

- 152.山本 純, 田中智博, 傳田将也, 戎野紘司, 野村 涉, 重永 章, 玉村啓和, 大高 章. フッ化物イオン応答型アミノ酸の開発と標的タンパク質精製ツールへの応用. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
- 153.野村 涉, 森 あつみ, 大橋南美, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. プローブ導入型タグ付加標的タンパク質融合体による細胞内動態解析方法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
- 154.野村 涉, 増田朱美, 卜部亜里沙, 玉村啓和. ジンクフィンガー融合型酵素によるゲノム編集法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
- 155.橋本知恵, 野村 涉, 鈴木貴晴, 大矢亜紀, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野 淳. 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入阻害剤としての外被タンパク質 gp41-C34 3 量体. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
- 156.鳴海哲夫. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究: 窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 第一回全体班会議「有機分子触媒による未来型分子変換」. 京都, 2012 年 6 月 8-9 日.
- 157.鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製を目指した構造活性相関研究. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
- 158.相川春夫, 野村 涉, 玉村啓和. 近赤外蛍光色素でラベル化した二価結合型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
- 159.湊 夏来, 野村 涉, 相川春夫, 玉村啓和. PKC リガンドの探索を目的とした蛍光性 DAG ラクトンの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
- 160.紺野 誠, 鳴海哲夫, 野村 涉, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
- 161.鈴木 貴晴, 橋本知恵, 野村 涉, 玉村啓和. HIV-gp41 のヘリックスバンドル形成を基にした膜融合阻害作用ペプチドの開発. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
- 162.鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 第 5 回有機触媒シンポジウム. 東京, 2012 年 10 月 26-27 日.
- 163.野村 涉, 大橋南美, 玉村啓和. ターゲットタンパク質特異的プローブの合成と応用. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
- 164.鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩を酸触媒とするインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
- 165.小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 有機銅試薬によるアリル位アルキル化反応を基軸とする Z 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
- 166.湊 夏来, 野村 涉, 相川春夫, 玉村啓和. 蛍光性 PKC リガンドの合成と新規スクリーニング法の開発. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
- 167.橋本知恵, 野村 涉, 駒野 淳, 玉村啓和. HIV-1 膜融合阻害剤としての gp41-C34 三量体ミミックの合成. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
- 168.増田朱美, 野村 涉, 玉村啓和. 設計型 DNA 組換え酵素の配列特異的反応に関する定量的解析. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
- 169.野村 涉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 細胞内でのタンパク質動態イメージングのための細胞膜透過型 ZIP タグ-プローブシステムの創製. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
- 170.大附寛幸, 一瀬裕太郎, 小林 剛, 原田恵嘉, 吉村和久, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦, 三浦智行. 中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
- 171.村上 努, 高野 皓, 藤野真之, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 野村 涉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1MA/CA 部分ペプチドの細胞内導入による新規 HIV-1 複製制御法の探索. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
- 172.廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 涉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
- 173.相川春夫, 松本大地, 野末愛美, 浦野恵美子, Mathieu Metifiot, Kasthuraiah Maddali, 野村 涉, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 村上 努, Yves Pommier, 山本直樹, 玉村啓和. ペプチドミメティック型インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
- 174.高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 藤野真之, 野村 涉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 MA, CA タンパク質を基にした新規抗 HIV-1 剤の創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
- 175.原田恵嘉, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する in vitro 耐性ウイルス誘導. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
- 176.鳴海哲夫, 廣田雄樹, 吉村和久, 原田恵嘉, 橋本知恵, 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 30 回メディスナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 28-30 日.
- 177.松本大地, 相川春夫, 浦野恵美子, 駒野 淳, 村上 努, 野村 涉, 山本直樹, 玉村啓和. インテグラーゼ阻害活性を有するステイブルペプチドの構造活性相関研究. 第 30 回メディスナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 28-30 日.

- 178.小関泰輔, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. CXCR4の多量化状態の解析を目指した多価結合型リガンドの創製研究. 第30回メディスナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012年11月28-30日.
- 179.高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する 8-アザクマリンルメチル型光分解性保護基の開発. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 180.大橋南美, 野村 渉, 湊夏来, 玉村啓和. 蛍光性PKC リガンドの合成と C1b ドメインへの蛍光基導入研究. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 181.小関泰輔, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. CXCR4の多量化状態の解析を目指した多価結合型リガンドの創製研究. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 182.相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 二価結合型CXCR4リガンドにおける近赤外蛍光色素導入位置の検討. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 183.小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. E型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 184.鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 新規アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 185.廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的としたインドール型低分子 CD4 ミミックの創製. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 186.Yoshimura K., Harada S, Boonchawalit S, and Matsushita S. Impact of Maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
- 187.Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at three amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
- 188.Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.
- 189.Harada S, Arai H, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.
- 190.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, 10. 19-21, 2011.
- 191.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, 10. 19-21, 2011.
- 192.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, 7. 17-20, 2011.
- 193.Harada S., Hamji A., Matsushita S., and Yoshimura K. Evolution and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during in vitro selection of raltegravir. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Aso, Kumamoto, Japan, 2010, 10.6-8.
- 194.Harada S., Yoshimura K., Kawanami Y., Matsushita S. In vitro selections of raltegravir resistant variants using diverse primary isolates, subtype B, C, CRF01\_AE, and CRF08\_BC. 2010 IYIS, Kumamoto, Japan.3.4-5, 2010.
- 195.Yoshimura K., Harada S., Matsushita S. Two step escape pathway of the HIV-1 subtype C primary isolate induced by the in vitro selection of Maraviroc. 17h Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010), San Francisco, USA, 2.16-19, 2010.
- 196.吉村和久, 原田恵嘉, 濱治有希, 松下修三: CCR5阻害剤maraviroc(MVC)耐性誘導によるEnvの変異が中和抗体感受性に及ぼす影響. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24 -26. 東京.
- 197.原田恵嘉, 濱治有希, 松下修三, 吉村和久: ラルテグラビルはHIV-1のin vitro馴化におけるEnv選択に影響する. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24 -26.東京.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 特許取得

1. HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：国際出願番号 PCT/JP2010/003280
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：国際公開番号WO2010/134305A1
3. HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド：特願 2011-082813
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：特願2011-51432、
5. 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
6. 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
7. 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公開番号：EP2444414
8. 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：米国公開番号：US20120052090
9. HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド：国際出願番号：PCT/JP2012/002312
10. HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド：国際公開番号：WO2012/137479

分担研究報告書

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

分担研究者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター・教授

**研究要旨**

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 (NBD-559) について広範囲の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。我々は、新規に開発した中和単クローン抗体パネルを用いて、YYA-021 との併用効果が得られる組み合わせを検討した。サブタイプ B 標準パネルウイルス(SVPB) に対する YYA-021 の効果を調べたところ、交差中和活性を持つ 0.5 $\mu$ g に関しては 12 種類のウイルスのうち 9 種類に関して中和増強効果を認めた。CD4i 抗体では 5 種類で中和活性増強がみられた。異なるサブタイプの代表的な株について、GFP 発現ベクターに組み込んだエンベロープ発現細胞に対する抗体の反応性、YYA-021 による反応性増強効果を調べたところ、サブタイプ A 及びサブタイプ C では CD4i の結合活性の増強が見られ、サブタイプ B では CD4i と V3 抗体の両方に活性が見られた。一方、6 種類の初感染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) を用いた検討では、YYA-021 非存在下で、中和抵抗性の T/F ウイルスが、YYA-021 存在下では、50%以上中和感受性となった。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。特に、今後可能性が増してくる、抗体を用いた「機能的治癒を目指した治療法の開発」に大変重要なものになると考えられる。

**A. 研究目的**

HIV-1 感染症の長期治療が可能となり、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。実際、残存する感染細胞の排除は困難なため、既存の抗ウイルス薬を用いた治療は一生継続しなくてはならず、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し、ウイルスを完全には排除できないまでも、治療中断を可能にする「機能的治癒」

をもたらす新規治療法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。本研究の目的は、このような戦略が、サブタイプ B の臨床分離株のみならず、非サブタイプ B ウイルスや感染初期のウイルス (transmitted/founder virus) を含む広範囲の臨床分離株に対して有効性を示すかどうか検討するところであり、この目的のために、どのような抗体との組み合わせが必要かについて、抗体パネ

ルおよびウイルスパネルを作成して検討した。

## 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。本年度は特に、サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ 1、4、3、2 株について、GFP 発現ベクターに組み込んだエンベロープに対する抗体の反応性を CD4i 抗体または交差反応性の V3 抗体について検討した。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 を使い、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 より供与されたサブタイプ A および AE の envelope construct を用いて pseudovirus panel を作成した。さらに、ARRRP より感染初期のウイルス (transmitted/founder virus : T/F virus) パネルの供与をいただき、これらに対する中和抗体活性並びに YYA-021 の中和増強活性を検討した。

(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

実験室株や臨床分離株に対する NBD-556 と YYA-021 の抗ウイルス効果と細胞毒性の比較

NBD-556 と YYA-021 の抗ウイルス効果と細胞毒性を比較するために、IIIB, 89.6 および 3 種類の臨床分離株を準備し、PM1/CCR5 細胞を用いて IC<sub>50</sub> と CC<sub>50</sub> を検討した。NBD-556 に関しては IC<sub>50</sub> が 5 から 30 μM の間であったが、YYA-021 は 15 から 51 μM と高く、平均で 2 倍から 4 倍くらいの濃度が必要であった。一方、PM1/CCR5 細胞を標的とした場合、NBD-556 の CC<sub>50</sub> は 110 μM、YYA-021 では 210 μM であった。

## 新規抗 V3 抗体の作成と交差反応性

我々は昨年までの研究で、YYA-021 や NBD-556 の非サブタイプ B に対する交差中和活性の検討を行う上で、CD4i のみを用いる研究では不十分であることを報告した。本年度は、新たにサブタイプ B の感染症例から、3 種類の抗 V3 抗体を作成し、これまでの抗体に加えて検討した。1D9, 19F8, 16G6 はいずれも JR-FL の V3 ペプチドに反応する単クローン抗体である。1D9 と 19F8 は、V3 エピトープの Tip 部分である IGPGRA の 315 がアルギニン (R) でなければ反応できない。一方、16G6 は、R315Q の変異を導入した JR-FL ウイルスにも交差反応性を示し、非サブタイプ B ウイルスの V3-tip の特徴である GPGQ モチーフの V3 にも交差反応することが示された。サブタイプ B のパネルウイルス (SVPB) を用いた中和試験で、1D9 は 12 個中 7 種類を中和し、サブタイプ B の中で交差中和活性を示す抗体と考えられるのに対し、19F8 はパネルウイルスの 1 種類に中和活性を示すのみの型特異的抗体である。一方、16G6 は 12 個中 3 種類のウイルスを中和するのみであるが、サブタイプの異なるウイルスに対する交差反応性を示す。16G6 は IGHV usage が 5-51\*01 であり、これまで Gorny らが報告してきた交差反応性の抗 V3 抗体の仲間と考えられる。

rCD4, NBD-556 または YYA-021 による JR-FL 感染細胞表面の Env に対する CD4i 抗体 (17b) の反応性の増強、および YYA-021 による Env 発現細胞に対する V3 抗体 (16G6) および CD4i 抗体 (916B2, 917B11) の反応性増強

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。CD4i 抗体の一つである 17b は、PM1/JR-FL 細胞では、FACS による解析で、平均蛍光強度 (MFU) が 14.2 とほとんど反応が起こらない。しかし、rCD4 の存在下では、反応プロフィールの MFU は 62.6 と著明に右へシフトし、細胞表面の蛍光の増強が検出できる。一方、NBD-556 または YYA-021 の存在下では、それぞれの MFU は 38.9 及び 36.9 と同等のシフトが見られた。サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ 1、4、3、2 株を選定し、GFP 発現ベクターに組み込み ENV は発現ベクターを作成した。作成したエンブ発現ベクターを用いて、293T 細胞をトランスフォームし、樹立した発現細胞を用いて、CD4i 抗体または交差反応性の V3 抗体の反応性を YYA-021 存在下もしくは非存在下に検討した。我々が樹立した 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 と著明に右へシフトし、細胞表面の蛍光の増強が検出できた。一方、YYA-021 の存在下では、それぞれの MFI は 37.4 及び 32.7 とシフトが見られた。これらの効果に関して、樹立した ENV 発現細胞での検討を用いて検討すると、917B11 の反応性はサブタイプ B (89.6、SF162、YU2) ばかりでなく、サブタイプ A(92UG037.8)、サブタイプ C(SVPC9,SVPC13, SVPC15)でも観察された。一方、サブタイプ AE(93TH966.8)では、明らかではなかった (図 1)。

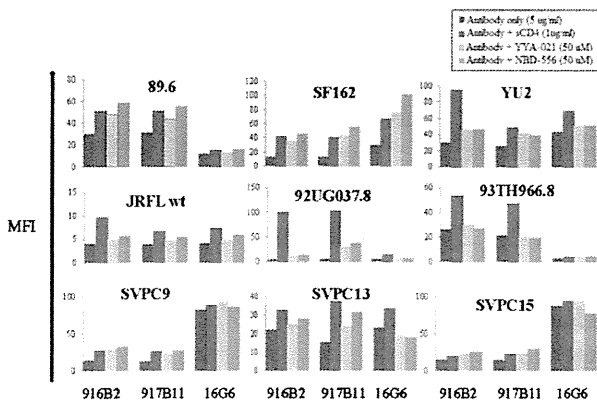


Fig. 1. YYA-021 effect over antibody binding to Env of subtype A,B,C and CRF01\_AE

一方、抗 V3 抗体である 16G6 は、サブタイプ B での増強効果は、SF162, YU2, JR-FLwt でみられるものの、89.6、92UG037.8、93TH966.8 には反応しないと考えられた。一方、サブタイプ C(SVPC9,SVPC13, SVPC15)には、YYA-021 非存在下でも良好な反応を示し、増強効果は明らかでない。これらから、YYA-021 は非サブタイプ B ではサブタイプ B とは異なる反応性を示す可能性が考えられる。また、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。

サブタイプ B 標準パネルウイルス (standard virus panel of subtype B; SVPB) に対する NBD-556 または YYA-021 の IC<sub>50</sub> の検討  
米国 NIAID が供給するサブタイプ B 標準パネルウイルス (SVPB) 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。IC<sub>50</sub> の値で比較すると、12 種類のうち 6 または 7 では CC<sub>50</sub> 以下の値で感受性 (IC<sub>50</sub>) が観察されたが、残りの半分は抑制されず、臨床分離株への増殖抑制効果は部分的であることが分かった (表 1)。また、NBD-556 と YYA-021 を比較すると、SVPB15 の例外をはぶいて IC<sub>50</sub> の値は YYA-021 が NBD-556 のほぼ 2 倍ないし同等であった。

表 1. Sensitivity of primary isolates of B subtype virus to YYA-021 and NBD-556

	NBD556 (μM)	YYA021(μM)
SVPB5	33.1	70.7
SVPB6	92.1	172.1
SVPB8	85.5	183.7
SVPB11	— *	— *
SVPB12	>100	>200
SVPB13	>100	>200
SVPB14	— *	— *
SVPB15	>100	55.6
SVPB16	84.8	152
SVPB17	— *	— *
SVPB18	61.7	139.2
SVPB19	20	32.3

YYA-021 (10 μM)による SF162, 89.6, IIB,

JR-FL pseudoviruses に対する中和増強効果  
 抗 V3 抗体である 0.5  $\gamma$  または KD-247、  
 CD4bs 抗体である 0.5  $\delta$ 、または 49G2 さらに  
 CD4i 抗体として 4E9C または 4C11 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 SVPC パネルウイルスに対する YYA-021 の中和増強効果

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 YYA-021 の中和増強効果を  
 調べるために、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 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。昨年度  
 までの検討に加え、5 種類の抗 V3 抗体 (0.5  $\gamma$ 、  
 KD-247、717G2b、16G6 および 1D9)、2 種類  
 の CD4bs 抗体 (49G2 および 82D5)、3 種類  
 の CD4i 抗体 (4E9C、916B2 および 917B11) に  
 ついて YYA-021 による中和の増強効果を検討し  
 た (表 II)。YYA-021 による中和活性の増強は  
 12 種類の SVPB 中 0.5  $\gamma$  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、16G6 については 4 種類、1D9 につい  
 ては 6 種類に観察された。一方、CD4i 抗体に関し  
 ては 4E9C では 5 種類、916B2 については 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。抗 V3 抗体で、非サブタイプ B ウイル  
 スに対して中和活性を持つのは 16G6 のみである  
 が、YYA-021 による増強効果は認められなかつ  
 た。現在、非サブタイプ B 感染例からの単クロ

ーン抗体の樹立中であり、これらを用いた検討が  
 必要である。

表 II. Effect of YYA-021 over the neutralization activity of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies against primary isolates of subtype B

Virus	anti V3						CD4bs						CD4i					
	0.5 $\gamma$	1:1274	3 $\gamma$ 25	16:6	1D9	49:2	37:6	41:6	41:6	91:6	91:6	91:6	91:6	91:6	91:6	91:6		
1	95.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
2	92	18.7	174.5	84.8	98.6	44.5	95	91.1	60.9	5.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
4	95.6	44.2	58.7	75.2	79	87.2	58	70	91.9	44.6	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
6	92	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
7	117	87	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
8	21.6	NS	71.8	11.8	89.3	32.6	NS	11.1	77.4	89.1	21.6	49.5	20.5	70	NS	NS		
9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
10	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
11	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
13	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
14	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
16	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
17	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
18	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
19	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

### 初感染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) に対する YYA-021 の中和増強効果

本年度はさらに、感染早期に分離され、実際に  
 人から人へ伝播したウイルスと考えられる初感  
 染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F  
 virus) に対する YYA-021 の抗ウイルス効果を  
 TZM-bl細胞を用いた中和試験を用いて検討した。  
 6 種類の T/F virus を用いた検討では、V3 抗体  
 の 1D9 は、YYA-021 非存在下には、6 種類中 2  
 種類しか中和できないが、YYA-021 存在下には  
 4/6 を中和した。また、交差反応性の V3 抗体  
 16G6 は T/F virus のどれも中和しなかったが、  
 YYA-021 存在下に 3/6 を中和した (表 III)。一  
 方、3 種類の CD4i 抗体 (4E9C、916B2 およ  
 び 917B11) は、どのウイルスも中和できないが、  
 YYA-021 存在下に 4E9C および 917B11 に中和  
 活性を認めた。このように、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。

表 III. Effect of YYA-021 over the neutralization activity of anti-V3 and CD4i antibodies against transmitted/founder virus

Virus	Anti V3						CD4i		4E9C
	16G6	1D9	916B2	917B11	917B11	4E9C			
pW110.c.2474 (SVPB)	NS	160.1 (34.5%)	43.02	19.21	NS	NS	NS	NS	NS
pC11058.c.2960 (SVPB)	NS	2.39	25.19	0.21	NS	NS	NS	29.23	NS
pR11058.c.2635 (SVPB)	NS	NS	NS (27%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pRE10.c.2864 (SVPB)	NS (25%)	34.77	NS (42%)	11.59	NS	NS	NS	NS (32%)	NS
pTR10.c.2851 (SVPB)	NA	NA	NS (35%)	105.6	NA	NA	NA	NA	NA
pC11106.c.2633	NA	NA	NS (18%)	NS	NA	NA	NA	NA	NA

### 霊長類を対象とした POC 試験プロトコル作成および抗体の調整

これまでの in vitro および in vivo の研究データ

をもとに霊長類を対象とした POC 試験プロトコルを作成した。基本的に、KD-247 に関して、ヒトを対象に行っている臨床試験に準じた方法で計画した。五十嵐らの研究により、KD-247 に感受性があり、しかも in vitro で、YYA-021 の中和増強効果が見られる SHIV KS661 を用いて ( $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>) 6 頭のアカゲザルに静脈内接種し 24 時間、8 日および 15 日後に 16 mg/kg の KD247 および 6.25 mg/kg の YYA-021 を静脈内投与し、血漿中ウイルス RNA 量および末梢血 CD4 陽性 T 細胞サブセット数の推移を非投与群サル 4 頭のそれらパラメータと比較した。結果は、五十嵐の報告に詳しく述べられているが、6 頭中 5 頭のアカゲザルの血漿中ウイルス RNA 量が非投与対照群と比較して接種 10 日後以降統計的に有意な差を以て抑制された。MM540 の血漿中ウイルス RNA 量は非投与対照群と同等であった。(KD-247 は化学及び血清療法研究所より供与いただいた)。

#### 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 $\mu$ 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。さらに、初感染ウイルス (T/F virus) に対しても YYA-021 の中和増強効果が認められたことは重要な点である。YYA-021 非存在下では、中和抵抗性の T/F ウイルスが、YYA-021 存在下では、50%以上が中和感受性になった。一方、非サブタイプ B ウイルスに交差反応する CD4i 抗体である 916B2、917B11 は、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。サブタイプ B 感染例から得られた、交差反応性のある抗 V3 抗体 16G6 を用いた解析を行ったが、非サブタイプ B に対する中和活性の増強は明らかではなかった。

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、実際霊長類を用いた POC 試験でも期待通りの臨床効果を示した (五十嵐教授の報告参照)。しかし、ヒトでの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  $\mu$ 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。

これらの結果に加え、抗体によって感染細胞を排除する ADCC (antibody mediated cellular cytotoxicity) 活性に及ぼす YYA021 の効果の検討を行った。HIV-1 感染細胞に対する ADCC 活性の測定は、分離株に関しては可能であったが、臨床株での検討には様々な困難が伴い、(多くの臨床株が ADCC の標的細胞である CEM-NKR 細胞に感染しないため) 十分な検討に至っていない。

#### E. 結論

YYA-021 は、実験室株ばかりでなく、T/F virus を含む多くの臨床分離株に対して、中和エピトープを露出させる活性を持つことを確認できた。YYA-021 は、レベルや範囲は抗体によって異なるものの、中和抵抗性の臨床分離株を、抗 V3 抗体ばかりでなく CD4i 抗体に対して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。本戦略は「治癒に向けた治療法」の開発の一つに位置付けることが可能と考えられる。多くの残された課題があるが、確実に一歩進んだと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (論文発表)



1. Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20: 354–358, 2010.
2. Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J. Gen. Virol.* 91: 1335-1345, 2010.
3. Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S. :Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J. Virol.* 84:7558-7568, 2010.
4. Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka,T., Nomura,W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H. :CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 5853- 5858, 2010.
5. 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.
6. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita, S., Sato, H.. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE* 7(5): e37530., 2012.
7. Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biological active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 v3 loop. *Cellular and molecular biology*, 58: 71-79, 2012.
8. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S, on behalf of the Epzicom-Truvada study team: Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for Treatment-naive Japanese Patients with HIV-1 Infection: A Randomized Multicenter Trial. *Internal Medicine*, 52: 735-744, 2013.
9. The Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, Matsushita S, et al.) Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. *Clin Infect Dis.* 56(7):1004 -17, 2013
10. Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94:933-943, 2013.
11. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM , Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J. Virol.* 87 : 5424-5346, 2013.
12. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.:

CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21:2518-2526, 2013.

13. Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Kazuhisa Y, and Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail *Frontiers in Microbiology/Virology*. 4:1-7, 2013.

(学会発表)

1. Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS Conference. July.18-23, 2010. Vienna, Austria.
2. Liu, M., Shibata, J., Harada, S., Takehisa, J., Yoshimura, K., Matsushita, S.: Impact of a point mutation V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of Env. *AIDS Vaccine 2010*, Sep.28-Oct.1, 2010. Atlanta, USA.
3. Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: Strategy to overcome neutralization of HIV-1 primary isolates. 11<sup>th</sup> GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct.6-8, 2010.Kumamoto.
4. Harada, S., Hamaji A., Matsushita, S., Yoshimura, K.: Evaluation and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during in vitro selection of raltegravir. 11<sup>th</sup> GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct.6-8, 2010.Kumamoto.
5. 吉村和久、原田恵嘉、濱治有希、松下修三：CCR5阻害剤maraviroc(MVC)耐性誘導によるEnvの変異が中和抗体感受性に及ぼす影響。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24 -26. 東京。
6. 原田恵嘉、濱治有希、松下修三、吉村和久：ラルテグラビルはHIV-1 のin vitro馴化におけるEnv選択に影響する。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24 -26.東京。
7. 松下修三：共催シンポジウム2 最新の情報を明日の臨床に生かす-Year in review 2010-「病態の研究と治療薬開発の未来」。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24 -26.東京。
8. 松下修三：共催セミナー8 HIV陽性者のメンタルヘルスへのアプローチ その2メンタルヘルス問題の「今」を考える：どのように捉え、どうアプローチすることが可能だろうか?～うつと依存症(薬物)を中心に。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24 -26. 東京。
9. 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.
10. Yoshimura K, Harada S, Hamaji 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.
11. 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.
12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. Harada, S., Arai, H., Narumi, T., Tamamura, H., Matsushita, S., Yoshimura, K. : In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. XIX International AIDS Conference (AIDS 2012), July 22-27, Washington DC, USA.
  21. Maruta, Y., Ramirez, K., Kuwata, T., Matsushita, S. :Construction and characterization of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. AIDS Vaccine 2012, September 9-12, 2012, Boston, USA.
  22. Kuwata, T., Takaki, K., Enomoto, E., Matsushita, S: Conformational epitope involving V3 and V4 loops is a major target for antibody-mediated neutralization in SIV smH635-infected macaques. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
  23. Maruta, Y., Ramirez, K., Kuwata, T., Suwa Y., Morioka, H., Kuwata, T, Matsushita, S.: Single-chain variable fragment (scFv) of anti-V3 monoclonal antibody efficiently neutralizes HIV-1 in vitro.

- 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE  
Joint International Symposium,  
2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
24. Tanaka, K., Kuwata, T., Maruta, Y.,  
Ramirez, K., Matsushita, S.: Analysis of  
antibodies to CD4-induced epitope on  
gp120. 13th Kumamoto AIDS Seminar  
GCOE Joint International Symposium,  
2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
25. Sonoda, T., Boonchawalit, S., Gatanaga  
H., Tanaka, K., Maruta, Y., Ramirez, K.,  
Kuwata, T., Matsushita, S.: Cross subtype  
neutralizing activity of plasma antibodies  
from patients infected with HIV-1  
CRF01\_AE HIV-1. 13th Kumamoto AIDS  
Seminar GCOE Joint International  
Symposium, 2012.10.25-26, Aso,  
Kumamoto, Japan.
26. 桑田岳夫、吉村和久、松下修三：SIV感染サ  
ルから分離された中和抗体B404はV3,V4  
ループを含むEnv立体構造を認識する 第  
26回日本エイズ学会学術集会・総会。  
2012.11.24-11.26.横浜。
27. 園田貴丈、Samatchaya Boonchawalit、田  
中和樹、丸田康広、Kristel Ramirez、桑田  
岳夫、松下修三：CRF01\_AE HIV-1 感染症  
例IgGの交差中和 活性の解析.第26回日本  
エイズ学会学術集会・総会。  
2012.11.24-11.26. 横浜。
28. 田中和樹、桑田岳夫、丸田泰広、園田貴丈、  
Kristel Ramirez、松下修三 .gp120 の  
CD4-induced epitopeに結合する中和抗  
体の解析。 第26回日本エイズ学会学術集  
会・総会。2012.11.24-11.26。 横浜。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
（総合）研究報告書

NBD559 及び NBD 誘導体の作成、NBD 誘導体の最適化の研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

**研究要旨** 現在では HIV-1 感染細胞や HIV-1 の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、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 CD4 ミミック、NBD-556 誘導体を同定した。NBD 誘導体を開発することにより、Env に立体構造変化を起こし、中和抗体の臨床効果を増強させるといふ、これまでとは全く異なる発想の戦略を立てられると考えられる。まず、NBD-556 の誘導体の一つである NBD-556 (YYA-021) が活性はほぼ同等で、細胞毒性が低いことを見出した。3 年間の研究期間で、YYA-021 誘導体 (CD4 ミミック) 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。さらに、CD4 ミミックと gp120 の Phe43-cavity のドッキングシュミレーションを基にした新規骨格の構築を行った。また、YYA-021 のラット、サルを用いた急性毒性試験、血中濃度測定および薬物動態解析を行い、実用化に向け、有用な知見を得た。

### A. 研究目的

HIV-1 感染症/AIDS の治療法は、多数の阻害剤の創出をバックに飛躍的に進歩している。しかし、既存の抗ウイルス剤の長期使用による薬剤耐性、慢性毒性の蓄積などの問題も抱えている。一方、治療中断と再開を繰り返す SMART study の失敗から、現在の抗ウイルス薬による治療は一生継続しなければならないものと認識されるようになった。よって、HIV の複製阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞や HIV-1 の潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められる。これまで我々は、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 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、その基本的性質と効果に焦点を絞って研究してきた(図 1, 2)。NBD-556 は、合抱体形成の阻害スクリーニングで発見された化合物であり、Env と CD4 分子の相互作用を阻害する侵入阻害剤候補分子である(Zhao Q, et al., *Virology*, 339:213-25, 2005, Schon A, *Biochemistry*, 45:10973-80, 2006) が、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なかった。

hydrogen bond with gp120 backbone carbonyl  
Sodroski, J., et al. *Structure*, **2008**, *16*, 1689.

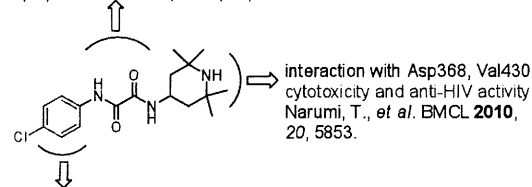


図 1 NBD-556 の構造と各領域の作用

我々は、NBD-556 の構造活性相関を行い、まず、YYA-021(NBD-559) (図 3) が NBD-556 とほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性が低いことを見出した。本研究班では、さらに多くの誘導体を探索し、非クレイド B ウイルスなど、現在の NBD 誘導体が効きにくいウイルスにも有効な新規誘導体を創出することと、このような新しい治療戦略が *in vivo* でも有効性であるかどうか、動物モデルで検証することを目的とした。

**The Entry of HIV-1 into target Cells**

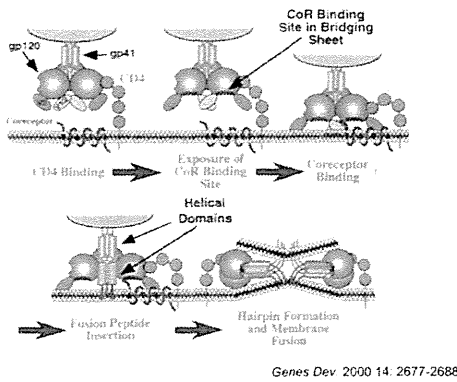


図2 HIV-1の感染機構

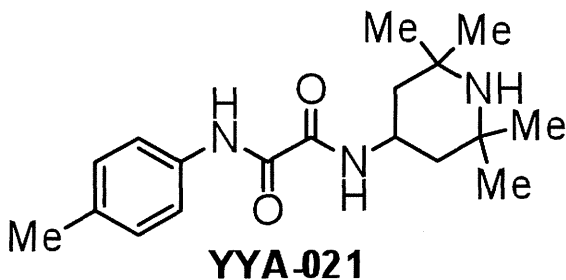


図3 YYA-021(NBD-559)の構造

一方、研究代表者である松下は広範囲の分離株を中和する抗体とそのエピトープに関して研究開発を行い（厚生労働省、滝口班）交差反応性の中和抗体を持つ長期非進行症例から20種類の中和抗体パネルを作成してきた。これらの抗体とNBD誘導体の併用が、どの程度の臨床分離ウイルスに有効かを調べることになる。抗体はウイルス膜上の機能的エンベロープに結合できるばかりでなく、ウイルス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、体内の感染細胞を最小まで減少させることが可能となり、長期間継続する現在の抗ウイルス療法とは異なる治療法開発が可能になる。このような目的のために必要な抗体はどのようなものか、抗体パネルで検討することが可能である。これまで、HIV-1に対する侵入阻害剤は、gp120の立体構造を変化させずにCD4やco-receptorへの結合を阻害するものを中心に進められてきた。その理由は、以前の臨床試験でsCD4の治療効果が見られなかったという歴史的事実と、立体構造変化を誘導すると感染を促進してしまう危険性があると考えられてきたことによる。我々の、コンセプトは、むしろ立体構造変化を起

こさせることで、中和抗体の効果を増強させるという、これまでとは異なる発想の戦略であるという点で独創的である。多くの感染者がgp120単量体に反応する抗体を持っており、ウイルス上の反応エピトープが表出しさえすれば自己のウイルスが中和可能になる可能性がある（Decker JM, et al., *J Exp Med*, 201:1407-19, 2005）。また、松下らが発見した中和単クローン抗体KD-247は臨床試験が進行しており(Eda Y, et al., *J Virol* 80:5563-5570, 2006)、このコンセプトの実現の可能性も高い。

本研究の第一のステップは、これまでin vitroで研究してきたNBD誘導体の効果をin vivo（霊長類モデル）で検証するために、どのようなシステムで行うかの検討である。これまでサルに感染可能なSHIVとして用いられてきたウイルス及び臨床分離株に近い新たなSHIVを用いて、in vitroで効果を確認し、その結果をもとに、YYA-021等のNBD誘導体を大量に準備する。これらの準備をしながら、動物モデルでの検討を計画し、ラット、サル等の少数の個体を用いた予備的研究から、段階的に進んでいく。すなわち、実用化に向け、YYA-021のラットおよびサルを用いた血中濃度測定および薬物動態解析を行う。さらに、これまで作成してきたNBD誘導体よりも低濃度で有効で、毒性が低く、さらに非クレイドBウイルスなど、現在のNBD誘導体が効きにくいウイルスにも有効な新規誘導体を探索する。

**B. 研究方法**

1) HIV-1 gp120の立体構造変化を誘導し中和抗体の感受性を増強する低分子化合物NBD誘導体の開発

N-(4-Chlorophenyl)-N'-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556)の誘導体を種々合成し、構造活性相関研究を行った。In vitroでの検討として、YYA-021を含むNBD誘導体を、感染細胞のFACS解析によりsCD4存在下のCD4i Abや抗V3Abの反応増強と比較し、三量体上で立体構造変化（エピトープの露出）を惹起するかを確認した。さらに、臨床応用を目的として、低濃度で、強力に中和抗体の感受性を増強し、細胞毒性も低いNBD誘導体を合成した。

具体的には、今までの研究により、NBD-556のフェニル部位はgp120のPhe43activityに入りこみ、抗HIV活性、細胞毒性に影響を与え、ピ

ペリジン部位については正確な作用が明らかにされていないので、NBD-556に関して、2級アミンの窒素原子（ピペリジン部位）に種々の置換基を導入し、また、芳香環（フェニル部位）にも置換基を導入し、構造活性相関研究を行った(図 4,5)。

これら化合物は種々のアニリンを出発原料として、クロログリオキシル酸エチルとのカップリング、けん化、続く対応するアミンと縮合することで合成した。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。また、gp120 の構造変化により露出される CD4i epitope を認識する CD4i 抗体を用いて、CD4 ミミック誘導体で処理した PM1/JR-FL 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 MTT assay で調べた。

**The Action of Each Part of NBD-556**

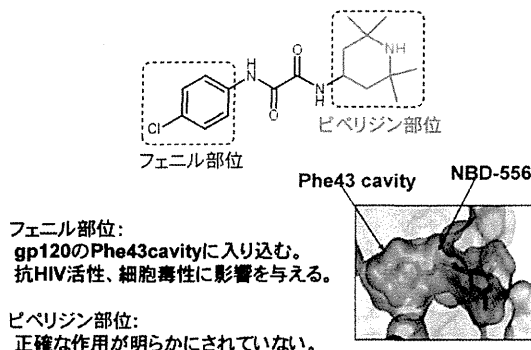


図 4 NBD-556 における各部位の作用

**Design of New Compounds 1-13**

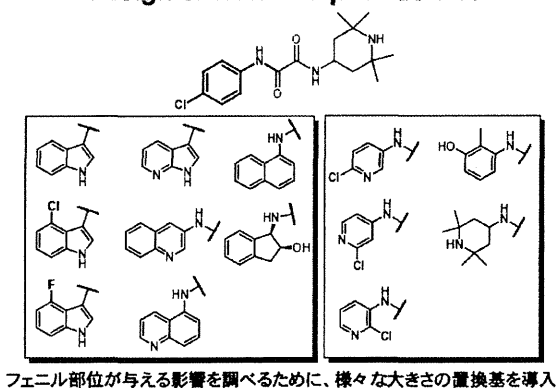


図 5 NBD 誘導体のフェニル基の置換

2) YYA-021 のラットを用いた急性毒性試験

YYA-021 のラットを用い、静脈注射による急性毒性試験を行った。YYA-021 の水系の溶媒への溶解度が低かったため、4 N HCl/dioxane を用いて塩酸塩とし、塩酸塩を PBS に溶解させてラットの尾静脈より投与した(0.5mg~5.0g)。投与後、数分、数時間後に少量採血し、YYA-021 の血中濃度を測定した。14 日間観察 (体重の増減・体重測定・餌および水の摂取量確認・外見の変化・生死の確認)した。

なお、急性毒性試験用のラットは安全性試験を始め薬理・毒性・生化学・栄養・その他幅広い研究分野に使用されている汎用系統 (General purpose)ラットを用いた(図 6)。

**-CD4 mimic 毒性試験用ラット**

- クローズドコロニー
- 大型で温順なアルビノラット
- 安全性試験を始め薬理・毒性・生化学・栄養・その他幅広い研究分野に使用されている汎用系統(General purpose)ラット



図 6 YYA-021 急性毒性試験用ラット

経口投与による急性毒性試験の準備をすすめた。投与方法は YYA-021 を水などで懸濁液とし、ゾンデで胃に直接注入する。

3) 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

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 7)。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、ピペリジン部位の相互作用に関する研究はまだあまりなされていない。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。

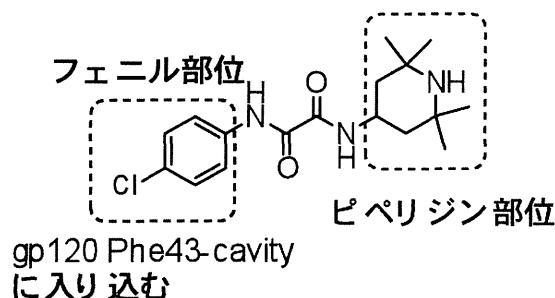


図 7 NBD-556 のピペリジン部位とフェニル部位

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、gp120 の構造変化により露出される CD4i epitope を認識する CD4i 抗体を用いて、CD4 ミミック誘導体で処理した PM1/CCR5 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。

#### 4) NBD 誘導体のフェニル部位の構造活性相関

まず、パラ位の置換基を塩素原子、および比較的良い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。

活性の評価方法は上記 3) と同様に行った。

#### 5) 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 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、ドッキングシミュレーションを行った。

#### 6) 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  $\mu$ 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。

#### 7) 分子モデリングをもとにした新規骨格の構築

CD4 ミミックと gp120 の結合モデル (図 8) の結果を精査すると、芳香環部位の環の平面性がオキサミド部位まで続いており、CD4 ミミックは高い平面性を保って gp120 と相互作用していることが示唆された。そこで、芳香環とオキサミドの一部をインドール骨格に置換する事で平面性を付与しつつ、分子全体としてのエントロピーの減少を目指し、インドール骨格含有化合物群をデザインした (図 9)。芳香環への塩素原子およびフッ素原子の導入も行い、置換位置とその効果について検討した。また電荷をもった化合物は毒性を示すことが一般的である為、無保護でのインドール上の二級アミンの酸性度に留意し、メチル基で保護したインドール誘導体も合成した。ピペリジン部位にはリード化合物由来の基本骨格や、高活性を示した上述の疎水性置換基を有する骨格を組み合わせた。

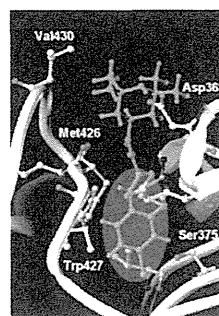




図 8 CD4 ミミックと gp120 のドッキングモデル

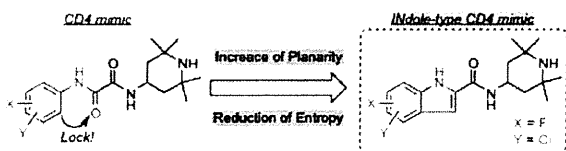


図 9 インドール型 CD4 ミミックのデザイン

8) 候補化合物群の合成

フルオロアニリンを出発原料とし NCS によるクロロ化を行い、次いでアミノ基を Boc 保護することで Boc アニリンへと誘導した。Boc アニリンに対し、ノルマルブチルリチウムとヨウ素を用い位置選択的にヨウ素化を行った後に、Boc を脱保護する事で三置換アニリンへと誘導した。三置換アニリンに酢酸パラジウム触媒のもとでピルビン酸と (DABCO): Diazabicyclo[2,2,2]octane: を作用させてインドール合成を行い、インドール-2-カルボン酸誘導体を誘導した。最後にインドール-2-カルボン酸誘導体に HOBt: 1-hydroxybenzotriazole と EDCI: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide を塩基性条件下で作用させ、そこに一級アミノ基を有する種々のピペリジン部位を加えることでアミド結合を形成させ、インドール型 CD4 ミミックを合成した。

9) YYA-021 の血中薬物動態解析

前年度に引き続き、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 μL (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(ラット、サルともに前年と同条件で投与)。また、YYA-021 の血球吸着試験、および血球から血漿への再分布の試験を行った。

10) 皮下投与用の YYA-021 の可溶化条件の検討

YYA-021 の 6.25mg/kg の静脈内投与では、血中濃度が測定できなかつたので、有効濃度到達を目指して、皮下投与を考えた。種々の溶剤を組み合わせ、可溶化条件を検討した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

1) HIV-1 gp120 の立体構造変化を誘導し中和抗体の感受性を増強する低分子化合物 NBD 誘導体の開発

CD4 mimic 誘導体に関して、ピペリジン環部のテトラメチル基除去、2 級アミンの窒素原子への種々の置換基の導入による影響を調べた。合成した化合物の FACS 解析により gp120 構造変化誘起能を調べた。その結果、テトラメチル基除去による gp120 構造変化誘起能への影響は見られなかった。さらに、種々の六員環構造を有する誘導体では、ピペリジン環より優位な生物活性を与えなかった。

次に、CD4 mimic 誘導体において、ピペリジン環および二級アミンを用いた gp120 構造変化誘起能に関する構造活性相関を調べた。その結果、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導体は共通してピペリジン環構造を有していた。また、ピペリジン環の窒素原子をアルキル基またはアシル基で修飾した誘導体では、大幅な細胞毒性の低下が認められたが、抗 HIV 活性については大幅な活性の低下または消失することが明らかになった。また、窒素原子自体は修飾せず、その周りを嵩高くしたところ、毒性が低下した。よって、窒素原子上の水素原子が、毒性に大きく関与していることが示唆された(図 10)。窒素原子を修飾、あるいはその周りを嵩高くした化合物に顕著な抗 HIV 活性が見られ、Comp35 が高い活性値を示した (図 11, 12)。

The Effects of Nitrogen Atoms for Cytotoxicity

Compd	Piperidine Sub	CC <sub>50</sub> (μM)*	Compd	Piperidine Sub	CC <sub>50</sub> (μM)*	Compd	Piperidine Sub	CC <sub>50</sub> (μM)*
NBD-556		170	18		>300	20		>300
17		100	19		>300	21		>300

\* using PM1/CCR5 cells

アミンを修飾し3級にすると、細胞毒性が低下



ピペリジン環上の窒素原子が細胞毒性に大きく関わっている可能性が高い!!

図 10 ピペリジン環の窒素原子の細胞毒性

に対する影響

**Design of New Compounds 22-35**

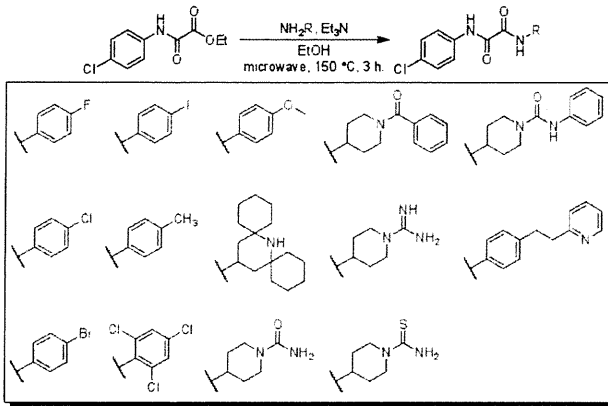


図 11 種々の新規化合物のデザイン

**Anti-HIV-1 Activity**

Compound	Piperidine Sub	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	Compound	Piperidine Sub	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	Compound	Piperidine Sub	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)
22		3.1	31		8.3	34		13
29		9.0	32		5.1			
30		5.5	33		6.2	35		0.68

Comp 35が高い活性値を示した。窒素原子を修飾、あるいはその周りを高高度した化合物に顕著な抗HIV-1活性が見られた。

図 12 ピペリジン基置換による抗 HIV 活性への影響

これまでの研究から、フェニル部位には適度な大きさが必要であるが、インドールのような大きな芳香環を持つ化合物では、抗 HIV 活性が低下した。また、フェニル基をピリジニル基に変えても、抗 HIV 活性は大きく低下した。これらの化合物は gp120 構造変化誘起能に対して、顕著な構造変化は誘起しなかった (図 13,14)。細胞毒性に対する影響は小さいものが多いが、活性が低かった (図 15)。

**Conformational Change of gp120 Induced by These Compounds**

Compound	Piperidine Sub	MFI <sup>a</sup>	Compound	Piperidine Sub	MFI <sup>a</sup>	Compound	Piperidine Sub	MFI <sup>a</sup>
1		13.29 (IC <sub>50</sub> = 70 μM)	5		12.93	9		13.96
2		13.25	6		15.39	10		13.40
3		13.89	7		15.35	11		14.32
4		13.21	8		14.09	12		14.21
						13		13.46

<sup>a</sup>4C11 only: 13.87 4C11 + NBD-556: 34.06

これら誘導体はgp120の顕著な構造変化を誘起しない。

図 13 フェニル基置換による gp120 構造変化誘起能への影響

**Anti-HIV-1 Activity, Cytotoxicity and MFI of Other Compounds**

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	CC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	MFI <sup>c</sup>
14		>100	380	14.53
15		13	3	12.87
16		12	11	14.28

<sup>a</sup>using TZM-bl cells <sup>b</sup>using PM1/CCR5 <sup>c</sup>4C11 only 15.30 4C11 only 13.87

Comp 15,16: 顕著な構造変化を誘起しない。

図 14 フェニル基置換による抗 HIV 活性と gp120 構造変化誘起能への影響

**Effects of Phenyl Moiety for Cytotoxicity**

Compound	Piperidine Sub	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	Compound	Piperidine Sub	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	Compound	Piperidine Sub	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)
1		71	5		>500	9		350
2		310	6		250	10		>500
3		73	7		40	11		290
4		270	8		250	12		>500
						13		480

<sup>a</sup>using TZM-bl cells

図 15 フェニル基置換の細胞毒性への影響

2) YYA-021 のラットを用いた急性毒性試験

YYA-021 のラットへの静脈注射による急性

毒性試験について、体重変化量は、2.5 mg および 5.0 mg 投与群で増加率が低かった。餌と水の摂取量は、5.0 mg 投与群が最も多かった。5.0 mg 投与群は、餌と水の摂取量が多かったにも関わらず体重の増加率が低かった (図 16,17)。5.0 mg 以下の投与で毒性・致死が見られないことがわかった。

YYA-021 は生理食塩水等の水系の溶媒に対して溶解性が低いため、高濃度の静脈注射による投与は困難である。高濃度の投与が可能な経口投与を現在検討中である。

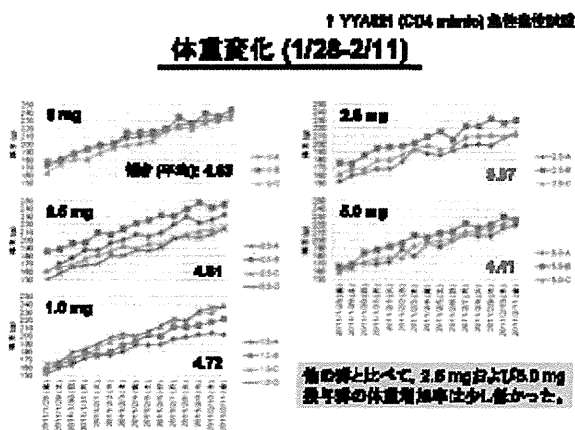


図 16 YYA-021 急性毒性試験 (静脈投与) における体重変化

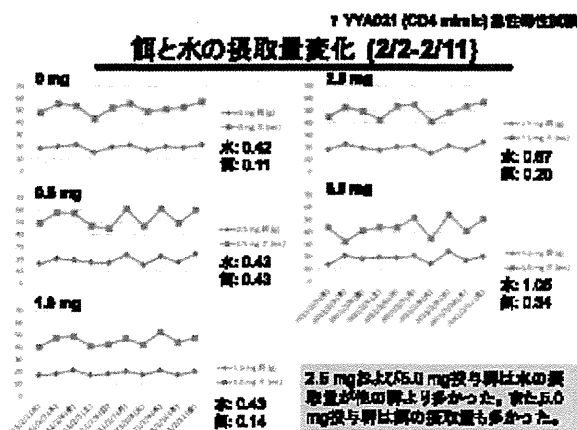


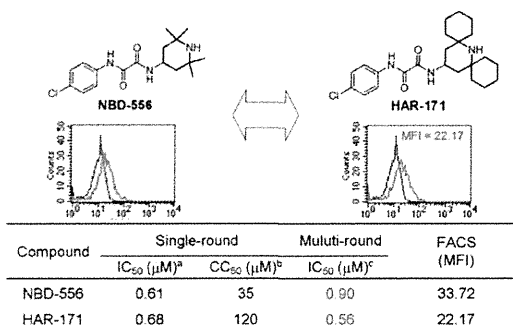
図 17 YYA-021 急性毒性試験 (静脈投与) における餌と水の摂取量変化

### 3) 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

図 18 に示すように、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 μM、0.68 μM 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。

### Anti-HIV Activity by Multi-round Assay



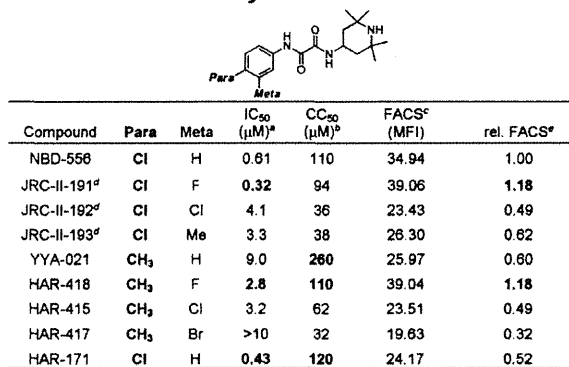
<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> values of single-round assay are based on the inhibition of HIV-1-induced cytopathogenicity in TZM-bl cell  
<sup>b</sup>CC<sub>50</sub> values are based on the reduction of the viability of mock-infected PM1/CCR5 cells  
<sup>c</sup>IC<sub>50</sub> values of multi-round assay are based on the inhibition of HIV-1-induced cytopathogenicity in PM1/CCR5 cell  
<sup>d</sup>HAR: 100 μM/4C11 (3.5 mg/mL), using YTA45P; MFI of 4C11: 14.94

図 18 マルチラウンドアッセイによる NBD-556 と HAR-171 の抗 HIV 活性の比較

### 4) NBD 誘導体のフェニル部位の構造活性相関

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、無置換体の YYA-021 において大幅な細胞毒性の低下がみられた (図 19)。

### SAR of Aromatic Moiety: Para- and Meta-Substituents



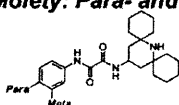
<sup>a</sup>The IC<sub>50</sub> values were determined using the WST-8 assay using PM1/CCR5 cells  
<sup>b</sup>HAR: 100 μM/4C11 (3.5 mg/mL), using YTA45P; Madani, N. et al., Structure, 2008, 16, 1599  
<sup>c</sup>rel. FACS values were calculated as [MFI(CD4 name)] / [MFI(NBD-556)] / [MFI(4C11)], MFI of 4C11: 10.23

図 19 フェニル部位の置換基の違いによる抗

## HIV 活性と gp120 構造変化誘起能への影響(その 1)

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さらに強い抗 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関してもさらに優れていることが明らかになった (図 20,21)。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 (図 20)。これによりメタ位へのフッ素の導入は envelope opener を目指すうえで有効であることが示唆された。

## SAR of Aromatic Moiety: Para- and Meta-Substituents

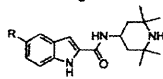


Compound	Para	Meta	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu$ M) <sup>b</sup>	FACS <sup>c</sup> (MFI)	rel. FACS <sup>c</sup>
HAR-171	Cl	H	0.43	120	24.17	0.52
HAR-431	Cl	F	0.23	11	51.39	1.73
HAR-424	Cl	Cl	0.62	11	25.74	0.59
HAR-430	Cl	Me	2.6	15	24.51	0.54
HAR-480	CH <sub>3</sub>	H	—	—	—	—
HAR-427	CH <sub>3</sub>	F	0.54	91	30.27	0.79
HAR-429	CH <sub>3</sub>	Cl	6.2	11	28.41	0.71
HAR-428	CH <sub>3</sub>	Br	3.2	11	20.08	0.34
NBD-556	Cl	H	0.61	110	34.94	1.00

<sup>a</sup>The IC<sub>50</sub> values were determined using the WST-8 assay using PM1HC95 cells. <sup>b</sup>using PM1HC95 cells. HAR 100  $\mu$ M+4C11 (3.5  $\mu$ g/mL), using YTA48P. <sup>c</sup>Madani, N. et al. Structure 2008, 16, 1699

<sup>d</sup>rel. FACS values were calculated as [(MFCM4 mmc) / (MFI of 4C11)] / [(MFINBD-556) / (MFCM411), MFI of 4C11  $\times$  0.23

## SAR of Aromatic Moiety: 5-Substituted Indole



Compd.	R	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu$ M) <sup>b</sup>	FACS <sup>c</sup> (MFI)	rel. FACS <sup>c</sup>
HAR-434	F	>100	115	10.38	0.01
HAR-437	Cl	15.6	31	11.20	0.07
HAR-438	Br	18.5	30	10.67	0.03
HAR-171		0.293	ND	19.43	0.52
JRC-II-191 <sup>d</sup>		0.32	94	39.06	1.18
NBD-556		ND	ND	24.88	1.00

<sup>a</sup>The IC<sub>50</sub> values were determined using the WST-8 assay using PM1HC95 cells. <sup>b</sup>using PM1HC95 cells. HAR 100  $\mu$ M+4C11 (3.5  $\mu$ g/mL), using YTA48P. <sup>c</sup>Madani, N. et al. Structure 2008, 16, 1699

<sup>d</sup>rel. FACS values were calculated as [(MFCM4 mmc) / (MFI of 4C11)] / [(MFINBD-556) / (MFCM411), MFI of 4C11  $\times$  0.23

図 20 フェニル部位の置換基の違いによる抗 HIV 活性と gp120 構造変化誘起能への影響(その 2)

5) 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 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 21)。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。

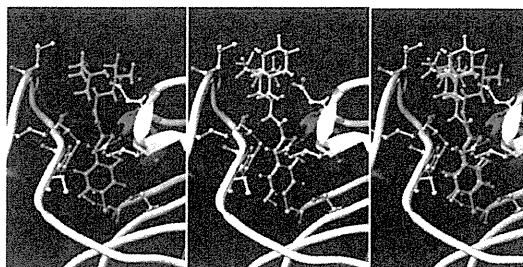


図 21 HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) と NBD-556(左)および HAR-171(中)のドッキングシュミレーション。右図は NBD-556 と HAR-171 の両方の重ね合わせ

6) 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  $\mu$ g/mL (15 min 後) であった (図 22, 23)。

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  $\mu$ g, 濃度: 230  $\mu$ g/mL)、7-8 分後には血中濃度が半分になっていると考えられる。

