

201319035A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

中和抗体を用いたHIV感染症の「機能的治癒」を
めざす新規治療法の開発

平成25年度総括・分担研究報告書

研究代表者 松下修三

平成26年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発…………… 1
松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)

II. 分担研究報告

1. 臨床研究のインフラ整備、臨床プロトコルの作成…………… 9
松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)
2. 中和抗体の効果を高める CD4 mimic の開発…………… 15
玉村啓和 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 教授)
3. 霊長類を用いた新規治療法 POC 試験…………… 20
五十嵐樹彦 (京都大学ウイルス研究所 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 30

総括研究報告書

中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発

研究代表者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター・教授

研究要旨

ヒト型化抗 V3 抗体である KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、中和抗体を用いた治療法を、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。我が国における中和抗体療法の対象症例選択の第一歩として、subtype B 感染症例 117 例のエンベロープ蛋白 (Env) の V3 配列を検討した。KD-247 の臨床試験で用いた genotype の基準を用いると、臨床試験の候補となるのは 31 例 (26.5%) であった。抗体による治療の対象症例拡大をめざし、候補抗体パネルを用いて、中和活性を増強する低分子 CD4 mimic 化合物 YYA-021 存在下または非存在下で広範囲の臨床分離株に対する有効性を検討した。subtype 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 μ 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。CD4 mimic の新規骨格を検討し、構造の異なる有用化合物の創出研究を行った。CD4 mimic の芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化のためにインドール骨格含有化合物群を合成した。また、逆に構造固定化をしないオキサミド部位の還元型化合物群を合成し、有望な化合物を得た。霊長類モデルを用いた研究で、KD-247 単独投与による *in vivo* でのウイルス増殖阻害を検討した。SHIV-KS661 曝露後ウイルス複製抑制効果は YYA-021 との併用投与と同等の効果が観察された。使用した用量で YYA-021 の効果が確認できなかった理由として、*in vivo* における薬物動態の関与が示唆された。これらの結果の中で、新たな治療用抗体候補の 0.5 μ g が、多くの臨床分離株を含む広範囲のウイルスに反応したこと及び YYA-021 とは基本骨格の異なる CD4 mimic が同定されたことは特筆すべきであり、今後の抗体を用いた治療法の開発を促進するものである。

分担研究者

玉村啓和 東京医科歯科大学
創薬化学・生体材料工学研究所 教授
五十嵐樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授

る症例をどのように選んでいくか、また、より広範囲の症例に対応する治療用抗体の開発も課題である。また、*in vivo* での効果判定のモデルとなる動物モデルシステムの構築の必要性がある。これらの目的で、新規抗体と抗体の中和活性を増強する小分子 (CD4 mimic) の開発と組み合わせの研究を行うとともに、本研究課題の前身である、「HIV エンベロープ蛋白 (Env) の立体構造変化誘導剤 (NBD 誘導体) の臨床応用に向けた基礎研究」(H22-政策創薬一般-007) において確立してきた霊長類を用いた *in vivo* 研究すなわち SIV-HIV-1 キメラウイルス (SHIV) /アカゲザル感染モデルを用いた POC 試験を継続する。

B. 研究方法

1) 臨床研究に向けた抗体療法の最適化の研究

HIV 感染症例より分離した PBMC から、DNA を分離し、nested-PCR にてエンベロープをクローニングし、遺伝子配列を解析した。これまで得られた解析結果から、KD-247 や我々の作成したパネルウイルスに対する反応性を検討した。一部の配列に関しては、発現ベクターに組み替え、pseudovirus を作成し、中和感受性を検討した。また、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 は、共同研究者の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

A. 研究目的

本研究の最終目的は、中和抗体を用いた HIV-1 感染症の「機能的治癒」をめざした治療法の開発である。抗ウイルス療法 (cART) の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著名に改善したが、長期治療の過程で様々な慢性合併症が起こる。その病態には、残存するウイルス増殖と慢性炎症の関与が考えられ、残存ウイルスの排除をめざす「治癒に向けた研究」は本領域で最も重要な研究である。我々は、化血研と共同で、HIV-1 の V3-tip に対するヒト型単クローン抗体 KD-247 の第 I 相 B 臨床試験を行い、ヒトにおける安全性と有効性を確認した。注目すべきは KD-247 の投与が終了し、血中濃度低下後も HIV-RNA のリバウンドが見られない症例が観察された点で、KD-247 は HIV の中和ばかりでなく、慢性感染細胞を排除し、セットポイントを下げた可能性が示唆された。本研究班では、KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。その一つは、抗体の必要量を減らすことであり、もう一つは耐性ウイルス出現の抑制である。抗体療法の対象とな

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。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の臨床試験に用いた抗 V3 中和抗体 KD-247 を用い、YYA-021 との相乗効果の検討をおこなった。そのほかに、ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP) が供給する subtype B ウイルス由来のエンベロープパネル (standard virus panel of subtype B; SVPB)、などを用いて 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) パネルの供与を受け、これらに対する中和抗体活性並びに YYA-021 の中和増強活性を引き続き検討した。

2) CD4 mimic 化合物としての新規骨格の構築

CD4 mimic と gp120 の結合モデルを精査すると、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 mimic 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、化合物群をデザインした。芳香環への塩素原子およびフッ素原子の導入、置換位置とその効果について検討した。また、逆にコントロールとして Gly リンカータイプの化合物群も合成した。

3) 霊長類モデルでの POC 試験

SHIV KS661/アカゲザル感染系：H22-政策創薬一般-007 で用いたのと同じの系を用いた。即ち、SHIV KS661 株 10,000 TCID₅₀ をインド産アカゲザルに静脈内接種した。本モデル系ではウイルス感染 10-12 日後に血漿中 RNA ウイルス量が 10⁸-10⁹ copies/ml のピーク値を示し、その後一端減少するものの、10⁶-10⁷ copies/ml の値を維持する。抗体投与スケジュール：16 mg/kg の KD-247 をウイルス接種 24 時間、8 および 15 日後に麻酔下の感染アカゲザルに静脈内投与した。投与量及び投与頻度・回数は H22-政策創薬一般-007 で行ったと同様とした。ウイルス学的及び免疫学的解析：ウイルス接種前より経時的に採血し、血漿より RNA を抽出、逆転写反応後、ウイルス gag 遺伝子領域を増幅するリアルタイム PCR 法により、血中ウイルス量を評価した。また、実験終了時に動物を安楽殺し、末梢血リンパ球、脾臓及び腸間膜リンパ節から単核細胞を調製後、同様に RNA 抽出、PCR を行い、組織におけるウイルス量を評価した。投与抗体の血中動態および抗イデオタイプ抗体の検出：H22-政策創薬一般-007 で検索した個体及び今年度本研究計画で検索した個体の経時血漿中の KD-247 を、抗原に Env 蛋白を用いた ELISA 法により検索した。血漿中の KD-247 結合性蛋白の検索に surface plasmon resonance 法 (Biacore 2000) を用いた。アビジン化されたセンサーチップにビオチン化 KD-247 をコーティングし、希釈経時血漿を導入して結合性蛋白を検出した。ウイルス遺伝子変異及び中和感受性の解析：経時血漿のうち、抗体投与中または投与後にウイルス量がリバウンドを示したものから RNA を抽出、逆転写後、env 遺伝子全

長を single genome amplification 法により増幅、クローニングし、塩基配列を決定した。それら env クローンをを用いて pseudotype ウイルスを作製し、KD-247 に対する中和感受性を比較した。

(倫理面への配慮)

HIV 感染症由来の血液検体に関しては、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得て採血した (臨床研究登録 UMIN000004720)。動物の飼養および動物実験には、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」を遵守した。アカゲザルの飼養に関し、環境大臣より許可を受けている。また、輸入サル飼育施設の指定を受けている。遺伝子組み換え生物第二種使用等にかかる拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

1) 臨床研究に向けた抗体療法の最適化の研究

これまでの研究を継続し、subtype B 標準パネルウイルス (SVPB) のみならず、初感染ウイルスなどについて YYA-021 の有効性を検討し、50% 以上の臨床分離株に中和増強効果を認めた。また、我が国における中和抗体療法の対象症例選択の第一歩として、subtype B 感染症例 117 例の V3 を検討した。KD-247 の臨床試験で用いた genotype の基準 (図 1) を用いると、KD-247 による臨床試験の候補となるのは 31 例

(26.5%) であった。これらの症例由来ウイルスの中和感受性を調べる研究 (phenotype 試験) として、候補症例より、HIV-1 のエンベロープをクローニングし、発現ベクターに組み替え、pseudotype ウイルスを作成し、これを用いて中和感受性および YYA-021 の中和増強活性を検討した。図 2 に一例を示す。

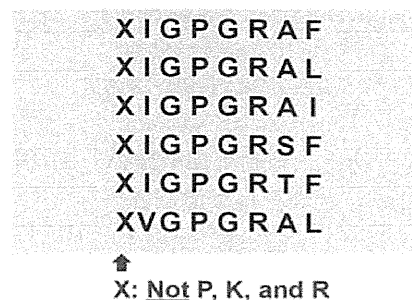


図 1. KD-247 の臨床試験で用いた適合症例選択のための V3 配列

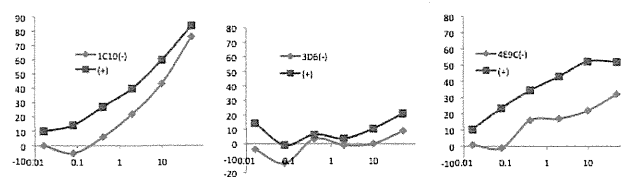


図 2. 臨床症例由来のエンベロープを持つシュドウイルスに対する YYA-021 の中和感受性増強

本症例の V3 シークエンスは NNTRKSIHIGPGRAWYATTDII と KD-247 の臨床試験で用いた基準とは 317 のアミノ酸のミスマッチがあ

る。

すなわち KD-247 では 317 が F、L または I でなければ中和活性が弱いのにに対し、0.5 γ (1C10) に対しては、L317W であっても中和感受性であった。一方、YYA-021 の存在下に V3 抗体 (1C10) と CD4i 抗体 (4E9C) に対して、それぞれ IC₅₀ 換算で約 5 倍と 10 倍以上の中和感受性の増強が観察された。SVPB パネルの pseudovirus 産生細胞から gp120/160 を抽出し、抗 C5 抗体にて gp120/160 を ELISA plate に capture する方法で結合活性を検討した。3 種類の抗体 (1C10/0.5 γ 、49G2、4E9C) を用いて検討したが、0.5 γ が SVPB15 に反応しない以外、これらの抗体はすべての gp120 単量体によく反応した。YYA-021 による結合の増強効果は 4E9C で観察可能であった。4E9C の結合活性は、6 種類のウイルスに関しては明らかにその増強がみられたが、2 種類では全く見られず、4 種類はその中間であった。これらの結果を一覧表に示す (表 1)。YYA-021 による中和活性の増強は gp120 単量体における結合活性の増強とは必ずしも関連せず、YYA-021 の Env 三量体に対する効果は、単量体 gp120 に対する効果と異なる可能性が示された。

表1. YYA-021のSubtype B panel virusに対する中和増強効果とgp120単量体への反応性増強効果

	SVPB5	6	8	11	12	13	14	15	16	17	18	19
IC ₅₀ to YYA021*	S	M	M	-	R	R	-	S	M	-	M	S
Binding enhancement of 4E9C against monomeric gp120**	++	-	+	+	+/-	++	++	++	++	-	-	++
Neutralization enhancement (V3: 0.5 γ)***	++	-	ND	+	++	++	+	ND	+	+	+	-
Neutralization enhancement (CD4i: 4E9C)***	++	+/-	+/-	++	+/-	-	+/-	++	+	++	-	-

*IC₅₀ to YYA021 was expressed as S<-100 μ M, M:100-200 μ M, R:>200 μ M, -:no suppression, ND: not determined.

**Binding enhancement of 4E9C was expressed as ++: >120%, +: 110-120%, +/-: 100-110%, -: <100% of control.

***Neutralization enhancement was evaluated by changes of IC₅₀ results: ++: >5x, +: 2-5x, +/-: <2x, -: no enhancement.

2) CD4 mimic 化合物としての新規骨格の構築

YYA-021 に代わりうる有用な化合物の創出のため構造活性相関研究を行い、数種類の新たな候補化合物を得た。その一つは indole タイプ CD4 mimic である。合成した 5-indole タイプ CD4 mimic の抗 HIV 活性および細胞毒性を評価し、いくつかの化合物を図 3 に示した。

Structure	R ^x	Compd.	IC ₅₀ (μ M) ^a	CC ₅₀ (μ M) ^b	FACS (MFI) ^c	Rel. FACS ^d
	R ¹	NBD-556	0.63	70.4	8.91	1.00
	R ¹	5	6.20	>300	12.3	3.95
	R ²	6	>100	>200	7.83	0.06
	R ³	7	1.13	>200	6.93	-
	R ¹	8a	3.65	48.6	8.70	0.82
	R ¹	9a	>10 (10 μ M, 32%)	19.4	8.55	0.68
	R ²	10a	>100	>200	8.24	0.42
	R ³	11a	3.60	11.4	8.05	0.25
	R ¹	12a	>100	60.3	8.08	0.28
	R ²	13a	>100	>200	8.14	0.33
	R ³	14a	>100	9.6	5.27	-

図3 5-indole タイプ CD4 mimic の活性評価

化合物 8a, 11a に顕著な抗 HIV 活性が見られた。さらに、6-indole タイプ CD4 mimic も合成したが、これ

らの化合物群には高活性なものは見られなかった。そこで、逆にオキサミド部位が構造的にフレキシブルになるよう Gly リンカータイプの化合物群も合成したところ、化合物 29, 26 に顕著な抗 HIV 活性が見られ、これらの細胞毒性は軽減していた (図 4)。

Structure	R ^x	Compd.	IC ₅₀ (μ M) ^a	CC ₅₀ (μ M) ^b	FACS (MFI) ^c	Rel. FACS ^d
	R ¹	NBD-556	0.63	70.4	65.31	1.00
	R ¹	8a	3.65	48.6	18.34	-
	R ¹	27	36.9	N. D.	30.22	0.224
	R ²	28	>100	N. D.	23.76	0.081
	R ³	29	2.20	>100	19.62	-
	R ¹	5	6.20	>300	18.78	-
	R ¹	30	23.0	N. D.	30.7	0.234
	R ²	31	63.0	N. D.	26.15	0.134
	R ³	32	1.0	>100	36.42	0.361
	R ¹	24	>30.0	N. D.	23.42	0.073
	R ²	25	>100	N. D.	18.46	-
	R ³	26	10.8	N. D.	28.7	0.190

図4 Gly リンカータイプ CD4 mimic の活性評価

NBD-556 と Phe43-cavity の共結晶 (3TGS) を参考にして、合成した CD4 mimic と Phe43-cavity のドッキングシミュレーションを行い、構造変換による結合様式の変化を考察した。図 5 に化合物 29 の Phe43-cavity へのドッキングモデルを示した。芳香環部位はほぼ変化しておらず、ピペリジン部位の向きが紙面と向き合うように変化していることが観察された。このことより、Gly リンカーへ構造変換しても、ある程度高活性が維持される理由が推察された。

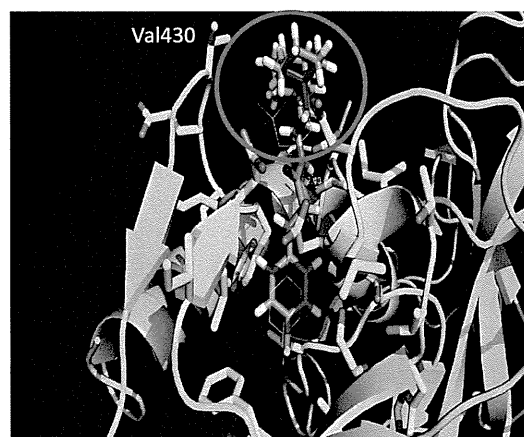
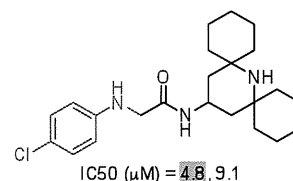


図5 Gly リンカータイプ CD4 mimic 化合物 29 の Phe43-cavity へのドッキングモデル (MOE 2012.10)

3) 霊長類モデルでの POC 試験

KD-247 血中濃度の推移および抗イデオタイプ抗体応答の検出: KD-247 をウイルス曝露 24 時間、8 及び 15 日後に投与した 3 頭のアカゲザルの血中抗体濃度をモニターした。3 頭のうち、MM531 のみ血中濃度が高くなったものの、全ての個体で同様の血中抗体動態を示した (図 6)。

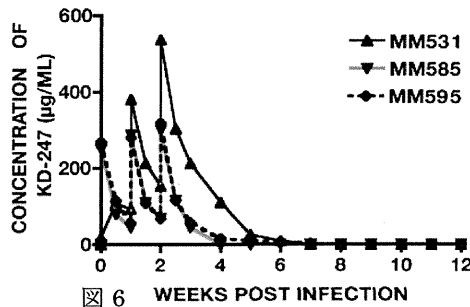


図 6 WEEKS POST INFECTION

これらの結果は、KD-247 と YYA-021 を複合投与した際に観察された抗体の動態と同様であり、投与群間で有意な違いはなかった。

一方、KD-247 投与後の経時血漿中の KD-247 反応性物質 (抗イデオタイプ抗体) の検索では、抗体の血中濃度が最も高く且つ長期間保たれた MM595 において対照 IgG と比べて高値の KD-247 反応性物質の産生が見られたが、KD-247 の消失が加速された様子はなかった。KD-247 および YYA-021 複合投与群でも 6 頭中 1 頭でのみ KD-247 反応性物質の産生が見られた個体があったが、この個体においても抗体のクリアランスが加速する事はなかった。

KD-247 単独投与によるウイルス複製抑制および CD4⁺T 細胞の動態: ウイルス曝露後の血中ウイルス RNA 量の推移を、非投与群及び YYA-021 および KD-247 複合投与群の結果と共に図 7 に示す。

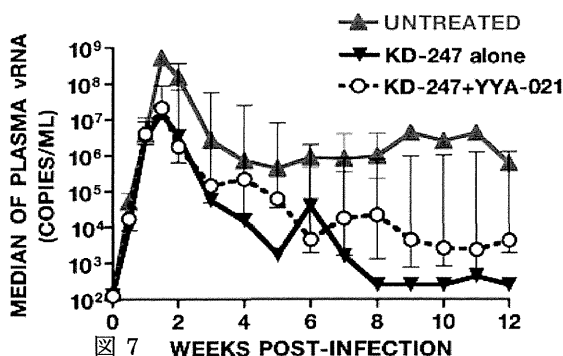


図 7 WEEKS POST-INFECTION

単独投与 (黒実線) 群においてもウイルス感染阻止は達成しなかったが、非投与群 (灰色実線) と比較してウイルス複製は抑制され、特にウイルス曝露 1.5 及び 8 週後では有意な差が見られた。複合投与群 (黒破線) と単独投与群では観察期間中ウイルス複製抑制に有意な差はなかった。ウイルス曝露後の血中 CD4⁺T 細胞数の推移を、非投与群及び YYA-021 および KD-247 複合投与群の結果と共に図 8 に示す。抗体投与群は単独、複合を問わず、SHIV-KS661 が引き起こす非可逆的 CD4 陽性 T 細胞枯渇を阻止した。

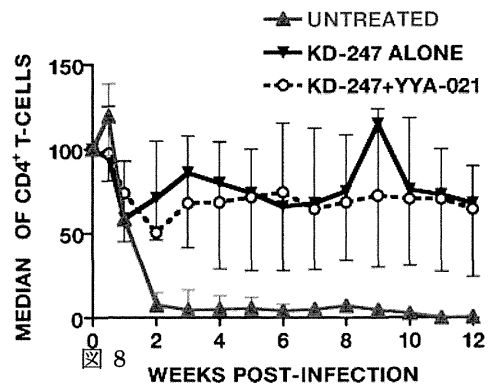


図 8

ウイルスの逃避変異解析: 霊長類を用いた POC 試験で用いた KD-247 および YYA-021 が SHIV-KS661 に対して逃避変異を誘導する様な選択圧となったかをウイルス遺伝子の解析から検討した。KD-247 は Env の可変領域の一つである V3 ループ上の一次配列を抗原決定基として認識するが、エピトープ部位の変異誘導は観察されなかった。一方、他の可変ループ (V1/V2 および V4) に糖鎖付加部位の消失、移動または糖鎖付加部位の近傍で電位の異なるアミノ酸への置換が見られた (表 2)。

V1/V2 LOOP			
CLONE ID	ANIMAL ID, WPI	DEDUCED AMINO ACID SEQUENCE	FREQUENCY
	SHIV KS661	CSFYITTSIRNFKVEYALFNRLDVPVVKNTENTRYRLISC	
	MM542, 6wpiK.....	1/8
a7414g	MM585, 6wpiE.....	5/6
Δ7421-5	MM566, 7wpiE.....	2/10
a7423g	MM542, 6wpiE.....	8/8
g7424a	MM566, 7wpiE.....	3/10
	MM538, 6wpiE.....	12/12
a7432g	MM566, 7wpiE.....	5/10
V4 LOOP			
CLONE ID	ANIMAL ID, WPI	DEDUCED AMINO ACID SEQUENCE	FREQUENCY
	SHIV KS661	CHTAQLPNSITQVAGCTRTGTEQNDIITLQC	
g8036a	MM538 6wpiH.....	12/12
g8054a	MM566 7wpiE.....	4/10

表 2.

観察された変異を持つ env クローンを用いて pseudotype ウイルスを作製し、中和試験を行ったところ、2 クローンが元株と比べて中和抵抗性を示した。YYA-021 が相互作用する HIV-1 Env のアミノ酸は既に報告されている (Yoshimura et al. J. Virol. 2010) が、得られた env の single genome amplicon クローンの遺伝子解析の結果、これらアミノ酸に変異は見られなかった。

D. 考察

本研究班の目的は、KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行うことである。高病原性 SHIV KS661 株に対する抗 V3 抗体 KD-247 の中和活性が CD4 mimic の YYA-021 により著明に増強される事が試験管内で明らかになり、これを個体レベル感染で検証するため、SHIV KS661 感染アカゲザルに感染 24 時間、8 日および 15 日後に KD-247 (16 mg/kg) および YYA-021 (6.25 mg/kg) を静脈内投与した所、非投与群と比較して血漿ウイルス RNA 量を有意に抑制した。しかし、今回の実験で KD-247 単独投与群においても同

様の抑制が見られたことから、今回用いた量の YYA-021 では個体レベルでの中和活性増強は明らかにできなかった。その理由として、二つの可能性が考えられる。一つは SHIV KS661 株が比較的中和感受性であり、KD-247 の高濃度投与で十分抑制されたため YYA-021 の効果がはっきりしなかった可能性がある。もう一つは、YYA-021 の用量と薬物動態の問題である。先行して行った YYA-021 の急性毒性試験で、12.5 mg/kg の YYA-021 の投与で脈拍低下による急性左心不全が観察されている。そこで、6.25 mg/kg を用量として用いたが、YYA-021 の血中濃度は投与完了 15 分後のみ検出可能で、以後は速やかに検出限界以下になった。YYA-021 が速やかに血中から検出出来なくなった理由は明らかではないが、試験管内で擬似的な状況を再現する目的で行った実験（抗凝固血液に YYA-021 を混合、30 分間静置した後、血漿及び血球成分に分けて分析を行った）では、約半分の YYA-021 は血球に吸着、または取り込まれていた。更に血漿を交換後、静置すると YYA-021 は再び血漿中に検出されたことから、本薬剤は血漿と血球の間に、ある平衡状態を以て分布する事が示唆された。このような性質が血漿中または組織間液に存在するウイルスへの作用を考えた時に長時間体内に留まる事が期待出来るので有利である一方、高用量投与によって血漿中の薬効濃度を保つ必要がある。より薬理学的特性（長い血中濃度の維持及び低毒性）の良好な誘導体の開発が必要である。

このようにこれまで作成した低分子 CD4 mimic である NBD-556 や YYA-021 などには、in vivo における薬物動態（分布）の問題が考えられることから、新規骨格を持つ CD4 mimic 化合物の創生を行っている。すなわち NBD 誘導体の芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化するためにインドール骨格含有化合物群を合成した。また、逆に構造固定化をしないオキサミド部位の還元型化合物群を合成した。MOE 2012.10 を用い、Phe43-cavity とのドッキングシミュレーションを行い、数種類の有望な化合物を同定するとともに、ピペリジン部位の向きとオキサミド部位の関係を中心とした構造活性相関は、今後の CD4 mimic の分子設計に有用な情報となる。

臨床研究に向けた研究の第一番目は対象症例の選定である。subtype B 感染症例 117 例の V3 配列に関して、KD-247 の臨床試験で用いた genotype の基準を用いて判定すると、KD-247 による臨床試験の候補となるのは 31 例 (26.5%) であった。これは米国での臨床試験で得られたデータ（高親和性の V3 を持つ例は、210 例中 81 例；37%）に比較して低率であり、我が国において HIV が独自の進化を遂げている可能性を示唆する。また、KD-247 を単独で用いる方法では、対象症例が subtype B 感染症例の 1/4 程度になることを示す。一方、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、交差中和活性を持つ 0.5 μ g に関しては 12 種類のパネルウイルスのうち 9 種類に関して中和増強効果を認めた。また、もともと中和能が弱いかほとんど認められない CD4i 抗体について 5 種類のウイルスで中和活性増強が

みられている。YYA-021 による中和活性の増強は gp120 単量体における結合活性の増強とは必ずしも関連せず、YYA-021 の Env 三量体に対する効果は、単量体に対する効果と異なる可能性が示された。新たな治療用抗体 0.5 μ g がより広範囲のウイルスに反応し、YYA-021 との併用で、多くの臨床分離株で中和抗体感受性を増強するという観察は、今後の抗体を用いた治療法の開発を促進するものである。

E. 結論

cART の進歩により、AIDS の発症阻止が可能となった。しかし、残存する HIV-1 感染細胞の排除は困難なため、治療は一生継続される必要がある。従来の抗ウイルス薬とは異なり、中和抗体とその効果を増強する小分子の併用では、HIV-1 感染細胞を標的とする効果が期待できる。すなわち、ウイルスリザーバーを減少させ、結果的に治療を中断できる可能性がある。これにより、治療期間を短縮し、HIV/AIDS 治療にかかわる医療費の削減につながる。抗体を用いた新規治療法の開発は、in vitro の研究から人への臨床応用を目指した臨床試験の段階に入りつつあるが、in vivo で最大の効果を得るためには、様々な可能性を動物モデルでの検証する必要がある。これには、多くのハードルが存在するが、「機能的治癒」をもたらす治療戦略が現実のものになれば、我が国ばかりか、世界の保険、医療、福祉の向上に役立つ成果が期待できる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表 (論文発表)

1. Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., Igarashi, T., Matsushita, S., Tamamura, H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 7884-7889, 2013.
2. Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralization sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small-molecule CD4 mimic. *J. Gen. Virol.* 94: 2710-2716, 2013.
3. 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.
4. 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.
 5. Kuwata, T., Takaki, K., Yoshimura, K., Enomoto, I., Wu, F., Ourmanov, K.I., Hirsch, V.M., 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.
 6. 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.
 7. Kuwata, T., Takaki, K., Enomoto, I., Kazuhisa, Y., 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.
 8. Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, Letendre S, Matsushita S, et al.). Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. *Clin. Infect. Dis.* 56:1004 -1017, 2013.
 9. 玉村啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗 HIV 剤の創製. *MEDCHEM NEWS* (日本薬学会 医薬化学部会)、24(1)巻 頁 14~19、2014 年
 10. Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* 16(4): 1184-1187 (2014).
 11. Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21(24): 7884-7889, 2013.
 12. Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(22): 6878-6885, 2013.
 13. Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a Replication-competent Simian - human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.* 94(12): 2710-2716, 2013.
 14. Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product. *ACS Chem. Biol.* 8(10): 2235-2244, 2013.
 15. Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 8(10): 1668-1672, 2013.
 16. Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21(15): 4452-4458, 2013.
 17. 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. *Bioorg. Med. Chem.* 21(9): 2518-2526, 2013.
 18. 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. *ChemMedChem* 8(1): 118-124, 2013.
 19. Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Peptide-based Ligand Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C. *Biopolymers: Peptide Science* 100(6): 613-620, 2013.
 20. Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian - human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J Gen Virol.* 94:2710-6, 2013.
 21. Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., Igarashi, T., Matsushita, S., and Tamamura, H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21:7884-9, 2013

(学会発表)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Maeda T, Murakami T. KD-1002 Principal Investigators and The Protocol Team of Quintiles. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1: a phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS 2013) 30 June –3 July 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.
2. Matsushita S. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1 : A Phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). IAS Towards an HIV Cure Symposium. 29th-30th June 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.
3. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Analysis of Env regions important for binding and resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. AIDS Vaccine 2013. 7–10 October 2013. Barcelona, Spain.
4. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Improving the broadness and potency of neutralizing anti-HIV-1 antibodies with a CD4 mimetic compound. AIDS Vaccine 2013. 7–10 October 2013. Barcelona, Spain.
5. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Identification of the Env region responsible for the resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29–31 October 2013, Kumamoto.
6. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Can antibodies contribute to controlling infection with transmitted/founder virus? 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29–31 October 2013, Kumamoto.
7. Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez K, Kawanami Y, Enomoto I, Matsushita S. Miniaturization of antibodies against CD4-induced epitope on gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29–31 October 2013, Kumamoto.
8. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez K, Alam M, Egami Y, Suwa Y, Morioka H, Matsushita S. Post-attachment neutralization as a mechanism of efficient activities of scFv from anti-V3 monoclonal antibody. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29–31 October 2013, Kumamoto.
9. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Effects of Enfuvirtide resistant mutations on the sensitivity to neutralizing antibodies. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29–31 October 2013, Kumamoto.
10. 松下修三, 大類 諭, Post F, Winston J, Hendry B, Gazzard B, Molina J, Liu HC, Piontkowsky D, Cheng AK, Rhee MS, Szwarcberg J. EVG/COBI/FTC/TDF 第 III 相臨床試験における腎機能に関連する安全性の評価 (投与 96 週時点) –アジア人についての層別集計結果を含む–. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
11. 桑田岳夫. シンポジウム 6 -中和抗体と抗 CCR5 阻害薬(Env). 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
12. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Combination of anti-V3 antibodies as a possible strategy for controlling transmitted/founder virus. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
13. 丸田泰広, 桑田岳夫, 田中和樹, Ramirez K, Alam M, 江上由華, 中原悠介, 諏訪喜昭, 森岡弘志, 松下修三. 抗 V3 抗体の小型化による CD4 結合後の HIV-1 中和活性の増進. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
14. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Enfuvirtide resistant mutation N43Dis associated with the enhanced neutralization by 10E8, a broadly neutralizing antibody against gp41 MPER. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
15. 田中和樹, 桑田岳夫, 丸田泰広, Ramirez K, 松下修三. gp120 の CD4-induced epitope に結合する中和抗体の小型化とその特性の検討. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
16. Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology & Medicinal Chemistry. Joint Symposium between Chulalongkorn University and IBB/TMDU on Biomedical Materials and Engineering, Oct 25, 2013, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
17. Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology for the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. The 17th Korean Peptide Protein Society

Symposium. Nov 29, 2013, Seoul National University, Seoul, Korea.

18. 玉村啓和:ケミカルバイオロジーとペプチド科学. 第17回ペプチドフォーラム-ケミカルバイオロジーを先導する明日のペプチド科学:新しい接点と可能性を探る-. 2013年6月18日、東京.
19. 玉村啓和:HIV感染防止AIDS発症防止についての基礎研究. 東京コンソーシアム教員研究セミナー-大学院紹介講演会「疾患予防」-. 2013年7月11日、東京.
20. 玉村啓和:ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブの創製. 生命分子機能研究会 2013 学術集会「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」. 2013年9月19-20日、長浜.
21. 玉村啓和:種々の作用点をターゲットとした抗 HIV 剤の創製. 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 第 42 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み-ウイルス感染症に挑む-」. 2013年12月9日、東京.
22. Nomura W, Ohashi N, Métiéfiot M, Fujino M, Pommier Y, Murakami T, Tamamura H. Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.
23. Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Honda Y, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized C34-Related Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.
24. 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 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
25. 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 原田恵嘉, 吉村和久, 橋本知恵, 野村 渉, 五十嵐樹彦, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を分子標的とするインドール型低分子 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 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
26. 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 吉村和久, 原田恵嘉, 橋本知恵, 野村 渉, 五十嵐樹彦, 松下修三, 玉村啓和. 抗 HIV 活性を有する CD 4 ミミック誘導体の構造活性相関研究:インドール型誘導体の設計、合成とその生物活性評価. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2013 年 10 月 26 日.
27. Taketomi S, Konno M, Narumi T, Nomura W, Tamamura H. Structure Activity Relationship Studies on a Spacer Moiety of Small Molecular CXCR4 Antagonists as Potent HIV-1 Entry Inhibitors. The 14th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 29-31, 2013.
28. Hirota Y, Narumi T, Yoshimura K, Harada S, Hashimoto C, Nomura W, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. Indole-type Small CD4 Mimic Molecules Targeting an HIV Envelope Protein gp120. The 14th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 29-31, 2013.
29. 大附寛幸, 五十嵐樹彦, 三浦智行:CCR5 指向性サブタイプ C エンベローを持つサル指向性 HIV-1 のブタオザルにおける複製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日
30. 大附寛幸, 丸田泰広, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 原田恵嘉, 三浦智行, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦:抗 V3 抗体および低分子 CD4 ミミック曝露後投与によるアカゲザルでの SHIV 複製抑制 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20 日-22 日
31. 米田舞, 大附寛幸, 松下修三, 五十嵐樹彦, 三浦智行:新規 CCR5 指向性かつ中和抵抗性 SHIV 分子クローンの作製及び解析 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20-22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許

1) 出願予定

発明者:玉村啓和、廣田雄樹、苛原 優、野村渉、鳴海哲夫、松下修三、吉村和久、原田恵嘉
発明の名称:抗 HIV 活性を有する低分子 CD4 mimic の開発

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

臨床研究のインフラ整備、臨床プロトコルの作成

研究分担者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨：

ヒト型化抗 V3 抗体である KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、中和抗体を用いた治療法を、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。我が国における中和抗体療法の対象症例選択の第一歩として、熊本大学の subtype B 感染症例 117 例のエンベロープ蛋白 (Env) の V3 配列を検討した。KD-247 の臨床試験で用いた genotype の基準を用いると、臨床試験の候補となるのは 31 例 (26.5%) であった。抗体による治療の対象症例拡大をめざし、候補抗体パネルを用いて、中和活性を増強する低分子化合物 YYA-021 存在下または非存在下で広範囲の臨床分離株に対する有効性を検討した。subtype 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 μ 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。また、CD4i 抗体では 5 種類で中和活性増強がみられた。また、臨床例から分離したエンベロープを持つ pseudovirus に関する検討を開始し、有効性を確認した。新たな治療用抗体 0.5 μ g が、多くの臨床分離株を含む広範囲のウイルスに反応し、YYA-021 との併用で中和抗体感受性を増強するという観察は、今後の抗体を用いた治療法の開発を促進するものである。

A. 研究目的

本研究の最終目的は、中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざした治療法の開発である。抗ウイルス療法 (cART) の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著名に改善したが、長期治療の過程で様々な慢性合併症が起こる。その病態には、残存するウイルス増殖と慢性炎症の関与が考えられ、残存ウイルスの排除をめざす「治癒に向けた研究」は本領域で最も重要な研究である (Deeks S. et al., Nat. Rev. Immunol.12, p607, 2012)。我々は、化血研と共同で、HIV-1 の V3-tip に対するヒト型単クローン抗体 KD-247 の第 I 相 B 臨床試験 (NCT00917813) を行い、ヒトにおける安全性と有効性を確認した。すなわち、16mg/kg 投与の 6 例中 2 例で 1log 以上、4 例で 0.45log 以上の

ウイルス量の低下が認められた。注目すべきは KD-247 の投与が終了し、血中濃度低下後も HIV-RNA のリバウンドが見られない症例が観察された点で、KD-247 は HIV の中和ばかりでなく、慢性感染細胞を排除し、セットポイントを下げた可能性が示唆された。本研究班では、KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。その一つは、抗体の必要量を減らすことであり、もう一つは耐性ウイルス出現の抑制である。

B. 研究方法

HIV 感染症例より分離した PBMC から、DNA を分離し、nested-PCR にてエンベロープをクローニングし、遺伝子配列を解析した。これまで得ら

れた解析結果から、KD-247 や我々の作成したパネルウイルスに対する反応性を検討した。一部の配列に関しては、発現ベクターに組み替え、pseudovirus を作成し、中和感受性を検討した。また、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、共同研究者の東京医科歯科大学、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。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の臨床試験に用いた抗 V3 中和抗体 KD-247 を用い、YYA-021 との相乗効果の検討をおこなった。そのほかに、ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP) が供給する subtype B ウイルス由来のエンベロープパネル (Standard virus panel of subtype B; SVPB)、などを用いて 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) パネルの供与を受け、これらに対する中和抗体活性並びに YYA-021 の中和増強活性を引き続き検討した。

(倫理面への配慮) HIV 感染症例由来の血液検体を用いたウイルス分離及び塩基配列同定、中和抗体感受性試験などに関しては、臨床研究に関する倫理指針に従い、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得たのちに採血した (臨床研究登録 UMIN000004720)。

C. 研究結果

これまでの研究を継続し、YYA-021 の有効性に関して、subtype B 標準パネルウイルス (SVPB) のみならず、初感染ウイルスなどについて調べ、50%以上の臨床分離株に中和増強効果を認めた。また、我が国における中和抗体療法の対象症例選択の第一歩として、熊本大学の subtype B 感染症例 117 例の V3 を検討した。KD-247 の臨床試験で用いた genotype の基準 (図1) を用いると、KD-247 による臨床試験の候補となるのは 31 例 (26.5%) であった。

```

XIGPGRAF
XIGPGRAL
XIGPGRAI
XIGPGRSF
XIGPGRTF
XVGPGRAL
↑
X: Not P, K, and R

```

図1. KD-247の臨床試験で用いた適合症例選択のためのV3配列

これらの症例由来ウイルスの中和感受性を調べる研究 (phenotype 試験) を開始した。すなわち、これらの臨床試験候補症例より、HIV-1 のエンベロープをクローニングし、発現ベクターに組み替え、pseudovirus を作成し、これを用いて中和感受性および YYA021 の中和増強活性を検討した。図 2 に一例を示す。

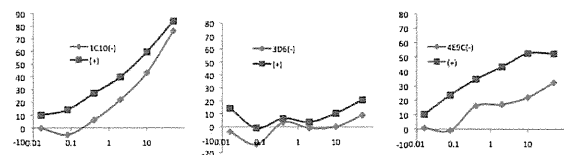


図2. 臨床症例由来のエンベロープを持つシェウドウイルスに対するYYA-021の中和感受性増強

本症例の V3 シーケンスは NNTRKSIHIGPGRAWYATTDII と KD-247 の臨床試験で用いた基準とは 317 のアミノ酸のミスマッチがある。すなわち KD-247 では 317 が F、L または I でなければ中和活性が弱いのにに対し、0.5 γ (1C10) に対しては、L317W であっても中

和感受性であった。一方、YYA-021 の存在下に V3 抗体 (1C10) と CD4i 抗体 (4E9C) に対して、それぞれ IC₅₀ 換算で約 5 倍と 10 倍以上の中和感受性の増強が観察された。

我々は、米国 NIAID が供給する subtype 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 を用いて検討を継続している。IC₅₀ の値で比較すると、12 種類のうち CC₅₀ 以下の値で感受性 (IC₅₀) が観察されたのは 6 種類で、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。また、NBD-556 と YYA-021 を比較すると、SVPB15 の例外をはぶいて IC₅₀ の値は YYA-021 が NBD-556 のほぼ 2 倍ないし同等であった。一方、SVPB パネルの pseudovirus 産生細胞から gp120/160 を抽出し、抗 C5 抗体にて gp120/160 を ELISA plate に capture する方法で結合活性を検討した。3 種類の抗体 (1C10/0.5 μ g, 49G2, 4E9C) を用いて検討したが、驚いたことに、1C10/0.5 μ g が SVPB15 に反応しない以外、これらの抗体はすべての gp120 単量体によく反応した (図 3)。

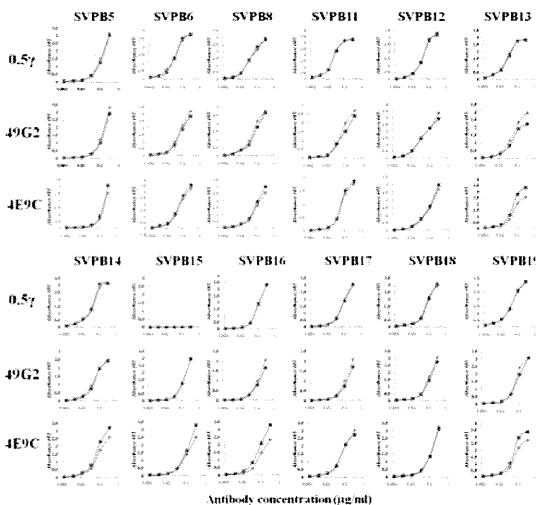


図3. Subtype B virus panel由来の単量体gp120/160に対する単クローン抗体パネルの反応性とYYA-021による反応性の増強効果

YYA-021 による結合の増強効果は 4E9C でのみ観察可能であった。4E9C の結合活性は、6

種類のウイルスに関しては明らかにその増強がみられたが、2 種類では全く見られず、4 種類はその中間であった。これらの結果を一覧表に示す (表1)。YYA-021 による中和活性の増強は gp120 単量体における結合活性の増強とは必ずしも関連せず、YYA-021 の Env 三量体に対する効果は、単量体 gp120 に対する効果と異なる可能性が示された。

表1. YYA-021のSubtype B panel virusに対する中和増強効果とgp120単量体への反応性増強効果

IC ₅₀ to YYA021*	SVPB5		6	8	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	S	M	M	-	R	R	-	S	M	-	M	S	
Binding enhancement of 4E9C against monomeric gp120**	++	-	-	+	+/+	++	++	++	++	++	-	-	++
Neutralization enhancement (V3:49G2)***	++	-	ND	+	++	+/+	+	ND	-	+	+	+	+
Neutralization enhancement (CD4i:4E9C)***	++	+/+	+/+	++	+/+	-	+/+	++	-	++	-	-	-

*IC₅₀ to YYA021 was expressed as S: <100 μ M, M: 100-200 μ M, R: >200 μ M, -: no suppression, ND: not determined.

**Binding enhancement of 4E9C was expressed as ++: >120%, +: 110-120%, +/+: 100-110%, -: <100% of control.

***Neutralization enhancement was evaluated by changes of IC₅₀, results: ++: >5x, +: 2-5x, +/+: <2x, -: no enhancement.

D. 考察

本研究班では、KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行うことである。その一つは、抗体の必要量を減らすことであり、もう一つは耐性ウイルス出現の抑制である。熊本大学の subtype B 感染症例 117 例の V3 配列に関して、KD-247 の臨床試験で用いた genotype の基準 (図1) を用いて判定すると、KD-247 による臨床試験の候補となるのは 31 例 (26.5%) であった。これは米国での臨床試験で得られたデータ (高親和性の V3 を持つ例は、210 例中 81 例; 37%) に比較して低率であり、我が国において HIV が独自の進化を遂げている可能性を示唆する。また、KD-247 を単独で用いる方法では、対象症例が 1/4 程度になることを示す。一方、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、交差中和活性を持つ 0.5 μ g に関しては 12 種類のパネルウイルスのうち 9 種類に関して中和増強効果を認めた。また、もともと中和能が弱いかほとんど認められない

CD4i 抗体について 5 種類のウイルスで中和活性増強がみられている。YYA-021 による中和活性の増強は gp120 単量体における結合活性の増強とは必ずしも関連せず、YYA-021 の Env 三量体に対する効果は、単量体に対する効果と異なる可能性が示された。

E. 結論

新たな治療用抗体 0.5 γ がより広範囲のウイルスに反応し、YYA-021 との併用で、多くの臨床分離株で中和抗体感受性を増強するという観察は、今後の抗体を用いた治療法の開発を促進するものである。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., Igarashi, T., Matsushita, S., Tamamura, H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 7884–7889, 2013.
2. Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralization sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small-molecule CD4 mimic. *J. Gen. Virol.* 94: 2710-2716, 2013.
3. 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.
4. 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.
5. Kuwata, T., Takaki, K., Yoshimura, K., Enomoto, I., Wu, F., Ourmanov, K.I., Hirsch, V.M., 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.
6. 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.
7. Kuwata, T., Takaki, K., Enomoto, I., Kazuhisa, Y., 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.
8. Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, Letendre S, Matsushita S, et al.). Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. *Clin. Infect. Dis.* 56:1004 -1017, 2013.

(学会発表)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Maeda T, Murakami T. KD-1002 Principal Investigators and The Protocol Team of Quintiles. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1: a phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS 2013) 30 June –3 July 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.

2. Matsushita S. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1 : A Phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). IAS Towards an HIV Cure Symposium. 29th-30th June 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.
3. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Analysis of Env regions important for binding and resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. AIDS Vaccine 2013. 7-10 October 2013. Barcelona, Spain.
4. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Improving the broadality and potency of neutralizing anti-HIV-1 antibodies with a CD4 mimetic compound. AIDS Vaccine 2013. 7-10 October 2013. Barcelona, Spain.
5. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Identification of the Env region responsible for the resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
6. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Can antibodies contribute to controlling infection with transmitted/founder virus? 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
7. Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez K, Kawanami Y, Enomoto I, Matsushita S. Miniaturization of antibodies against CD4-induced epitope on gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
8. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez K, Alam M, Egami Y, Suwa Y, Morioka H, Matsushita S. Post-attachment neutralization as a mechanism of efficient activities of scFv from anti-V3 monoclonal antibody. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
9. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Effects of Enfuvirtide resistant mutations on the sensitivity to neutralizing antibodies. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
10. 松下修三, 大類 諭, Post F, Winston J, Hendry B, Gazzard B, Molina J, Liu HC, Piontkowsky D, Cheng AK, Rhee MS, Szwarcberg J. EVG/COBI/FTC/TDF 第 III 相臨床試験における腎機能に関連する安全性の評価 (投与 96 週時点) -アジア人についての層別集計結果を含む-. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
11. 桑田岳夫. シンポジウム 6 -中和抗体と抗 CCR5 阻害薬(Env). 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
12. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Combination of anti-V3 antibodies as a possible strategy for controllingtransmitted/founder virus. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
13. 丸田泰広, 桑田岳夫, 田中和樹, Ramirez K, Alam M, 江上由華, 中原悠介, 諏訪喜昭, 森岡弘志, 松下修三. 抗 V3 抗体の小型化による CD4 結合後の HIV-1 中和活性の増進. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
14. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Enfuvirtide resistant mutation N43Dis associated with the enhancedneutralization by 10E8, a broadlyneutralizing antibody against gp41 MPER. 第 27 回日本エイズ学会学術集

会・総会. 2013年11月20日-22日, 熊本.

15. 田中和樹, 桑田岳夫, 丸田泰広, Ramirez K, 松下修三. gp120 の CD4-induced epitope に結合する中和抗体の小型化とその特性の検討. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013年11月20日-22日, 熊本.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発
分担研究課題名 中和抗体の効果を高める CD4 mimic の開発

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所教授

研究要旨 我々がここ数年研究している低分子 CD4 ミミック NBD-556 や YYA-021 は、HIV 膜タンパク質 gp120 と宿主細胞タンパク質 CD4 の相互作用を標的とする HIV 侵入阻害剤である。これらは侵入阻害活性だけでなく、可溶性 CD4 と同様に gp120 の構造変化を誘起する特性も有している。本研究ではこれら CD4 ミミックのさらなる活性の向上を目的とし、中和抗体との併用を指向した新規治療法の開発を目指した。今年度は CD4 ミミックの新規骨格の検討によるさらなる有用化合物の創出研究を行った。CD4 ミミックの芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化するためにインドール骨格含有化合物群を合成した。また、逆に構造固定化をしないオキサミド部位の還元型化合物群を合成した。これらの構造活性相関を検討し、新規化合物の創出を行った。

A. 研究目的

現在の抗ウイルス薬による治療においては、HIV 生活環の阻害ばかりでなく、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ている。我々がここ数年来進めている中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で、HIV-1 gp120 の CD4 結合部位に作用し、立体構造を変化させ、中和抗体の反応性を飛躍的に増強する低分子 CD4 ミミックを採用し、その効果に関する研究を行ってきた(図 1, 2)。CD4 ミミックのひとつ NBD-556 は、Env と CD4 分子の相互作用を阻害するため、侵入阻害剤候補として開発された分子である(Zhao Q, et al., *Virology*, 339:213-25, 2005, Schon A, *Biochemistry*, 45:10973-80, 2006)。NBD-556 は比較的細胞毒性

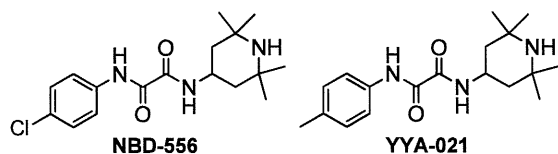


図 1 CD4 ミミック NBD-556 と YYA-021 の構造

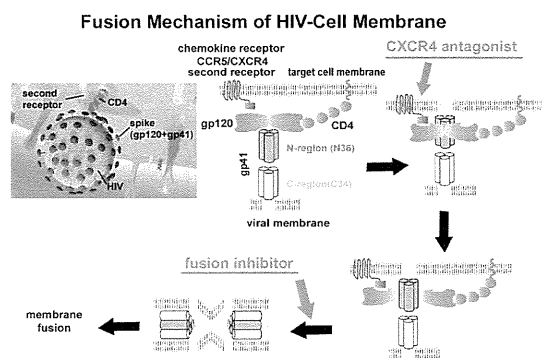


図 2 HIV-1 の侵入機構

が高いという欠点もあり、我々は NBD-556 とほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性が低い YYA-021(NBD-559) (図 1) 等を見出した。本研究班では、さらに有用な誘導体を探索し、このような化合物を中和抗体との併用に用いた機能的治癒という新しい治療戦略が *in vivo* でも有効性であるかどうかを動物モデルで検証することを目的とした。

研究代表者である松下は、交差反応性の中和抗体を持つ長期非進行症例から中和抗体パネルを作成している。我々の戦略は、立体構造変

様式 A (8)

別紙 3

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に基づく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ことや (Decker JM, et al., J Exp Med, 201:1407-19, 2005)、中和抗体 KD-247 の臨床試験が進行中であること (Eda Y, et al., J Virol 80:5563-5570, 2006) が我々の戦略の実現性を後押ししている。

これまで構造活性相関研究により、芳香環部位のパラ位およびメタ位への塩素原子およびフッ素原子の導入、あるいは、ピペリジン環部位への疎水性基の導入が抗 HIV 活性の向上に寄与することがわかっている(図 3)。また、さらに低濃度で有効で、毒性が低く、非クレイド B ウイルスなどにも有効な新規誘導体を探索することを目的としており、今年度は、さらに有効な新規誘導体を探索した。

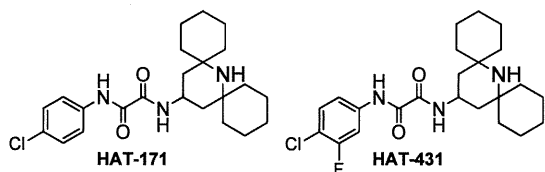


図 3 これまでの構造活性相関で得られたリード化合物の構造の構造

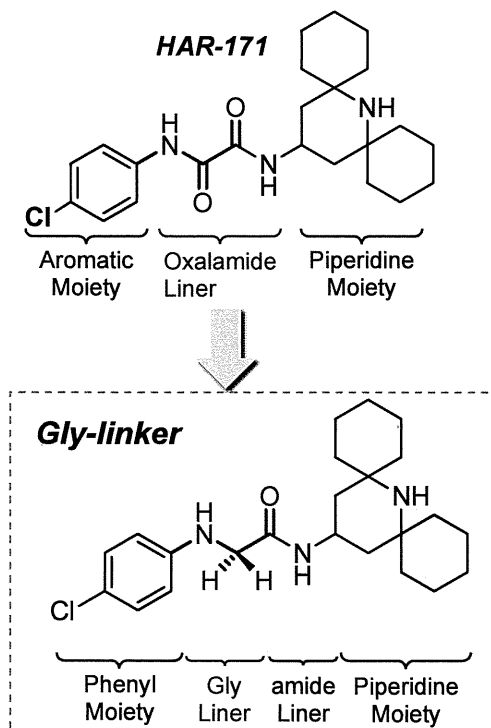
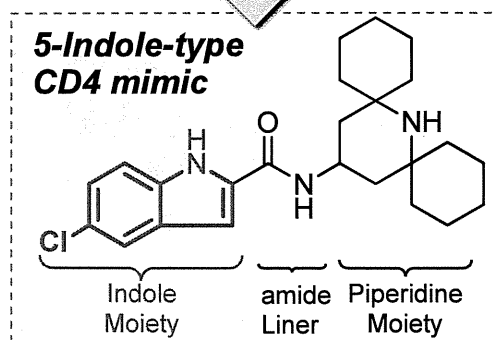
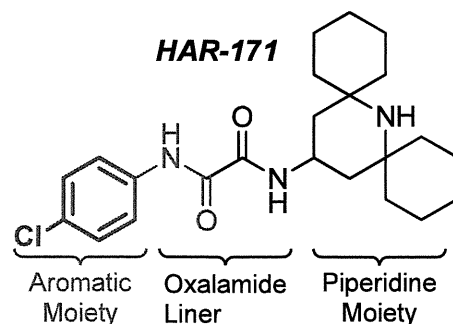


図 5 Gly-linker タイプ CD4 mimic のデザイン



Increase of planarity

Reduction of entropy

図 4 5-indole タイプ CD4 mimic のデザイン

B. 研究方法

1) 新規骨格の構築

CD4 ミミックと gp120 の結合モデルを精査すると、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、化合物群をデザインした (図 4)。芳香環への塩素原子およびフッ素原子の導入、置換位置とその効果について検討した。

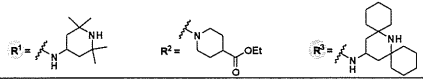
また、逆にコントロールとして Gly リンカータイプの化合物群も合成した (図 5)。

(倫理面への配慮)

様式 A (8)

別紙 3

今年度の分担者の研究においては、該当事項



Structure	R ^X	Compd.	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	FACS (MFI) ^c	Rel. FACS ^d
	R ¹	NBD-556	0.63	70.4	8.91	1.00
	R ¹	5	6.20	>300	12.3	3.95
	R ²	6	>100	>200	7.63	0.06
	R ³	7	1.13	>200	6.93	-
	R ¹	8a	3.65	48.6	8.70	0.82
	R ¹	9a	>100 (10 μM, 32%)	19.4	8.55	0.68
	R ²	10a	>100	>200	8.24	0.42
	R ³	11a	3.60	11.4	8.05	0.25
	R ¹	12a	>100	60.3	8.08	0.28
	R ²	13a	>100	>200	8.14	0.33
	R ³	14a	>100	9.6	5.27	-

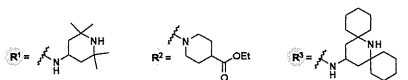
図 6 5-indole タイプ CD4 mimic の活性評価

はなかった。

C. 研究結果

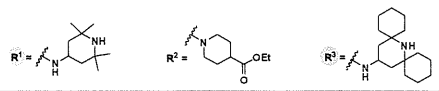
1) indole タイプ CD4 mimic の活性評価と構造活性相関

合成した 5-indole タイプ CD4 mimic の抗



Structure	R ^X	Compd.	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	FACS (MFI) ^c	Rel. FACS ^d
	R ¹	NBD-556	0.63	70.4	31.36	-
	R ¹	15a	>100	37.4	48.21	2.61
	R ²	16a	>100	52.6	19.70	0.112
	R ³	17a	>100 (10 μM, 11%)	10.7	20.66	0.0200
	R ¹	18a	88.7	102.7	19.92	0.0906
	R ²	19a	>100	121.4	19.67	0.114
	R ³	20a	>100	11.3	19.09	0.170
	R ¹	15b	>100 (10 μM, 27%)	33.2	21.66	0.0753
	R ²	16b	>100	78.4	24.87	0.381
	R ³	17b	>100	33.9	24.20	0.317
	R ¹	18b	>100	18.7	24.55	0.351
	R ²	19b	>100	41.1	19.82	0.100
	R ³	20b	>100	29.4	22.14	0.121

図 7 6-indole タイプ CD4 mimic の活性評価



Structure	R ^X	Compd.	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	FACS (MFI) ^c	Rel. FACS ^d
	R ¹	NBD-556	0.63	70.4	65.31	1.00
	R ¹	8a	3.65	48.6	18.34	-
	R ¹	27	36.9	N. D.	30.22	0.224
	R ²	28	>100	N. D.	23.76	0.081
	R ³	29	2.20	>100	19.62	-
	R ¹	5	6.20	>300	18.78	-
	R ¹	30	23.0	N. D.	30.7	0.234
	R ²	31	63.0	N. D.	26.15	0.134
	R ³	32	1.0	>100	36.42	0.361
	R ¹	24	>30.0	N. D.	23.42	0.073
	R ²	25	>100	N. D.	18.46	-
	R ³	26	10.8	N. D.	28.7	0.190

図 8 Gly リンカータイプ CD4 mimic の活性評価

HIV 活性および細胞毒性を評価し、いくつかの化合物を図 6 に示した。化合物 **8a**, **11a** に顕著な抗 HIV 活性が見られた。さらに、6-indole タイプ CD4 mimic も合成し、その抗 HIV 活性および細胞毒性を評価した(図 7)。しかしながら、これらの化合物群には高活性なものは見られなかった。そこで、逆にオキサミド部位が構造的にフレキシブルになるよう Gly リンカータイプの化合物群も合成した。オキサミド部位がフレキシブルになっても、化合物 **29**, **26** に顕著な抗 HIV 活性が見られ、これらの細胞毒性は軽減していた。

様式 A (8)

別紙 3

2) Docking study による解析

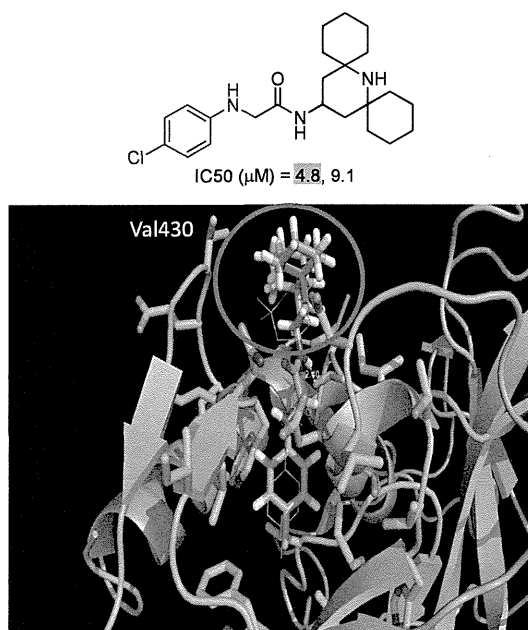


図 9 Gly リンカータイプ CD4 mimic 化合物 **29** の Phe43-cavity へのドッキングモデル(MOE 2012.10)

NBD-556 と Phe43-cavity の共結晶 (3TGS) を参考にして、合成した CD4 ミミックと Phe43-cavity のドッキングシュミレーションを行い、構造変換による結合様式の変化を考察した。図 9 に化合物 **29** の Phe43-cavity へのドッキングモデルを示した。芳香環部位はほぼ変化しておらず、ピペリジン部位の向きが紙面と向き合うように変化していることが見て取れた。このことより、Gly リンカーへ構造変換しても、ある程度高活性が維持される理由が推察された。

D. 考察

低分子 CD4 ミミック NBD-556 や YYA-021 誘導体の芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化するためにインドール骨格含有化合物群を合成した。また、逆に構造固定化をしないオキサミド部位の還元型化合物群を合成した。MOE 2012.10 を用い、Phe43-cavity とのドッキングシュミレーションを行い、ピペリジン部位の向きとオキサミド部位の関係を中心に構造活性相関を議論し、今後の CD4 ミミックの分子設計に有用な情報を得た。

E. 結論

CD4 ミミック誘導体の各部位が Phe43-cavity のアミノ酸残基と静電的相互作用および疎水性相互作用している。ドッキングモデルを基にして、ピペリジン部位の向きとオキサミド部位の関係を中心に構造活性相関研究を進めることにより、さらなる有用な CD4 ミミックの創製が可能であると考えられた。

F. 謝辞

熊本大学エイズ学研究センター、松下修三教授、国立感染症研究所エイズ研究センター、吉村和久室長、原田恵嘉博士、京都大学ウイルス研究所、五十嵐樹彦教授、三浦智行准教授、大附寛幸博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 玉村啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗 HIV 剤の創製. MEDCHEM NEWS (日本薬学会 医薬化学部会)、24(1)巻 頁14~19、2014年
- 2) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* 16(4): 1184–1187 (2014).
- 3) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21(24): 7884–7889, 2013.
- 4) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(22): 6878–6885, 2013.
- 5) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a Replication-competent Simian-human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.* 94(12): 2710–2716, 2013.
- 6) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product. *ACS Chem. Biol.* 8(10): 2235–2244, 2013.
- 7) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 8(10): 1668–1672, 2013.
- 8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N,