

201124028A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV侵入の動的超分子機構を標的とする
ケミカルバイオロジー創薬研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 鳴海 哲夫

平成24年（2012）年 4月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

**HIV侵入の動的超分子機構を標的とする
ケミカルバイオロジー創薬研究**

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 鳴海 哲夫

平成24年（2012）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

HIV侵入の動的超分子機構を標的とする ケミカルバイオロジー創薬研究 鳴海 哲夫	----- 1
--	---------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
--------------------	----------

III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 12
------------------	----------

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

HIV 侵入の動的超分子機構を標的とするケミカルバイオロジー創薬研究

研究者代表者 鳴海 哲夫 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 助教

研究要旨 本研究課題では、HIV の細胞侵入過程である動的超分子機構を標的として、これまでほとんど行われてこなかった有機合成化学に基づいたケミカルバイオロジー研究を行うことで、HIV の細胞侵入時の HIV 外被タンパク質と宿主側タンパク質との相互作用様式に関して、有機化学的手法による解析を行い、その知見に基づいた新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究を展開した。平成 22 年度は、宿主側から HIV 側タンパク質への機能解析として、申請者らが見出した低分子 CD4 ミミックを化学修飾することで様々な機能を付与した高度機能性 CD4 ミミックライブラリーを構築し、gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性を評価した。その結果、ピペリジン環上の窒素原子が gp120 構造誘起能および細胞毒性などの生物活性に大きく寄与することを明らかにし、リード化合物 (NBD-556) の二つの *gem*-ジメチル基を二つのシクロヘキシル基に置換することで、NBD-556 と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつより強力な抗 HIV 活性を有する誘導体 (HAR-171) の創出に成功した。平成 23 年度は、CD4 ミミック誘導体の構造最適化を深化しつつ、コレセプター CCR5/CXR4 との相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ペプチドをリード化合物として、部分ペプチドライブラリーを構築し、コレセプター結合活性および抗 HIV 活性を評価した。その結果、芳香環パラ位の塩素原子に加え、メタ位にフッ素原子を導入することで、HAR-171 の 2 倍程度の抗 HIV 活性および 1.5 倍程度の gp120 構造変化誘起能を有する HAR-431 を見出した。また、X4 指向性ウイルスの V3 loop 領域由来の部分ペプチドおよびそれらを組み合わせたシャッフルペプチド、ヘリックス領域を安定化する非天然アミノ酸を導入したペプチドミメティックを合成し、CXCR4 結合活性および抗 HIV 活性を評価した。その結果、BASE, STEM, TIP の全ての領域を含み、N 末端と C 末端をジスルフィド結合で環化した環状ペプチドにおいてのみ顕著な CXCR4 結合活性および抗 HIV 活性が見られた。これらの成果は、今後の HIV 侵入過程を標的とした創薬研究の進展に資するものである。なお、見出した研究成果を基に更なる構造活性関連研究が進行中である。

A. 研究目的

現在 HIV 感染症の化学療法において有効な治療法として確立している多剤併用療法の問題点として、長期投与による毒性や耐性ウイルスの出現などが挙げられる。これら問題の解決には HIV の侵入から出芽に至る生命現象をこれまでとは異なる角度から改めて解析し、既存の情報を再構築する必要があると考えられる。一方、工学分野では化学を

出発点に生命現象を解析するケミカルバイオロジー研究が盛んに行われ、様々なタンパク質において新たな情報が見出されている。このような背景のもと、HIV 関連タンパク質に対してケミカルバイオロジー研究を行い、HIV の関わる生命現象を有機化学的に解析し、個体間ではなく原子・分子レベルの相互作用として理解することは、極めて重要と考えられる。

HIV は外被タンパク質がヒトの宿主細胞上にある複数のタンパク質（CD4 や CCR5/CXCR4）とダイナミックな構造変化を起こしながら相互作用することで宿主細胞に感染する。そこで本研究課題では、HIV 側および宿主側タンパク質の機能を模倣した有機分子を創製し、それらを用いて HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式を両方向から解析し、その知見に基づいた合理的分子設計により新規 HIV 侵入阻害剤の開発を目的とする。

B. 研究方法

【CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究】

平成 22 年度に引き続き CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究を進めた。これまでの結果から、芳香環部位のクロロアニリン、ピペリジン環部位の嵩高い置換基が生物活性発現に重要であることが明らかにしている。そこで、平成 22 度の研究（図 1）によって見出した HAR-171 をリード化合物として、高活性化および低毒性化など

医薬品プロフィールを目指し、新規 CD4 ミミック誘導体を化学合成し、それら化合物の生物活性（抗 HIV 活性、細胞毒性、gp120 の構造変化誘起能）を評価した。

CD4 ミミック誘導体の生理活性試験

細胞毒性および抗 HIV 活性については WST-8 アッセイによる評価を行った。96 well round-bottom micro culture plate にて、各 CD4 ミミック誘導体存在下または非存在下で、細胞毒性試験では無感染の PM1/CCR5 細胞 3×10^3 cells を、抗 HIV-1 活性試験では 200 TCID₅₀ のウイルスを感染させた PM1/CCR5 細胞または TZM-bl 細胞 3×10^3 cells を 37 °C 下で 5 日間培養した。それぞれの well から 100 μL の培養液を取り除き、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) 溶液 10 mL を加え、37 °C で 3 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて吸光度 (450 nm) を測定して、細胞の生存率を算出した。

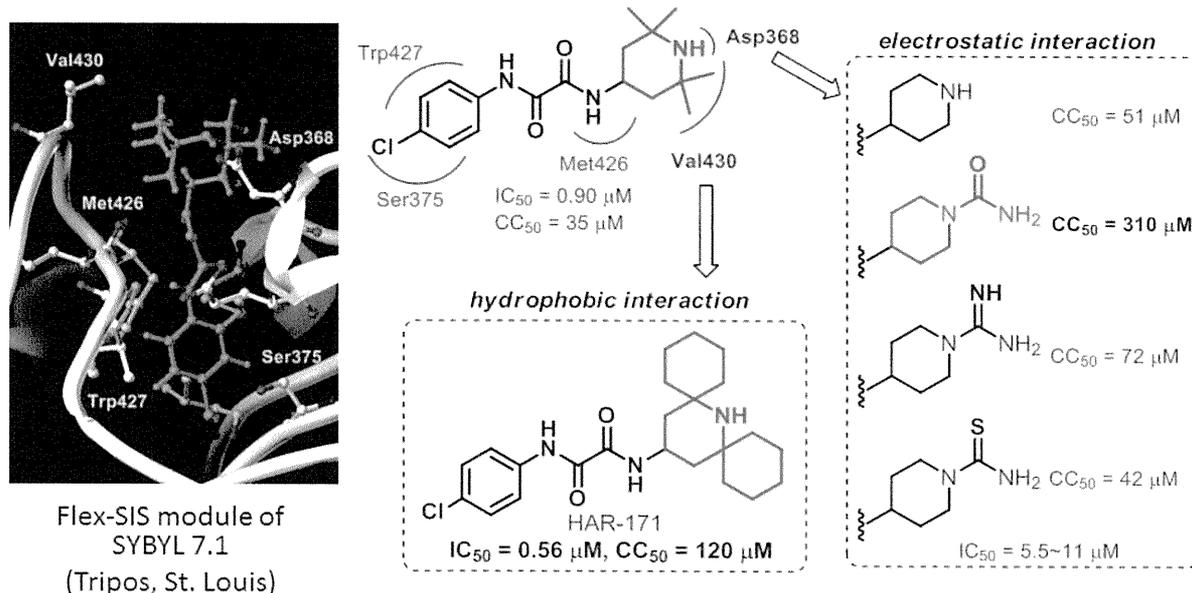


図 1. 平成 22 年度の研究の概要

gp120 構造変化誘起能の評価

HIV-1 に継続感染させた PM1 細胞 1×10^5 cells を、FACS buffer (PBS; 2% BSA, 0.2% azide, pH 7.2) 中において CD4 ミミック誘導体 100 μ M 存在下または rsCD4 0.5 μ g/mL 存在下で、4 °C 下、15 分間攪拌したのち、CD4i 抗体 4C11 (終濃度 3.4 - 6.7 μ g/mL) を加えて 4 °C 下で 30 分間攪拌した。また、4C11 の代わりに 8D11 を加えた細胞をコントロールとした。遠心後 (4 °C, 1200 rpm, 3 分間)、上清を除去し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。そこに fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させたヤギ由来抗ヒト IgG 抗体を加え、4 °C 下で 30 分間染色し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。また、固定化溶液 (PBS; 2% paraformaldehyde) を加え、4 °C 下で 30 分間固定化したのち、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。その後、フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD) にて測定を 2 回以上行った。

【V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製】

HIV 側タンパク質から宿主側への機能解析として、コレセプターとの相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ペプチドをリード化合物として、部分ペプチドライブラリーを構築し、ウィルス視点でのコレセプターの機能解析を行い、CXCR4 結合活性を評価した。

[¹²⁵I]-SDF-1 α による CXCR4 競合阻害実験

ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞を遠心沈降 (1000 rpm, 5 min.) した後、上澄みを除去した。沈殿した細胞に結合実験用 buffer (RPMI; 20 % HEPES, 0.5% BSA) を 5×10^5 cell/120 μ L になるように加え、シリコナイズドチューブに 120 μ L ずつ分注した。調整した各サンプルに化合物溶液 (終濃度 10 μ M) 15 μ L、SDF-1 α /CXCL12 (終濃度 1 μ M) buffer 15 μ L、10% DMSO を含む結合実験用 buffer 15 μ L をそれぞれ加え、全てのサンプルに放射性同位体標識された CXCR4 の天然リガンド

である [¹²⁵I]-SDF-1 α /CXCL12 (終濃度 0.5 nM) 15 μ L を添加し、氷上で 1 h インキュベートした。インキュベート終了後、oil cushion 用 oil (olive oil:dibutyl phthalate = 1:4, v/v) 500 μ L を加え、遠心沈降 (4 °C, 14000 rpm, 2 min) した。水層および油層を除去した後、ペレットのついているチューブの先を切り落とし、RIA tube に入れて gamma-counter で測定することで、各化合物の結合活性を評価した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、日本学術会議による動物実験の適切な実施に向けたガイドライン及び厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を厳密に遵守して、実験計画を綿密に検討した上で必要最小限の実験動物を用いて効率的に実験を実施した。

C. 研究結果**【低分子CD4ミミックの構造活性相関研究】**

平成 22 年度に見出した NBD-556 のピペリジン環の *gem*-ジメチル基を大きな疎水性官能基であるシクロヘキシル基に置換した HAR-171 をリード化合物として、構造活性相関研究をさらに展開した。これまでの構造活性相関研究および理論計算によるドッキングシミュレーションから、芳香環部位は Val255 や Ser375 との疎水性相互作用や水素結合による相互作用が示唆されており、これらと効率よく相互作用するように様々なヘテロ原子や置換基を配置した化合物群の設計および合成した (図 3)。また、芳香環パラ位の置換基に加え、芳香環メタ位にヘテロ原子を導入した化合物群も併せて合成した (図 4)。さらにこれら化合物にシクロヘキシル基を導入した化合物群も併せて合成した。

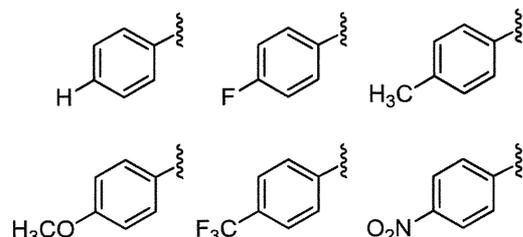
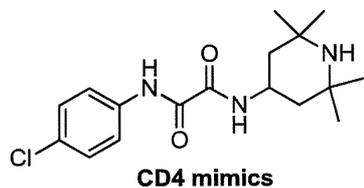


図 2. 芳香環パラ位に種々の置換基を導入した化合物群

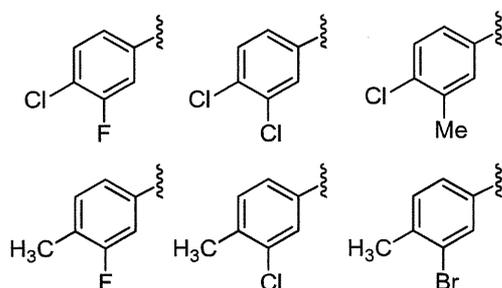
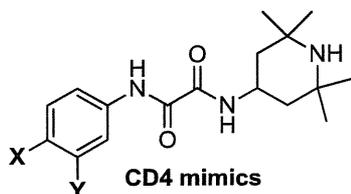
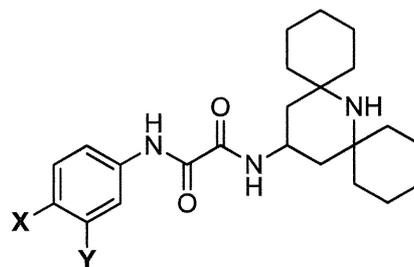


図 3. 芳香環パラ位およびメタ位に種々の置換基を導入した化合物群

生物活性評価の結果、芳香環パラ位の塩素原子に加え、メタ位にフッ素原子を導入することで、**HAR-171** ($IC_{50} = 0.43 \mu M$) の 2 倍程度の抗 HIV 活性および 1.5 倍程度の gp120 構造変化誘起能を有する **HAR-431** を見出した ($IC_{50} = 0.23 \mu M$) (図 4)。また、芳香環パラ位の塩素原子をメチル基に置換し、メタ位にフッ素原子を導入した誘導体 **HAR-427** も同様に顕著な抗 HIV 活性を示し ($IC_{50} = 0.54 \mu M$)、gp120 構造変化誘起能を維持していた。さらに、分子モデリングによる解析も行い、

CD4ミミックは gp120 の Phe43 cavity 近傍の 6 個のアミノ酸 (Val255、Asp368、Ser375、Met426、Trp427、Val430) との相互作用が重要であることを明らかにした。



HAR-171 (X = Cl, Y = H)
HAR-427 (X = Me, Y = F)
HAR-431 (X = Cl, Y = F)

図 4. 顕著な生物活性を有する CD4 ミミック

【V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製】

V3 loop は 1) ジスルフィド結合を含む逆平行β鎖の base 領域、2) 構造的に自由度が高い stem 領域、3) 高度に保存された tip 領域の 3 つのフラグメントに別けられ、base 領域はコレセプターの N 末端と相互作用し、tip および stem 領域はコレセプターの body と相互作用することが示唆されている (図 5)。そこで、X4 指向性ウイルスの V3 loop 領域由来の部分ペプチドおよびそれらを組み合わせたシャッフルペプチド、ヘリックス領域を安定化する非天然アミノ酸を導入したペプチドミメティックを合成した (図 6)。

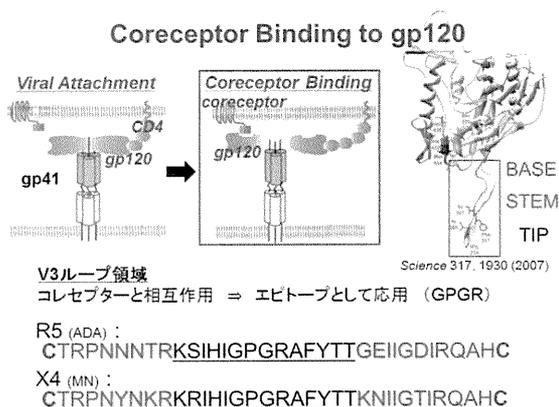


図 5. V3 loop 領域の概要

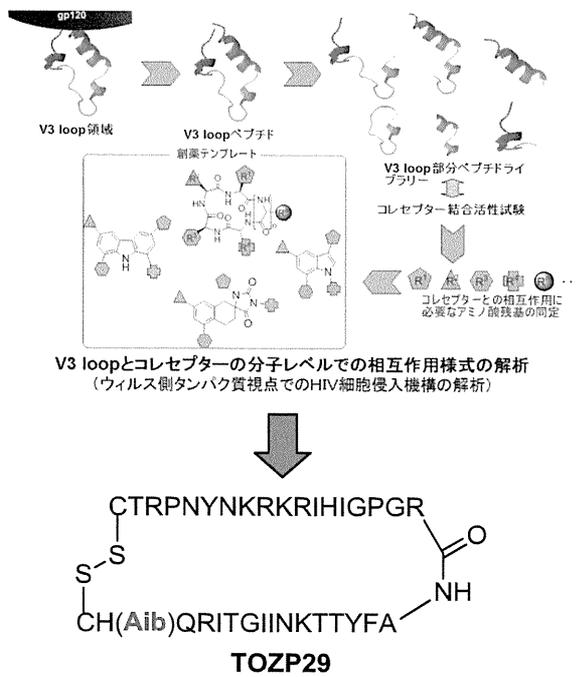


図 6. V3 loop ミミックの創製

CXCR4 の天然リガンドである SDF-1 α との競合阻害実験によって CXCR4 結合活性を評価したところ、部分ペプチドやシャッフルペプチドはほとんど活性を示さなかったのに対し、base, stem, tip の全ての領域を含み、N末端とC末端をジスルフィド結合で環化した環状ペプチド TOZP-022において顕著なCXCR4結合活性が見られた。さらに、V3 loop の C 末端のヘリックス構造をより高度に再現するために 33 残基目のアラニンに非天然アミノ酸である α -アミノイソブタン酸 (Aib) に置換したペプチド TOZP-029 ではCXCR4結合活性が向上することを明らかにした。

D. 考察

平成 22 年度からの継続している宿主側タンパク質 CD4 の機能を模倣した低分子型 CD4 ミミックの構造活性相関研究により、リード化合物と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつ顕著な抗 HIV 活性を有する HAR-171 や HAR-427 を見出し、さらなる構造最適化により HAR-171 の 2 倍

程度強力な抗 HIV 活性を有する HAR-431 を見出すことに成功した。HAR-427 および HAR-431 ではメタ位のフッ素原子の導入が効果的に働いたものと推定される。分子モデリングによるリガンド結合部位および相互作用様式の解析から、メタ位のフッ素原子は gp120 の Ser375 との水素結合に寄与しているものと考えられる。また、これら誘導体は顕著な gp120 の構造変化誘起能を有していることから、メタ位のフッ素原子の導入は抗 HIV 活性だけでなく種々の生物活性に寄与することが示唆された。

gp120 の V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製研究では、V3 loop の base, stem, tip などの部分ペプチドやそれらを組み合わせたシャッフルペプチドでは、CXCR4 結合活性および抗 HIV 活性を示さなかったのに対し、全ての領域を含む環状ペプチドではCXCR4結合活性が見られたことから、V3 loop 領域とコレセプターの相互作用はペプチドの配列だけでなく構造的な要因が大きいことが示唆された。さらに、C末端のヘリックス構造を誘起するために Aib を導入したペプチドにおいて、CXCR4 結合活性が向上したことから V3 loop の構造が重要であることを示唆している。また、V3 loop の保存領域である GPGR 配列を含む部分ペプチドはCXCR4結合活性を維持していなかったことや先に述べたペプチド構造の重要性から、GPGR 配列は V3 loop 領域の環構造の保持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

E. 結論

HIV の細胞侵入の第一段階である gp120 と CD4 の相互作用様式の解析を目的として、gp120 の構造変化を誘起する CD4 ミミック誘導体のさらなる構造最適化を行い、平成 22 年度に報告者らが見出した HAR-171 よりさらに強力な抗 HIV 活性を有する HAR-431 を見出し

た。また、コレセプターCCR5/CXCR4 との相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製研究において、V3 loop とコレセプターの相互作用様式を化学的手法により解析することで、TOZP-029 を見出し、配列だけでなく構造の重要性を明らかにした。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の開発研究において、重要な基礎的知見を与えるものと思われる。

F. 謝辞

抗ウイルス活性の測定実験および gp120 構造変化誘起能の評価に関して、熊本大学エイズ学研究所 エイズ研究センター第一室・室長、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

I. 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) Narumi T, Bode JW, α,α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids. *Heterocycles*, 82: 1515-1525, 2011
- 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* 12: 535-539, 2011.
- 4) 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.
- 5) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano AJ, Yamamoto, N, Tamamura H. Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 3287-3291, 2012.
- 10) 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.

著書

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
 - 5) Narumi T, Bode JW. α,α -Dichloroisoioxazolidinones 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.
 - 6) 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) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
- 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) 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.
 - 30) 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.
 - 31) 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.
 - 32) 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.
 - 33) 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.
 - 34) 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.
 - 35) 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.
 - 36) 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.
 - 37) 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.
 - 38) 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.
 - 39) 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.
 - 40) 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.
 - 41) 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

別添 3

- 幌, 2011年9月27-29日.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- (ア) HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド: 特願2011-082813
- (イ) 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、
- (ウ) 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
- (エ) 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

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
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.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium	American Peptide Society	San Diego	2011	132-133
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.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium	American Peptide Society	San Diego	2011	134-135
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.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	40
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.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	220
Narumi T, Bode JW.	α,α -Dichloroisoaxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	178
Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H.	Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	103

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, 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
Narumi T, Bode JW	α, α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids.	Heterocycles	82	1515-1525	2011
Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H, et al.	Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C	ChemBioChem	12	535-539	2011
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
Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists.	ChemMedChem	6	834-839	2011
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
Nomura W, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency	ChemMedChem	7	205-208	2012
Narumi T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H, et al.	Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins	Bioorg Med Chem	20	1468-1474	2012
Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano AJ, Yamamoto, N, Tamamura H.	Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines	Bioorg Med Chem	20	3287-3291	2012
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

Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins

Wataru Nomura¹, Toru Nakahara¹, Chie Hashimoto¹, Kenji Ohba²,
Tetsuo Narumi¹, Naoki Yamamoto², and Hirokazu Tamamura¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan; ²Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, 117597, Singapore

Introduction

Development of new anti-HIV drugs such as protease inhibitors and integrase inhibitors has contributed to highly active anti-retroviral therapy (HAART) for AIDS. We have also developed several anti-HIV agents including CXCR4 antagonists [1], CD4 mimics [2] and integrase inhibitors [3]. Although practically useful drugs have been discovered, the antibody therapy is still a promising and desirable treatment. To develop effective HIV vaccines, artificial antigen molecules have been synthesized based on HIV-1 envelope proteins such as gp120 and gp41. Gp41 plays a pivotal role in the membrane fusion process of HIV-1 infection, and is divided by the N-terminal helix region (N36) and the C-terminal helix region (C34). In the membrane fusion process, a six-helical bundle structure of gp41 is formed, which consists of a trimeric coiled-coil of N36 surrounded by three strands of C34 in an antiparallel fashion. Thus, it suggests that antibodies, which recognize the N36 trimer and the C34 trimer, might block HIV-1-entry.

Results and Discussion

Initially, to construct an N36 trimer mimic, three strands of the N36 peptides were assembled on a C3-symmetric template with three equivalent linkers by thiazolidine ligation [4] for chemoselective coupling of an N-terminal Cys-containing unprotected N36 peptide with an aldehyde scaffold-containing three arms (Figure 1) [5]. Sera produced by immunization of the synthetic N36 trimer antigen showed structural preference in binding to the N36 trimer (Figure 2) and higher potent neutralizing activity, compared to sera produced by the N36 monomer immunization. As anti-HIV peptides, the N36 trimer and monomer showed modest inhibitory activity, and the trimer is three times more potent than the monomer. Next, to construct a C34 trimer mimic, three strands of the C34 peptides were assembled on another C3-symmetric template with three equivalent linkers by native chemical ligation for chemoselective coupling of a C-terminal-thioester-containing unprotected C34 peptide with Cys-containing three arms. Sera produced by immunization of the synthetic C34 trimer antigen showed structural preference in binding to the C34 trimer and higher potent neutralizing activity, compared to sera produced by the C34 monomer immunization. It is noteworthy that as

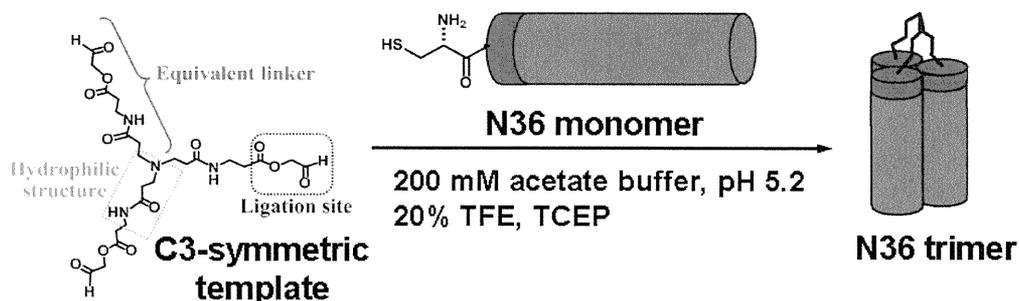


Fig. 1. Synthesis of an N36 trimer assembled on a C3-symmetric template.

anti-HIV peptides, the C34 trimer and monomer showed high inhibitory activity, and that the trimer is 100 times more potent than the monomer (EC_{50} (C34 trimer) = 1.30 nM, EC_{50} (C34 monomer) = 124 nM). The C-region of gp41 such as C34 is known to be critical as fusion inhibitors, and enfuvirtide (Trimeris/Roche) is cross to the C-region. Thus, it can be explained that these C34 monomer and trimer have potent fusion inhibitory activity, but it is difficult to explain the reason for the higher inhibitory activity of the C34 trimer relative to that of the monomer. The elucidation of the detailed action mechanism of the C34 trimer as a fusion inhibitor will be the subject of our future study. There are two advantages in the design of inhibitors and vaccines: The exposed timing of epitopes of the helical region trimers is limited

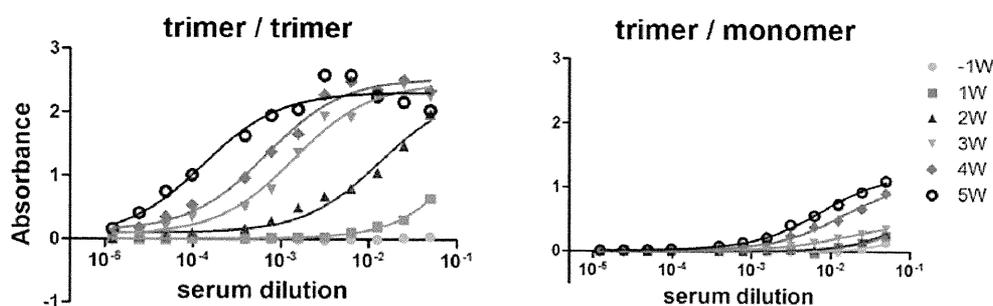


Fig. 2. Results of serum titer ELISA of antisera collected during immunization (from one week before start to five weeks after immunization start) to determine the immunogenicity of designed antigens. The titers were evaluated as followings; antiserum against the N36 trimer binding to the N36 trimer (left) and to the N36 monomer (right).

in the fusion step, and carbohydrates are not included in the amino acid residues of the regions. Burton's group reported the importance of antibody recognition for the trimer form of surface proteins, suggesting the trimer-specific antibodies show broad and potent neutralization [6]. The N36 and C34 trimer-form specific antibodies produced in this study could also obtain the corresponding properties. The elucidation of antibody-producing mechanisms and epitope recognition mode of induced antibodies will be addressed in our future studies. The designs of antigens and inhibitors targeting the dynamic supramolecular mechanism of HIV-1 fusion will be useful for AIDS vaccines and anti-HIV agents.

Acknowledgments

We thank Ms. Aki Ohya and Aiko Ogawa (Tokyo Medical and Dental University) for the synthesis of antigen peptides, Drs. Kosuke Miyachi and Jun A. Komano (AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases) for biological assays, and also Prof. Kazunari Akiyoshi (Kyoto University) for allowing access to CD spectropolarimeter. C.H. is supported by JSPS research fellowships for young scientists. This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and Health and Labour Sciences Research Grants from Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

References

1. Liu, C.F., Tam, J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6584-6588 (1994).
2. Nakahara, T., et al. *Bioconjugate Chem.* **21**, 709-714 (2010).
3. Walker, L.M., et al. *Science* **326**, 285-289 (2009).
4. Tamamura, H., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 877-882 (1998).
5. Yamada, Y., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 354-358 (2010).
6. Suzuki, S., et al. *J. Med. Chem.* **53**, 5356-5360 (2010).

Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells

Wataru Nomura, Tomohiro Tanaka, Akemi Masuda, Tetsuo Narumi,
and Hirokazu Tamamura

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

Introduction

The chemokine receptor CXCR4 is a membrane protein belonging to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs), which are attractive drug targets involving 40% of commercially available drugs. It has been difficult, however, to obtain structural information pertaining to GPCR which is required for drug development. Recent studies have indicated a pivotal role for homo- and hetero-oligomerization of CXCR4 in cancer metastasis and the significance of oligomeric forms of GPCR has been gaining acceptance [1]. In this study, we designed and synthesized novel CXCR4 bivalent ligands consisting of two molecules of [*cyclo*(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-D-Cys-)] (Nal = L-3-(2-naphthyl)alanine) an FC131 analogue [2,3], connected by a poly-L-proline or a PEGylated poly-L-proline linker. Our bivalent ligands with linkers of various lengths were used to determine the distance between two binding sites of ligands consisting of CXCR4 dimers. This approach will expand the utility of the polyproline helix in elucidation of biologically important questions concerning GPCRs. Moreover, by obtaining specificity for the dimeric form of receptors, fluorescent labeling of the ligands would produce a molecular probe specific for oligomerized receptors in cancer diagnosis.

Results and Discussion

Acetamide-capped FC131 (**2**), in which Gly was replaced by D-Cys and the molecule was capped with an acetamide group, was synthesized as a monomer unit of the ligand (Figure 1). Although this substitution causes 2-fold decrease in binding to CXCR4, the binding affinity is still adequate for analyses. In conjugation reaction, the compound **1** was mixed with various proline linkers in ratio of 2:1 in a buffer solution. Poly-L-proline helices are known to maintain a length of 0.9 nm per turn [4]. In this study, polyproline helices covering 2-8 nm of length, and a PEGylated polyproline-type linker covering the same range of length and owing to the PEG moiety, flexible at both ends, were synthesized (Figure 1). The binding affinities of the synthetic ligands were evaluated in a competitive binding assay against [¹²⁵I]SDF-1 α as reported previously [3] (Table 1). It is known [5] that the binding affinities of bivalent GPCR ligands depend on the linker lengths and the binding assay in this study also showed that the binding of bivalent ligands is clearly dependent on the linker lengths. The ligands with the highest affinity in two types of linkers were 20-prolines (**8**) and 12-prolines-PEG (**14**). As monomer controls, FC131 with 6-proline (**17**) or PEG linker (**18**), acetylated at the other end were prepared. In comparison with controls, **8** and **14** showed a 7.3- and 21.2-fold increase of binding affinity, respectively. The results indicate successful bivalent binding of ligands, which has been known to be responsible for an increase in binding affinity. It is of interest that the maximum increase

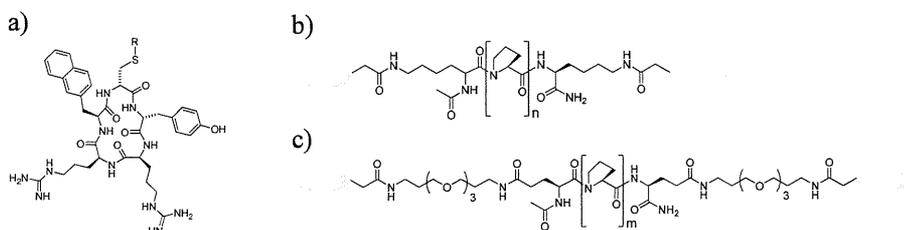


Fig. 1. Design of bivalent ligands against CXCR4 chemokine receptor. As CXCR4 binding moiety, D-Cys FC131, (R=H, **1**) and acetamide-capped FC131 (R=CH₂CONH₂, **2**) were prepared (a). Two kinds of linkers, poly-L-proline (b, **3-10**) and PEG-conjugated poly-L-proline (c, **11-16**), with CXCR4 binding moieties on both ends (shown as ovals).

Table 1. Results of binding assay of ligands by [¹²⁵I]SDF-1α competition assay

Entry	K _i (nM)	linker length (nm)	Entry	K _i (nM)	linker length (nm)
FC131	31.5	-	10 (27pro FC131b)	45.8	8.1
2 (Acetamide FC131)	53.4	-	11 (3proPEG FC131b)	87.2	3.8
3 (6pro FC131b)	51.2	1.8	12 (6proPEG FC131b)	45.6	4.7
4 (9pro FC131b)	45.4	2.7	13 (9proPEG FC131b)	17.8	5.6
5 (12pro FC131b)	64.4	3.6	14 (12proPEG FC131b)	13.9	6.5
6 (15pro FC131b)	59.5	4.5	15 (15proPEG FC131b)	49.3	7.4
7 (18pro FC131b)	13.2	5.4	16 (18proPEG FC131b)	83.3	8.3
8 (20pro FC131b)	9.9	6	17 (Ac6pro FC131)	72	-
9 (23pro FC131b)	22.5	6.9	18 (AcPEG FC131)	294	-

in binding was observed for linkers of similar length (ca. 5.5-6.5 nm). Molecular modeling studies of the binding site of FC131 suggest that amino acids in transmembrane 7 are important for FC131 binding. Utilizing the rhodopsin structure, it was revealed that in TM4-5 assembly form the distance between ligand binding sites is 5.3 nm. The changes in binding affinity are relatively moderate and the existence of different assembly forms is possible but a majority of the population should be the TM4-5 assembly form. A hypothesis was derived from the increased binding of linkers of the appropriate length that such ligands could be applied as probes specific for CXCR4 on the cell surface as the receptors are overexpressed in several kinds of malignant cells and that the dimer formation of the receptor should depend on the expression level. Accordingly, compound **7**, labeled with tetramethylrhodamine (TAMRA-labeled **7**) (**19**), was synthesized and tested for CXCR4 imaging. To obtain merge images of CXCR4 and ligands, the EGFP gene was fused to C-terminal of the CXCR4 gene and the plasmid containing the gene was transiently transfected. The increase in binding affinity of the bivalent ligand was clearly reflected in the imaging of CXCR4 receptors on the cell surface. When TAMRA-labeled **17** (**20**) was utilized as a monomer ligand, only a trace of binding was observed. Additionally, binding to mock HeLa cells was not observed for either ligand. To assess further the binding specificity of bivalent ligands to CXCR4 expressed on the cell surface, FACS analysis utilizing Jurkat cells was performed. In the bivalent ligand binding, the MFI changes from 12.34 to 18.86. It is of interest that bivalent ligand showed clear difference from monomer binding, in which the MFI was 13.29 at 25 nM (Figure 2) [6].

Our approach has the advantages that the ligand can directly capture dimeric forms of GPCRs and the linkers can be applied to virtually any known GPCR receptors. Information from such analysis could offer a consensus to the controversial currently unsolved mechanisms.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Kazunari Akiyoshi (Kyoto University) for access to laser scanning microscope. T.T. and A.M. are supported by JSPS research fellowships for young scientists. This research was supported in part by New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO).

References

- George, S.R., O'Dowd, B.F., Lee, S.P. *Nature Rev. Drug Discov.* **1**, 808-820 (2002).
- Tamamura, H., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 877-882 (1998).
- Fujii, N., et al. *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, 3251-3253 (2003).
- Kuemin, M., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15474-15482 (2009).
- Handl, H.L., et al. *Bioconjugate Chem.* **18**, 1101-1109 (2007).
- Tanaka, T., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15899-15901 (2010).

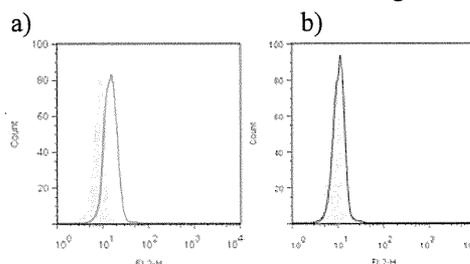


Fig. 2. Flow cytometric analysis for CXCR4 binding of **19** and **20** to Jurkat cells. Each panel shows binding of **19** (a) and **20** (b). control MFI: 12.34, Dimer (**19**) MFI: 18.86, Monomer (**20**) MFI: 13.29.

Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells

Wataru Nomura¹, Nami Ohashi¹, Atsumi Mori¹, Tetsuo Narumi¹, Tomohiro Tanaka¹, Akemi Masuda^{1,2}, Hiroshi Tsutsumi¹, and Hirokazu Tamamura^{1,2*}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 101-0062, Japan; ²Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 113-8510, Japan
E-mail: tamamura.nr@imd.ac.jp

New tag-probe pairs based on leucine zipper peptides for labeling target proteins have been developed. These consist of an α -helical probe peptide with an environmental-sensitive fluorescent dye and two antiparallel α -helical tag peptides. Here, the pairs were applied to the fluorescent imaging of CXCR4.

Keywords: CXCR4; fluorescent dye; leucine zipper; protein imaging; tag-probe

Introduction

Practical techniques of protein imaging *via* functional peptide tags are useful in the field of proteome and chemical biology. A novel fluorescent changeable tag-probe system based on the artificial leucine zipper peptides, designated a ZIP tag-probe pair, has been developed for labeling target proteins.^{1,2} The design of ZIP tag-probe pairs is based on the crystal structure of an antiparallel coiled-coil trimer of a GCN4 mutant. The probe peptide is an α -helical peptide with an environmentally sensitive fluorescent dye, 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD). Tag peptides are designed as antiparallel 2α -helical peptides linked *via* a loop sequence (Fig. 1). It is thought that hydrophobic cores of leucine zipper peptides can form hydrophobic pockets in which small organic molecules such as fluorescent dyes can be located. Furthermore, selective binding of environmentally sensitive fluorescent dyes to these pockets inside the leucine zipper assembly induces colorimetric changes from dark and weak yellow to bright and strong green, and enhances their fluorescence intensity. Here, the ZIP tag-probe system was applied to the fluorescent imaging of ZIP tag-fused proteins on the surface of living cells.

Results and Discussion

CXCR4 was chosen as a model protein in living cells. CXCR4 is one of the 7-transmembrane G-protein coupled receptors, a member of a chemokine receptor family. The tag is genetically fused at the N-terminus of CXCR4. The tag-fused CXCR4 is transiently expressed on the surface of CHO-K1 cells and double labeling experiments of the tag-fused CXCR4 using a fluorescent CXCR4 antagonist with a tetramethylrhodamine (TAMRA)³ and the probe peptide with the NBD dye were performed. As a result, the tag-fused CXCR4 was specifically stained with red fluorescence by the TAMRA-appended CXCR4 antagonist.

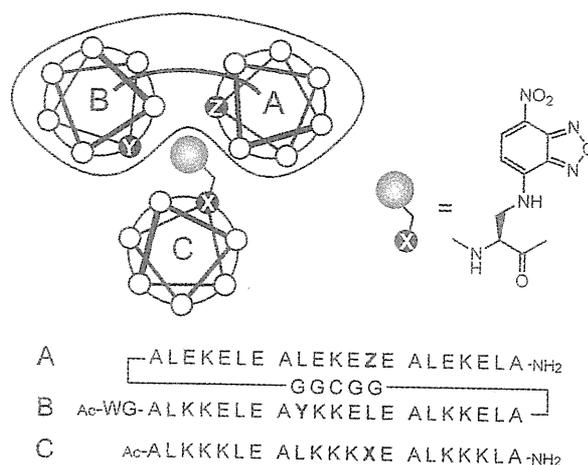


Fig. 1. The design and structure of the ZIP tag-probe pair based on three strand leucine zipper peptides. X = Dap(NBD), Y = Z = Ala, Dap = L- α -2,3-diaminopropionic acid, NBD = 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

Then, the sequential labeling of the tag-fused CXCR4 using the probe peptide was performed. Without removal of the probe peptide, a bright green fluorescence was observed on the surface of cells in the presence of the excess probe peptide. Since the fluorescence due to the TAMRA-appended CXCR4 antagonist was also observed, the binding events between the tag and the probe peptide, and between CXCR4 and the TAMRA-appended CXCR4 antagonist are independent each other. The fluorescence image of the probe peptide was closely merged with that of the TAMRA-appended CXCR4 antagonist. These results suggest that CXCR4 can be successfully visualized using the ZIP tag-probe system without removal of excess probe molecules. This ZIP tag-probe system is consequently a useful fluorescent imaging tool for proteins in living cells.

The authors deeply thank Prof. K. Akiyoshi, Kyoto University, for our access to a confocal microscope.

References

1. Tsutsumi, H., Nomura, W., Abe, S., Mino, T., Masuda, A., Ohashi, N., Tanaka, T., Ohba, K., Yamamoto, N., Akiyoshi, K., and Tamamura, H. (2009) *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 9164-9166.
2. Nomura, W., Mino, T., Narumi, T., Ohashi, N., Masuda, A., Hashimoto, C., Tsutsumi, H., and Tamamura, H. *Biopolymers: Peptide Science*, in press.
3. Nomura, W., Tanabe, Y., Tsutsumi, H., Tanaka, T., Ohba, K., Yamamoto, N., and Tamamura, H. (2008) *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1917-1920.

Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker

Wataru Nomura¹, Tomohiro Tanaka¹, Akemi Masuda^{1,2}, Tetsuo Narumi¹, and Hirokazu Tamamura^{1,2*}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 101-0062, Japan; ²Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 113-8510, Japan

E-mail: tamamura.mr@tmd.ac.jp

Novel CXCR4 bivalent ligands which linked two FC131 analogues with rigid linkers were designed and synthesized. The binding of the bivalent ligands showed that the dimer of CXCR4 could be formed by TM4-5 assembly. This bivalent ligand approach could be useful for elucidation of GPCR functions.

Keywords: bivalent; CXCR4; FC131; linker; proline

Introduction

The chemokine receptor CXCR4 is a membrane protein belonging to the family of G protein-coupled receptors (GPCR), which is an attractive drug target. It has been difficult however to obtain structural information pertaining to GPCR which is necessary for drug development. In this study, we designed and synthesized novel CXCR4 bivalent ligands consisting of two molecules of an FC131^{1,2} analogue [*cyclo*(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-D-Cys-)] (Nal = L-3-(2-naphthyl)alanine, **1**), connected by a poly-L-proline or a PEGylated poly-L-proline linker. Poly-L-prolines have been utilized as rigid linkers. Our bivalent ligands with linkers of various length were used to determine the distance between two binding sites of ligands consisting of CXCR4 dimers.

Results and Discussion

In this study, polyproline helices covering 2-8 nm of length, and a PEGylated polyproline-type linker covering the same range of length having both flexible ends owing to the PEG moiety were synthesized (Fig. 1). The binding affinity of the synthetic ligands was evaluated in a competitive binding assay against [¹²⁵I]SDF-1 α as reported previously.² The ligands with the highest affinity in two types of linkers were 18-prolines (**7**, $K_i=13.2$ nM) and 9-prolines-PEG (**13**, $K_i=17.8$ nM). In comparison with monomer controls, **7** and **13** showed 5- and 17-fold increases of binding affinity, respectively.

It is of interest that the maximum increase in binding was observed for linkers of similar length (ca. 5.5-6.5 nm). In the dimer state of CXCR4 there could be some forms. These forms have different distances between the binding pockets of ligands. Utilizing the rhodopsin structure, it was revealed that in TM4-5 assembly form the distance between ligand binding sites is 5.3 nm.

Hypotheses were derived from the increased binding of linkers of the appropriate length that such ligands could be applied as probes specific for CXCR4 on the cell surface

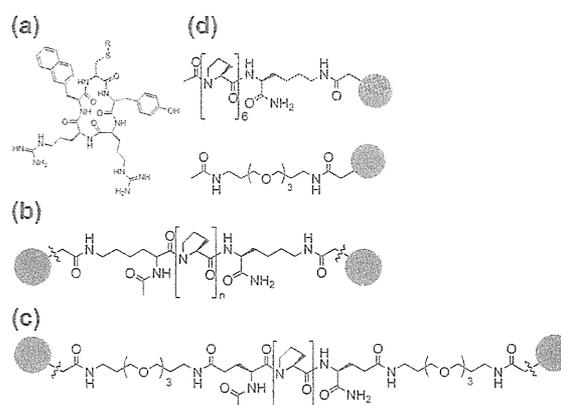


Fig. 1. Design of bivalent ligands against CXCR4 chemokine receptor. As CXCR4 binding moieties, D-Cys FC131, ($R = H$, **1**) and acetamide-capped FC131 ($R = CH_2CONH_2$, **2**) were prepared (a). Two kinds of linkers, poly-L-proline (b, **3-10**, $n=6, 9, 12, 15, 18, 20, 23$, and 27) and PEG-conjugated poly-L-proline (c, **11-16**, $m=3, 6, 9, 12, 15$, and 18), with CXCR4 binding moieties on both ends were prepared (shown as circles). As monomer binding ligands with linkers, Ac6pro FC131 (**17**, d, upper), and AcPEG FC131 (**18**, d, lower) were synthesized.

as the receptors are overexpressed in several kinds of malignant cells and that the dimer formation of the receptor should depend on the expression level. Accordingly, compound **7**, labeled with tetramethylrhodamine (TAMRA-labeled **7**) was synthesized and tested for CXCR4 imaging. To obtain merge images of CXCR4 and ligands, the EGFP gene was fused to C-terminal of the CXCR4 gene and the plasmid containing the gene was transiently transfected. The increase in binding affinity of the bivalent ligand was clearly reflected in the imaging of CXCR4 receptors on the cell surface. When TAMRA-labeled **17** was utilized as a monomer ligand, only a trace of binding was observed. To assess further the binding specificity of bivalent ligands to CXCR4 expressed on the cell surface, FACS analysis utilizing Jurkat cells was performed. It is of interest that bivalent ligand showed clear difference from monomer binding.

In summary, we have presented experimental results concerning the native state of the CXCR4 dimer utilizing the bivalent ligands.

References

1. Tamamura, H., et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 877-882.
2. Fujii, N., et al. (2003) *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 3251-3253.