージングツールの創出: クロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 25) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体の創製研究. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 26) 田中智博, 橋本知恵, 小森谷真央, 野村 渉, 鳴海哲夫, 吉村和久, 松下修三, 村上 努, 駒野淳, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. リバースからフォワードへケミカルゲノミクスを活用した抗 HIV 剤の創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 27) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 堅固なリンカーを有する二価結合型 CXCR4 リガンドの開発と応用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 28) 橋本知恵, 野村 渉, 中原 徹, 田中智博, 堤浩, 長谷山正樹, 大庭賢二, 鳴海哲夫, 村上努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を基にしたエイズワクチン開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 29) 増田朱美, 野村 渉, 奥田 毅, 玉村啓和. 亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素のデザイン. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 30) 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. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 31) 田中智博. GPCR 2 量体構造解析を指向したツールの開発. 第9回バイオテクノロジー国際会議. 2010年6月30日.
 - 32) 野村 渉, 田中智博, 増田朱美, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価結合型リガンドの新規デザインによる CXCR4 の細胞表面における機能解析. 第4回バイオ関連化学シンポジウム. 大阪, 2010年9月24-26日.
 - 33) 野村 渉, 相馬 晃, 中原 徹, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-gp41 の三量体構造に特異的な中和抗体を誘導する人工抗原ペプチド. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
 - 34) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新

- 規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 35) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 36) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 侵入機構を基にした宿主細胞タンパク質由来抗原分子の創製. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 37) 増田朱美, 野村 渉, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 亜鉛フィンガー融合酵素による配列特異的DNA組換え反応効率の検討. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 38) 小森谷真央, 村上 努, 田中智博, 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54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 39) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 新井啓之, 大橋南美, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 40) 森 あつみ, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 玉村啓和. 細胞内タンパク質の挙動解明を志向したタグ・プローブシステムの開発. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
- 41) 野村 渉, 中原 徹, 橋本知恵, 大庭賢二, 相馬 晃, 田中智博, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を模倣した立体構造特異的人工抗原分子の創製. 第36回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010年11月1-2日.
- 42) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 尾崎太郎, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和. 有機銅試薬によるクロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第36回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010年11月1-2日.
- 43) 小森谷真央, 村上 努, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチド. 第29回メディシナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010年11月17-19日.
- 44) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第29回メディシナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010年11月17-19日.
- 45) 村上 努, 小森谷真央, 鈴木慎太郎, 橋本知恵, 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58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010年11月7-9日.
- 46) 近藤麻美, 野村 渉, 玉村啓和, 鈴木陽一, 梁 明秀. 亜鉛フィンガー—LEDGF 融合タンパクを用いた LV ベクターの配列特異的挿入法の開発の試み. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010年11月7-9日.
- 47) 橋本知恵, 田中智博, 浦野恵美子, 尾崎太郎, 新井啓之, 鳴海哲夫, 野村 渉, Maddali K, Pommier Y, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010年11月24-26日.
- 48) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010年11月24-26日.
- 49) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 中原 徹, 田中智博, 大庭賢二, 相馬 晃, 長谷山正樹, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 侵入過程の動的超分子機構を基にした新規エイズワクチンの創製. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010年11月24-26日.
- 50) 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24回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010年11月24-26日.
- 51) 尾崎太郎, 田中智博, 宮内浩典, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村啓和. gp120 の CD4 結合サイトを模倣した新規抗原分子の創製. 第24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。)

1. 特許取得

- 1) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：国際出願番号 PCT/JP2010/003280

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究事業）
分担研究報告書

NBD誘導体の効果の動物モデルを用いた研究

研究分担者- 五十嵐 樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨 相同組換え法によりアカゲザルで良く増殖するCCR5指向性クレードC型臨床分離HIV-1株Envを持つ新規SHIVを短期間で作製することができた。本手法により、本プロジェクトで開発するNBD誘導体のin vivoでの有効性を評価するのに適したSHIV-アカゲザルモデルを確立する。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の治療は、既存の薬剤の長期使用による様々な問題を抱え、HIV 生活環の阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞を標的にする新規治療法が求められている。研究代表者は、中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で HIV-1、gp120 の CD4 結合部位に作用して ENV 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定した。In vivo では、中和抗体の多くは、Env に反応エピトープが保存されているにもかかわらず、中和能が見られない。これは、Env が三量体を形成しその立体構造によりエピトープを遮蔽しているためと考えられている。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和エピトープに到達可能となれば、既に体内に存在する抗体でウイルスを中和できるようになる。中和抗体はウイルス膜上の機能的 Env に結合できるばかりでなく、感染細胞の表面に結合し、ADCC などの作用でこれを攻撃する。これらの効果が in vivo でも検証できれば、体内の感染細胞を減少させることが可能となり、長期間継続しなければならぬ現在の抗ウイルス療法とは異なる治療法の開発が可能となる。本分担研究では、このような新しい治療戦略が in vivo で有効かどうか、動物モデルで検証することを目的とする。

B. 研究方法

既存の SHIV-アカゲザルエイズモデルで用いられている SHIV に対する NBD 誘導体の効果を検討する。一方、これまでサルモデルに用いられてきた SHIV が、臨床分離株のモデルになるかどうか重要なテーマであり、臨床分離株で得られたデータと比較す

るとともに、新たに臨床分離株を用いた SHIV の作製を行う。動物モデル研究は少数の個体を用いた準備的研究から、段階的に進めていく。サル感染実験にあたっては、血漿中ウイルス RNA 量や末梢血 CD4 陽性細胞数等の通常の感染マーカーのみならず、プロウイルス DNA や HIV 感染に関連する炎症マーカーなども測定する。発症阻止ばかりでなく残存ウイルスを減少させる方法を探究する。予備的研究では、89.6, SF162, JR-FL などのエンベロープに対しては NBD 誘導体の有効性が検証済みであり、これらのウイルスの Env を持つ SHIV を用いた in vitro の実験から開始する計画であるが、より臨床株に近い SHIV を新規に作製し、新たな治療モデルを構築する。

（倫理面への配慮）

動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。また、組換え SHIV 感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

これまで主に作製されてきた SHIV は、CXCR4 を使用する X4 型であり、CCR5 指向性である大多数の

HIV-1 とは病態が異なる事が分かっている。また、世界中の HIV 感染者の約 60% が clade C ウイルスに感染しているが、現存する clade C の SHIV は数少ない。そこで本年度は、より実際の臨床株に近い SHIV モデルの構築を目指し、感染伝播と病原性に深く関与している CCR5 指向性 clade C HIV-1 株の env 領域を持つ SHIV の作製を行った。細胞の相同組換え機構を利用した新規組換え技術を用いて、clade B SHIV-KS661 をバックボーンとして clade C HIV-1 臨床分離株の env 領域を持つ SHIV を作製した。シーケンス解析で組換え部位の特定を行い、clade C HIV-1 env を持つ新規 SHIV の生成を確認した。作製した新規 SHIV 及び病原性分子クローン化ウイルス SIVmac239 をアカゲザル末梢血単核球 (PBMC) に接種後、培養上清中の逆転写酵素活性を経時的に評価したところ、新規 SHIV は SIVmac239 と同程度に複製した。低分子阻害剤を用いた共受容体指向性試験により、新規 SHIV は、CCR5 指向性であることを確認した。アカゲザル肺胞マクロファージでの複製能を評価したところ、新規 SHIV はマクロファージ指向性である事を明らかにした。3 頭のアカゲザルにこの SHIV を接種し、血漿中ウイルス RNA 量、末梢血中 CD4 陽性 T 細胞数、肺胞中 CD4/CD3 陽性 T 細胞の割合の変動から、個体レベルのウイルス複製及び病原性を評価した。(1) 新規 SHIV はサル個体内において高力価で複製した。(2) 感染サルの末梢血 CD4 陽性 T 細胞を減少させなかったが、CCR5 指向性ウイルスが標的とするエフェクターメモリー CD4 T 細胞が多数分布するエフェクターサイトの一つである肺胞において、顕著に CD4 陽性 T 細胞を減少させた。

D. 考察

相同組換え現象を利用した新規 SHIV 作製技術により、従来より短期間で、サル個体における複製能の高い新規 SHIV を作製できることが明らかとなった。今後この技術を用いて、本プロジェクトで開発する NBD 誘導体の効果を評価できる新規サルエイズモデルを確立できるものと期待される。

E. 結論

相同組換え法によりアカゲザルで良く増殖する CCR5 指向性クレード C 型臨床分離 HIV-1 株 Env を持つ新規 SHIV を短期間で作製することができた。本手法により、本プロジェクトで開発する NBD 誘導体の

in vivo での有効性を評価するのに適した SHIV-アカゲザルモデルを確立する。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., Igarashi, T., Miura, T., and Akashi, M.: Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus. *Vaccine*, 28: 5377-5385, 2010.

(2) Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: *In vivo* analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology*, 399: 134-143, 2010.

(3) Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, 91: 773-781, 2010.

(4) Nishimura, Y., Shingai, M., Willey, R., Sadjadpour, R., Lee, W. R., Brown, C. R., Brenchley, J. M., Buckler-White, A., Petros, R., Eckhaus, M., Hoffman, V., Igarashi, T. and Martin, M. A. Generation of the Pathogenic R5-Tropic Shivad8 by Serial Passaging in Rhesus Macaques. *J. Virol.* 84:4769-4781, 2010.

2. 学会発表

(1) 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル/ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26-28 日、東京。

(2) S. Iwami, Y. Takeuchi, T. Igarashi and T. Miura: Estimate of viral productivity and infectivity in vitro. KSIAM, April 24-25, 2010, Chungnam National University.

(3) S. Iwami, Y. Takeuchi, T. Igarashi and T. Miura: Estimate of viral productivity and infectivity in vitro. CMPD3, May 31- June 4, 2010, Bordeaux, France.

(4) 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル／ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第19回サル疾病ワークショップ、2010年7月3日、神奈川。

(5) S. Iwami, M. Horiike, T. Miura and T. Igarashi: Contribution of Long-Lived Productively Infected Cells in SIV Infection. SIAM Conference on Life Science, July 12-15, 2010, Pittsburgh, Pennsylvania.

(6) 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、三浦智行：計算ウイルス学・免疫学の展開-ウイルス感染力推定法の開発-、日本応用数理学会、2010年9月8日、東京。

(7) 岩見真吾、堀池麻里子、三浦智行、稲葉寿、守田智、五十嵐樹彦：SIV感染アカゲザルによるHAART治療モデルのデータ解析とその理論、第20回日本数理生物学会、2010年9月14日、札幌。

(8) 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、三浦智行：数理モデルによるウイルス感染力推定法の開発、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島。

(9) 大附寛幸、藤田泰久、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術によるR5指向性 clade C envを持つサル指向性 HIV-1 の創出、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島。

(10) 高原悠佑、松岡佐織、石井洋、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗：サルエイズモデルにおける HAART 実施前後の CTL 反応の比較、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島。

(11) 仲宗根咲子、松山めぐみ、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：マクロファージにおける霊長類レンチウイルス出芽様式の超微形態学的解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島。

(12) 堀池麻里子、松山めぐみ、安井美加、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：多剤併用療法実施下のサルエイズモデルにおけるリンパ節内でのウイルス新規感染の可能性、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島。

(13) 岩見真吾、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦：

SIV 感染アカゲザルによる HAART 治療モデルのデータ解析、第24回日本エイズ学会学術集会、2010年11月24-26日、東京。

(14) 中村仁美、大附寛幸、松田健太、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル指向性ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第24回日本エイズ学会学術集会、2010年11月24-26日、東京。

(15) 藤田泰久、大附寛幸、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術によるCCR5指向性 clade C HIV-1 株の env 領域を持った SHIV の作製、第24回日本エイズ学会学術集会、2010年11月24-26日、東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

NBD誘導体の活性測定、NBD誘導体の最適化の研究

研究分担者・吉村和久・熊本大学エイズ学研究センター・准教授

研究要旨：

平成 22 年度は、HIV-1 エンベロープの立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる CD4 類似低分子化合物 (NBD-556) およびその誘導体に関する研究を行った。この NBD-556 が、実際にどのような抗体の中和感受性を増強するのかを検討した。その結果、治療用抗 HIV-1 中和抗体 KD-247 のみならず、松下研究室で樹立された CD4i 抗体の中和活性も NBD-556 の添加により著しく増強することがわかった。また、感染者から分離したウイルスに対する同時期の血清 IgG による中和も、NBD-556 存在下では中和できるようになることが確認でき、これらを報告した。これらの結果を踏まえて、中和抗体の感受性増強能は維持しつつ、細胞毒性の低い低分子化合物の検索をあわせて行った。そしていくつかの候補化合物から、毒性の低い YYA-021(NBD-559) を選び、NBD-556 との比較検討を行った。

A. 研究目的

我々は、低分子化合物 NBD-556 が gp120 の立体構造を大きく変化させ、中和抗体の反応性を増強することを証明した。また、NBD-556 が gp120 のどの部位と結合しているかを *in vitro* 耐性誘導により調べた結果、sCD4 の結合部位と非常に近いこともわかった。そこで、中和抗体の感受性増強能は NBD-556 並みに維持しつつ、細胞毒性の低い低分子化合物の検索を目的として研究を行った。

B. 研究方法

分担研究者の一人である東京医科歯科大学生体材料工学研究所機能分子部門分子認識分野の玉村啓和教授により、HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物(NBD-556)およびその誘導体の合成を行い、抗ウイルス効果と抗体の反応性の変化を WST-8 assay と FACS で解析した。また、広範囲ウイルス中和抗体 KD-247(抗 V3 抗体)や松下研究室で樹立しされた 4E9C (CD4i 抗体)等の抗 HIV-1 エンベロープ抗体を用いて、NBD 誘導体による中和感受性の増強効果

を検討した。また、感染症例からウイルスと血清 IgG を分離精製し、中和実験を行った。

(倫理面での配慮)

研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会、倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

FACS解析でNBD-556がsCD4と同様にCD4i抗体の結合を増強することを確認した後、NBD-556がgp120のどの部位と結合しているかを詳細に知るために、我々が開発した*in vitro*耐性誘導システムを用いて、この化合物に耐性のウイルスをとり、sCD4の耐性ウイルスとシークエンスを比較検討した。その結果、NBD-556とsCD4それぞれの耐性誘導で観察された変異部位をgp120の3次元結晶解析図上にプロットすると、NBD-556の変異部位はsCD4のそれと非常に似通った部位に集中していることがわかった。つまり、NBD-556がsCD4のgp120上の結合部位と非常に近い位置で結合していることが示唆された。

一般的に、HIV感染症例においては、血中のウイルスに対する同時期の抗体には、ほとんど中和活性が見られない。ところが、NBD-556が1 μ Mでも存在すると、自己血清IgGによる明らかなウイルス感染阻害効果が認められるようになった。このことは、ウイルスと同時期に存在する血中の抗体は、中和エピトープが変異しているために中和できなくなっているのではなく、三量体構造の内側に反応エピトープが隠されていて、抗体がアクセスできないためであることを示している。同じウイルスを使って、中和単クローン抗体KD-247(坑V3抗体)や松下研究室で樹立した4E9C(CD4i抗体)を用いて、抗体の中和感受性のNBD-556による増強効果を調べた結果も、同様にNBD-556低濃度存在下で、著明な中和感受性の増強が認められた。これらのことは、CD4i抗体や坑V3抗体が血中に存在している場合、エンベロープの立体構造変化を誘発するような化合物(NBD誘導体)を加えるだけで、それまで中和抵抗性であったウイルスを感受性に変えることが可能となることが示された。

ただ、NBD-556の最大の問題点として細胞毒性が強いことがあげられる。このままでは、動物実験での使用は非常に困難であることは明白である。そこで新しい低毒性のNBD誘導体の開発を主たる目的として、玉村教授にNBD-556類似の低分子化合物の合成をお願いした。その結果、エンベロープの三量体構造変化はNBD-556と遜色なく維持され、かつ細胞毒性の低い誘導体YYA-021(NBD-559)の開発に成功した。この化合物は、FACS解析でCD4i抗体の反応性がNBD-556とほぼ同等であるだけでなく、CC50(50%細胞傷害濃度)の値がNBD-556より1.5-2倍高かった。この誘導体は、NBD-556と同様に臨床分離株に対する中和抗体の感受性を増加させることが確認された。

D. 考察

我々の研究結果から、抗V3中和抗体

やCD4i抗体等の抗ウイルス効果を増強するような立体構造変化を引き起こす機能を持つ分子量350前後の低分子化合物NBD-556は、実際の感染症例でも血中に存在する中和抗体の中和感受性を増強する可能性が期待できることが示唆された。このことは、このようなエンベロープに立体構造変化を誘導する化合物が侵入阻害剤だけでなく、既存の血中抗体の中和感受性を増強するのみならず、治療用の坑HIV抗体の増強をも可能性とすることを意味している。これまで多くのNBD誘導体をスクリーニングした結果、NBD-556と同等の中和抗体増強作用を持ちかつ、毒性の低いYYA-021(NBD-559)を見いだすことに成功した。今後、この化合物を用いての動物実験への移行における基礎実験を継続していく。また、より毒性が低くPKの良い化合物の探索も平行して継続していく予定である。

E. 結論

NBD-556様の中和抗体増強物質の存在下では血清IgGで同時期のウイルスを中和できるようになり、これらの化合物は新しいコンセプトの坑HIV治療の道を開くものとして、今後発展させていきたい。今後、より毒性の低い新規化合物のYYA-021(NBD-559)を用いて、動物実験に向けた基礎実験をすすめていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Narumi, T., Ochiai, C., **Yoshimura, K.**, Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5853-5858, 2010.
- ② **Yoshimura, K.**, Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S. Enhanced exposure of human

immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol*, 84:7558-7568, 2010.

- ③ Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita, S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol*, 91: 1335-1345, 2010.
- ④ Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. :CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 354-358, 2010.

2. 学会発表

- ① Harada S., Hamji A., Matsushita S., and Yoshimura K. Evolution and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during in vitro selection of raltegravir. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2010.10.6-8, Aso, Kumamoto, Japan.
- ② Liu M., Shibata J., Harada S., Takehisa J., Yoshimura K., Matsushita S. Impact of a point mutation in V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of Env. AIDS Vaccine 2010, 2010.9.28-10.1, Atlanta, USA.
- ③ Matsushita S., Mouri S., Harada S., Yamada Y., Tamamura H., Yoshimura K. CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS conference, 2010.7.18-23, Vienna, Austria.
- ④ Harada S., Yoshimura K., Kawanami Y., Matsushita S. In vitro selections of raltegravir resistant variants using diverse primary isolates, subtype B, C, CRF01_AE, and CRF08_BC. 2010 IYIS, 2010.3.4-5, Kumamoto, Japan.
- ⑤ Yoshimura K., Harada S., Matsushita S. Two step escape pathway of the

HIV-1 subtype C primary isolate induced by the in vitro selection of Maraviroc. 17h Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010), 2010.2.16-19, San Francisco, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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

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
Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H.	CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist.	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	20	5853-5858	2010
Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S.	Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds.	J Virol	84:	7558-7568	2010
Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita, S.	HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2.	J Gen Virol	91	1335-1345	2010
Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H.	CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry.	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	20	354-358	2010

研究成果の刊行に関する一覧表

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
鳴海哲夫、 玉村啓和	ペプチドミメティックによる創薬研究	日本生化学会	「生化学」特集号「ペプチド科学と生化学の接点」	日本生化学会	東京	2010	第82巻6号 頁515-523
野村 渉、 増田朱美、 玉村啓和	エピジェネティックな遺伝子発現制御のためのDNAメチル化酵素の創製	日本生化学会	「生化学」ミニレビュー	日本生化学会	東京	2010	第82巻5号 頁393-397
Tanaka T, Nomura W, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	From Reverse to Forward Chemical Genomics: Development of Anti-HIV Agent	Kouji Okamoto (Eds.)	Peptide Science 2009	The Japanese peptide Society	Osaka	2010	105-106
Ohya A, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Synthesis and Evaluation of Artificial Antigen Peptide Based on the Trimeric Form of HIV Fusion Protein	Kouji Okamoto (Ed.)	Peptide Science 2009	The Japanese peptide Society	Osaka	2010	29-32
Nomura W, Furuta T, Tamamura H, et al.	Caged DAG-Lactones for Study of Cellular Signaling in a Spatial-and Temporal Specific Manner	Kouji Okamoto (Eds.)	Peptide Science 2009	The Japanese peptide Society	Osaka	2010	347-348
Ohashi N, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H, et al.	Fluorescent-Based Orthogonal Sensing Methods for Double Evaluation in PKC Ligands Screening	Kouji Okamoto (Ed.)	Peptide Science 2009	The Japanese peptide Society	Osaka	2010	353-354

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
Tomohiro Tanaka, Tetsuo Narumi, Naoki Yamamoto & Hirokazu Tamamura et al.	Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists	ChemMedChem		<i>in press</i>	2011
Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H.	Intense blue fluorescence in a leucine zipper assembly	ChemBioChem		<i>in press</i>	2011

Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H.	Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C	ChemBioChem		<i>in press</i>	2011
Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H.	Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding	Bioconjugate Chem.	22	82-87	2011
Yamada Y, Narumi T, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H, et al.	CD4 mimics targeting the mechanism of HIV	Bioorg. Med. Chem. Lett.	20	354-358	2010
Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Ohya A, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H.	Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies	Bioconjugate Chem	21(4)	709-714	2010
Melchionna R, Fujii N, Tamamura H, Napolitano CM, Germani A, et al.	Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors	Muscle Nerve	41(6)	828-835	2010
Yoshimura K, Harada S, Shibata J, Hatada M, Yamada Y, Ochiai C, Tamamura H, Matsushita S.	Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds	J. Virol.	84(15)	7558-7568	2010
Suzuki S, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H, et al.	Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products	J. Med. Chem.	53 (14)	5356-5360	2010
Suzuki S, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H, et al.	Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: Structure-activity relationship studies	Bioorg. Med. Chem.	18	6771-6775	2010
Narumi T, Matsushita S, Tamamura H, et al.	CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist	Bioorg. Med. Chem. Lett.	20	5853-5858	2010
Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Masuda A, Tamamura H.	Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of dimerization state in cells	J. Am. Chem. Soc.	132 (45)	15899-15901	2010
Nomura W, Tsutsumi H, Tamamura H, et al.	Development of Crosslink-Type Tag-Probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins	Biopolymers: Peptide Science	94	843-852	2010
Aoki T, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, Komano J, et al..	Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag	Gene. Ther.	17(9)	1124-1133	2010

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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

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
Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horii, M., Igarashi, T., Miura, T., and Akashi, M.	Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus.	Vaccine	28	5377-5385	2010
Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.	<i>In vivo</i> analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6.	Virology	399	134-143	2010
Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.	Small intestine CD4 ⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load.	J. Gen. Virol.	91	773-781	2010
Nishimura, Y. Shingai, M. Willey, R. Sadjadpour, R. Lee, W. R. Brown, C. R. Brechler, J. M. Buckler-White, A. Petros, R. Eckhaus, M. Hoffman, V. Igarashi, T. and Martin, M. A.	Generation of the Pathogenic R5-Tropic SHIV-89.6 by Serial Passaging in Rhesus Macaques.	J. Virol.	84	4769-4781	2010

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Narumi, T., Ochiai, C., <u>Yoshimura, K.</u> , Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H.	CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist.	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	20	5853-5858	2010
<u>Yoshimura, K.</u> , Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S.	Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds.	J Virol	84:	7558-7568	2010
Hatada, M., <u>Yoshimura, K.</u> , Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita, S.	HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2.	J Gen Virol	91	1335-1345	2010
Yamada, Y., Ochiai, C., <u>Yoshimura, K.</u> , Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H.	CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry.	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	20	354-358	2010



CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist

Tetsuo Narumi^a, Chihiro Ochiai^a, Kazuhisa Yoshimura^b, Shigeyoshi Harada^b, Tomohiro Tanaka^a, Wataru Nomura^a, Hiroshi Arai^a, Taro Ozaki^a, Nami Ohashi^a, Shuzo Matsushita^b, Hirokazu Tamamura^{a,*}

^aInstitute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

^bCenter for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2010

Revised 22 July 2010

Accepted 26 July 2010

Available online 3 August 2010

Keywords:

CD4

HIV entry

Hybrid molecule

gp120

ABSTRACT

Small molecules behaving as CD4 mimics were previously reported as HIV-1 entry inhibitors that block the gp120–CD4 interaction and induce a conformational change in gp120, exposing its co-receptor-binding site. A structure–activity relationship (SAR) study of a series of CD4 mimic analogs was conducted to investigate the contribution from the piperidine moiety of CD4 mimic **1** to anti-HIV activity, cytotoxicity, and CD4 mimicry effects on conformational changes of gp120. In addition, several hybrid molecules based on conjugation of a CD4 mimic analog with a selective CXCR4 antagonist were also synthesized and their utility evaluated.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The infection of host cells by HIV-1 takes place in multiple steps via a dynamic supramolecular mechanism mediated by two viral envelope glycoproteins (gp41, gp120) and several cell surface proteins (CD4, CCR5/CXCR4).¹ Cell penetration begins with the interaction of gp120 with the primary receptor CD4. This induces conformational changes in gp120, leading to the exposure of its V3 loop allowing the subsequent binding of gp120 to a co-receptor, CCR5² or CXCR4.³

N-(4-Chlorophenyl)-*N'*-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)oxalamide (NBD-556: **1**) and the related compounds NBD-557 (**2**) and YYA-021 (**3**) have been identified as a novel class of HIV-1 entry inhibitors, which exert potent cell fusion and virus cell fusion inhibitory activity at low micromolar levels (Fig. 1).⁴ Furthermore, compound **1** can also induce thermodynamically favored conformational changes in gp120 similar to those caused by CD4 binding. The X-ray crystal structure of gp120 complexed with CD4 revealed the presence of a hydrophobic cavity, the Phe43 cavity, which is penetrated by the aromatic ring of Phe⁴³ of CD4.⁵ Molecular modeling revealed that compound **1** is also inserted into the Phe43 cavity, the *para*-chlorophenyl group of **1** entering more deeply than the phenyl ring of Phe⁴³ of CD4 and interacting with the conserved gp120 residues such as Trp⁴²⁷, Phe³⁸², and Trp¹¹².^{4c} The modeling also suggested that an oxalamide linker forms hydrogen bonds with carbonyl groups of the gp120 backbone peptide bonds. Our model of **1** docked into gp120 revealed that eight other gp120

residues, Val²⁵⁵, Asp³⁶⁸, Glu³⁷⁰, Ser³⁷⁵, Ile⁴²⁴, Trp⁴²⁷, Val⁴³⁰, and Val⁴⁷⁵ are located within a 4.4 Å-radius of **1** and that a large cavity exists around the *p*-position of the aromatic ring of **1**.^{4c} Based on these observations, we conducted a structure–activity relationship (SAR) study of a series of analogs of CD4 mimics with substituents at the *p*-position of the aromatic ring. This study revealed that a certain size and electron-withdrawing ability of the substituents are indispensable for potent anti-HIV activity.^{4c}

Although several reported SAR studies of **1** have revealed the contributions of the phenyl ring and the oxalamide linker of **1** to the binding affinity with gp120, the anti-HIV activity and the CD4 mimicry on conformational changes of gp120,⁴ there has been, to the best of our knowledge, no prior report describing SAR studies of the piperidine ring of **1**. In this paper, the contributions of the piperidine ring of **1** to the anti-HIV activity, CD4 mimicry and cytotoxicity were investigated through the SAR studies focused on the piperidine ring of **1**. Furthermore, to apply the utility of CD4 mimics to the development of potent anti-HIV agents, a series of the

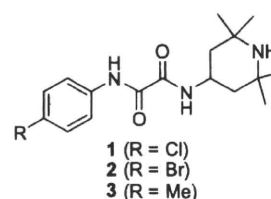


Figure 1. NBD-556 (**1**) and related compounds.

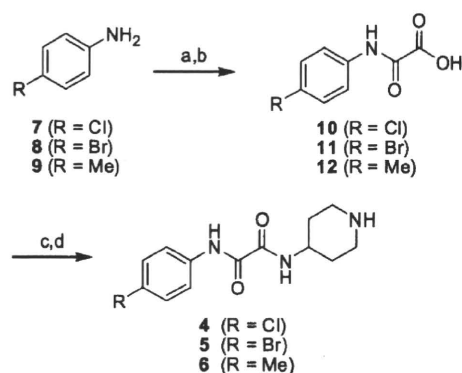
* Corresponding author.

E-mail address: [tamamura.mr@tmd.ac.jp](mailto:tamura.mr@tmd.ac.jp) (H. Tamamura).

hybrid molecules that combined CD4 mimic analogs with a selective CXCR4 antagonist were also synthesized and bioevaluated.

For the design of novel CD4 mimic analogs, we initially tried to directly derivatize the nitrogen atom of piperidine group. However, direct alkylation and acylation of **1** failed probably as a result of steric hindrance from the methyl groups on the piperidine ring so we synthesized several derivatives lacking the methyl groups and evaluated their anti-HIV activity, cytotoxicity, and ability to mimic CD4. According to the previous SAR study,^{4e} the *p*-Cl (**4**), *p*-Br (**5**) and *p*-methyl derivatives (**6**) lacking the methyl groups on the piperidine ring were prepared. Compounds **4–6** were synthesized by published methods as shown in Scheme 1. Briefly, coupling of aniline derivatives with ethyl chloroglyoxalate in the presence of Et₃N and subsequent saponification gave the corresponding acids (**10–12**). Condensation of these acids with 4-amino-*N*-benzylpiperidine in the presence of EDC–HOBT system, followed by debenzylation under von Braun conditions with 1-chloroethyl chloroformate⁵ produced the desired compounds **4–6**.⁷

The anti-HIV activity of each of the synthetic compounds was evaluated against MNA (R5) strain, with the results shown in Table 1. IC₅₀ values were determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method⁸ as the concentrations of the compounds which conferred 50% protection against HIV-1-induced cytopathogenicity in PM1/CCR5 cells. Cytotoxicity of the compounds based on the viability of mock-infected PM1/CCR5 cells was also evaluated using the MTT method. CC₅₀ values, the concentrations achieving 50% reduction of the viability of mock-infected cells, were also determined. Compounds **1** and **3** showed potent anti-HIV activity. The anti-HIV IC₅₀ of compound **2** was previously reported to be comparable to that of compound **1**,



Scheme 1. Synthesis of compounds **4–6**. Reagents and conditions: (a) ethyl chloroglyoxalate, Et₃N, THF; (b) 1 M aq NaOH, THF, 67%–quant.; (c) 1-benzyl-4-aminopiperidine, EDC·HCl, HOBT·H₂O, Et₃N, THF; (d) (i) 1-chloroethyl chloroformate, CH₂Cl₂; (ii) MeOH, 8–47%.

Table 1
Effects of the methyl groups on anti-HIV activity and cytotoxicity of CD4 mimic analogs^a

Compd	R	IC ₅₀ (μM) MNA (R5)	CC ₅₀ (μM)
1	Cl	12	110
2	Br	ND	93
3	Me	15	210
4	Cl	8	100
5	Br	6	50
6	Me	20	190

^a All data with standard deviation are the mean values for at least three independent experiments (ND = not determined).

and thus was not determined in this study. Novel derivatives **4** and **6** without the methyl groups on the piperidine ring, showed significant anti-HIV activity comparable to that of the parent compounds **1** and **3**, respectively. The *p*-methyl derivative **6** has slightly lower activity than the *p*-Cl derivative **4** and the *p*-Br derivative **5**. These results are consistent with our previous SAR studies on the parent compounds **1–3**. Compound **5** was found to exhibit relatively strong cytotoxicity (CC₅₀ = 50 μM) and compounds **4** and **6** have cytotoxicities comparable to that of compounds **1** and **3**, respectively. This observation indicates that the methyl groups on the piperidine ring do not contribute significantly to the anti-HIV activity or the cytotoxicity.

Compound **1** and the newly synthesized derivatives **4–6** were also evaluated for their effects on conformational changes of gp120 by a fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis. The profile of binding of an anti-envelope CD4-induced monoclonal antibody (4C11) to the Env-expressing cell surface (an R5-HIV-1 strain, JR-FL, -infected PM1 cells) pretreated with the above derivatives was examined. Comparison of the binding of 4C11 to the cell surface was measured in terms of the mean fluorescence intensity (MFI), as shown in Figure 2. Pretreatment of the Env-expressing cell surface with compound **1** (MFI = 53.66) produced a significant increase in binding affinity for 4C11, consistent with that reported previously.^{4e} This indicates that compound **1** enhances the binding affinity of gp120 with the 17b monoclonal antibody which recognizes CD4-induced epitopes on gp120. The Env-expressing cells without CD4 mimic-pretreatment failed to show significant binding affinity to 4C11. On the other hand, the profiles of the binding of 4C11 to the Env-expressing cell surface pretreated with compound **4** (Cl derivative) and **5** (Br derivative) (MFI = 49.88 and 52.34) were similar to that of compound **1**. Pretreatment of the cell surface with compound **6** (Me derivative) (MFI = 45.99) produced slightly lower enhancement but significant levels of binding affinity for 4C11, compared to that of compound **1** as pretreatments. These results suggested that the removal of the methyl groups on the piperidine moiety might not affect the CD4 mimicry effects on conformational changes of gp120 and it was conjectured that the phenyl ring of CD4 mimic might be a key moiety for the interaction with gp120 to induce the conformational changes of gp120. This is consistent with the results in the previous paper where it was reported that CD4 mimics having suitable substituent(s) on the phenyl ring cause a conformational change, resulting in external exposure of the co-receptor-binding site of gp120.^{4e}

Based on these results, a series of *N*-alkylated and *N*-acylated piperidine derivatives **13–18** with no methyl groups were prepared. Several compounds with 6-membered rings were also prepared to determine whether or not the piperidine ring is mandatory. The synthesis of these derivatives is shown in Scheme 2. Since the *p*-Cl derivative **4** showed potent anti-HIV activity and relatively low cytotoxicity, compared to the *p*-Br derivative **5**, chlorine was selected as the substituent at the *p*-position of the phenyl ring. The *N*-methyl derivative **13** was synthesized by coupling of **10** with 4-amine-1-methylpiperidine. Alkylation of **4** with *tert*-butyl bromoacetate, followed by deprotection of *tert*-butyl ester provided compound **14**. The *N*-isopropyl derivative **15** was prepared by reductive amination of **4** with isopropyl aldehyde. The *N*-acyl derivatives **16–18** were prepared by simple acylation or condensation with the corresponding substrate. The synthesis of other derivatives **19–23** with different 6-membered rings is depicted in Scheme 3. The 6-membered ring derivatives with the exception of **21** were prepared by coupling of acid **10** with the corresponding amines. Compound **21** was prepared by reaction of **10** with thionyl chloride to give the corresponding acid chloride, which was subsequently coupled with 4-aminopyridine.

Compounds **1**, **3**, and **13–18** were evaluated for their CD4 mimicry effects on conformational changes of gp120 by the FACS anal-

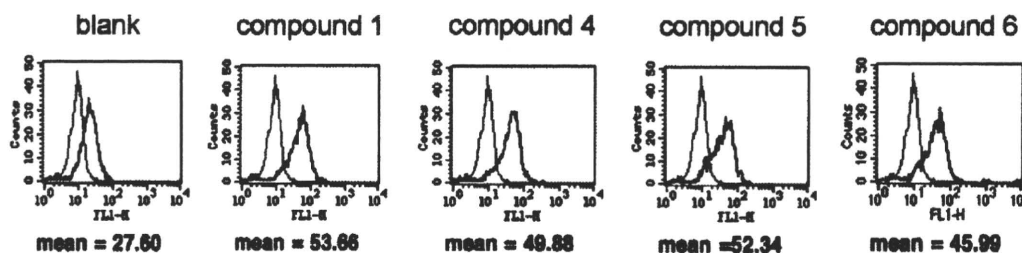
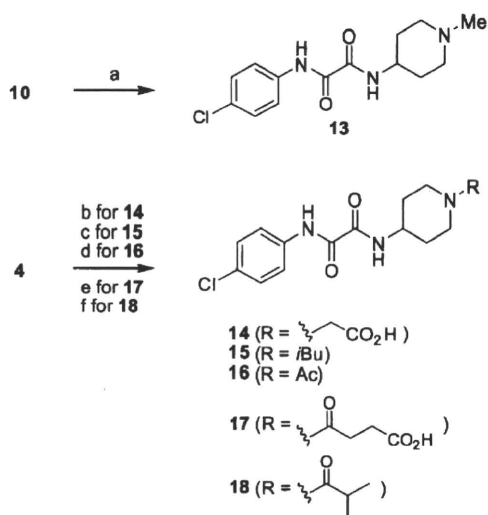
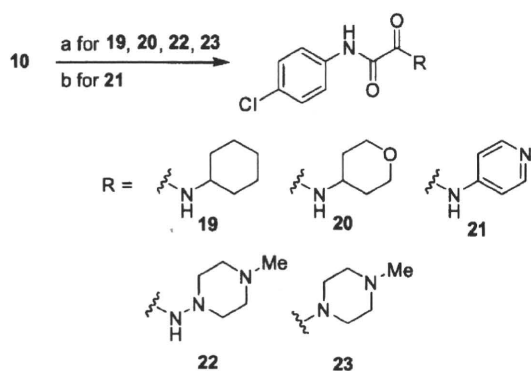


Figure 2. FACS analysis of compounds 1 and 4–6. JR-FL (R5, Sub B) chronically infected PM1 cells were preincubated with 100 μM of a CD4 mimic for 15 min, and then incubated with an anti-HIV-1 mAb, 4C11, at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The cells were washed with PBS, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-human IgG antibody was used for antibody-staining. Flow cytometry data for the binding of 4C11 (green lines) to the Env-expressing cell surface in the presence of a CD4 mimic are shown among gated PM1 cells along with a control antibody (anti-human CD19; black lines). Data are representative of the results from a minimum of two independent experiments. The number at the bottom of each graph shows the mean fluorescence intensity (MFI) of the antibody 4C11.



Scheme 2. Synthesis of N-alkylated and N-acylated piperidine derivatives 13–18. Reagents and conditions: (a) 4-amine-1-methylpiperidine, EDC-HCl, HOBT-H₂O, Et₃N, THF, 16%; (b) (i) *tert*-butyl bromoacetate, NaH, DMF; (ii) TFA, 6%; (c) isobutylaldehyde, NaBH(OAc)₃, AcOH, DCE, quant.; (d) acetyl chloride, Et₃N, DMF, quant.; (e) succinic anhydride, Et₃N, THF, 37%; (f) isobutyric acid, EDC-HCl, HOBT-H₂O, Et₃N, THF, 95%.



Scheme 3. Synthesis of 6-membered ring derivatives 19–23. Reagents and conditions: (a) the corresponding amine, EDC-HCl, HOBT-H₂O, Et₃N, THF, 22%–quant.; (b) 4-aminopyridine, SOCl₂, MeOH, 38%.

ysis, and the results are shown in Figure 3. Pretreatment of the Env-expressing cells with the N-substituted compounds 13, 15, 16, and 18 produced a notable increase in binding affinity to

4C11, similar to that observed in the pretreatment with compound 1. The profile of the binding of 4C11 to the cell surface pretreated with compounds 14 and 17 was similar to that of controls, suggesting that these derivatives offer no significant enhancement of binding affinity for 4C11 and that the carboxylic moiety in the terminal of piperidine ring is not suited to CD4 mimicry. It is hypothesized that the carboxylic moieties of compounds 14 and 17 might prevent the interaction of CD4 mimic with gp120 by their multiple contacts with side chain(s) of amino acid(s) around the Phe43 cavity, such as Asp³⁶⁸ and Glu³⁷⁰. Replacement of the piperidine moiety with the different 6-membered rings resulted in a significant loss of binding affinity for 4C11 in the FACS analysis of compound 19–23 (MFI(19) = 11.44, MFI(20) = 12.84, MFI(21) = 12.47, in MFI(blank) = 11.34; MFI(22) = 26.67, MFI(23) = 20.21, in MFI(blank) = 26.79, data not shown), indicating a significant contribution from the piperidine ring which interacts with gp120 inducing conformational changes.

In view of their ability to induce conformational changes of gp120, the anti-HIV activity and cytotoxicity of the piperidine derivatives 13–18 were further evaluated, with the results shown in Table 2. The anti-HIV activity of the synthetic compounds was evaluated against various viral strains including both laboratory and primary isolates and IC₅₀ and CC₅₀ values were determined as those of compounds 4–6. The *N*-methylpiperidine compound 13, was not found to possess significant anti-HIV activity against a primary isolate, but was found to possess moderate anti-HIV activity against a laboratory isolate, a IIIB strain (IC₅₀ = 67 μM). Anti-HIV activity was not observed however, even at concentrations of 100 μM of 13 against an 89.6 strain. The potency was approximately eight-fold lower than that of the parent compound 1 (IC₅₀ = 8 μM), indicating a partial contribution of the hydrogen atom of the amino group of the piperidine ring to the bioactivity of CD4 mimic. Although compound 15, with an *N*-isobutylpiperidine moiety, failed to show significant anti-HIV activity against laboratory isolates, relative potent activity was observed against a primary isolate, an MTA strain (IC₅₀ = 28 μM). Compounds 16 and 18, which are *N*-acylpiperidines, were tested against laboratory isolates and significant anti-HIV activity was not observed even at 100 μM . Compounds 14 and 17, with the carboxylic moieties, failed to show significant anti-HIV activity against laboratory isolates even at 100 μM , which are compatible with the FACS analysis. These results suggest that the *N*-substituent on the piperidine ring of CD4 mimic analogs may contribute to a critical interaction required for binding to gp120. Compounds 19–23 showed no significant anti-HIV activity against a IIIB strain even at 100 μM , which are compatible with the FACS analysis (data not shown).

All but one of the compounds 13–18 have no significant cytotoxicity to PM1/CCR5 cells (CC₅₀ \geq 260 μM); the exception is compound 18 (CC₅₀ = 45 μM). Compounds 13 and 15 show relatively potent anti-HIV activity without significant cytotoxicity.

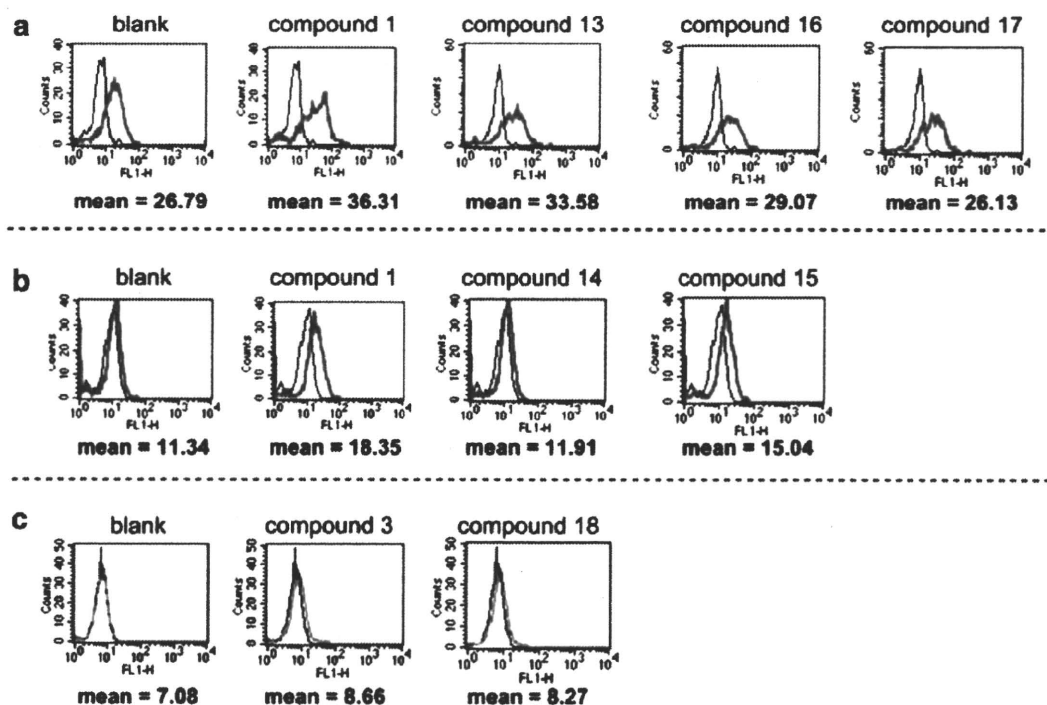


Figure 3. FACS analysis of compounds 1, 3, and 13–18. The experimental procedures are described in Figure 2. The lanes of (a), (b) and (c) show independent experiments.

Table 2
Anti-HIV activity and cytotoxicity of compounds 13–18^a

Compd	R	IC ₅₀ (μM)			CC ₅₀ (μM)
		Laboratory isolates		Primary isolates	
		IIIB (X4)	89.6 (dual)	MTA (R5)	
1		8	10	ND	150
4	H	ND	ND	ND	100
13	Me	67	>100	ND	>300
14	CH ₂ CO ₂ H	>100	ND	ND	260
15	<i>i</i> Bu	>100	ND	28	>300
16	Ac	>100	>100	ND	>300
17	C(O)CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	>100	>100	ND	>300
18	C(O) <i>i</i> Pr	>100	ND	ND	45

^a All data with standard deviation are the mean values for at least three independent experiments.

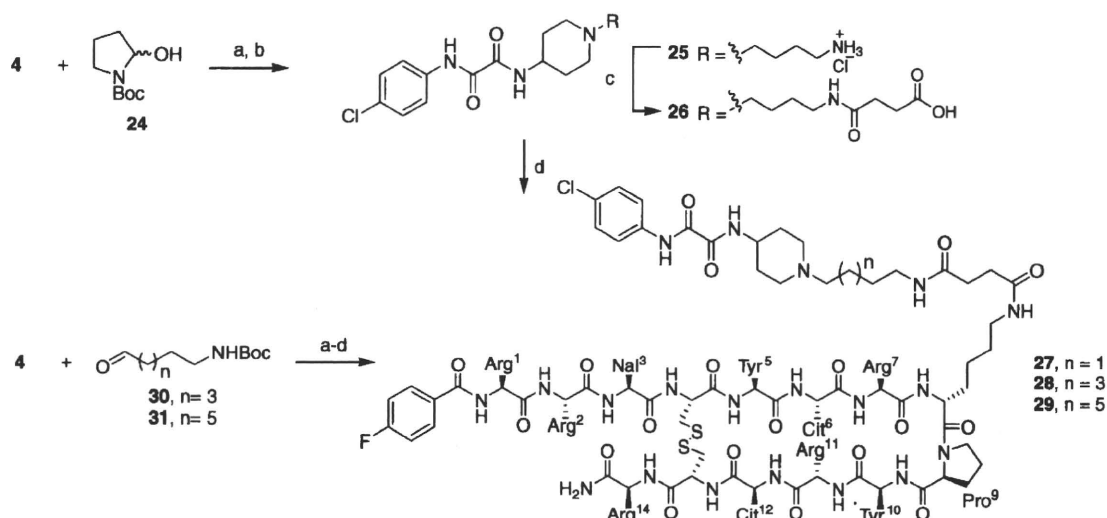
The results for **15** showed it to have 3–6 times less cytotoxicity than **4** and **18**. This observation indicates that the alkylation of the piperidine nitrogen may be favorable because it lowers the cytotoxicity of CD4 mimic analogs.

In the course of the SAR studies on CD4 mimic analogs, we have already found that a CD4 mimic or sCD4 exhibited a remarkable synergistic effect^{4e} with a 14-mer peptide CXCR4 antagonist T140.⁹ This result indicates that the interaction of CD4 mimic with gp120 could facilitate the approach of CXCR4 to gp120 by exposing the co-receptor binding site of gp120. It was thought that the CD4 mimic analogs conjugated with a selective CXCR4 antagonist might as a consequence show a higher synergistic effect for the improvement of anti-HIV activity. In this context, efforts were made to synthesize and bioevaluate hybrid molecules that combined a CD4 mimic analog with 4F-benzoyl-TZ14011, which is a derivative of T140 optimized for CXCR4 binding and stability *in vivo*.¹⁰

The synthesis of hybrid molecules **27–29** is outlined in Scheme 4. To examine the influence of the linker length on anti-HIV activity and cytotoxicity, three hybrid molecules with linkers of different

lengths were designed. Based on the fact that alkylation of the piperidine nitrogen, having no deleterious effects on bioactivity, is an acceptable modification of CD4 mimic analogs, the alkylamine moiety was incorporated into the nitrogen atom of the piperidine moiety to conjugate CD4 mimic analogs with 4F-benzoyl-TZ14011. Reductive alkylation of **4** with *N*^α-Boc-pyrrolidin-2-ol **24**, which exists in equilibrium with the corresponding aldehyde, and successive treatment with TFA and HCl/dioxane provided the amine hydrochloride **25**. Treatment of **25** with succinic anhydride under basic condition gave the corresponding acid **26**, which was subjected to condensation with the side chain of *D*-Lys⁸ of 4F-benzoyl-TZ14011 in an EDC–HOBt system to give the desired hybrid molecule **27** with a tetramethylene linker.¹¹ Other hybrid molecules **28** and **29** bearing hexa- and octamethylene linkers, respectively, were prepared using the corresponding aldehydes **30** and **31**.

The assay results for these hybrid molecules **27–29** are shown in Table 3. To investigate the effect of conjugation of two molecules on binding activity against CXCR4, the inhibitory potency against



Scheme 4. Synthesis of hybrid molecules **27–29**. Reagents and conditions: (a) NaBH(OAc)₃, AcOH, DCE; (b) TFA, then 4 M HCl/1,4-dioxane; (c) succinic anhydride, pyridine, DMF, then 4 M HCl/1,4-dioxane; (d) 4F-benzoyl-TZ14011, EDC-HCl, HOBT·H₂O, Et₃N, DMF. Nal = 1-3-(2-naphthyl)alanine, Cit = L-citrulline.

Table 3
CXCR4-binding activity, anti-HIV activity and cytotoxicity of hybrid molecules **27–29**^a

Compd	EC ₅₀ ^b (μM)	IC ₅₀ ^c (μM)	CC ₅₀ ^d (μM)	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
4F-benzoyl-TZ14011	0.0059	0.0131	ND	ND
1 (NBD-556)	ND	0.210	ND	19.2 ^e
27 (C4)	0.0044	0.0509	8.60	169
28 (C6)	0.0187	0.0365	8.00	219
29 (C8)	0.0071	0.0353	8.60	244
AZI	ND	0.0493	ND	ND

^a All data with standard deviation are the mean values for at least three independent experiments.

^b EC₅₀ values are based on the inhibition of [¹²⁵I]-SDF-1α binding to CXCR4 transfectants of CHO cells.

^c IC₅₀ values are based on the inhibition of HIV-1-induced cytopathogenicity in MT-2 cells.

^d CC₅₀ values are based on the reduction of the viability of mock-infected MT-2 cells.

^e This value is based on the CC₅₀ and IC₅₀ values from Table 1.

binding of [¹²⁵I]-SDF-1α to CXCR4 was measured. All the hybrid molecules **27–29** significantly inhibited the SDF-1α binding to CXCR4. The corresponding EC₅₀ values are: EC₅₀(**27**) = 0.0044 μM; EC₅₀(**28**) = 0.0187 μM; EC₅₀(**29**) = 0.0071 μM. These potencies are comparable to that of 4F-benzoyl-TZ14011 (EC₅₀ = 0.0059 μM), indicating that introduction of the CD4 mimic analog into the D-Lys⁸ residue of 4F-benzoyl-TZ14011 does not affect binding activity against CXCR4. Comparison of the binding activities of **27–29** showed that all hybrid molecules were essentially equipotent in inhibition of the binding of SDF-1α to CXCR4. This observation indicates that the linker length between two molecules has no effect on the binding inhibition.

Anti-HIV activity based on the inhibition of HIV-1 entry into the target cells was examined by the MTT assay using a IIB(X4) strain. In this assay, the IC₅₀ value of 4F-benzoyl-TZ14011 was 0.0131 μM. All hybrid molecules **27–29** showed significant anti-HIV activity [IC₅₀(**27**) = 0.0509 μM; IC₅₀(**28**) = 0.0365 μM; IC₅₀(**29**) = 0.0353 μM]; however, the potency was 2- to 4-fold lower than that of the parent compound 4F-benzoyl-TZ14011, indicating that the conjugation of CD4 mimic with a CXCR4 antagonist did not provide a significant synergistic effect. In view of the fact that the combinational uses of CD4 mimic with T140 produced a highly remarkable

synergistic effect, the lower potency of hybrid molecules may be attributed to the inadequacy in the structure and/or the characters of the linkers. All the hybrid molecules **27–29** have relatively strong cytotoxicity [CC₅₀(**27**) = 8.6 μM; CC₅₀(**28**) = 8.0 μM; CC₅₀(**29**) = 8.6 μM]. However, selectivity indexes (SI = CC₅₀/IC₅₀) were 169 for **27**, 219 for **28**, and 244 for **29**, all 9–13 times higher than that of **1** (SI = 9.2). This result indicates that conjugation of a CD4 mimic analog with a selective CXCR4 antagonist can improve the SI of CD4 mimic.

The SAR study of a series of CD4 mimic analogs was conducted to investigate the contribution of the piperidine moiety of **1** to anti-HIV activity, cytotoxicity, and CD4 mimicry on conformational changes of gp120. The results indicate that (i) the methyl groups on the piperidine ring of **1** have no great influence on the activities of CD4 mimic; (ii) the presence of piperidine moiety is important for the CD4 mimicry; and (iii) N-substituents of the piperidine moiety contribute significantly to anti-HIV activity and cytotoxicity, as observed with N-alkyl groups such as methyl and isobutyl groups which show moderate anti-HIV activity and lower cytotoxicity.

Several hybrid molecules based on conjugation of a CD4 mimic with a selective CXCR4 antagonist were also synthesized and bio-evaluated. All the hybrid molecules showed significant binding activity against CXCR4 comparable to the parent antagonist and exhibited potent anti-HIV activity. Although no significant synergistic effect was observed, conjugation of a CD4 mimic with a selective CXCR4 antagonist might lead to the development of novel type of CD4 mimic-based HIV-1 entry inhibitors, which possess higher selective indexes than a simple CD4 mimic. These results will be useful for the rational design and synthesis of a new type of HIV-1 entry inhibitors. Further structural modification studies of CD4 mimic are the subject of an ongoing project.

Acknowledgements

This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, Japan Human Science Foundation, and Health and Labour Sciences Research Grants from Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare. T.T. and N.O. are grateful for the JSPS Research Fellowships for Young Scientist.