

201108015A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の立体構造変化
誘導剤 (NBD誘導体) の臨床応用に向けた基礎研究

平成23年度総括・分担研究報告書

研究代表者 松下修三

平成24年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の立体構造変化誘導剤 (NBD 誘導体) の
臨床応用に向けた基礎研究 ----- 1
松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)

II. 分担研究報告

1. NBD 誘導体と中和抗体併用の最適化の研究、中和抗体の作成 ----- 15
松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)
2. NBD559 及び NBD 誘導体の作成、NBD 誘導体の最適化の研究 ----- 19
玉村啓和 (東京医科歯科大学 教授)
3. NBD 誘導体の効果の動物モデルを用いた研究 ----- 30
五十嵐樹彦 (京都大学ウイルス研究所 教授)
4. NBD 誘導体の活性測定、NBD 誘導体の最適化の研究 ----- 34
吉村和久 (熊本大学・エイズ学研究センター 准教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 43

総括研究報告書

HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の立体構造変化誘導剤 (NBD 誘導体) の臨床応用に向けた基礎研究

研究代表者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター・教授

研究要旨

HIV-1 感染細胞や潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められている。我々は、HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の CD4 結合部位に作用して Env 三量体構造を変化させ、中和抗体活性を増強する低分子化合物 NBD-556 を同定し、その低毒性誘導体である YYA-021 について臨床分離株に対する有効性を検討した。YYA-021 は機能的 Env 三量体及び gp120 単量体について NBD-556 と同等の構造変化誘導能を示した (玉村、吉村、松下)。Subtype B 及び C 標準パネルウイルス (SVPB, SVPC) などを用いて、YYA-021 の効果を調べたところ、中和増強効果 (2X 以上) はサブタイプ B ウイルスの 50~30% であること、非サブタイプ B ウイルス では 28% と考えられた (松下)。NBD-556、YYA-021 誘導体を用いて構造活性相関研究を行い、それら化合物について抗 HIV 活性、細胞毒性、そして gp120 の構造変化誘起能について評価した。その結果、ピペリジン部位の窒素原子近傍の修飾や芳香環の置換基の変換が抗 HIV 活性、細胞毒性および gp120 の構造変化に影響を与えることを見出した。(玉村、吉村)。新規化合物を用いて *in vitro* 耐性誘導を行い、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を調べた。得られた耐性変異は、i) V255M 単独変異を持つグループ、ii) V255M+T375I を中心とした複数の変異を持つグループ、そして、iii) CD4 cavity の入り口付近に変異を持つグループの 3 つに分類できることが分かった (玉村、吉村、松下)。相同組換え法により新規 SHIV (SHIV-MNA) を作製した。SHIV-MNA は、抗 HIV-1 Env V3 抗体 KD-247 に対する中和感受性が NBD 誘導体存在下で上昇する HIV-1 MNA 株の Env を持ち、親株と同様の中和プロファイルを示した。(五十嵐、松下)。また、非ヒト霊長類を用いた POC 試験に向け、YYA-021 のラットおよびサルを用いた YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析を行った。YYA-021 の非ヒト霊長類における安全性を dose escalation により検討したところ、12.5 mg/kg で PR 延長を伴う除脈による急性左心不全が疑われる副作用を観察した。この投与量の 1/5-1/10 量が最大許容投与量と考えられた (五十嵐)。これらの知見をもとに、より立体構造変化誘導能に優れた臨床応用に最適な小分子の探索を継続するとともに、霊長類における POC 試験を開始する予定である。

分担研究者

玉村啓和 東京医科歯科大学
創薬化学・生体材料工学研究所 教授
五十嵐樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授
吉村和久 熊本大学エイズ学研究センター
准教授

つようになった。これらの合併症 (comorbidity) の出現を阻止するためには、HIV の生活環の阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞や潜伏感染を標的とする新規治療薬の開発が必要である。

我々は、中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の CD4 結合部位に作用して Env 三量体構造を変化させ、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、N-(4-Chlorophenyl)-N'-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556) を同定した (創薬基盤推進、岩本班)。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 (Kwong P. D., et al., Nature,

A. 研究目的

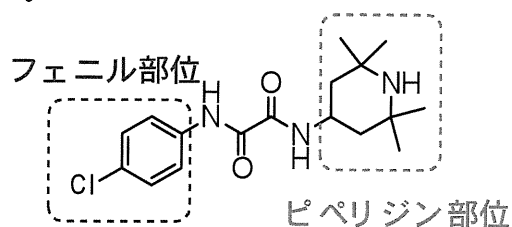
優れた臨床効果を持つ抗ウイルス療法の開発により、HIV-1 感染症の長期間にわたる発症阻止が可能となった。しかし、残存する感染細胞の排除は困難なため、治療薬の慢性毒性が問題となっている。さらに残存するウイルスやウイルス蛋白による慢性炎症が引き起こす「老化」の促進のため、心血管病やこれまで AIDS と関係ないと考えられてきた癌や肝臓病などによる「早期死亡」が目立

420:678-682, 2002)。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和エピー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。NBD-556 は Env と CD4 分子の相互作用を阻害するため、侵入阻害剤候補として開発されたが (Zhao Q, et al., *Virology*, 339:213-25, 2005)、有効濃度と細胞毒性の差が小さいため臨床開発は行われてこなかった。本研究班は、多くの誘導体を探索し、より有効な NBD 誘導体を作成することと、このような新しい治療戦略が *in vivo* でも有効かどうか、動物モデルで検証することを目的とする。

B. 研究方法

1) NBD 誘導体のピペリジン部位の構造活性相関

CD4 と gp120 の相互作用において、特に重要な働きをしているとされているのが 43 残基目のフェニルアラニン及び 59 残基目のアルギニンである。低分子化合物 NBD-556 はこの 2 つの重要なアミノ酸と類似した部位を有し、CD4 と gp120 との相互作用を阻害する HIV-1 侵入阻害剤である。また、本化合物は 1) F43Cavity 内のアミノ酸と相互作用し、2) コレセプターとの相互作用に必須である gp120 の構造変化を誘起することから低分子型 CD4 ミミックとしても期待されている (図 1)。本化合物は、構造上、フェニル部位、オキサアミド部位、ピペリジン部位の 3 つの部位に分類することが可能である。これまでの研究により、フェニル部位、オキサアミド部位の F43cavity 内における各アミノ酸との相互作用は明らかにされつつあるが、ピペリジン部位に関する研究は少ない。そこで、ピペリジン部位に種々の置換基を導入し、構造活性相関研究を行った。



gp120 Phe43-cavity
に入り込む

図 1 NBD-556 のピペリジン部位とフェニル部位

合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を PM1/CCR5 細胞を用いて WST assay で評価した。また、CD4i 抗体を用いて、NBD 誘導体で処理した JR-FL 慢性感染 PM1 細胞表面にお

ける gp120 の構造変化誘起能を評価した。また、細胞毒性を WST assay で調べた。また、NBD-556 と HAR-171 をマルチラウンドアッセイにより、抗 HIV 活性の比較を行った。(玉村、吉村、松下)。

2) NBD 誘導体のフェニル部位の構造活性相関
パラ位の置換基を塩素原子、および比較的良好な結果を与えたメチル基に固定して、メタ位の置換基について検討を行った。2 個のシクロヘキシル環を有する誘導体も合成し生物活性について評価した (玉村)。

3) HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシュミレーション
Phe43-cavity と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシュミレーションの比較を行った。NBD-556 および HAR-171 の構造は SYBYL 7.1 (Tripos, St. Louis) で構築し、力場 MMFF94 と部分荷電でエネルギー最小化した。SYBYL module/FlexSIS を使用し、gp120 の結晶構造 (PDB: 1RZJ) に対して、ドッキングシュミレーションを行った (玉村)。

4) YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析

YYA-021 のラットにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。生理食塩水に溶解した 2.5 mg/mL YYA-021 1ml を (投与量 2.5 mg) 投与後、数分、数時間後に少量 500 μ L (血液量 約 11 mL/体重 180 g) 採血し、YYA-021 の血中濃度を測定した。また、サルにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。15 mL および 30 mL (70.6 mg in 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaCl}$ pH 7.4 のうち 15 mL および 30 mL を投与) YYA-021 溶液投与後 (投与量: 35.3 mg および 70.6 mg) 数分、数時間後に採血 3.0 mL (体重: 5.32 kg) し、YYA-021 の血中濃度を測定した。(玉村)

5) 既存 SHIV の中和感受性および NBD 誘導体存在下における感受性増強効果

HIV-1 89.6 株 (クレード B) 由来の Env を持つ SHIV-KS661 株の、中和抗体 KD-247 に対する感受性を TZM-bl 細胞を用いた中和試験で評価した。さらに、YYA-021 存在下における中和感受性の増強効果を評価した。

6) 新規 SHIV-MNA15 株の作出および性状の解析

KD-247 に低感受性であるものの、YYA-021 存在下で中和感受性が顕著に上昇する事が知られている HIV-1 MNA 株の env gp120 を含む遺伝子領域を PCR 増幅し、その断片を SHIV-KS661 の相当領域を含まない遺伝子断片と共にヒトリンパ球系細胞 C8166-CCR5 に遺伝

子導入し、感染性ウイルス粒子を産生させた。ウイルス液調製後、ゲノム RNA を抽出し、cDNA に逆転写して塩基配列を決定した。このウイルスの KD-247 に対する感受性および YYA-021 存在下における中和感受性増強を評価した。さらに、SHIV-MNA のアカゲザル末梢血単核細胞における複製能を SIV239 と比較した。

7) YYA-021 のサルにおける安全性評価

サルを用いた proof of concept 実験に向けて、YYA-021 のアカゲザルにおける急性毒性を評価した。

i) 2.5 mg/kg の YYA-021 を筋肉内投与し、経時的に採血、臨床状態を観察した。

ii) 2.5 mg/kg の YYA-021 を静脈内投与し、経時的に採血、臨床状態を観察した。

その後、iii) 6.25 mg/kg、iv) 12.5 mg/kg に静脈内投与量を上げ、経時的採血、臨床状態の観察を行った。

(五十嵐)

8) POC 試験に用いる YYA-021 の交差反応性の(倫理面への配慮)

すでに分離されたウイルスや NIAID より供与された臨床分離株、作製済みの中和抗体などを用いた研究には倫理的な問題は生じない。臨床検体を用いた中和抗体の研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会にて承認されている(松下、吉村)。動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた(玉村)。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。京都大学ウイルス研究所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(五十嵐)。

C. 研究結果

エンベロップ蛋白(Env)三量体の立体構造を変化させる小分子の同定(NBD 誘導体)から始まった本研究班には二つの柱がある。一つは低濃度で、広範囲のウイルスに有効な新規 NBD 誘導体の探索であり、もう一つは、in vivo 投与のための SHIV モデルの最適化にむけた基礎的研究(in vitro)及

関する研究

YYA-021 の機能的 Env 三量体に対する結合活性の測定は、HIV-1 感染細胞またはエンベロップ導入細胞を用いて FACS 解析により行った。また、gp120 単量体に対する単クローン抗体の反応性の増強に関しては、抗 gp120-C5 抗体を用いた gp120-capture ELISA で調べた。抗体サンプルは、我々が開発した抗体パネル及び米国で臨床試験中の抗 V3 中和抗体 KD-247 を用い、YYA-021 との相乗効果の検討をおこなった。ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP) が供給するサブタイプ B 及び C の臨床ウイルス由来のエンベロップパネル(Standard virus panel of subtype B; SVPB, Standard virus panel of subtype C; SVPC)、さらに ARRRP より供与されたを用いたサブタイプ A および AE の envelope construct を用いて pseudovirus panel を作成した(松下)。

び最適化された霊長類モデルでの POC 試験である。昨年度までの NBD 誘導体の基本的性質の研究に引き続き、本年度は研究の第 2 段階として、POC 試験に用いる NBD 誘導体 YYA-021 の特徴に関する詳細な研究、さらにその問題点を踏まえた新規誘導体の開発、NBD 誘導体の効果の動物モデル(in vivo)での POC 試験のための予備的実験(急性毒性試験、血中濃度測定)及び感染実験に使用する SHIV の特定に基づいた POC 試験の具体的な計画などを行った。

臨床分離株に対する NBD-556 と YYA-021 の抗ウイルス効果の比較

異なるサブタイプのウイルスを含む広範囲の臨床分離株に対する NBD-556 と YYA-021 の抗ウイルス効果を比較するために、米国 NIAID が供給するサブタイプ B 及び C の標準パネルウイルス(SVPB または SVPC) に対する NBD-556 または YYA-021 の抗ウイルス効果を TZM-bl 細胞を用いた Pseudovirus neutralization assay を用いて検討した。pseudovirus panel を用いて IC₅₀ を算出した。昨年までの研究で、PM1/CCR5 細胞を標的とした場合、NBD-556 の CC₅₀ は 110 μM、YYA-021 では 210 μM であったことから、IC₅₀ がこれ以下の濃度の場合を有効と考え、サブタイプ B パネルでは 12/12、C パネルでは 7/12 であった。一方、IC₅₀ が CC₅₀ の 1/2 以下であったのは、サブタイプ B パネルでは 9/12、C パネルでは 5/12 であった。これらの観察は、昨年までの観察と同様に抗ウイルス活性と 3 量体の立体構造変化誘導能及び中和抗体活性増強能が必ずしも同

じではないことを示す(松下)。

SVPB 及び SBPC パネルウイルスに対する YYA-021 (10 μ M)の中和増強効果

我々は昨年度までに3種類の抗V3抗体(0.5 γ , KD-247 および 717G2b)、3種類のCD4bs抗体(0.5 δ , 49G2 および 82D5)、2種類のCD4i MAbs (4E9C および 4C11)にてYYA-021による中和の増強効果を検討した。本年度はこれに加えて、サブタイプを超えて交差反応性を示すCD4i MAbsである916B2、917B11を加えて検討した。YYA-021による中和活性の増強は12種類のSVPB中0.5 γ に関しては9種類、KD-247に関しては5種類、717G2に関しては6種類に観察された。一方、CD4i抗体に関しては4E9C 5種類、4C11については1種類のみ、916B2では2種類、917B11では4種類に増強がみられた。CD4bs抗体についてはYYA-021による中和増強は認められなかった。一方、12種類のSVPCと2種類のCRF01_AEウイルスのうち、YYA-021による中和活性の増強が認められたのは、916B2では1種類、917B11では2種類であった(吉村、松下)。

新規NBD誘導体の開発とin vitro耐性誘導によるEnvにおける作用部位の同定

昨年度までに行ったin vitro耐性誘導の結果、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。そこで、本年度我々は、新規に合成された数十個のNBD誘導体から、立体構造変化を惹起する11個の誘導体を選んで、sCD4とともに、in vitro耐性誘導実験を行った。今回は、よりin vivoに近いウイルスを使用する目的で、臨床分離R5ウイルス株(Y1)を用いて行った。すべての化合物を5-9回パッセージし、最終濃度が20-100 μ M(CD4は5 μ g/ml)に到達するまで継代した。その結果、今回試した全ての化合物に対する耐性ウイルスを得ることができた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、すべてのNBD誘導体に対して交差耐性を示した。最終パッセージのウイルスのgp120のシークエンスを比較したところ、大きく3つに分類できることが分かった。それらは、i)V255M単独変異を持つグループ、ii)V255M+T375Iを中心とした複数の変異を持つグループ、そして、iii)CD4 cavityの入り口付近に変異を持つグループであった(吉村、松下)。

低分子化合物 NBD 誘導体のピペリジン部位の構造活性相関

NBD-556 と HAR-171 をマルチラウンドアッセイにより、抗 HIV 活性の比較を行った。シングルラウンドアッセイでは 0.61 μ M、0.68 μ M とほぼ同程度であった抗 HIV 活性が、マルチラウンドアッセイでは HAR-171 の方が 1.6 倍も向上するという結果になった。

まず、芳香環のパラ位を塩素原子に固定して、メタ位にフッ素、塩素、メチル基を導入した化合物群においては、Sodolowski らによって報告されたメタ位にフッ素原子を有する JRC-II-191 という化合物が非常に高い抗 HIV 活性を示し、また構造変化誘起能においても元のリード化合物より優れていることが明らかとなった。続いて、パラ位にメチル基を有し、メタ位にフッ素、塩素、臭素を導入した化合物群においても、フッ素置換体が顕著な抗 HIV 活性、構造変化誘起能を有していることがわかった。さらに、2個のシクロヘキシル環を有する誘導体について、パラ位に塩素原子を有する化合物群では、先と同様にフッ素置換体において、強い抗 HIV 活性を有することが明らかになり、さらに構造変化誘起能についてもさらに優れていることが明らかになった。続いて、パラ位にメチル基を有する化合物群においても、フッ素置換体が顕著な抗 HIV 活性、構造変化誘起能を有していることがわかった(玉村、吉村)。

HIV-1 gp120 (Phe43-cavity)と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシミュレーション

Phe43-cavity と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシミュレーションの比較を行った。NBD-556 はピペリジンの窒素原子と Asp368 が静電相互作用しており、HAR-171 はピペリジン側鎖のシクロヘキシル基と Val430 が疎水性相互作用していることが示唆された(図2)。これより、ピペリジン部位の構造により、相互作用するアミノ酸および化合物のドッキング様式が異なり、化合物の生理活性に影響を与えることが示唆された(玉村)。

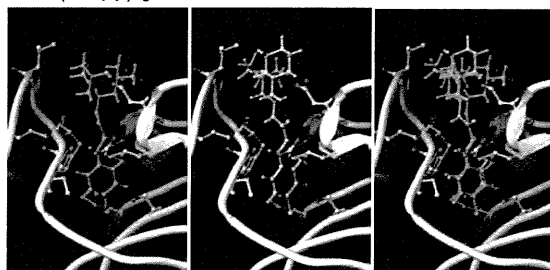


図 2 HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) と NBD-556(左)および HAR-171(中)のドッキングシミュレーション。右図は NBD-556 と HAR-171 の両方の重ね合わせ

YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析

YYA-021 のラットにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。生理食塩水に溶解した YYA-021 (投与量 2.5 mg) 投与群において、HPLC で検出した YYA-021 の最高濃度は約 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (15 min 後) であった (図 3)。投与した YYA-021 が 100% 血中に循環していると仮定すると (YYA-021 含有量: 約 11.4 μg , 濃度: 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、17.8 分後には血中濃度が半分になっていると考えられる。また、サルにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。YYA-021 (投与量: 35.3 mg) 群、70.6 mg 投与群について、現在解析中である (五十嵐、玉村)。

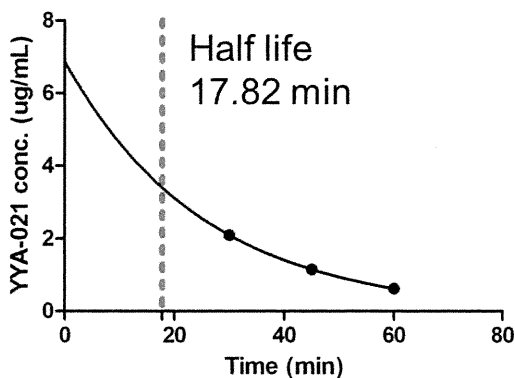


図 3 ラットにおける YYA-021 半減期の算出 (静脈投与)

既存 SHIV の中和感受性および NBD 誘導体存在下における感受性増強効果

SHIV-KS661 株の、中和抗体 KD-247 に対する感受性を TZM-bl 細胞を用いた中和試験によって評価したところ、 IC_{50} が 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であったことから、国際標準株との比較により Tier1B 相当であることが明らかとなった。さらに、YYA-021 存在下において KD-247 に対する中和感受性の増強効果が観察された (五十嵐)。

新規 SHIV-MNA 株の作出および性状の解析

HIV-1 MNA 株の env gp120 を含む遺伝子領域を PCR 増幅した断片を SHIV-KS661 の相当領域と入れ替えたウイルスを相同組換え法を用いて作製した。ウイルスの塩基配列を決定し、このウイルスが HIV-1 MNA 株の env gp120 を含むことを確認した。このウイルス SHIV-MNA の KD-247 に対する感受性および YYA-021 存在下における中和感受性増強効果を評価したところ、親株と同様に KD-247 に対して低感受性 (Tier2,3 相当) であるものの、YYA-021 存在下で中和感受性が顕著に上昇することを確認した。さらに、

SHIV-MNA のアカゲザル末梢血単核細胞における複製能を調べたところ SIV239 と同様に効率よく複製した (五十嵐)。

YYA-021 のサルにおける安全性評価

i) はじめに比較的少量 (2.5 mg/kg) の YYA-021 を筋肉内に投与し、極端な副反応が起こりうるか検討した。カニクイザルにおける全血液量は体重の約 8% と見積もられている (Noor et al. Primates, 22:281, 1981) ので、これをアカゲザルに適用し、全ての薬剤が排泄・拡散せず血中に留まると仮定した場合の最大血中濃度は 96 μM と見積もられる。これは試験管内において YYA-021 が KD-247 と相乗的にウイルス中和をする際に必要な 20 μM を理論的に上回る値である。投薬後、サルに特記すべき臨床状態の変化はなかったため、当初計画通り、投与 0.5、1、2、4、12 および 24 時間後に採血し、血漿を分離し冷凍保存した。更に、投与 48 時間後に採血し血清を分離、投与前に調製、凍結保存した血清と合わせて血清生化学検査を依頼した。

ii) 筋肉内投与で目立った副作用がなかったため、同量を静脈内投与した。やはり特記すべき臨床状態の変化はなかったため、当初計画通り採血を行った。

iii) 6.25 mg/kg 静脈内投与 (最大血中濃度理論値: 236 μM) において、投与終了直後に軽度の瞳孔散大、チアノーゼ、軽度の徐脈が認められたが短時間で回復したため、当初計画通り採血を行った。この実験では 30 分間で緩徐に静脈内投与を行ったため、投与中の覚醒を防ぐため通常の 2 倍量の追加麻酔を投与直前に行った事による深麻酔が投与直後に観察された異状の原因の可能性があった。

iv) そこで、12.5 mg/kg 静脈内投与 (最大血中濃度理論値: 460 μM) においては追加麻酔量を通常量に戻す代わりに所要時間を 30 分から 20 分に短縮して投与した。YYA-021 投与開始 6 分後より心拍数の低下 (85-69 bpm) および瞳孔の散大が認められた。心拍数は更に低下を続け 50 bpm 近くまで低下したため、投与終了 9 分後にドブタミンを 0.32 mg 静脈内投与した。投与終了 0.5、1、2 および 4 時間後に採血したが、4 時間後採血の際に麻酔時にサルがふらついており、恰も麻酔から覚醒していないかの様に観察された。投与終了 12 時間後に観察をした所、ふらつき、顔面蒼白、若干の脱水を認めたため、麻酔・採血を割愛した。その後、投与 24 時間後にかけて状態は回復したため、24 および 48 時間後に採血した。

iv) の実験で経時的に記録した心電図を解析した所、1.投与後の徐脈、2.右軸偏位、PR 波の若干

の延長が認められ、投与により急性左心不全が起こった可能性が示唆された。

投与前後に採取した血清の生化学的検査から、i)ではASTおよびALTが、ii)、iii)およびiv)ではALTがそれぞれ投与48時間後に約2倍に上昇した。アカゲザルにおける正常値をやや上回る検査値異常であったが、一過性の上昇であった。現在、血中薬物濃度について検討中である(五十嵐、玉村)。

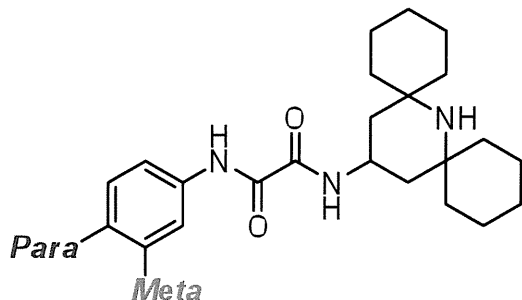


図4 NBD化合物のピペリジン部位、およびフェニル部位の置換

D. 考察

現在、POC試験に用いるリード化合物と考えているYYA-021はprimary isolatesでもEnv三量体の内部に隠されている中和エピトープを外部に露出させ中和抗体感受性に変えることが観察された。特に、サブタイプBウイルスに関して交差中和活性を持つ0.5 μ gに関しては12種類のパネルウイルスのうち9種類に関して中和増強効果を認めた。また、もともと中和能が弱いかほとんど認められないCD4i抗体について5種類のウイルスで中和活性増強がみられている。一方、非サブタイプBに交差反応するCD4i抗体である916B2、917B11を用いて、検討すると15種類のパネルウイルスのうち3種類に関して中和増強効果を認めた。YYA-021の非サブタイプBウイルスに対する効果はより効果的な抗体を用いた分析が必要と考えられる。

YYA-021はNBD-556に比較して、抗ウイルス活性は1/2~1/4と劣るが、中和エピトープの露出という意味ではほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性は約1/2である。この意味で中和抗体を用いたPOC試験に適した小分子であると考えられるが、臨床応用に向けての課題も明らかとなった。すなわち、これらの解析から中和増強効果(2X以上)はサブタイプBウイルスの50~30%であること、非サブタイプBウイルスでは28%と考えられること、また、細胞毒性は低いものの、10-20 μ Mの高濃度を要することである。これらから、臨床応用に最適な小分子の探索は継続されるべき課題であると考えられる。

YYA-021、NBD誘導体のピペリジン部位、お

よびフェニル部位の構造活性相関を抗ウイルス活性、Env立体構造変化誘導作用、耐性誘導などを用いて行った。ピペリジン環にテトラメチル基(上)、ジシクロヘキシル基(下)、どちらを有する誘導体でも、meta-F基(para-CH₃, para-Clのいずれでも)のものが高活性を示した(図4)。さらにPhe43-cavityとNBD-556およびHAR-171のドッキングシュミレーションの比較において、NBD-556はピペリジンの窒素原子とcavityのAsp368が静電的相互作用しており、HAR-171はピペリジン側鎖のシクロヘキシル基とVal430が疎水性相互作用していることが示唆された。これより、ピペリジン部位の構造により、相互作用するアミノ酸および化合物のドッキング様式が異なり、化合物の生物活性に影響を与えることが示唆された。これらの情報からさらなる有用なCD4 mimic誘導体を創製が可能であると考えられる。

一方、非ヒト霊長類モデルでのPOC試験に向けたSHIVモデルの最適化とin vivo投与のための基礎的研究(in vitro)も推進することができた。ラットを用いてYYA-021の急性毒性試験、血中濃度測定および薬物動態解析を行い、POC試験に向けて有用な知見を得た。既存のSHIV/アカゲザルモデルとして使用されているSHIV-KS661は、Tier1B相当の中和感受性ウイルスであるが、YYA-021存在下でさらに中和感受性が増強されることから、SHIV-KS661を用いてサル個体におけるYYA-021による治療効果の評価を行うことは可能である。今年度新規に作製したSHIV-MNAは、臨床分離株由来でTier2,3相当の中和抵抗性ウイルスであることから、SHIV-MNAがサル個体で効率よく複製すれば、中和抵抗性の臨床分離株においてウイルスタンパクの構造変化の誘導による中和抗体に基づく新規治療戦略の前臨床試験がサルで可能になる。

YYA-021は静脈内投与した場合、12.5 mg/kgの量で急性左心不全を疑わせる副作用が観察された。この半量では心電図異常は見られず、POC試験に用いる投与量としてはこの6.25 mg/kg以下の量が適切と考えられる。安全性を担保する観点からは、1/10-1/5量にすべきであるが、血中濃度のデータに依存するところである。血中濃度がトラフ値で20 μ Mを超えるような投与量および間隔を見いだす事でPOC試験の投与量の最終判断が可能となる。

E. 結論

YYA-021はNBD-556に比較して、抗ウイルス活性は1/2~1/4と劣るが、中和エピトープの露出という意味ではほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性

は約 1/2 である。YYA-021 はまた、多くの primary isolates で中和エピトープを露出させ、中和抗体感受性に変えることができる。この意味で中和抗体を用いた POC 試験に適した小分子であると考えられる。POC 試験に用いることが可能な YYA-021 の投与量に関しては、サルモデルでの血中濃度のデータの解析に待つところが大きい。理論値からは、安全に投与できる量は target dose である 20 μ M を十分越えていると考えられる。また、既存の SHIV/アカゲザルモデルとして使用されている SHIV-KS661 を POC 試験に用いることができることが分かり、第一段階の POC 試験の計画はほぼ整ったと言える。次年度はできるだけ早く POC 試験を開始する予定である。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ない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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., Yoshimura, K., Kodama, E., Miyamoto, F., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. Acquisition of resistance to HIV-1 entry inhibitors in vitro and in vivo. *J AIDS & Clinical Research*, in press, 2012.
- 2) Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Nomura, W., Matsushita, S., Tamamura, H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 19:6735-6742, 2011.
- 3) Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Satoshi Kimura S, Oka S and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group. Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine *Intern Med* 50: 699-705, 2011
- 4) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H. Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry*, in press
- 5) 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. *薬学雑誌* (日本薬学会)、131(1)巻 頁69~78、2012年
- 6) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*, 7: 205- 208, 2012.
- 7) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 1468-1474, 2012.
- 8) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19 : 6735-6742, 2011.
- 9) 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* 12: 535- 539, 2011.
- 10) Ohashi N, Wataru 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.
- 11) Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence in a Leucine Zipper Assembly. *ChemBioChem* 12: 691- 694, 2011.
- 12) 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* 6: 834– 839, 2011.
- 13) Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, Tamamura H. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem* 22: 923-930, 2011.
- 14) Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Tamamura H. The Success and Failures of HIV Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discovery* 6: 1067-1090, 2011.
- 15) 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* 59: 997-1007, 2011.
- 16) Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, He M, Suzuki T, Fujino N, Kunishima H, Hatta M, Nishimaki K, Aoyagi T, Tokuda K, Kitagawa M, Yano H, Tamamura H, Fujii N, Kaku M. The Increase in Surface CXCR4 Expression on Lung Extravascular Neutrophils and its Effects on Neutrophils During Endotoxin-Induced Lung Injury. *Cell Mol Immunol* 8: 305-314, 2011.
- 17) Morita, D., Igarashi, T., Horiike, M., Mori, N., and Sugita, M. T cells monitor N-myristoylation of the nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. *J. Immunol.* 187:608-12, 2011.
- 18) Takahara, Y., Matsuoka, S., Kuwano, T., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Nakasone, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408:615-9, 2011.
- 19) Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T., and Igarashi, T. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-infected rhesus macaque by phage display. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27(5): 487-500, 2011.
- 20) Nishimura, Y., Shingai, M., Lee, W. R., Sadjadpour, R., Donau, O. K., Willey, R., Brenchley, J. M., Iyengar, R., Buckler-White, A., Igarashi, T., and Martin, M. A. Recombination Mediated Changes in Coreceptor Usage Confers an Augmented Pathogenic Phenotype in a Non-human Primate Model of HIV-1 Induced AIDS. *J. Virol.* 85:10617-26, 2011.
- 21) Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T., and Matsuoka, S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* 55:768-773, 2011.
- 22) Horiike, M., Iwami, S., Kodama, M., Sato, A., Watanabe, Y., Yasui, M., Ishida, Y., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi T. Lymph nodes harbor viral reservoirs 1 that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology.* 423:107-18, 2012.

著書

- 1) Masuda A, Nomura, W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 130-131, 2011.*
- 2) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide*

- Symposium, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 132-133, 2011.
- 3) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 134-135, 2011.
 - 4) 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. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 40, 2011.
 - 5) 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. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 220, 2011.
 - 6) Narumi T, Bode JW. α , α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 178, 2011.
 - 7) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 103, 2011.
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otaka A. Design and Synthesis of Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
 - 2) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25 -30, 2011.
 - 3) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K , Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25- 30, 2011.
 - 4) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
 - 5) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Yamamoto N, Chiba J, Tanaka T, Murakami T, Tamamura H. Identification of Anti-HIV Peptides Derived from Matrix Proteins. ACS Meeting Fall201, Denver, Colorado, USA, Aug 28 -Sep 1, 2011.
 - 6) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. HIV-1 Co-Receptor CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton

- Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
- 7) Nomura W, Ohashi N, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Synthesis of C1b Domains of Protein Kinase C Having Solvatochromism and their Application to Bio-sensing. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
 - 8) Urabe A, Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Sequence-Specific Recombination Enabled by a Pair of Zinc Finger Recombinases. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
 - 9) Narumi T, Arai H, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Study of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the Dynamic Supramolecular Mechanism of HIV Entry and Their Hybrid Molecules with a CXCR4 Antagonist. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
 - 10) Arai H, Narumi T, Yoshimura K, Harada S, Aikawa H, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of CD4 Mimics Targeting the Interaction with Asp368 and Val430 in Gp120. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
 - 11) Matsushita S, Ramirez K, Maruta Y, Harada S, Yamada Y, Tamamura H, Kuwata T, Yoshimura K. Cross-Subtype Reactivity and Neutralization Activity of a Panel of Human Monoclonal Antibodies Obtained from a Single Donor. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
 - 12) Narumi T, Seike S, Tamamura H. Synthetic Studies on (*Z*) and (*E*)-Chloroalkene Skeltons As Amide Bond Equivalents. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 13) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Studies of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the HIV Entry Mechanism. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 14) Narumi T, Shishido M, Tamamura H. *N*-(Benzoyloxy)sulfonamides-Mediated Aziridination of α , β -Unsaturated Enones. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 15) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Development of Artificial Recombinases for Genome Editing. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 16) Nomura W, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic Antigens for Induction of Structure-Specific Antibodies against Trimer-Form of gp41. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 17) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 18) Narumi T, Nomura W, Tamamura H. Several HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion, Integrase and Matrix. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 19) Narumi T, Kambe C, Nomura W, Tamamura H. Development of Photochemically Removable Protecting Groups in Hydrophilic Environments: Synthesis and Photochemical Property of 8-Azacoumarins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 20) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otaka A. Application of Stimulus-responsive Amino Acid to

- Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 21) 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. シンポジウム「新しい抗感染症剤研究の最前線 - 発見、ケミカルバイオロジーそして創薬へ -」. 日本薬学会第131年会 (中止). 静岡, 2011年3月28-31日.
 - 22) 鳴海哲夫, 新井啓之, 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ミミックの創製研究. 日本薬学会第131年会 (中止). 静岡, 2011年3月28-31日.
 - 23) 鳴海哲夫, 玉村啓和. イミダゾリウム塩の構造最適化を指向した構造活性相関研究. 日本薬学会第131年会 (中止). 静岡, 2011年3月28-31日.
 - 24) 森 あつみ, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 増田朱美, 玉村啓和. 新規タグ・プローブシステムの細胞内タンパク質イメージングへの応用. 日本薬学会第131年会 (中止). 静岡, 2011年3月28-31日.
 - 25) 野村 渉, 卜部亜里沙, 近藤麻美, 増田朱美, 鳴海哲夫, 梁 明秀, 玉村啓和. ジンクフィンガーヌクレアーゼによるEBウイルス複製阻害効果の検討. 日本薬学会第131年会 (中止). 静岡, 2011年3月28-31日.
 - 26) 鳴海哲夫, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 田中智博, 野村 渉, 新井啓之, 尾崎太郎, 大橋南美, 松下修三, 玉村啓和. 新規HIV侵入阻害剤の創製研究: 低分子型CD4ミミック-CXCR4アンタゴニストのハイブリッド分子の設計と合成. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 27) 鳴海哲夫, 新井啓之, 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の構造変化を誘起する低分子CD4ミミックの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 28) 野村 渉, 玉村啓和. 配列特異的DNA切断の化合物による制御法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 29) 橋本知恵, 野村 渉, 大矢亜紀, 宮内浩典, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV外被タンパク質gp41-C34 3量体の合成とその抗HIV作用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 30) 鳴海哲夫, 神戸千秋, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する光分解性保護基の開発研究: 8-アザクマリン化合物の合成と光化学的特性. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 31) 増田朱美, 野村 渉, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 高い反応効率をもつ亜鉛フィンガー融合型DNA組換え酵素の構築. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 32) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋南美, 鳴海哲夫, 堤浩, 玉村啓和. 細胞内タンパク質可視化を目的としたタグ・プローブシステムの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 33) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を導入したprotein kinase C δ C1bドメインによるリガンド結合活性評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 34) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 相馬 晃, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 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. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 35) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和. シスアミド等価体としてのE型クロロアルケン骨格の合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 36) 鳴海哲夫, 宍戸美華, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドを用いる α, β -不飽和エノンのアジリジン化反応. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 37) 野村 渉, 田中智博, 相馬 晃, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 細胞表面におけるCXCR4二量体構造解析のための堅固なリンカーを有する二価型リガンドの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 38) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を活用したPKCリガンドのorthogonal screening methods. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
 - 39) 野村 渉, 近藤麻美, 卜部亜里沙, 増田朱美, 梁 明秀, 玉村啓和. 亜鉛フィンガーヌクレ

- アーゼを用いたEBウイルス弱毒化に関する研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会. 東京, 2011年5月23-25日.
- 40) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和, Jeffrey W. Bode. 新規アミノ酸モノマーの設計と合成: 縮合剤を用いない α -ペプチド合成への展開. 第9回次世代を担う有機化学シンポジウム. 東京, 2011年5月27-28日.
 - 41) 大附寛幸, 三浦智行, 小林剛, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦. HIV-1 エンベロープ蛋白質を標的とした治療を評価するためのサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と *in vitro* における中和感受性の評価. 第25回近畿エイズ研究会学術集会. 京都, 2011年6月18日
 - 42) 野村 渉, 増田朱美, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 細胞内における配列特異的DNA組換え反応の定量的測定法開発. 第11回日本蛋白質科学会年会. 大阪, 2011年6月7-9日.
 - 43) 鳴海哲夫, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和, 吉村和久, 原田恵嘉, 松下修三. HIV 外被タンパク質gp120 の構造変化を誘起する低分子CD4 ミミックの構造活性相関研究. 創薬懇話会. 岡山, 2011年7月6-7日
 - 44) 玉村啓和. HIV-1遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤. 第16回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 大阪, 2011年8月26 -27日.
 - 45) 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5回バイオ関連化学シンポジウム, 筑波, 2011年9月12-14日.
 - 46) 増田朱美, 野村 渉, 大庭賢二, 卜部亜里沙, 山本直樹, 玉村啓和. ジンクフィンガー融合DNA組換え酵素の反応効率最適化. 第5回バイオ関連化学シンポジウム. 筑波, 2011年9月12-14日.
 - 47) 関根綾太, 鈴木商信, 玉村啓和, 古田寿昭. 新規ケージドパクリタキセルの設計・合成と細胞骨格の光制御への応用. 2011年光化学討論会. 宮崎, 2011年9月6-8日.
 - 48) 野村 渉, 田中智博, 青木 徹, 相馬 晃, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2価型CXCR4リガンドの開発と受容体結合機能の解析. 第48回ペプチド討論会. 札幌, 2011年9月27-29日.
 - 49) 野村 渉, 堤 浩, 阿部清一郎, 森 あつみ, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. ロイシンジッパー構造を基にした青色蛍光を発するタグ-プローブシステム. 第48回ペプチド討論会. 札幌, 2011年9月27-29日.
 - 50) 野村 渉, 橋本知恵, 中原 徹, 大矢亜紀, 宮内浩典, 大庭賢二, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIVワクチンを指向したgp41の動的構造変化を模倣した抗原ペプチドの開発研究. 第48回ペプチド討論会. 札幌, 2011年9月27-29日.
 - 51) 新井啓之, 鳴海哲夫, 野村 渉, 原田恵嘉, 吉村和久, 松下修三, 玉村啓和. HIV外被タンパク質gp120の構造変化を誘起する低分子CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 52) 卜部亜里沙, 野村 渉, 増田朱美, 玉村啓和. 1対で反応するジンクフィンガーリコンビナーゼの設計とその反応. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 53) 尾崎太郎, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddali, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野淳, 玉村啓和. HIVタンパク質Vprを基にしたインテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 54) 宍戸美華, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドによる α - β -不飽和エノンの アジリジン化反応. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 55) 清家俊輔, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法の開発. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 56) 相馬 晃, 野村 渉, 田中智博, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. CXCR4二量化状態解析のための2価結合型リガンドの合成. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 57) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋 南美, 鳴海 哲夫, 玉村 啓和. 細胞内蛋白質のタグ- プローブシステムを利用した蛍光イメージングツールの創製. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
 - 58) 鳴海哲夫, 野村 渉, 神戸千秋, 相川春夫, 古田寿昭, 玉村啓和. 光制御型PKCリガンドの創製と新規光分解性保護基の開発研究. 第37回反応と合成の進歩シンポジウム. 徳島, 2011年11月7-8日.
 - 59) 相川春夫, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 玉村啓和. 蛍光ラベル化した二価結合型CXCR4リガンドの創製と応用. 第37回反応と合成の進歩シンポジウム. 徳島, 2011年11月7-8日.
 - 60) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 低分子型CD4ミ

- ミック: HIV外被タンパク質の構造変化を促すHIV侵入阻害剤. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 61) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1第二受容体CXCR4の細胞外ドメインを基にしたエイズワクチンの開発研究. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 62) 鳴海哲夫, 新井啓之, 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ミミックの構造活性相関研究. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 63) 尾崎太郎, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddali, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野 淳, Vpr由来インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 64) 玉村 啓和. ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー. 第14回ペプチドフォーラム. 鹿児島, 2011年12月16日.
- 65) 中村碧, 高原悠佑, 阪脇廣美, 堀池麻里子, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 成瀬妙子, 木村彰方, 侯野哲朗, 松岡沙織 サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京
- 66) 張險峰, 五十嵐樹彦, 松尾和浩, 堀端重男, 横溝香里, 三浦智行, 大橋貴, 山本直樹, 志田壽利 高病原性SIVに対する組換えBCGと弱毒ワクチン(m8Δ)エイズワクチンの防御効果 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京
- 67) 森田大輔, 五十嵐樹彦, 堀池麻里子, 森直樹, 杉田昌彦 Nef蛋白質のミリスチン酸修飾をモニターする新たな免疫システム 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京
- 68) 大附寛幸, 三浦智行, 小林剛, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦 中和抵抗性のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製とin vitroにおける立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京
- 69) Yoshimura K., Harada S., Hamji A., Matsushita S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the in vitro selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
- 70) Harada S., Ishikawa T., Hamaji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
- 71) Yoshimura K., Harada S., Hamji A., Matsushita S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced in vitro selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Roma, Italy, 2011, 7. 17-20.
- 72) Kuwata T, Igarashi T, Matsushita S. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies against V3 loop from SIV-infected macaques. AIDS Vaccine 2011, 9.12-9.15. Bangkok, Thailand, USA.
- 73) Yoshimura K, Harada S, Hamji A, Matsushita S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced in vitro selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17-20, Roma, Italy.
- 74) Harada S., Ishikawa T., Hamaji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17-20, Roma, Italy.
- 75) Yoshimura K., Harada S., Hamji A., Matsushita S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the in vitro selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
- 76) Harada S., Ishikawa T., Hamaji A.,

- Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
- 77) Maruta, S, Ramirez, K, Kuwata, T., Matsushita, S. : Construction of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
- 78) Ramirez, K, Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K, Tamamura, H., Matsushita, S : Novel CD4-induced monoclonal antibodies (MAbs) with cross-neutralizing activity against primary isolates of HIV-1 B and C subtypes. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
- 79) Kuwata, T, Takaki, K., Matsushita, S: Biased induction of neutralizing antibodies with particular specificity and gene usage in SIVsmH635FC-infected macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
- 80) 桑田岳夫：SIVsmH635FC感染サルにおける特定のエピトープと遺伝子に偏った中和抗体の誘導. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
- 81) Ramirez, K, Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K, Tamamura, H., Matsushita, S : Cross-reactivity and cross-neutralizing activity of monoclonal antibody(MAbs) to CD4-induced epitope of gp120 against HIV-1B, C, CRF_01 subtype viruses. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
- 82) 丸田泰広、桑田岳夫、クリステル.パオラ.ラミレス.バルデス、松下修三：HIV-1のV3領域に結合する中和抗体の遺伝子組換えによる小型化の試み.第25回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
- 1) HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド：特願2011-082813
- 2) 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：特願2011-51432、
- 3) 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：米国出願番号：13/319,813
- 4) 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：EP出願番号：10777543.9

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得

研究要旨

HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の CD4 結合部位に作用して Env 三量体構造を変化させ、中和抗体活性を増強する低分子化合物 NBD-556 を同定し、その低毒性誘導体である YYA-021 (NBD-559) について広範囲の臨床分離株に対する有効性の検討を続けている。サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ 1、15、12、2 株について、交差中和活性を持つ 2 種類の CD4i 単クローン抗体を用いて、YYA-021 の中和増強効果を調べたところ、サブタイプ A では見られず、サブタイプ B では 6/15、サブタイプ C では 2/12、CRF01_AE では 1/2 の株に観察された。サブタイプ B のウイルスパネル (Standard virus panel of subtype B; SVPB) を用いて検討すると、交差中和活性を持つ V3 抗体の中和活性は 9/15 株に関して増強効果を認めたことから、CD4i 抗体を用いた分析では増強効果に関する評価は不十分である可能性が考えられた。非サブタイプ B ウイルスに交差反応する他の単クローン抗体に関してさらに検討する必要がある。YYA-021 による中和活性の増強は gp120 単量体における結合活性の増強とは必ずしも関連せず、Env 三量体に対する効果は、単量体に対する効果と異なる可能性が示された。YYA-021 が、多くの臨床分離株で中和エピトープを露出させ中和抗体感受性にするという観察は、中和抗体を用いた治療の開発及びワクチン開発に重要な意味を持つと考えられる。

A. 研究目的

優れた効果を持つ抗ウイルス療法の開発により、HIV-1 感染症の長期間にわたる発症阻止が可能となった。しかし、残存する感染細胞の排除は困難なため、治療薬の慢性毒性が問題となっている。さらに残存するウイルスやウイルス蛋白による慢性炎症が引き起こす「老化」の促進のため、心血管病やこれまで AIDS と関係ないと考えられてきた癌や肝臓病などによる「早期死亡」が目立つようになった。これらの合併症 (comorbidity) を阻止するためには、HIV の生活環の阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞や潜伏感染を標的とする新規治療薬の開発が求められている。

我々は、中和抗体の臨床応用に向けた基礎研究の過程で HIV-1、gp120 の CD4 結合部位に作用してエンベロープ蛋白 (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。一連の研究で、NBD-556 の誘導体の一つである YYA-021 (NBD-559) がほぼ同等の活性を持ちながら、低い細胞毒性を示すことを見出した。本年度の研究の目的は、これまで JR-FL やサブタイプ B ウイルス株について行ってきた

YYA-021 の抗ウイルス効果に関する基礎的研究を拡大し、異なるサブタイプのウイルスを含む広範囲の臨床分離株に対する効果を検討するところにある。

B. 研究方法

N-(4-Chlorophenyl)-N-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556) の phenyl ring の p-position に methyl group を持つ誘導体 YYA-021 (NBD-559) は、東京医科歯科大学、玉村教授により合成され供給された。YYA-021 の機能的 Env 三量体に対する結合活性の測定は、HIV-1 感染細胞またはエンベロープ導入細胞を用いて FACS 解析により行った。また、gp120 単量体に対する単クローン抗体の反応性の増強に関しては、抗 gp120-C5 抗体を用いた gp120-capture ELISA で調べた。抗体サンプルは、我々が開発した抗体パネル及び米国で臨床試験中の抗 V3 中和抗体 KD-247 を用い、YYA-021 との相乗効果の検討をおこなった。ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP) が供給するサブタイプ B 及

び C の臨床ウイルス由来のエンベロープパネル (Standard virus panel of subtype B; SVPB, Standard virus panel of subtype C; SVPC)、さらに ARRRP より供与されたを用いたサブタイプ A および AE の envelope construct を用いて pseudovirus panel を作成した。

(倫理面への配慮) 本年度の研究は倫理的問題を含まないものである。

C. 研究結果

臨床分離株に対する NBD-556 と YYA-021 の抗ウイルス効果の比較

異なるサブタイプのウイルスを含む広範囲の臨床分離株に対する NBD-556 と YYA-021 の抗ウイルス効果を比較するために、米国 NIAID が供給するサブタイプ B 及び C の標準パネルウイルス (SVPB または SVPC) に対する NBD-556 または YYA-021 の抗ウイルス効果を TZM-bl 細胞を用いた Pseudovirus neutralization assay を用いて検討した。pseudovirus panel を用いて IC₅₀ を算出した。昨年までの研究で、PM1/CCR5 細胞を標的とした場合、NBD-556 の CC₅₀ は 110 μM、YYA-021 では 210 μM であったことから、IC₅₀ がこれ以下の濃度の場合を有効と考えると、サブタイプ B パネルでは 12/12、C パネルでは 7/12 であった。一方、IC₅₀ が CC₅₀ の 1/2 以下であったのは、サブタイプ B パネルでは 9/12、C パネルでは 5/12 であった。これらの観察は、昨年までの観察と同様に抗ウイルス活性と 3 量体の立体構造変化誘導能及び中和抗体活性増強能が必ずしも同じではないことを示す。

YYA-021 による非サブタイプ B 由来 Env 発現細胞に対する CD4i 抗体(916B2、917B11)の反応性の増強

CD4i 抗体が反応するエピトープは CD4 が gp120 に結合しなければ Env 三量体の内側に隠されていると考えられている。我々が最近樹立した CD4i 抗体である 916B2、917B11 は、JR-FLwt の env 導入細胞では、FACS による解析で、平均蛍光強度 (MFI) が 18.2 と 18 と反応性は弱いものであった。しかし、rCD4 の存在下では、反応プロフィールの MFI は 112 及び 24 と著明に右シフトし、細胞表面の蛍光の増強が検出できる。一方、YYA-021 の存在下では、それぞれの MFI は 37.4 及び 32.7 と同等のシフトが見られた。これらから、NBD-556 及び YYA-021 は、rCD4 に比較すると Env 三量体への効果は部分的ではあるものの、抗体によっては同程度に rCD4 をミミックするのではないかと考えられた。我々はさらに

サブタイプ C 由来の ENV として SVPC13 及び 15 AE 由来として 93TH1996.8 などの ENV 発現細胞での解析を進めている。

YYA-021 (10 μM)による SF162, 89.6, IIIB, JR-FL pseudoviruses に対する中和増強効果

抗 V3 抗体である 0.5 γ または KD-247, CD4bs 抗体である 0.5 δ, または 49G2 さらに CD4i 抗体として 4E9C または 4C11 に加えて 916B2 及び 917B11 を用いて YYA-021 の中和増強効果を比較した。SF162 は V3 や CD4bs 抗体によく中和されるためその効果は明らかではないが、CD4i 抗体に対する中和増強効果は著名に認められた。CD4i 抗体に対する中和増強効果は 89.6 でも IIIB でも観察された。一方、V3 抗体の中和活性は 89.6 と JR-FL では明らかに増強された。CD4bs 抗体に関しては、中和増強効果は認められなかった。

SVPB 及び SBPC パネルウイルスに対する YYA-021 (10 μM)の中和増強効果

我々は昨年度までに 3 種類の抗 V3 抗体 (0.5 γ, KD-247 および 717G2b)、3 種類の CD4bs 抗体 (0.5 δ, 49G2 および 82D5)、2 種類の CD4i MAbs (4E9C および 4C11) にて YYA-021 による中和の増強効果を検討した。本年度はこれに加えて、交差反応性の CD4i MAbs である 916B2、917B11 を加えて検討した。YYA-021 による中和活性の増強は 12 種類の SVPB 中 0.5 γ に関しては 9 種類、KD-247 に関しては 5 種類、717G2 に関しては 6 種類に観察された。一方、CD4i 抗体に関しては 4E9C 5 種類、4C11 については 1 種類のみ、916B2 では 2 種類、917B11 では 4 種類に増強がみられた。CD4bs 抗体については YYA-021 による中和増強は認められなかった。一方、12 種類の SVPC と 2 種類の CRF01_AE ウイルスのうち、YYA-021 による中和活性の増強が認められたのは、916B2 では 1 種類、917B11 では 2 種類であった。

SVPB パネルウイルスの gp120 単量体に対する YYA-021 (10 μM)の中和増強効果

SVPB パネルの pseudovirus 産生細胞から gp120/160 を抽出し、抗 C5 抗体にて gp120/160 を ELISA plate に capture する方法で結合活性を検討した。3 種類の抗体 (0.5 γ, 49G2, 4E9C) を用いて検討したが、驚いたことに、0.5 γ が SVPB15 に反応しない以外、これらの抗体は、すべての gp120 単量体によく反応した。YYA-021 による結合の増強効果は 4E9C でのみ観察可能で

あった。4E9C の結合活性は、6 種類のウイルスに関しては明らかにその増強がみられたが、2 種類では全く見られず、4 種類はその中間であった。YYA-021 による中和活性の増強は gp120 単量体における結合活性の増強とは必ずしも関連せず、YYA-021 の Env 三量体に対する効果は、単量体 gp120 に対する効果と異なる可能性が示された。

D. 考察

YYA-021 は primary isolates でも Env 三量体の内部に隠されている中和エピトープを外部に露出させ中和抗体感受性に変えることが観察された。特に、サブタイプ B ウイルスに関して交差中和活性を持つ 0.5 γ に関しては 12 種類のパネルウイルスのうち 9 種類に関して中和増強効果を認めた。また、もともと中和能が弱いかほとんど認められない CD4i 抗体について 5 種類のウイルスで中和活性増強がみられている。

一方、非サブタイプ B(サブタイプ C を中心として)に交差反応する CD4i 抗体である 916B2、917B11 を用いて、検討すると 15 種類のパネルウイルスのうち 3 種類に関して中和増強効果を認めた。YYA-021 の非サブタイプ B ウイルスに対する効果はより効果的な抗体を用いた分析が必要と考えられる。

YYA-021 は NBD-556 に比較して、抗ウイルス活性は 1/2~1/4 と劣るが、中和エピトープの露出という意味ではほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性は約 1/2 である。この意味で中和抗体を用いた POC 試験に適した小分子であると考えられるが、臨床応用に向けての課題も明らかとなった。すなわち、これらの解析から中和増強効果(2X 以上)はサブタイプ B ウイルスの 50~30%であること、非サブタイプ B ウイルス では 28%と考えられること、また、細胞毒性は低いものの、10-20 μ M の高濃度を要することである。これらから、臨床応用に最適な小分子の探索は継続されるべき課題であると考えられる。

E. 結論

YYA-021 は NBD-556 に比較して、抗ウイルス活性は 1/2~1/4 と劣るが、中和エピトープの露出という意味ではほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性は約 1/2 である。YYA-021 はまた、多くの primary isolates で中和エピトープを露出させ、中和抗体感受性に変えることができる。この意味で中和抗体を用いた POC 試験に適した小分子であると考えられる。これらの観察は中和抗体を用いた治療の開発並びにワクチン開発に重要な意味を持つと考えられる。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 19: 6735-6742 (2011).
2. Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Satoshi Kimura S, Oka S and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group. Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. *Intern Med* 50: 699-705, 2011

2. 学会発表

1. Kuwata T, Igarashi T, Matsushita S. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies against V3 loop from SIV-infected macaques. *AIDS Vaccine* 2011, 9.12-9.15. Bangkok, Thailand, USA.
2. Yoshimura K, Harada S, Hamji A, Matsushita S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced in vitro selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17-20, Roma, Italy.
3. Harada S., Ishikawa T., Hamaji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17-20, Roma, Italy.
4. Yoshimura K., Harada S., Hamaji A., Matsushita S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the in vitro selection of maraviroc. 12th

- Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
5. Harada S., Ishikawa T., Hamji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
 6. Maruta, S, Ramirez, K, Kuwata, T., Matsushita, S. : Construction of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
 7. Ramirez, K, Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K, Tamamura, H., Matsushita, S : Novel CD4-induced monoclonal antibodies (MAbs) with cross-neutralizing activity against primary isolates of HIV-1 B and C subtypes. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
 8. Kuwata, T, Takaki, K., Matsushita, S: Biased induction of neutralizing antibodies with particular specificity and gene usage in SIVsmH635FC-infected macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
 9. 桑田岳夫：SIVsmH635FC 感染サルにおける特定のエピトープと遺伝子に偏った中和抗体の誘導. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
 10. Ramirez, K, Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K, Tamamura, H., Matsushita, S : Cross-reactivity and cross-neutralizing activity of monoclonal antibody(MAbs) to CD4-induced epitope of gp120 against HIV-1B, C, CRF_01 subtype viruses. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
 11. 丸田泰広、桑田岳夫、クリステル.パオラ. ラミレス.バルデス、松下修三：HIV-1 の V3 領域に結合する中和抗体の遺伝子組換えによる小型化の試み.第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.