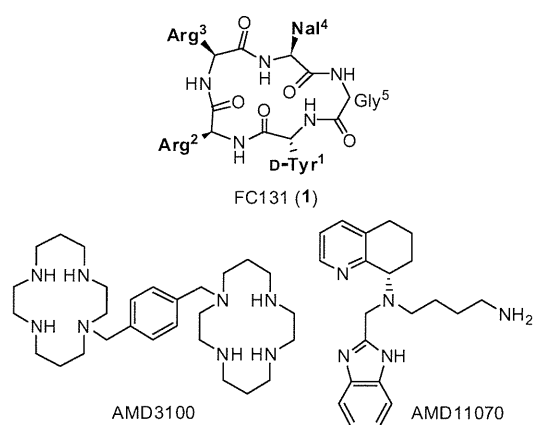


Figure 1. Structures of reported CXCR4 antagonists.



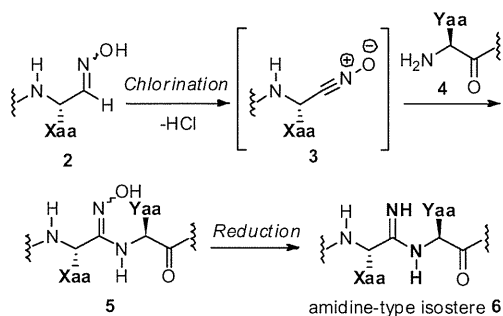
の向上に寄与していることが示唆されている。

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

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

B. 研究方法

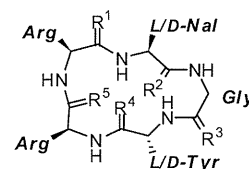
Scheme 1. Synthetic scheme for amidine-type peptide bond isostere **6**.



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

環状アミジン **6** を合成した。FC131 (**1**) のすべてのペプチド結合をそれぞれアミジンに変換した誘導体と、FC131 のナフチルアラニン及び D-チロシン部位の立体異性体を合わせ、計 7 種の誘導体 **7** の合成を計画した (Figure 2)。

Figure 2. FC131 analogs **7** (R^X = O or NH).



(倫理面への配慮)

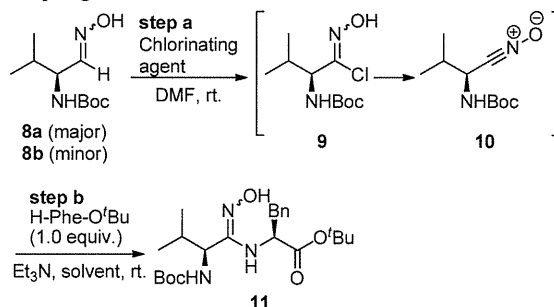
該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

C. 研究結果

アミドキシム合成反応及びアミジンへの変換反応の条件検討

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

Table 1. Optimization of the aldoxime–amino acid coupling conditions.

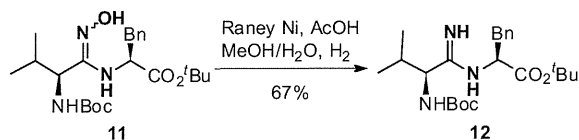


entry	substrate	method ^a	yield (%)
1	8a	A	77
2	8b	A	decomp.
3	8a	B	71 ^b
4	8b	B	81

^a method A: step a: NaOCl aq. (3.0 eq., 30% aqueous sol), Et₃N (3.0 eq.); step b: Et₃N (6.0 eq.)/DCM. method B: step a: NCS (1.1 eq.); step b: Et₃N (4.0 eq.)/Et₂O. ^b When CHCl₃ was used as reaction solvent in step a, the starting material **8a** was recovered.

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

Scheme 2. Conversion of *N*-hydroxyamidine **11** to amidine **12**.

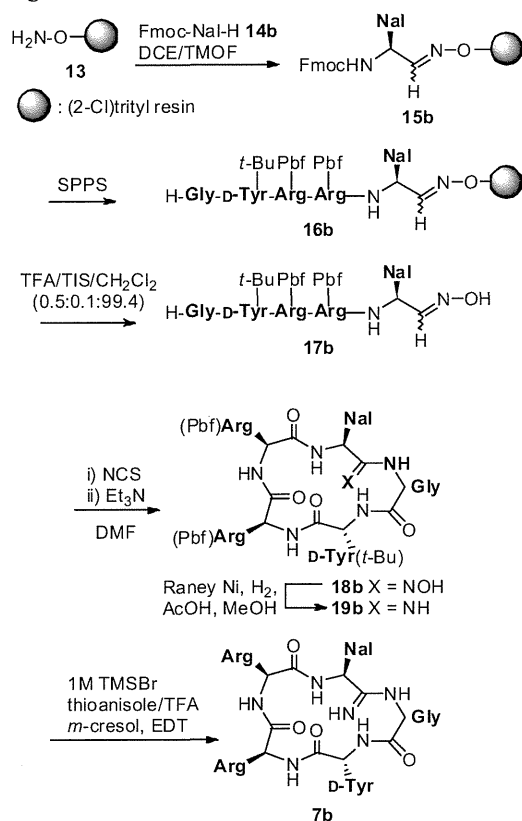


アミジン含有 FC131 誘導体の合成

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

他の部位にイソスターを有する誘導体も同様の反応条件を用いて合成した。最終生成物は HPLC にて単離精製し、総収率 2.1-

Scheme 3. Synthesis of amidine-containing FC131 analogs **7b**.



6.7%にて 7 種のアミジン含有ペプチド **7a-g** が得られた。尚、懸念されたエピメリ化等の副反応は観察されなかった。

活性評価

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

Table 2. Inhibitory activity of FC131 and the derivatives **7a-g** against [¹²⁵I]-SDF-1 binding to CXCR4.

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

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

その結果、5 種の誘導体が FC131 に比べて高い結合阻害活性を示した。中でも Nal-Gly 間をアミジンで置換した誘導体 **7b** は、これまでに報告されている FC131 誘導体類の中で最も高い活性を示した。また、受容体の酸性側鎖との相互作用が報告されている Gly-D-Tyr 間及び Arg-Arg 間のペプチド結合のアミジンへの変換が活性の向上に寄与したことから (Table 2, **7a** 及び **7e**)、アミジン部位が塩基性官能基として機能していることが示唆された。一方、Tyr-Arg 間へのアミジンの導入が活性の低下を招いたことから (Table 2, **7f** 及び **7g**)、Tyr-Arg 間のペプチド結合カルボニル基が活性発現に不可欠であることが示唆された。また、CXCR7 に対する結合阻害は観察されなかった。

続いて、抗 HIV-1 活性を評価した (Table 3)。CXCR4 感受性株である NL4-3 と IIIB を用いた際には強力な抗 HIV-1 活性を示し、

Table 3. Anti-HIV activity of FC131 and the derivatives **7a-g**.

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

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

その強さは、概ね SDF-1 阻害活性評価と同様の傾向にあった。一方、CCR5 感受性株である Ba-L に対しては活性を示さなかった。

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

合成したアミジン含有 FC131 誘導体はすべて強力な選択的 CXCR4 拮抗活性を示し、本化合物群は新たな抗 HIV-1 剤のリード化合物として有望であると考えられる。

3-2: 新規 CXCR4 拮抗剤の受容体結合様式の解明 (平成 23 年度)

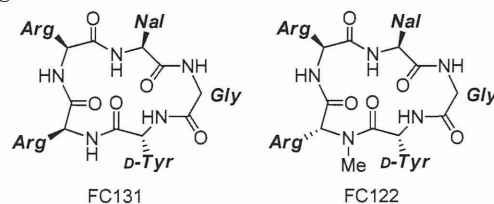
A. 研究目的

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

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

また、さらに詳細な FC131 の構造活性相関研究を行い、Arg² の *N*-メチル化及び立体配置の変換がその活性に影響を及ぼすことを報告した。しかしながら、FC122 の D-Tyr¹-D-MeArg² 間のペプチド結合の約

Figure 1. Structures of FC131 and FC122.

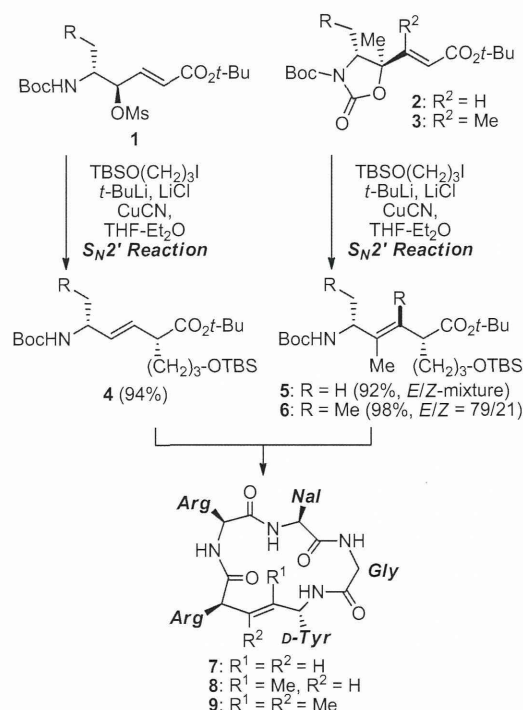


30%はシス配座で存在しており、その活性に寄与するコンフォメーションは明らかでなかった。研究グループでは、シス-トランス異性化を起こさないアルケン型ペプチドイソスターを導入した各種 FC131 誘導体の活性評価と構造解析を行い、FC131 及びその誘導体の活性コンフォメーションを精査した (Figure 1)。

B-C. 研究方法・研究結果 各種誘導体の合成

D-チロシンから誘導したメシラート 1 及びオキサゾリジノン 2, 3 に対する有機銅試薬を用いた S_N2' 反応を鍵反応として FC131 の D-Tyr¹-Arg² ジペプチド部位に相当する 3 種類の (E)-アルケン型ジペプチドイソスター 4-6 を立体選択的に合成した (Scheme 1)。

Scheme 1. Synthesis of alkene isostere-containing FC131 derivatives.



つづいて、得られたジペプチドイソスターを Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖へ導入後、一連の反応により FC131 誘導体 7-9 へと導いた。Arg² に相当するアミノ酸残基

部位のエピマー**10**は同様の合成経路により、イソスター部位を飽和炭素鎖とした誘導体**11**はペプチド**7**を接触水素化反応に付すことにより、それぞれ合成した。

生物活性の評価

得られた各誘導体の生物活性は、放射標識 SDF-1 の CXCR4 への結合に対する阻害活性として評価した。イソスターを含むペプチドのうち、D-Tyr¹-D-MeArg²ジペプチドを変換したペプチド**10**が最も高い活性を示し、この他の誘導体も含めこれまでに得られた FC131 誘導体の構造活性相関と一致する結果が得られた。当該ペプチド結合部分が平面構造とならないペプチド**11**は、受容体結合阻害活性を示さなかった。四置換アルケン型イソスターが *N*-メチルペプチド結合等価体として機能していること、および、FC122 の活性コンフォメーションにおいて、D-Tyr¹-D-MeArg²間のペプチド結合はトランス配座であることが示唆された (Table 1)。

溶液中でのコンフォメーション解析

FC131 とその誘導体の活性コンフォメー

Table 1. Biological activity of FC131 and the derivatives.

Peptide	Sequence	IC ₅₀ (μ M)
FC131	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.084
7	cyclo(-D-Tyr- ψ [(<i>E</i>)-CH=CH]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.33
8	cyclo(-D-Tyr- ψ [(<i>E</i>)-CMe=CH]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.50
9	cyclo(-D-Tyr- ψ [(<i>E</i>)-CMe=CMe]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	2.5
10	cyclo(-D-Tyr- ψ [(<i>E</i>)-CMe=CMe]-D-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.10
11	cyclo(-D-Tyr- ψ [CH ₂ -CH ₂]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	>10
FC162	cyclo(-D-Tyr-MeArg-Arg-Nal-Gly-)	0.29
FC122	cyclo(-D-Tyr-D-MeArg-Arg-Nal-Gly-)	0.063

ションを同定する目的で、ペプチド**7-10**の ¹H-NMR スペクトルを測定した。ペプチド**7-9**は、FC131 とよく似たイソスター部位周辺の NOE パターンを示した一方で、ペプチド**10**は DMSO 溶液中で 2 つのコンフォメーションをとっていることが示唆された (Figure 1)。このうち、コンフォメーション**10-A**の主鎖構造は FC131 とよく類似していた一方、**10-B**の主鎖構造は D-Tyr¹-D-MeArg²ジペプチド部位について FC131 とは異なっていた。

CXCR4 との結合様式の解明

NMR 解析により得られた溶液中でのコンフォメーションと、近年報告された CXCR4 の X 線結晶構造解析の情報をもとに、分子モデリングによる FC131 とその誘導体の結合様式の解析を行った。

まず、FC131 では、Arg²のグアニジノ基が CXCR4 の Asp97 および Asp187 と相互作用しており、Arg²のアミド水素が結晶水を介して Glu288 と水素結合ネットワークを形成していることが示唆された (Figure 2a)。また、Arg³のグアニジノ基は、CXCR4 の His113、Thr117、および Asp171 と相互作用しており、Nal⁴のカルボニル基は Tyr255 および Glu288 の側鎖と結晶水を介する水素結合を形成していた。これらの FC131 のアミノ酸側鎖が関与する相互作用は、以下に示すイソスターを含むペプチド**7-10**においても共通して認められた。

CXCR4 結合時の二置換アルケン型イソ

Figure 1. Superimposed low-energy structures of FC131 (gray) and the isostere-containing derivatives: (a) **7** (blue), (b) **8** (green), (c) **9** (yellow), (d) **10-A** (orange), and (e) **10-B** (pink).

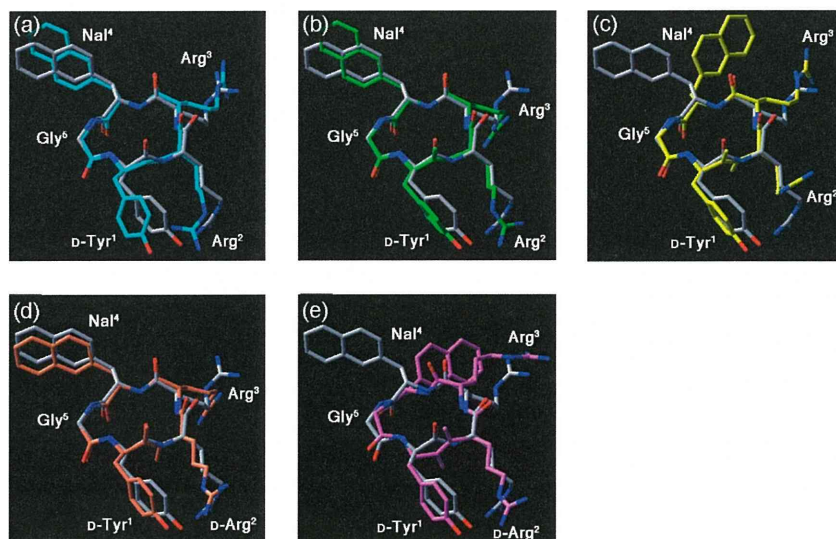


Figure 2. Binding modes of FC131 derivatives: (a) FC131, (b) 7, and (c) 8.

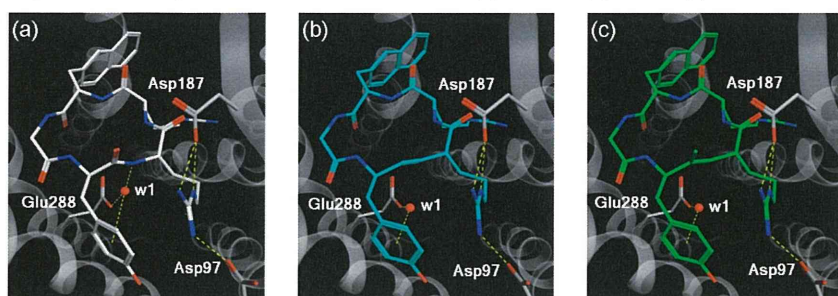
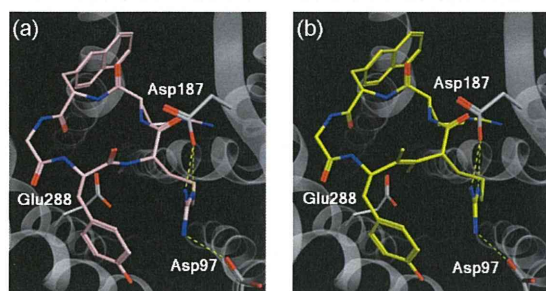


Figure 3. Binding modes of FC131 derivatives: (a) FC162 and (b) 9.

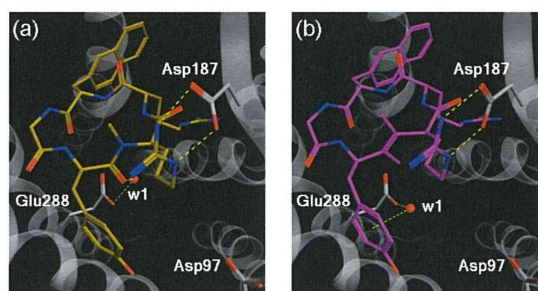


スター含むペプチド7のコンフォメーションはFC131とほぼ同等であり、側鎖の水素結合ネットワークも維持されていた (Figure 2b)。FC131に比べて活性の低下が認められたのは、イソスターの導入により一部の水素結合が失われたことによるものと考えられる。ペプチド8においても、ペプチド7と同様の結合様式が得られ (Figure 2c)、FC131のD-Tyr¹のカルボニル酸素およびペプチド8のイソスター部位のγ-メチル基はいずれも受容体結合には寄与しないことが示唆された。

ペプチド9もまた、FC131と同様の結合様式で受容体と相互作用していたが、イソスターのβ-メチル基の存在により結晶水の位置に水分子を結合様式に含むことができず、水素結合ネットワークの一部が失われていることが示唆された (Figure 3b)。このβ-メチル基はFC162のMeArg²のN-メチル基に相当し、FC162の低活性を裏付けるものである (Figure 3a)。

最後に、ペプチド10の結合様式について検討を行った。まず、FC131と類似したコンフォメーションである10-Aを初期構造としてモデリングを行ったところ、ペプチド7-9の結合様式とよく似たモデルを構築することができた。しかしながら、ペプチド10の優れた活性を裏付ける合理的な解釈を与えることができなかった。このため、もう1つのコンフォメーションである10-B

Figure 4. Binding modes of FC131 derivatives: (a) FC122 and (b) 10.



を用いてモデリングを行ったところ、アルケン部位がフリップした別の結合様式で相互作用していることが示唆された (Figure 4b)。このモデルでは、Arg²のグアニジノ基がAsp187と2つの相互作用をしており、また、イソスターのβ-メチル基がペプチド結合の自由回転を抑制することで受容体への結合の際のエントロピーロスを減弱させていることが示唆された。

さらに、これまでの研究により得られたペптаペプチド骨格を有するCXCR4拮抗剤のうち、最も高い活性を示したFC122の結合様式は、ペプチド10の結合様式をもとに得られたモデルがより妥当なものであると評価できた (Figure 4a)。すなわち、FC122のCXCR4との結合時の構造は、溶液中のコンフォメーションとは異なるものであり、FC122のD-Tyr¹-D-MeArg²ジペプチド周辺の部分構造は、ペプチド10とよく類似していた。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

D. 考察

近年 X 線結晶構造解析による受容体-リガンド複合体構造が報告された CVX15 (16 残基ペプチド) の結合様式をもとに、FC131 およびその誘導体の結合様式解析を行った。

FC131 およびその誘導体は、CVX15 の受容体結合に必須と想定される相互作用をすべて共有していた。すなわち、FC131 の Arg³ と Nal¹ は、CVX15 の Arg² および Nal³ に相当する。この結果は、これまで研究グループが実施してきた T140 の構造活性相関データとも一致するものであり、今後の小分子 CXCR4 拮抗剤の分子設計のための有用な指針を与える知見である。

E. 結論

FC131 の活性コンフォメーションと受容体結合様式を解明する目的で、4 つのアルケン型ジペプチドイソスターを利用した構造活性相関研究を実施した。各誘導体の生物活性評価により、活性発現の鍵となる D-Tyr¹-Arg² ジペプチド部位がトランス配座で受容体と相互作用していることが示唆された。また、NMR による溶液中での構造解析により、ペプチド **10** が他のペプチドとは異なる特徴的なコンフォメーションをとることが明らかとなった。

これらの情報をもとに、最近 X 線結晶構造が明らかにされた CXCR4 との結合様式を解析したところ、FC131 およびその誘導体はいずれもよく似た相互作用様式により受容体と結合している一方で、D-Tyr¹-D-MeArg²-ジペプチド構造もしくはその等価体部分構造を有する FC122 およびペプチド **10** は、当該ジペプチド部位の配座が異なる別の相互作用様式で受容体と結合していることが示唆された。

平成 22 年度の研究で得られたアミジンイソスターを有する新規高活性 CXCR4 拮抗剤とともに、本研究により得られた 2 つの特徴的な結合様式は、今後新たな CXCR4 拮抗剤を創製するための有用な知見になるものと期待される。

3-3 : 新規 CXCR4 拮抗剤の安定性・薬物動態評価 (平成 24 年度)

A. 研究目的

新規 CXCR4 拮抗剤の有効性評価の一環として、平成 22 年度までの研究において創製した FCA003 [cyclo (D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-ψ[-C(=NH)-NH-])] のラット血漿中での安定性評価を行うとともに、マウス尾静脈急速投与後の血中動態、肝臓及び腎臓内の薬剤量を測定することにより、薬物動態に関する知見を得る。

B. 研究方法

CXCR4 拮抗剤のラット血漿中での安定性評価

FCA003 を終濃度 100 µg/mL となるようにラット血漿に添加し、37°C で 30, 60, 120 分間インキュベーションした。各反応溶液に 100%TFA (トリフルオロ酢酸) を 5 mL 添加して混合後、4°C で 12,000 rpm で遠心し、上清を回収して HPLC 分析した。

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の血中濃度推移の評価

FCA003 を生理食塩水に 2 mg/mL となるように溶解し、マウスに投与した (0.2 mg/head)。ネンブタール麻酔下で、後大静脈腹部よりヘパリン処理した注射筒により投与後 5, 15, 30, 120, 180, 240 分後に採血した。ヘパリン処理したチューブに入れ遠心回収した上清 50 µL に 100%TFA を 5 µL 添加した。混合後 4°C で 12,000 rpm で遠心して上清を回収し、HPLC 分析した。

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の肝臓と腎臓内量測定試験

FCA003 を投与後、摘出・保存した肝臓と腎臓の各総重量を測定後、約 100 mg の大きさに切り取り細胞破砕用チューブに入れた。生理食塩水 900 µL を加え、ジリコニアビーズを添加 (1 ビーズ/チューブ) 後、TISSUE LYSER II (QIAGEN 社) にて破砕した (振動数 25 回/秒, 2 分間)。破砕後に 4°C で 40,000 g にて 30 分間遠心し、上清 100 µL を回収した。遠心回収した上清 100 µL に 100%TFA を 10 µL 添加し、混合後 4°C で 12,000 rpm で遠心して上清を回収し、HPLC 分析した。

C. 結果

CXCR4 拮抗剤のラット血漿中での安定性評価

各反応時間の FCA003 を HPLC 分析し、ピーク面積を算出して検量線より残存濃度を算出したところ、下記のような薬剤残存量の変遷が認められた。

時間 (min)	残存量 (µg/mL)	残存率 (%)
0	104.9	100.0
30	103.3	98.5
60	92.2	87.9
120	65.0	62.0

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の血中濃度推移の評価

各採血時間の FCA003 を HPLC 分析し、ピーク面積を算出して検量線より血中濃度を算出したところ、下記のような各時間の薬剤残存量の変遷が認められた。

時間 (min)	残存量 ($\mu\text{g/mL}$)
0	100.0 \pm 0.0
5	10.2 \pm 2.0
15	7.1 \pm 2.5
30	6.5 \pm 2.2
120	2.1 \pm 0.6
180	1.9 \pm 1.1
240	0.6 \pm 0.1

*マウス血液量を2 mLとして計算

片対数グラフによる濃度推移が一相性の減少直線を示したことから、FCA003 は静脈内急速投与後、速やかに全身へ比較的均一に分布することが推測された。そこで、one-compartment PK model による動態解析を実施した。理論曲線による実データへのカーブフィッティング、PK パラメータの算出には動態解析プログラム「MULTI」を使用した。実データと理論曲線との一致(計算結果)は良好であり、FCA003 の血中濃度-時間推移は one-compartment model で再現できることが示唆された。

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の肝臓と腎臓内量測定試験

各採血時間に摘出した肝臓及び腎臓より調製したサンプルを HPLC 分析し、ピーク面積を算出して検量線より肝臓及び腎臓内の化合物量を算出した。時間の経過とともに、肝臓及び腎臓抽出液中に FCA003 の分布が認められた。

時間 (min)	肝臓中 (μg)	腎臓中 (μg)	血液中 (μg)
0	0.0	0.0	200.0*
5	-1.2	0.1	20.4
15	-1.1	0.5	14.4
30	0.1	1.0	13.0
120	1.7	3.3	4.2
180	1.3	4.3	3.8
240	1.3	3.4	1.2

*マウス血液量を2 mLとして計算

D. 考察

ラット血漿中安定性試験より、FCA003 は120分の反応で62%の残存量を示したことから、ラット血漿中での半減期は約180

分と推定された。各採血時間に対応する血中濃度に基づき、one-compartment PK model による動態解析を実施した。

代表的なPKパラメータは以下の通りである。投与量を200 $\mu\text{g}/30\text{ g}$ /匹とすると、Div = 6667 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となる。推定された初期濃度(P1)が $C_0 = 9.7\ \mu\text{g}/\text{mL}$ なので、分布容積(V_d)は $\text{Div}/C_0 = 684\ \text{mL}/\text{kg}$ となる。この値はマウスの生理的なtotal body water space = 725 mL/kgと非常に近い値であることから、FCA003は投与後速やかに全身へ分布するものと推測された。

半減期($t_{1/2}$)は56.8分、平均滞留時間(MRT)は81.9分となり、約1時間で血中濃度が半減するという、静脈投与後の血中濃度推移を予測しやすい結果となった。

全身クリアランス(CL_{tot})は8.35 mL/min/kgとなり、マウスの肝臓血流速度(90 mL/min/kg)や腎臓血流速度(65 mL/min/kg)、糸球体濾過速度(14 mL/min/kg)と比較しても小さい数値であり、それほど極端に大きな全身クリアランス値ではなかった。

各採血時間でのHPLC-UV分析チャートから、5, 15, 30分ではFCA003のピークの減少は認められるが代謝物はほとんど観察されず、120, 180, 240分ではFCA003のピークの減少とともに代謝物と思われるピークの増加が観察された。これはin vitroラット血漿中安定性試験の結果と一致した。

FCA003 の受容体結合阻害活性の IC_{50} 値は9.4 nMであり、これは分子量を約1,000とした場合0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当し、今回の血中濃度は十分に有効血中濃度を維持していると推察される。さらに、 $C_p(t) = C_0 \cdot \exp(-k_e \cdot t)$ の理論式から計算すると、 IC_{50} 値以上の血中濃度を維持する時間は投与後約9時間であると予想された。

また、FCA003 をマウス尾静脈急速投与し5, 15, 30, 120, 180分後に摘出した肝臓及び腎臓より調製したサンプルをHPLC分析した結果、時間の経過とともに腎臓及び肝臓にFCA003が検出された。この結果は、FCA003が静脈内急速投与後に速やかに全身へと比較的均一に分布することと矛盾しないと考えられる。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究協力先である京都薬科大学の同動物実験委員会によって規定された動物実験ガイドラインに基づいて適切に

実施した。

E. 結論

FCA003 をラット血漿中に添加してインキュベーション後、HPLC 分析を行ったところ、120 分後に約 4 割程度が分解されることが判明した。また、FCA003 を静脈投与後、継時的に採血を行い、薬物の血中濃度の推移を精査したところ、速やかに全身へ比較的均一に分布することが推測された。さらに、FCA003 を静脈投与し 5, 15, 30, 120, 180 分後の肝臓及び腎臓中の薬剂量を定量分析したところ、時間の経過とともに腎臓及び肝臓に FCA003 が検出された。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Nakamura S, Nakano H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, Matsuoka M, Kodama EN. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Res.* 87(2) 179-186 (2010)
2. Oishi S, Watanabe K, Ito S, Tanaka M, Nishikawa H, Ohno H, Shimane K, Izumi K, Sakagami Y, Kodama EN, Matsuoka M, Asai A, Fujii N. Affinity selection and sequence-activity relationships of HIV-1 membrane fusion inhibitors directed at the drug-resistant variants. *Med. Chem. Commun.* 1(4) 276-281 (2010)
3. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. The essential functions of adiposteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33(3) 387-399 (2010)
4. Mandawat A, Fiskus W, Buckley KM, Robbins K, Rao R, Balusu R, Navenot JM, Wang ZX, Ustun C, Chong DG, Atadja P, Fujii N, Peiper SC, Bhalla K. Pan-histone deacetylase (HDAC) inhibitor panobinostat depletes CXCR4 levels and signaling and exerts synergistic anti-myeloid activity in combination with CXCR4 antagonists. *Blood*, 116(24) 5306-5315 (2010)
5. Martin SK, Diamond P, Williams SA, To LB, Peet DJ, Fujii N, Gronthos S, Harris AL, Zannettino AC. Hypoxia-inducible factor-2 is a novel regulator of aberrant CXCL12 expression in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica*, 95(5) 776-784 (2010)
6. Gravel S, Malouf C, Boulais PE, Berchiche YA, Oishi S, Fujii N, Leduc R, Sinnott D, Heveker N. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits β -arrestin to CXCR7 roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* 285(49) 37939-37943 (2010)
7. Shimura K, Nameki D, Kajiwarra K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically constrained HIV-1 fusion inhibitors. *J. Biol. Chem.* 285(50) 39471-39480 (2010)
8. Noda M, Omatsu Y, Sugiyama T, Oishi S, Fujii N, Nagasawa T. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK cell development in adult mice. *Blood*, 117(2) 451-458 (2011)
9. Inokuchi E, Yamada A, Hozumi K, Tomita K, Oishi S, Ohno H, Nomizu M, Fujii N. Design and synthesis of amidine-type peptide bond isostere: application of nitrile oxide derivatives as active ester equivalents to peptide and peptidomimetics synthesis. *Org. Biomol. Chem.* 9(9) 3421-3427 (2011)
10. Xu C, Liu J, Chen L, Liang S, Fujii N, Tamamura H, Xiong H. HIV-1 gp120 enhances outward potassium current via CXCR4 and cAMP-dependent protein kinase a signaling in cultured rat microglia. *Glia*, 59(6) 997-1007 (2011)
11. Masuda R, Oishi S, Ohno H, Kimura H, Saji H, Fujii N. Concise site-specific synthesis of DTPA-peptide conjugates: application to imaging probes for the chemokine receptor CXCR4. *Bioorg. Med. Chem.* 19(10) 3216-3220 (2011)
12. Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres. *ACS Med. Chem. Lett.* 2(6) 477-480 (2011)
13. Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianosc SG, Kodama E.

- Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effect on T-20. *Antivir. Chem. Chemother.* 22(1) 51-55 (2011)
14. Dar A, Schajnovitz A, Lapid K, Kalinkovich A, Itkin T, Ludin A, Kao W, Battista M, Tesio M, Kollet O, Cohen NN, Margalit R, Buss EC, Baleux F, Oishi S, Fujii N, Larochelle A, Dunbar CE, Broxmeyer HE, Frenette PS, Lapidot T. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 25(8) 1286-1296 (2011)
 15. Kuil J, Yuan H, Buckle T, van den Berg NS, Oishi S, Fujii N, Josephson L, van Leeuwen FWB. Synthesis and evaluation of a bimodal CXCR4 antagonistic peptide. *Bioconjug. Chem.* 22(5) 859-864 (2011)
 16. Nishizawa K, Nishiyama H, Matsui Y, Kobayashi T, Kotani H, Masutani H, Oishi S, Saito R, Toda Y, Fujii N, Yodoi J, Ogawa O. Thioredoxin interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 32(10) 1459-1466 (2011)
 17. Buckle T, Van den Berg NS, Kuil J, Bunschoten A, Oldenburg J, Borowsky AD, Wesseling J, Masada R, Oishi S, Fujii N. Van Leeuwen, F.B. Non-invasive longitudinal imaging of tumor progression using an ¹¹¹Indium labeled CXCR4 peptide antagonist. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2(1) 99-109 (2012)
 18. Yoshikawa Y, Kobayashi K, Oishi S, Fujii N, Furuya T. Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: new insight into CXCR4-FC131 interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(6) 2146-2150 (2012)
 19. Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives. *Future Med. Chem.* 4(7) 837-844 (2012)
 20. Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, Ohno H, Yoshikawa Y, Furuya T, Hoshino M, Fujii N. Structure–activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4) antagonist FC131 using a series of alkene dipeptide isosteres. *J. Med. Chem.* 55(6) 2746-2757 (2012)
 21. Oishi S, Fujii N. Peptide and peptide-mimetic ligands for CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). *Org. Biomol. Chem.* 10(30) 5720-5731 (2012)
 22. Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Yano Y, Matsuzaki K, Navenot JM, Peiper SC, Fujii N. Paradoxical downregulation of CXC chemokine receptor 4 induced by polyphemusin II-derived antagonists. *Bioconjug. Chem.* 23(6) 1259-1265 (2012)
 23. Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One.* 7(5) e37163 (2012)
 24. Li X, Qian H, Miyamoto F, Naito T, Kawaji K, Kajiwara K, Hattori T, Matsuoka M, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Kodama EN. A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424(2) 257-261 (2012)
 25. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-*c*][1,3]-benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org. Biomol. Chem.* 10(33) 6792-6802 (2012)
 26. Otani Y, Kijima T, Kohmo S, Oishi S, Minami T, Nagatomo I, Takahashi R, Hirata H, Suzuki M, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Fujii N, Kumanogoh A. Suppression of metastases of small cell lung cancer cells in mice by a peptidic CXCR4 inhibitor TF14016. *FEBS Lett.* 586(20) 3639-3644 (2012)
 27. Zhang Y, Patel S, Abdelouahab H, Wittner M, Willekens C, Shen S, Betems A, Joulin V, Opolon P, Bawa O, Pasquier F, Ito M, Fujii N, Gonin P, Solary E, Vainchenker W, Coppo P, De Botton S, Louache F. CXCR4

- inhibitors selectively eliminate CXCR4-expressing human acute myeloid leukemia cells in NOG mouse model. *Cell Death Dis.* 3, e396 (2012)
28. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-*c*][1,3]-benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.* 20(21) 6434-6441 (2012)
 29. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem. Biol.* 19(11) 1437-1446 (2012)
 30. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(4) 908-915 (2013)
 31. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photo-affinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg. Med. Chem.* 21(7) 2079-2087 (2013)
- ## 2. 学会発表
1. 増田 亮、大石真也、棚原憲子、大野浩章、平澤 明、辻本豪三、矢野義明、松崎勝巳、藤井信孝 蛍光標識 CXCR4 受容体リガンドの創製と応用 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム (京都) 2010 年 11 月
 2. Inokuchi E, Tomita K, Oishi S, Ohno H, Fujii N. A novel approach to peptide synthesis using nitrile oxide components. 5th International Peptide Symposium (京都) 2010 年 12 月
 3. Kobayashi K., Hayashi, R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Naito T., Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis of alkene-type dipeptide isosteres and its application to structure-activity relationship study on a CXCR4 antagonist FC131. 5th International Peptide Symposium (京都) 2010 年 12 月
 4. 小林数也、林亮子、大石真也、久保達彦、大野浩章、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成と CXCR4 拮抗剤 FC131 の構造活性相関研究への応用 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 29 日
 5. 井ノ口恵利子、山田 愛、大石真也、久保達彦、大野浩章、保住健太郎、野水基義、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 アミジン型ペプチド結合等価体の合成と応用、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
 6. Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, Ohno H, Naito T, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study on a CXCR4 antagonist FC131 using alkene-type dipeptide isosteres. 22nd American Peptide Symposium (サンディエゴ) 2011 年 6 月
 7. Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis and biological evaluation of novel CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres. 22nd American Peptide Symposium (サンディエゴ) 2011 年 6 月
 8. Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Gozoh Tsujimoto, Yoshiaki Yano, Katsumi Matsuzaki, and Nobutaka Fujii. Synthesis and application of fluorescent SDF-1 derivatives. 22nd American Peptide Symposium (サンディエゴ) 2011 年 6 月
 9. Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Yano Y, Matsuzaki K, Nakase I, Futaki S, Fujii N. Internalization of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) induced by polyphemusin II-derived antagonist peptides. 第 48 回ペプチド討論会 (札幌) 2011 年 9 月
 10. Mizuhara T., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Diversity-oriented synthesis of pyrimido [1,2-*c*][1,3]benzothiazin-6-imine and the related tricyclic heterocycles. Nature Chemical Biology Symposium 2011: Cancer Chemical Biology (ボストン) 2011 年 10

月

11. Oishi S, Masuda R, Tanahara N, Ohno H, Yano Y, Matsuzaki K, Hirasawa A, Tsujimoto G, Fujii N. Development and application of fluorescent probes for monitoring CXCR4 receptor internalization. Nature Chemical Biology Symposium 2011: Cancer Chemical Biology (ボストン) 2011年10月
 12. 小林数也、大石真也、井ノ口恵利子、林亮子、富田健嗣、久保達彦、棚原憲子、大野浩章、藤井信孝、吉川寧、古谷利夫、志村和也、松岡雅雄、アルケン型及びアミジン型ジペプチドイソスターの合成とCXCR4拮抗剤の構造活性相関研究への応用、第37回反応と合成の進歩シンポジウム(徳島)2011年11月
 13. 水原司、大石真也、藤井信孝、大野浩章、C-H官能基化反応、及び芳香族求核置換反応によるピリミド[1,2-c]ベンゾチアジン-6-イミンとその誘導体の効率的合成法の開発、第31回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」(京都)2011年11月
 14. Mizuhara T, Oishi S, Fujii N, Ohno H. Efficient synthesis of pyrimido[1,2-c]benzothiazin-6-imine and related tricyclic heterocycles bicyclic heterocycles by Cu(II)-mediated C-H functionalization and aromatic nucleophilic substitution. AIMECS11(東京)2011年12月
 15. Kubo T, Inokuchi E, Oishi S, Ohno O, Shimura S, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres. AIMECS11(東京)2011年12月
 16. 水原司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 Synthesis and structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives for development of anti-HIV agents. The 7th SKO Joint Symposium for Young Scientists(京都)2012年5月
 17. 水原司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 ピリミドベンゾチアジン誘導体の新規合成法の開発と抗HIV剤を指向した構造活性相関研究 第6回日本ケミカルバイオロジー学会年会(京都)2012年6月
 18. Tsukasa Mizuhara, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Nobutaka Fujii Efficient synthesis of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives and its application to structure-activity relationship study of anti-HIV agents. The 6th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Science(大阪)2012年9月
 19. 水原司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 ピリミドベンゾチアジン誘導体の合成法の開発と抗HIV剤の構造活性相関研究への応用 第42回複素環化学討論会(京都)2012年10月
 20. 水原司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 ピリミドベンゾチアジン誘導体の新規合成法の開発と抗HIV剤を指向した構造活性相関研究 平成24年度日本薬学会近畿支部大会(兵庫)2012年10月
 21. 久保達彦、大石真也、大野浩章、藤井信孝 CXCR4アンタゴニストFC131をリードとする新規CXCR7選択的リガンドの開発平成24年度日本薬学会近畿支部大会(兵庫)2012年10月
 22. Tsukasa Mizuhara, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, and Nobutaka Fujii. Synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives. IKCOC-12(京都)2012年11月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 1. 新規ケモカイン受容体拮抗剤
日本：特願2011-044035：出願(2011年3月1日)
外国(PCT)：JP2012/055099：出願(2012年2月29日)
発明者：藤井信孝、大野浩章、大石真也、井ノ口恵利子、久保達彦、松岡雅雄、志村和也；出願者：京都大学
 2. ピリミドベンゾチアジン-6-イミン誘導体またはその塩を含有するウイルス感染症の治療および/または予防のための薬剤
日本：特願2011-105642：出願(2011年5月10日)

日本：特願2012-50334：優先権出願（2012年3月7日）

外国（PCT）：JP2012/061890：出願（2012年5月9日）

発明者：前田英樹、加藤貴之、松岡雅雄、志村和也、藤井信孝、大野浩章、大石真也、水原司；出願者：京都大学、富士フイルム

2. 実用新案登録

該当事項無し

3. その他

該当事項なし

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡雅雄

研究分担者：国立感染症研究所エイズ研究センター 村上 努

研究要旨：新規 CXCR4 阻害剤 KRH-3955 を材料として試験管内で薬剤耐性誘導を行い、耐性変異のパターンや耐性機構を解析することにより、より耐性の出にくい薬剤の設計や耐性変異パターンの予測を行うことが本分担研究の最終目的である。H22 年度は KRH-3955 と KRH-3148（対照薬剤として、AMD3100 と AMD070）を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験（耐性誘導約 2 年）で得られた感染細胞から抽出した DNA について HIV-1 Env 領域全体を PCR 法にて増幅し、この領域に蓄積された変異を解析した。その結果、得られた耐性 HIV-1 株の Env 領域中の V3, V4 領域に共通した変異が認められ、いずれの CXCR4 阻害剤から誘導された耐性 HIV-1 由来 Env 組換え株もすべての CXCR4 阻害剤に対して同時に耐性を獲得していることが明らかにした。H23 年度では、得られた CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の HIV-1 コレセプター利用能に変化がないことを示した。H24 年度では、1) 耐性 HIV-1 由来 Env 組換え株もすべての CXCR4 阻害剤に対して同時に耐性を獲得していることを耐性誘導に使用した PM1/CCR5 細胞を用いて確認した。さらに、耐性 HIV-1 由来 Env 組換え株において特に gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体に対する感受性が著しく上昇しているという興味深い結果を得た。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

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

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

(2) で増幅した Env 領域を NL4-3 の対応する領域と入れ替えた Env 組換え NL4-3 の作製を pNL4-3 から作製したプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトして調製した。

(4) H22 年度に作製した CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 の CXCR4 阻害剤感受性を MT-4 細胞および耐性誘導に使用した PM1/CCR5 細胞（共同研究者 熊本大・前田先生分与）によって評価した。ウイルス複製抑制活性の評価は、MTT 試験によって行った。

(5) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株のコレセプター利用能の検討：

作製した CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 のコレセプター利用能を標的細胞として、U87. CD4、

U87. CD4. CXCR4、U87. CD4. CCR5 をウイルス対照として、NL4-3 と R5 HIV-1 である NL(AD8) を使用した。コレセプター利用能を評価するためのウイルス複製能の測定は、ウイルス感染後 5 日目の培養上清中の p24(CA) 抗原濃度によって行った。

(6) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性試験：

作製した CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 (および対照としての NL4-3) の中和抗体感受性試験を TZM-bl 細胞

(NIH AIDS Reagent Program より分与) を標的細胞として、1) gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体である 447-52D (Polmum Scientific)、2) gp41 の膜貫通領域近傍をエピトープとする中和抗体である 2F5 (NIH AIDS Reagent Program) についてウイルス感染価の中和能を測定した。

(倫理面での配慮)

本研究で使用を予定する複製可能な組換えウイルスは大臣確認を得ている(大 19-6 および大 17-23) ほか、組換え DNA 実験の申請は本研究所に機関承認されている(機 19-63 ほか)。

C. 研究結果

(1) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験：

PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、NL4-3 を親株とした薬剤耐性株誘導実験を 2007. 10. 11 に開始した。実験開始時の薬剤濃度は EC₅₀ よりやや低い濃度に設定し、ほぼ 4 日おきに 1:5 に培養物を継代した。ウイルス感染による CPE が培養全体に観察されるようになった時点で薬剤濃度を 1.5 倍上昇させた。なお、コントロールとして薬剤無添加での感染細胞の継代培養(この場合は、CPE でほぼ完全に細胞が死滅するので培養上清のみを継代した)も併行して行った(図 1)。今回 DNA を抽出した感染細胞を採取した 2009 年 9 月の時点での薬剤濃度は、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 でそれぞれ 15、750、3000、4500 nM である。

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

4 種の Forward, Reverse のプライマーセットを用いて増幅した Env 領域断片の塩基配

列を決定した結果、V3 領域にお互いに一部共通した置換変異が認められた(図 2)。いずれの CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 においても、認められた V3 領域の変異は、AMD3100 耐性 HIV-1 株で報告されている変異と部分的にオーバーラップしていた(図 2)。V4 領域において、KRH-3148 と AMD070 に共通した 5 アミノ酸の欠失変異が認められた(図 3)。

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

MT-4 細胞を用いた場合、いずれの CXCR4 阻害剤から誘導された CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 由来の Env 組換え NL4-3 も 4 種すべての CXCR4 阻害剤に対して同時に薬剤耐性を獲得していた(表 1)。同様の結果が PM1/CCR5 細胞を標的細胞としたときにも得られた(表 2)。

(4) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株のコレセプター利用能の検討：

H22 年度に作製した CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 は、U87. CD4 や U87. CD4. CCR5 では感染・複製せず、U87. CD4. CXCR4 細胞においてのみその複製が認められた。すなわち、組換え NL4-3 はすべて親株である NL4-3 と同様 X4 コレセプター利用能表現系を示した(表 3)。

(5) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性試験：

いずれの CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 も gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体である 447-52D および gp41 の膜貫通領域近傍をエピトープとする中和抗体である 2F5 に対する感受性が上昇していた。特に、KRH-3955 と KRH-3148 耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 は、447-52D に対して 5-40 倍、2F5 に対して 5 倍と顕著にその中和抗体感受性が上昇していた。(表 4)。

D. 考察

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

2) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異はコレセプター利用能の変化(X4

から R5) を伴わないで数倍程度の薬剤耐性を可能にした。より高度な CXCR4 阻害剤耐性を獲得する場合にのみコレセプター利用能の変化が必要になるのかもしれない。

3) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異は、Env を標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異であり、実際に HIV 感染者体内で今回使用した CXCR4 阻害剤を投与した場合は、出現しても淘汰される可能性が示唆された。

E. 結論

今回検討している 4 種の CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域中の V3, V4 領域に共通した変異が認められた。また、いずれの CXCR4 阻害剤から誘導された耐性 HIV-1 由来 Env 組換え株もすべての CXCR4 阻害剤に対して同時に耐性を獲得しており、作用機序の近似が推察された。また、上記の CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域中変異は Env を標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異でもあることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami, T and N. Yamamoto. The role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target (Review). *Future Microbiology*, 5 (7): 1025-1039, 2010.
2. Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists. *Chem. Med. Chem.*, 6: 834-839, 2011.
3. Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa W, Sohma A, Itotani K, Kawamata M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Pharmacophore-based small molecule CXCR4 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 4169-4172, 2012.
4. Nakasone T, Murakami T, Yamamoto N: Double oral administrations of

emtricitabine/tenofovir prior to virus exposure protects against highly pathogenic SHIV infection in macaques. *Jpn J Infect Dis* 65: 345-349, 2012.

5. Nakasone T, Kumakura S, Yamamoto M, Murakami T, Yamamoto N: Single oral administration of the novel CXCR4 antagonist, KRH-3955, induces an efficient and long-lasting increase of white blood cell count in normal macaques, and prevents CD4 depletion in SHIV-infected macaques: A preliminary study. *Med Microbiol Immunol* doi 10.1007/s00430-012-0254-1, 2012.
6. Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Low-molecular-weight CXCR4 ligands with variable spacers. *Chem Med Chem* 8(1): 118-124, 2013.

2. 学会発表

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

図1. CXCR4阻害剤耐性HIV-1の誘導方法

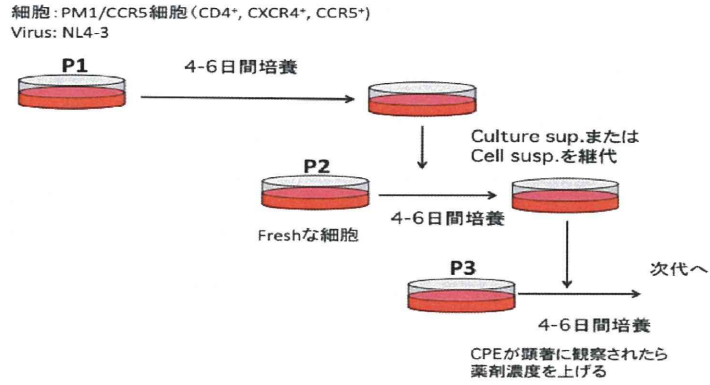


図2. CXCR4阻害剤耐性HIV-1株のV3 loop配列

NL4-3 CTRPN-NNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHC
 NL4-3
 (Passage Control) -----
 KRH-3955^R -----I--R--H-----D-----
 KRH-3148^R -----I--R-----T-----T--
 AMD3100^R -----R-----T-----D-----
 AMD070^R -----R-----T-----T--
 AMD3100^R -----YES-T-R--H-----V--H--T--
 (JVI, 70, 689, 1996)

図3. CXCR4阻害剤耐性HIV-1株のV4 loop配列

NL4-3 CNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPC
 NL4-3
 (Passage Control) -----
 KRH-3955^R -----
 KRH-3148^R -----*****-----
 AMD3100^R -----
 AMD070^R -----*****-----
 AMD3100^R -----*****-----
 (JVI, 70, 689, 1996)

表1. Env組換えHIV-1株の各CXCR4阻害剤に対する耐性度

Virus	EC ₅₀ (nM)				
	KRH-3955 (fold increase)	KRH-3148	AMD3100	AMD070	AZI
NL4-3	4.4 (1.0)	7.9 (1.0)	49 (1.0)	54 (1.0)	178 (1.0)
NL4-3 (passage control)	4.9 (1.1)	10 (1.3)	49 (1.0)	60 (1.1)	187 (1.1)
KRH-3955 ^R	17 (3.8)	71 (9.0)	278 (5.7)	402 (7.4)	194 (1.1)
KRH-3148 ^R	15 (3.4)	40 (5.1)	176 (3.6)	303 (5.6)	36 (0.20)
AMD3100 ^R	13 (3.0)	41 (5.2)	171 (3.5)	254 (4.7)	221 (1.2)
AMD070 ^R	18 (4.1)	76 (9.6)	280 (5.7)	379 (7.0)	21 (0.11)

表2. CXCR4阻害剤耐性HIV-1Env組換え株の各種CXCR4阻害剤に対する耐性度

Virus	EC ₅₀ (nM) in PM1/CCR5 cells				
	KRH-3955 (fold increase)	KRH-3148	AMD3100	AMD070	T141
NL4-3	1.1 (1.0)	4.5 (1.0)	54 (1.0)	22 (1.0)	25 (1.0)
NL4-3 (passage control)	1.4 (1.3)	9.2 (2.0)	87 (1.6)	50 (2.3)	44 (1.8)
KRH-3955 ^R	7.8 (7.1)	85 (19)	724 (13)	335 (15)	123 (4.9)
KRH-3148 ^R	11 (1.0)	129 (29)	834 (15)	451 (21)	172 (6.9)
AMD3100 ^R	6.3 (5.7)	67 (15)	670 (12)	263 (12)	107 (4.3)

表3. CXCR4阻害剤耐性HIV-1のCoreceptor利用能

p24 (ng/ml) at day 5 after infection

Virus	U87.CD4	U87.CD4.CXCR4	U87.CD4.CCR5
NL4-3	<0.05	>50	<0.05
NL4-3 (passage control)	<0.05	>50	<0.05
NL(AD8)	<0.05	<0.5	>50
KRH-3955 ^R	<0.05	>50	<0.05
KRH-3148 ^R	<0.05	>50	<0.05
AMD3100 ^R	<0.05	>50	<0.05
AMD070 ^R	<0.05	>50	<0.05

表4. CXCR4阻害剤耐性HIV-1Env組換え株の各種中和抗体に対する感受性の比較

Virus	IC ₅₀ (nM) in TZM-bl cells		
	447-52D (fold increase)-Exp1	447-52D (Exp2)	2F5
NL4-3	1.6 (1.0)	3.7 (1.0)	1.8 (1.0)
NL4-3 (passage control)	>10 (>6.3)	>10 (>2.7)	3.6 (2.0)
KRH-3955 ^R	0.04 (0.025)	0.076 (0.021)	0.28 (0.16)
KRH-3148 ^R	0.27 (0.17)	0.27 (0.073)	0.43 (0.24)
AMD3100 ^R	1.2 (0.75)	0.76 (0.21)	0.81 (0.45)
AMD070 ^R	3.9 (2.4)	1.4 (0.38)	0.96 (0.53)

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄
研究分担者：京都大学ウイルス研究所 助教 志村 和也

研究要旨 抗 HIV 活性を有する PD 404182 誘導体の作用機序を明らかにするために、time of drug addition assay を行った結果、吸着阻害剤である DS5000 と同様のプロファイルが確認されたことから、PD 404182 は HIV 感染最初期に作用点を有している可能性が高い。また、予めウイルスを PD 404182 で処理した時のみに抗 HIV 活性が認められたことから、本薬剤の作用点はウイルス側に存在することが明らかになった。さらに、マウスに対する毒性評価を行った結果、耐容性が高いことが判明した。

A. 研究目的

当研究グループでは、抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングにより、PD 404182 を新規抗 HIV 薬候補化合物として見出している。本年度は、本化合物および高活性誘導体の作用機序を推測することを目的とし、種々の評価法を用いて解析した。さらに、本化合物のマウスに対する毒性を評価した。

B. 研究方法

Time of drug addition assay (平成 24 年度)

本評価法には、HeLa-CD4/CCR5-LTR/beta-galactosidase (MAGI/CCR5)細胞を用いた。96-well プレートに播種した本細胞に、HIV-1_{IIIB} を感染させ、感染から 0、2、4、6、8、10、12、24、および 48 時間後に PD 404182 および高活性誘導体を添加した。作用点既知の各種抗 HIV 剤 [DS5000 (吸着阻害剤)、T-20 (融合阻害剤)、AZT (核酸系逆転写酵素阻害剤)、NVP (非核酸系逆転写酵素阻害剤)、RAL (インテグラーゼ阻害剤)] を対照として用いた。上記の各種化合物は、予め算出した EC₉₀ 値 (HIV-1 の感染を 90% 阻止する濃度) で用い、抗 HIV 活性は、multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) 法により評価した。

作用点の解析 (平成 24 年度)

化合物の前処理群として、高タイターの HIV-1_{IIIB} 粒子と 100 μM の PD 404182 を混合し、37°C で静置した。90 分後、本混合物を

1000 倍希釈し、MAGI/CCR5 細胞に感染させた。一方、後処理群では、PD 404182 の代わりに終濃度を揃えた DMSO と同タイターのウイルス粒子を混合した。本混合物を細胞に添加する際に 100 nM の PD 404182 を加えた。両群とも感染 48 時間後に MAGI 法によりウイルス粒子の感染性を評価した。

化合物添加タイミングの抗 HSV-2 活性への影響 (平成 24 年度)

PD 404182 の高活性誘導体 10 μM で 60 分、30 分および 15 分処理した野生型 HSV-2 をそれぞれ Vero 細胞に感染させた。また、未処理野生型 HSV-2 を感染させた細胞に、感染後 0 分、15 分、30 分および 60 分後に同化合物を 10 μM になるように添加した。上記の処理による抗 HSV-2 活性は、プラーク法で評価した。

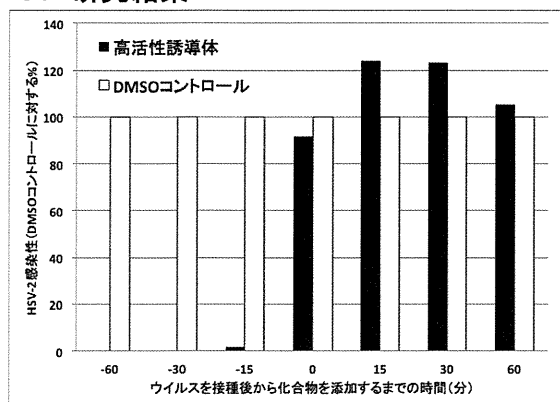
PD 404182 のマウス毒性試験 (平成 24 年度)

日本クレアより入手した Jcl:ICR マウス (雌・6 週齢) に対して、PD 404182 を 30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg、あるいは 1 mg/kg で 1 日 1 回の腹腔内投与を行い、これを 3 日連続で行った。その後 1 週間にわたり、体重の増減を指標として評価した。溶媒コントロールとして、1%DMSO 溶液を用いた。

(倫理面への配慮)

本動物実験は京都大学ウイルス研究所内で行い、京都大学が定める動物実験の指針に沿って行った。

C. 研究結果



Time of drug addition assay

本評価法では、作用点既知の抗 HIV 剤を用いて、ウイルス感染後の経時的な抗 HIV 活性プロファイルと比較することにより、標的化合物の作用点を推測するものである。本試験では、ウイルスのライフサイクル順に、吸着・融合・逆転写・インテグレーションの各ステップに対する阻害剤を対照に用いて、PD 404182 および高活性誘導体の作用機序解明を試みた。その結果、PD 404182 および試験に用いた全ての高活性誘導体は、いずれも吸着阻害剤である DS5000 に類似のプロファイルを示した。

作用点の解析

本解析では、PD 404182 の作用点がウイルス側に存在するのか、標的細胞側に存在するのかを明らかにすることを目的とした。PD 404182 の高濃度溶液 (100 μ M) で予め処理した HIV-1 (前処理群) は、溶媒コントロールの対照群と比較して、1%以下の感染性を示した。一方、細胞感染時に PD 404182 を加えた HIV-1 (後処理群) は、約 80%程度の感染性を有していた。AZT を用いて同様の実験を行ったが、前処理群、後処理群とも約 70~80%程度の感染性を有していた。

化合物添加タイミングの抗 HSV-2 活性への影響

HSV-2 感染系を用いて、PD 404182 の高活性誘導体を添加するタイミングが抗 HSV-2 活性に与える影響を精査した。その結果、本化合物で予め 60 分、30 分、15 分処理した HSV-2 粒子では、いずれも感染性が失われていた (図 1)。一方、感染と同時に本化

合物を添加した HSV-2 には、溶媒コントロールと同程度の感染性が認められた。また、感染から 15 分、30 分、60 分後に本化合物を添加しても、まったく抗 HSV-2 活性は認められなかった。

図 1. 化合物添加タイミングによる抗 HSV-2 活性変化

PD 404182 のマウス毒性試験

Jcl:ICR マウスに PD 404182 を 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回、3 日間連続投与した結果、死亡例は認められなかった。また、その後の体重の増減も溶媒コントロールとの間に大きな差は認められなかった。

D. 考察

PD 404182 の作用機序を明らかにするために種々の試験を行った。Time of drug addition の結果から、PD 404182 の作用点は、ウイルスの細胞への吸着過程を含む感染最初期であることが確認された。さらには、HSV-2 を用いた試験において、感染成立後では化合物の抗ウイルス活性が認められないことや、本化合物の標的は細胞側因子ではなく、ウイルス粒子中に存在するといった結果からも、本化合物が選択的にウイルス粒子に存在する分子に作用して抗ウイルス活性を示していることが推測された。また、本化合物は比較的高い耐容性を示した。

E. 結論

PD 404182 はウイルス粒子に存在する分子に影響を与えることで、感染性を消失させていると推測された。また、抗ウイルス活性発揮のためには、予めウイルス粒子と接触している必要があるため、感染予防薬としての適用が考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido [1,2-*c*][1,3]-benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org. Biomol. Chem.* 10(33) 6792-6802 (2012)
2. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-*c*][1,3]-benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.* 20(21) 6434-6441 (2012)
3. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem Biol.* 19(11) 1437-1446 (2012)
4. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(4) 908-915 (2013)
5. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J. Virol.* 87(8) 4322-4329 (2013)
6. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photoaffinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg. Med. Chem.* 21(7) 2079-2087 (2013)

2. 学会発表

1. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニズムの解析：第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
2. 戸上博昭、志村和也、宮沢孝幸、松岡雅雄：ニホンザルより検出された

SRV-4 に対する抗 HIV 薬の効果：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月 13 日-15 日

3. 志村和也、水原司、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：広範なスペクトルを有する新規抗 HIV 薬の同定とその開発：第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、2012 年 11 月 24 日-26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 新規ケモカイン受容体拮抗剤
日本：特願2011-044035：出願（2011年3月1日）
外国（PCT）：JP2012/055099：出願（2012年2月29日）
発明者：藤井信孝、大野浩章、大石真也、井ノ口恵利子、久保達彦、松岡雅雄、志村和也；出願者：京都大学
2. ピリミドベンゾチアジン-6-イミン誘導体またはその塩を含有するウイルス感染症の治療および／または予防のための薬剤
日本：特願2011-105642：出願（2011年5月10日）
日本：特願2012-50334：優先権出願（2012年3月7日）
外国（PCT）：JP2012/061890：出願（2012年5月9日）
発明者：前田英樹、加藤貴之、松岡雅雄、志村和也、藤井信孝、大野浩章、大石真也、水原司；出願者：京都大学、富士フイルム

2. 実用新案登録

該当事項無し

3. その他

該当事項無し