

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	試験管内で多剤耐性HIVに対して強力な活性を発揮する bis-tetrahydrofuranylurethane(bis-THF)構造を有する新規の非ペプチド系HIVプロテアーゼ阻害剤(PI) GRL-...
Author(s)	天野, 将之
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11090">http://hdl.handle.net/2298/11090</a>
Right	

# 学位論文

## Doctor's Thesis

試験管内で多剤耐性HIVに対して強力な活性を発揮する  
*bis*-tetrahydrofuranylurethane (*bis*-THF) 構造を有する新規の非  
ペプチド系HIVプロテアーゼ阻害剤 (PI) GRL-98065の研究

(A novel *bis*-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease  
inhibitor (PI) GRL-98065 potent against multi-PI-resistant HIV *in vitro*)

天野 将之  
Masayuki Amano

指導教官

熊本大学大学院医学教育部博士課程  
臨床医科学専攻血液内科学

満屋 裕明 教授

2008年3月

# 学 位 論 文

Doctor's Thesis

試験管内で多剤耐性HIVに対して強力な活性を発揮する  
*bis*-tetrahydrofuranylurethane (*bis*-THF) 構造を有する新規の非  
ペプチド系HIVプロテアーゼ阻害剤 (PI) GRL-98065の研究

(A novel *bis*-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease  
inhibitor (PI) GRL-98065 potent against multi-PI-resistant HIV *in vitro*)

天野 将之

Masayuki Amano

指導教官： 血液内科学教授 満屋 裕明

審査委員： ウイルス制御学教授 滝口 雅文

病態制御学教授 松下 修三

感染防御学教授 原田 信志

予防開発学教授 岡田 誠治

2008年3月

# 目次

- ① 要旨
- ② 発表論文リスト
- ③ 謝辞
- ④ 略語一覧
- ⑤ 研究の背景と目的
  - 1. HIV-1 感染症とは
  - 2. 抗 HIV 療法の進歩と問題点
  - 3. HIV-1 の生活環と薬剤標的
  - 4. HIV-1 プロテアーゼの機能とプロテアーゼ阻害剤の作用機序
  - 5. HIV-1 の薬剤耐性獲得機序
  - 6. 本研究の目的
- ⑥ 実験方法
  - 1. 細胞およびウイルス
  - 2. 使用薬剤
  - 3. 抗ウイルス活性および細胞毒性の評価
  - 4. 試験管内での PI 耐性誘導実験
  - 5. プロテアーゼおよび gag 領域の塩基配列の決定
  - 6. GRL-98065 耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> の複製能評価
  - 7. 結晶構造解析
- ⑦ 実験結果
  - 1. HIV-1<sub>LAI</sub> および 2 種類の HIV-2 に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性および細胞毒性の評価
  - 2. 試験管内で既存の PIs に高度耐性を獲得した変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価
  - 3. 種々の HIV-1 subtype に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価
  - 4. 複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価
  - 5. 試験管内における GRL-98065 耐性変異 HIV-1 の誘導
  - 6. GRL-98065 耐性変異 HIV-1 の複製能評価
  - 7. GRL-98065 耐性変異 HIV-1 に対する既存 PIs の活性評価
  - 8. GRL-98065 と HIV-1 プロテアーゼ間の結晶構造解析
- ⑧ 考察
- ⑨ 結語
- ⑩ 参考文献

## 1) 要旨

[ 目的 ] 多剤併用療法が HIV-1 感染症の治療に効果を挙げる一方で、薬剤耐性株の出現が問題となっており、薬剤耐性株に有効かつ耐性獲得に抵抗する新規の抗 HIV 剤の開発が急務となっている。我々は、*bis*-THF 構造を有する新規の HIV-1 プロテアーゼ阻害剤(PI)である GRL-98065(065)を同定し、その抗 HIV 活性を検討した。

[ 方法 ] 薬剤の活性測定は MT2 を用いた MTT assay と PBMC、MT4 を用いた p24 assay で行った。併せて 065 と HIV-1 プロテアーゼ(PR)の相互作用について結晶構造解析を行った。

[ 結果 ] MTT assay において、065 は野生型 HIV-1 に対して強力な活性を発揮( $IC_{50}$ : ~0.5 nM)し、細胞毒性は軽度で( $CC_{50}$ : 35.7  $\mu$ M)、selectivity index (SI)は 71,400 と佳良であった。2 種類の HIV-2 株に対しても良好な活性を示した( $IC_{50}$ : ~5 nM)。p24 assay で、6 種類の既存 PIs 高度耐性株に対して強い活性を示した( $IC_{50}$ : 1.5 ~ 5.7 nM)が、APV 高度耐性株に対しては、野生型と比べ 107 倍の活性低下を認めた( $IC_{50}$ : 32 nM)。また複数の多剤耐性臨床分離株に対し強力な活性を示し( $IC_{50}$ : 2.7 ~ 5.6 nM)、種々の HIV-1 subtypes に対しても高い活性( $IC_{50}$ : 0.2 ~ 0.5 nM)を示した。試験管内 065 耐性誘導では、対照薬と比較して 065 に対する HIV-1 の耐性獲得は遅延した。065 耐性株は複数の既存 PIs に対して感受性を維持した。結晶構造解析で *bis*-THF 構造が PR 活性中心部位(Asp29, Asp30)の主鎖と強固に結合し、対側の benzodioxole 構造が PR flap 部位の Gly48'と水素結合を有することが判明した。

[ 考察 ] 065 は、試験管内で多剤耐性臨床分離株を含めた HIV-1 および HIV-2 の複製を、非常に低い濃度で阻害した。また複数の既存 PIs 耐性株に対し高い活性を維持していたが、APV 耐性株に対して活性低下を認めた。構造の類似性が交叉耐性に関与していると考えられた。試験管内 065 耐性誘導において、PR 領域に 10 ヶ所の変異を確認した。このうち 065 の prototype である TMC126 で出現報告のある特徴的な A28S 変異を認め、この変異が同様に 065 耐性にも関与する可能性が示唆された。結晶構造解析の結果、*bis*-THF 構造が PR 活性中心の主鎖と強固に結合することに加え、benzodioxole 構造が可動性に富んだ flap の Gly48'と水素結合することにより、065 の PR への結合を安定化させ、高い抗 HIV 活性に関与していると考えられた。

[ 結論 ] 本研究結果により、新規の HIV-1 PI である 065 は多剤耐性株を含めた広いスペクトラムの高い抗 HIV 活性を有し、薬剤耐性 HIV 感染症例の有望な治療薬となる可能性を持つことが示唆された。

## 2 ) 発表論文リスト

### ① 関連論文

1. Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Debananda Das, Jianfeng Li, Sofiya Leschenko, Yuan-Fang Wang, Peter I. Boross, Irene T. Weber, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya  
A novel *bis*-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) GRL-98065 potent against multi-PI-resistant HIV *in vitro*.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 2143-2155, 2007.

### ② その他の論文

1. Yasuhiro Koh, Shintaro Matsumi, Masayuki Amano, Davis DA, Jianfeng Li, Sofiya Leschenko, Baldrige A, Tatsuo Shioda, Yarchoan R, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya  
Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization.,  
*Journal of Biological Chemistry*. 282: 28709-28720, 2007.
2. Hiroto Nakata, Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Eiichi Kodama, Guangwei Yang, Christopher M. Bailey, Satoru Kohgo, Hiroyuki Hayakawa, Masao Matsuoka, Karen S. Anderson, Yung-Chi Cheng, and Hiroaki Mitsuya  
Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 2701-2708, 2007
3. 天野将之, 満屋裕明 「HIV感染症に対する新しい治療薬開発の動向」,  
医学のあゆみ, 医歯薬出版(東京), 213: 891-900, 2005.
4. 天野将之, 満屋裕明 「米国における周産期HIV感染の現状と対策」  
周産期医学, 東京医学社(東京), 37: 1499-1508, 2007

### 3 ) 謝辞

本研究の機会を賜り、御指導頂きました熊本大学大学院医学教育部血液内科学・感染免疫診療部教授満屋裕明先生に深く感謝いたします。

実験手技・実験計画等について御指導頂きました熊本大学医学部血液内科学・感染免疫診療部宮川寿一先生、こう康博先生、中田浩智先生に深く感謝いたします。

実験手技指導・実験補助を頂いた熊本保健科学大学青木学先生、熊本大学大学院医学教育部血液内科学・感染免疫診療部青木宏美技官、中山麻紀技官に深く感謝いたします。

#### 4 ) 略語一覧

HIV-1 : human immunodeficiency virus 1

AIDS : acquired immunodeficiency syndrome

HAART : highly active antiretroviral therapy

PIC : pre-integration complex

FCS : fetal calf serum

PI : protease inhibitor

SQV : saquinavir

RTV : ritonavir

APV : amprenavir

NFV : nelfinavir

IDV : indinavir

LPV : lopinavir

ATV : atazanavir

DRV : darunavir

*Bis*-THF : *bis*-tetrahydrofuranylurethane

TCID<sub>50</sub> : tissue culture infectious dose 50%

IC<sub>50</sub> : 50% inhibitory concentration

CC<sub>50</sub> : 50% cytotoxicity concentration

SI : selectivity index

DMSO : dimethyl sulfoxide

PHA : phytohemagglutinin

PBMCs : peripheral blood mononuclear cells

PCR : polymerase chain reaction

LTR : long terminal repeat

MDR : multi-drug resistant

PDB : protein data bank



## 5 ) 研究の背景と目的

### 1. HIV-1 感染症とは

HIV-1 (human immunodeficiency virus 1) は一本鎖 RNA のゲノムを持つレトロウイルス科に属するウイルスであり、そのゲノムは gag, pol, env といったレトロウイルスの基本となる構造遺伝子を含んだ 10 種類の遺伝子をコードする。HIV-1 はヒトに感染することによって感染個体でのヘルパーT 細胞である CD4 陽性 T 細胞の減少を特徴とする後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) を引き起こす。1981 年に米国西海岸において最初の後天性免疫不全患者の症例報告があり、その 2 年後に患者の組織より初めて HIV-1 ウイルスが分離培養されてからすでに四半世紀が経とうとし(1)、この間 HIV-1 に関する研究はウイルスの各蛋白 (構成蛋白やウイルス酵素、調節蛋白など) の構造学的および機能的解析・宿主細胞への感染からウイルス複製にいたる過程の解明・感染個体において免疫不全へ進展する過程や病態の把握・治療薬の開発など多方面において長足の進歩を遂げてきたが、10 kb 弱のゲノムを持つ 80~120 nm 程度の非常に小さなこの病原体において、我々が解明すべき領域は未だ多々存在するであろう。

HIV-1 感染症では、本来宿主をウイルスなどの感染より守る免疫担当細胞の総括といえる活性型 CD 4 陽性 T 細胞に主に感染が起こり、宿主ゲノムに組み込まれたプロウイルス DNA より新規の感染性ウイルスが産生され新たな感染が繰り返されて感染細胞を破壊していく。

同時に休止期にあるメモリーCD4陽性T細胞やマクロファージのような長期間生存する細胞にも感染する。宿主側の免疫機能が強く働く感染初期にはCD4陽性T細胞数は感染個体において保たれているが、宿主免疫より回避したウイルスが増殖する感染後期においては、免疫中枢であるCD4陽性T細胞の著明な減少とともに、カリニ肺炎やサイトメガロ感染症、真菌感染症などの日和見感染症をきたすようになる。また悪性リンパ腫に代表される悪性腫瘍や中枢および末梢神経障害などの合併症もよく認められる。

## 2. 抗 HIV 療法の進歩と問題点

HIV-1 感染症に対する HAART 療法 (highly active antiretroviral therapy) の出現は、先進諸国での AIDS 流行に対して大きなインパクトを与え、当初は致死的であった HIV-1 感染症は、いまやコントロール可能な慢性感染症と位置づけられている(32)。しかし著しく早い HIV-1 の増殖速度に加え、複製の際に不断に突然変異を来すという固有の特性 (error-prone) により、HIV-1 が容易に薬剤耐性変異を獲得すること、また感染細胞が reservoir としてリンパ節等の組織中に長期間留まることなどの理由により、依然として感染個体より HIV-1 を完全に駆逐することは不可能である(8, 38)。更に、感染者が長期間の HAART 療法を受けることによって、①長期投与に関連する薬剤の毒性②免疫再構築症候群の発生③生存期間延長による悪性腫瘍合併例の増加④高騰する治療費、などの様々な問題が発生している。また、薬剤耐性変異 HIV-1 の出現により HAART 療法に制限が必要となる症例も増加している(3, 10, 15, 16, 23, 24)。

効果的な抗ウイルス薬としては、ウイルス受容体・ウイルス由来の酵素や構造蛋白・ウイルス遺伝子やその転写に特異的に作用し、宿主細胞側の代謝や機能に影響を及ぼさない薬剤が望まれる。しかし抗 HIV-1 薬において、宿主側に対する毒性や副作用を持たずに、完全に HIV-1 特異的に作用を発揮する薬剤は、非常に長期間の投与が必要となる現時点では存在しない。故に、特異的な機序により抗ウイルス活性を発揮し、副作用が最小限に抑えられる薬剤の開発は、HIV-1 感染症の治療において依然重要な命題である。

### 3. HIV-1の生活環と薬剤標的

HIV-1はウイルス自身および宿主細胞中の蛋白による調節を受けながら以下に述べるステップを踏まえて宿主細胞に侵入し、新規の感染性ウイルス粒子を複製していく。①HIV-1の宿主細胞への侵入はHIV-1の外套表面の糖蛋白であるgp120と宿主細胞膜表面レセプターであるCD4との結合より開始する②結合することでgp120の構造変化が起こり、セカンドレセプター/コレセプターであるケモカイン受容体と結合③その結果ウイルス糖蛋白gp41がその表面に直接暴露されて、gp41の先端が宿主細胞膜上に挿入され、gp41中に存在する2つのヘリカルループ部位 (HR1/HR2) が会合してヘアピンループを形成し、ウイルス外殻と宿主細胞膜の脂質二重層間で膜融合反応が起こる④脱殻によってp24蛋白を失ったウイルスRNAがp17蛋白とp9蛋白の一部・pol由来の酵素であるインテグラーゼ・逆転写酵素およびVprと高分子複合体を形成し細胞内へ送り込まれる⑤逆転写酵素によってウイルス

RNAより二本鎖ウイルスDNAが合成される⑥pre-integration complex (PIC) が宿主細胞の核内へと輸送される⑦核内においてインテグラーゼによりウイルスDNAが宿主細胞のゲノムへ組み込まれる⑧組み込まれたウイルスDNA (プロウイルス) を鋳型とし、種々な因子 (tat, rev等のウイルス側の調節蛋白および宿主細胞のNF- $\kappa$ B等) の刺激によってウイルスmRNAが合成され (転写) 細胞形質へ輸送される⑨粗面小胞体において糖鎖形成されたenv糖蛋白が細胞形質膜表面下へ輸送される⑩Pr55 gagおよびPr160 gag-pol ポリプロテインが合成され (翻訳) 細胞形質膜表面下へ輸送される⑪細胞形質膜表面下に集合したgag ポリプロテインは細胞形質膜を湾曲させ、出芽過程へ進む⑫出芽過程において未熟な初期粒子内にenv糖蛋白・ウイルスRNAが組み込まれる (アッセムブリ) ⑬細胞形質膜よりウイルス粒子が放出されることで出芽過程が完了する⑭出芽過程もしくは出芽直後に、ウイルスのプロテアーゼによってPr55 gagおよびPr160 gag-pol ポリプロテインは切断され、成熟したgagおよびpol蛋白となる (プロセッシング) ⑮プロテアーゼによる切断はウイルス核を濃縮させ、成熟した感染性ウイルス粒子の産生へと導く(4, 9)。

これらHIV-1の生活環におけるウイルス由来の蛋白 (酵素) に加え、HIV-1の感染に必須となる宿主因子が薬剤開発の標的と成り得るため、作用機序の異なる様々な薬剤がHIV-1感染の治療薬として開発・臨床応用されている。まずウイルスDNAが宿主ゲノムに組み込まれるまでの前期過程に作用する薬剤として、コレセプター阻害剤であるCCR5阻害剤・CXCR4阻害剤があげられるが、これらは宿主細胞側であるコレセプター因子を標的とする

ためHIV-1が耐性を獲得しにくく、既存の抗ウイルス療法が効かなくなった患者に対しても治療効果を期待できるとされている(2, 25, 29)。融合阻害剤であるEnfuvirtide (Fuzeon, T-20)は、HIV-1粒子の表面糖蛋白、gp41の一部に結合し、ウイルスと細胞膜の融合に必須であるgp41のヘアピンループ形成を阻害することで融合を阻止するペプチド系薬剤である(6, 20)。逆転写酵素阻害剤は細胞内で三リン酸化された後、逆転写酵素の基質として認識され逆転写酵素のdNTP結合部位でDNA鎖に取り込まれることで正常基質の取り込みを競合的に阻害するとともに、五炭糖の3'-OHを欠如した構造を有するためDNA鎖の伸長反応を停止させる作用機序を持つ(27)。インテグラーゼ阻害剤はウイルスDNAの宿主ゲノムへの組み込みを阻害する(28)。後期過程において、HIV-1プロテアーゼ阻害剤 (PI) は後述するようにHIV-1プロテアーゼの酵素活性を阻害し構成蛋白・機能性蛋白の成熟化を抑制することで新規HIV-1の複製を阻害し、逆転写阻害剤とともにHAART療法における二本の柱としての重要な役割を担っている。また、新規開発中の成熟阻害剤であるPA-457はHIV-1生活環における後期過程のgag プロセッシング ( p24蛋白のp25からp24への変換 ) を阻害する特徴を持つ(35)。

#### 4. HIV-1プロテアーゼの機能とプロテアーゼ阻害剤の作用機序

HIV-1プロテアーゼは酵素活性をほとんど有しないPr160 gag-pol ポリプロテインとして産生される。出芽過程もしくは出芽直後に、HIV-1プロテアーゼは二量体化し活性化され、

Pr160 gag-pol ポリプロテインより自己を切り出し成熟蛋白となり、Pr55 gag ポリプロテインより構成蛋白であるp17, p24, p9, p6/7を切断、またPr55 gag-pol ポリプロテインより機能性蛋白（酵素）であるプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼを切断し、成熟したウイルス蛋白へと変化させる。HIV-1のプロテアーゼは99アミノ酸からなるサブユニット同士がホモダイマーを形成したアスパラギン酸プロテアーゼである。成熟プロテアーゼニ量体の内部に位置する活性部位にはDTG motifという触媒残基が存在し、Pr55 gagやPr160 gag-pol ポリプロテイン等の基質が活性部位に結合したとき、Phe-ProやPhe-Leu, Phe-Thrといった開裂部位（cleavage sites）を切断する。活性部位は2つのβ-ヘアピン構造、および基質や阻害剤結合時に蓋をするように大きく構造を変化させる可動性に富んだ“flap”部位に覆われている(5)。HIV-1プロテアーゼ阻害剤はプロテアーゼの基質と似た構造を有するが、本来の基質とは異なりHIV-1プロテアーゼによる切断を受けないため、ウイルス蛋白の成熟化が起こらず、結果として未熟な感染性を有しないウイルス粒子の産生へ誘導することでその抗HIV作用を発揮する。HIV-1プロテアーゼ阻害剤は逆転写酵素阻害剤とともにHIV-1感染症の治療において重要であるが、不良なアドヒアランスや薬剤相互作用、交差耐性の出現、リポジストロフィーや心血管障害、耐糖能異常などの代謝異常に代表される長期毒性などの問題も抱えており、これらを克服しうる新規のプロテアーゼ阻害剤の開発が望まれている。

## 5. HIV-1の薬剤耐性獲得機序

HIV-1は1日あたり $10^8 \sim 10^9$ という著しく早い増殖速度に加え、他のレトロウイルスの数の10～数100倍という高い確率で遺伝情報の複製エラーをおこすという逆転写酵素の特性により、容易に薬剤耐性変異を獲得しうる(17, 34)。薬剤の存在下において増殖に利点を有する変異ウイルスが生き残り増え続けることで、その薬剤に対する耐性が生じる。99アミノ酸からなるHIV-1プロテアーゼモノマーにおいて、およそ半数の位置でのアミノ酸の変異がプロテアーゼ阻害剤の選択圧にさらされた状況下で薬剤耐性変異として出現しうるとされる。プロテアーゼ阻害剤と直接結合する活性部位のアミノ酸に生じる薬剤耐性変異に加え、活性部位から離れた位置のアミノ酸に生じた変異においても非間接的に活性部位の構造に混乱を引き起こすことで、薬剤の結合を阻害する結果となりうる。また基質であるgagやgag-polポリプロテインのcleavage siteやその近傍に変異が生じることで酵素活性の減弱した変異プロテアーゼによる切断を受けやすくなり、ウイルスの複製能が代償される(7)。

臨床症例より分離された多剤耐性ウイルスにおいて、gag蛋白のcleavage site近傍に数アミノ酸の挿入変異を認め、この変異の存在によりウイルスの複製が改善するとの報告もある(39)。これらの異なる部位での変異が組み合わさることでHIV-1は相加的・相乗的に薬剤に対する耐性を獲得し、変異が入ることで損なわれた自身の複製能を回復していく。

## 6. 本研究の目的

現在開発中の多くの抗HIV-1剤はウイルス構成分子を標的にしているが、ウイルス蛋白の結晶構造解析の結果を基に薬剤の設計が行われることが多くなっており、その開発・改良の速度は格段に早くなっている。現在の抗HIV治療薬に求められる特性として、既存の薬剤より強力で、薬剤耐性を発現させないか遅延させ、服用法が簡単で、副作用が少なく、安価であること等が挙げられる。我々は米国 purdue大学の Arun Ghosh博士のグループと共同で、既存のPIsに耐性を有する変異HIV-1に対して有効な非ペプチド系PIの開発に重点を置いて研究を行っており、その1つである darunavir (DRV)/TMC114は P2 siteに特徴的な 3(*R*),3a(*S*),6a(*R*)-*bis*-tetrahydrofuranylurethane (*bis*-THF)構造を有し(11, 12, 21)、多剤に耐性となり既存のHAART療法に不応性となった症例に対する治療薬として既に認可され臨床に供されている。今回我々はDRVと同様に *bis*-THF構造を有する新規の非ペプチド系HIV-1 PIであるGRL-98065を同定、同化合物の抗HIV活性および細胞毒性を評価し、また GRL-98065とHIV-1プロテアーゼの相互作用について結晶構造解析による評価を行った。



## 6 ) 実験方法

### 1. 細胞およびウイルス

MT-2 細胞と MT-4 細胞は、10%の fetal calf serum (FCS; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) 及び 50 U/ml の penicillin と 100 µg/ml の kanamycin を添加した RPMI-1640 液体培地を用いて培養を行った。薬剤の抗ウイルス活性評価には、HIV-1<sub>LAI</sub>、HIV-1<sub>NL4-3</sub>、2 種類の HIV-2 株(HIV-2<sub>EHO</sub>, HIV-2<sub>ROD</sub>)、未治療患者由来の臨床分離 HIV-1 株(HIV-1<sub>ERS104pre</sub>) (37) 及び 6 種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株、subtype の異なる 5 種類の臨床分離 HIV-1 株 (HIV-1<sub>92UG029</sub> / subtype A; X4, HIV-1<sub>92UG037</sub> / subtype A; R5, HIV-1<sub>Ba-L</sub> / subtype B; R5, HIV-1<sub>97ZA003</sub> / subtype C; R5, 及び HIV-1<sub>92TH019</sub> / subtype E; R5) (National Institutes of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH) を使用した。

### 2. 使用薬剤

*bis*-THF 構造を有する新規の非ペプチド系 HIV-1 PI, GRL-98065 及び darunavir (DRV/TMC114) (図 1) の他に以下の薬剤を使用した。Saquinavir (SQV) は Roche Products Ltd. (Welwyn Garden City, United Kingdom) より供与, ritonavir (RTV) は Abbott Laboratories (Abbott Park, Ill.) より供与いただいた。Amprenavir (APV) は GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, N.C.) より供与, nelfinavir (NFV), indinavir (IDV),

lopinavir (LPV) はJapan Energy Inc, Tokyoより供与、atazanavir (ATV) はBristol Myers Squibb (New York, NY) より供与いただいた。

### 3. 抗ウイルス活性および細胞毒性の評価

薬剤の抗ウイルス活性の評価として、MTT assay 法と p24 assay 法を用いた。MTT assay 法では、96 well plate に 1 well あたり RPMI 1640 (10% fetal calf serum、50 U/ml penicillin、100 µg/ml kanamycin) に希釈した薬剤を 10 倍ずつ希釈して 100 µl ずつ加えた。あらかじめ virus の titration を行い、100 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infectious dose 50%) の濃度となるように、各 well に virus と MT-2 細胞 (2X10<sup>3</sup> 個/well) を medium に加え 100 µl ずつ各 well にまき、control として MT-2 細胞のみを加えた well を作成し、37°Cの CO<sub>2</sub> incubator で 7 日間培養した。鏡検にて合胞体形成確認後、各 well より上清を 100 µl ずつ除去し、MTT 試薬 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を 10 µl ずつ加え、37°Cの CO<sub>2</sub> incubator で 4 時間呈色反応を行なった。各 well に MTT 可溶化溶液を 100 µl ずつ加え、ホルマザンの結晶を pipetting で溶かした。Microplate reader (Vmax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) にて 570 nm での各 well の吸光度を測定、細胞のみを培養した control well での吸光度と比較することで、感染による細胞障害を 50%阻害する濃度である IC<sub>50</sub> 値を算定した。細胞毒性の評価では、96 well plate に 1 well あたり medium に希釈した薬剤を 10 倍ずつ希釈して 100 µl ずつ加え、medium に希釈した MT-2 細胞 (2X10<sup>3</sup> 個/well) を各 well

にまき、同様に7日間の培養後 MTT 試薬による反応後に microplate reader で吸光度を測定し、細胞のみを培養した control well での吸光度と比較することで、薬剤による 50%細胞障害濃度である  $CC_{50}$  値を算定した。p24 assay 法では、HIV 非感染健常者の buffy coat より、ficoll 重層法にて PBMC を採取し、10  $\mu$ g/ml の PHA を加えて刺激し、37°C の  $CO_2$  incubator で2日間培養し、活性化 PBMC を回収した。96 well plate に1 well あたり medium に希釈した薬剤を10倍ずつ希釈して100  $\mu$ l ずつ加えた。各 well に virus と活性化 PBMC ( $2 \times 10^5$  個/well) を10 ng/ml の IL2 の添加してある medium に加え、各 well に100  $\mu$ l ずつまき、control として virus と PBMC のみを加えた well を作成し、37°C の  $CO_2$  incubator で7日間培養した。全自動化学発光酵素免疫測定システム (Lumipulse F; Fujirebio Inc., Tokyo) を用いて各 well の p24 抗原量を測定し、薬剤の入っていない control well での p24 抗原量と比較することで、p24 産生を 50%阻害する濃度である  $IC_{50}$  値を算定した(26)。全ての assay は duplicate もしくは triplicate で行い、PHA-PBMC はそれぞれ独立した assay 毎に一人の donor 由来のものを使用した。

#### 4. 試験管内でのPI耐性誘導実験

MT-4細胞 ( $10^5$ /ml) を HIV-1<sub>NL4-3</sub> (500 TCID<sub>50</sub>s) とともに  $IC_{50}$ 濃度の薬剤存在下で培養し、day7における上清中の p24 抗原量を測定することでウイルスの増殖を確認し、濃度を上げた薬剤の存在下で新たな MT-4細胞にウイルス上清のみを加えることで培養を継続した (cell

free manner)。耐性誘導中の任意のpassageにおける感染細胞のDNAを抽出し、組み込まれているプロウイルス DNAの塩基配列を調べた。

#### 5. プロテアーゼおよびgag領域の塩基配列の決定

HIV-1感染MT-4細胞から、InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて抽出したDNAを鋳型とし、プロウイルス DNAのプロテアーゼおよびgag領域の塩基配列の決定、クローニングを行った(21)。実験室株であるHIV-1<sub>NL4-3</sub>の塩基配列を基にgagおよびプロテアーゼ領域を全て含むように、5'LTRおよび逆転写酵素領域にプライマー { 外側センス鎖プライマー[5'-GAT GCT ACA TAT AAG CAG CTG C-3' (LTR F1)], 外側アンチセンス鎖プライマー[5'-CTC GTG ACA AAT TTC TAC TAA TGC-3' (PR12)], 内側センス鎖プライマー[5'-GAG ACT CTG GTA ACT AGA GAT C-3' (LTR F2)], 内側アンチセンス鎖プライマー[5'-CCA TCC CGG GCT TTA ATT TTA CTG GTA C-3' (Ksma2.1)] } を設定した。第1PCRは 20 μl中に 1 μlの鋳型DNAと10 μlのPremix *Taq* (Ex *Taq* Version; Takara Bio INC., Otsu), 10 pmolの各プライマーからなる。第1PCRの条件は95°C・3分を1サイクル、95°C・40秒, 55°C・20秒, 72°C・2分を30サイクル、72°C・10分を1サイクル行った。第1PCR産物は直接第2PCRの鋳型として使い、95°C・3分を1サイクル、95°C・30秒, 55°C・20秒, 72°C・2分を30サイクル、72°C・10分を1サイクルで行い、第2PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウム染色し約2kbのバンドを確認した。第2PCR産物はspin columns (MicroSpin S-400 HR columns; Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J.) で精製後、直接クロー

ニングに使用もしくはmodel 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) によって塩基配列を決定した。

#### 6. GRL-98065 耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> の複製能評価

6 well plate に MT-4 細胞 ( $2.4 \times 10^5$ ) と 30 ng p24 抗原量の GRL-98065 耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> (40 passage: HIV-1<sub>GRL98065p40</sub>) もしくは野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> を加えて3時間培養し、MT-4 細胞を回収後 GRL-98065 添加の有無で3ボトルに分けて9日間培養し(MT-4 細胞の最終濃度は  $10^4$ /ml、GRL-98065 の最終濃度は 0, 0.01, 0.1  $\mu$ M)、上清中の p24 抗原量を1日おきに測定した。

#### 7. 結晶構造解析

GRL-98065 を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、精製した野生型 HIV-1 プロテアーゼをとともに結晶化を始めた。25 mM sodium acetate (pH 4.8)、10% 塩化ナトリウム、6% dioxane、10% DMSO の溶液とともに hanging-drop 蒸気拡散法により結晶化された。シンクロトロン光源施設の beamline X-26C による X 線回析結果を記録し、ソフトウェア SHELX-97 を用いる事でプロテアーゼ阻害剤と野生型 HIV-1 プロテアーゼ複合体の結晶構造解析を行った(30, 31, 36, 40)。

## 7 ) 実験結果

### 1. HIV-1<sub>LAI</sub> および 2 種類の HIV-2 に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性および細胞毒性の評価

MT-2 細胞を標的細胞とした MTT assay の結果、野生型実験室株である HIV-1<sub>LAI</sub> に対し、既存の PI と比較して、GRL-98065 は IC<sub>50</sub> 値が 0.5 nM と非常に強力な抗ウイルス活性を示し、細胞毒性の指標である CC<sub>50</sub> 値は 35.7 μM と MT-2 細胞に対する毒性は軽微で、CC<sub>50</sub> 値と IC<sub>50</sub> 値の比である selectivity index は 71,400 だった。2 種類の HIV-2 株である EHO、ROD に対する抗ウイルス活性を測定した。野生型 HIV-1<sub>LAI</sub> と比較して 6~9 倍の活性低下を認めたが、既存の PIs 比較してその IC<sub>50</sub> 値は数 nM と、いずれの strain に対しても良好な抗ウイルス活性を示した(表 1)。

### 2. 試験管内で既存の PIs に高度耐性を獲得した変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価

試験管内誘導で既存の PIs に高度耐性を獲得した変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対する活性を測定した。これらの耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> は、最初に野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と MT-4 細胞を IC<sub>50</sub> 濃度の薬剤存在下で培養を開始し、継代時にはウイルス上清に新規の MT-4 細胞を加え、培養液中の薬剤濃度を徐々に上昇させる条件下で培養を続けた結果、SQV,RTV,IDV,NFV,APV,LPV それぞ

れ 5  $\mu\text{M}$ 、また ATV 1  $\mu\text{M}$  存在下で増殖可能となっており、それぞれのプロテアーゼ領域に複数の各薬剤耐性関連変異を有している。MT-4 細胞を標的細胞とした p24 assay の結果、既存の PIs は ATV 耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対する ATV の IC<sub>50</sub> 値が 0.33  $\mu\text{M}$  である以外、SQV,RTV,IDV,NFV,APV,LPV は各薬剤関連高度耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対していずれも 1  $\mu\text{M}$  を超える IC<sub>50</sub> 値を示し、野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と比較して著明な活性低下を示した。また非関連高度耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対しても各薬剤間で交叉耐性を認めた。GRL-98065 は APV 高度耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 以外に対しては数 nM の強い抗ウイルス活性を示したが、類似構造を有する APV 高度耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対しては、野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と比べ 107 倍の活性低下を認めた。しかし、その IC<sub>50</sub> 値は 0.032  $\mu\text{M}$  と依然十分な抗ウイルス活性を維持していた(表 2)。

### 3. 種々の HIV-1 subtype に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価

PHA で刺激した PBMC を標的細胞とした p24 assay を用いて、種々の臨床分離 HIV-1 subtype ( subtypes A, B, C, E ) に対する抗ウイルス活性を測定した。GRL-98065 はいずれの HIV-1 subtype に対しても、subnanomolar の高い活性を示した(表 3)。

### 4. 複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価

32 ~ 83 ケ月の長期間に渡って 9 ~ 11 種類の薬剤を含む多剤併用療法を施行された後、治

療不応性となった臨床患者より分離された、6種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1(41)に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性を測定した。これらの多剤耐性臨床分離 HIV-1 はプロテアーゼ領域に 9~14 箇所の耐性関連変異を有している。PHA で刺激した PBMC を標的細胞とした p24 assay の結果、RTV, IDV, NFV の多剤耐性臨床分離 HIV-1 に対する IC<sub>50</sub> 値はほぼ全て 1 μM を超える値を示し、他の既存 PIs の抗ウイルス活性も野生型 HIV-1 臨床分離 HIV-1<sub>104pre</sub> と比較して著明に低下していた。その一方、GRL-98065 はこれら 6 種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1 に対して IC<sub>50</sub> 値が 2.7~5.6 nM と強力な抗ウイルス活性を維持していた(表 4)。

#### 5. 試験管内における GRL-98065 耐性変異 HIV-1 の誘導

IC<sub>50</sub> 濃度 (0.0005 μM) の GRL-98065 存在下で野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と MT-4 細胞の培養を開始し、継代時にはウイルス上清に新しく MT-4 細胞を加え、GRL-98065 の濃度を徐々に上昇させる条件下で培養を続けることにより GRL-98065 耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> を誘導した(41)。この耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> は passage 40 において 0.5 μM の GRL-98065 存在下で増殖可能であった。同時に耐性誘導実験を行った対照薬剤である APV, LPV, ATV と比較して、GRL-98065 に対する HIV-1<sub>NL4-3</sub> の耐性獲得は遅延することが判った(図 2)。GRL-98065 耐性誘導実験の経過において passages 5, 10, 15, 20, 25, 30, 33, 40 での感染 MT-4 細胞より DNA を抽出し、プロウイルス DNA における HIV-1 プロテアーゼおよび gag 領域の変異を



調べた。プロテアーゼ領域では、passage 15 より K43I, I85V 変異が出現、passage 20 からは A28S, V82I, L89M 変異、passage 25 からは M46I, A71V 変異、passage 30 からは E21K 変異の蓄積を認めた。Passage 40 において I50V, D60N 変異が出現し、プロテアーゼ領域において 10 ヶ所の変異の蓄積を認めることとなった。I50V 変異は A28S 変異を有しないクローンに認められた(図 3)。Gag 領域において、passage 25 より R275K 変異、passage 33 より G412D 変異の蓄積を認めた。また passage 40 において p7/p1 cleavage site に I437T 変異を認めた(図 4)。

#### 6. GRL-98065 耐性変異 HIV-1 の複製能評価

耐性誘導実験における passage 40 の GRL-98065 耐性変異 HIV-1<sub>NL4-3</sub> (HIV-1<sub>GRL98065p40</sub>) と野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> の複製能を比較した。HIV-1<sub>GRL98065p40</sub> は培養液中の GRL-98065 の有無に関わらず増殖可能であり、GRL-98065 非存在下では野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> との間に複製能の顕著な違いは認められなかった(図 5)。

#### 7. GRL-98065 耐性変異 HIV-1 に対する既存 PIs の活性評価

8 種類の既存 PIs の GRL-98065 耐性変異 HIV-1 に対する活性を、MT-4 細胞を標的細胞とした p24 assay を用いて評価した。HIV-1<sub>GRL98065p40</sub> に対する GRL-98065 の IC<sub>50</sub> 値は 0.18  $\mu$ M であり、野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> と比較して 600 倍の活性低下を認めた。また GRL-98065 と類似構造を有する APV, DRV も同様に IC<sub>50</sub> 値がそれぞれ >1  $\mu$ M, 0.21  $\mu$ M と活性の低下を認め

た。しかし、SQV と ATV はそれぞれ IC<sub>50</sub> 値が 0.032 μM, 0.011 μM であり、野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub> に対しての IC<sub>50</sub> 値と比較してそれぞれ 5 倍, 3 倍と活性低下は軽度であった。また IDV, LPV もそれぞれ 8 倍, 6 倍と活性低下は顕著ではなく、複数の PIs が GRL-98065 耐性変異 HIV-1 に対して感受性を維持していた(表 5)。

#### 8. GRL-98065 と HIV-1 プロテアーゼ間の結晶構造解析

GRL-98065 および DRV と野生型 HIV-1 プロテアーゼ間の結合様式について評価するため結晶構造解析を 1.6Å の解像度( R factor が 0.147, R free が 0.208 )で行った。GRL-98065 は Asp29, Asp30, Gly27, Asp30' の主鎖および Asp25, Asp25' の側鎖と水素結合を有し、両者とも *bis*-THF 構造がプロテアーゼ活性中心部位 (Asp29, Asp30) の主鎖と強固に結合することが判明した。両者は似たプロテアーゼへの結合様式を示したが、相違点が以下の通り認められた。いずれも Asp30' との水素結合を有しているものの、GRL-98065 が Asp30' のアミド基と水素結合を有するのに対し、DRV はカルボニル基と水素結合を有していた。また GRL-98065 において、P2' site の benzodioxole 構造がプロテアーゼ flap 部位の Gly48' と水分子を介した水素結合を有することが判明したが、この Gly48' との水素結合は DRV では認められなかった(図 6)。

GRL-98065 および DRV と既存の PIs において、野生型プロテアーゼ活性中心の Asp29, Asp30, Asp30' の主鎖との水素結合の数を結晶構造解析で評価した。既存のプロテアーゼ阻害剤の水素結合数は 2 個未満であるのに対し、GRL-98065 および DRV は 4 個の水素結合

を有しており、この 2 剤が既存のプロテアーゼ阻害剤と比較してより強固に野生型プロテアーゼ活性中心部位に作用することが判明した(表 6)。次に、2~11 ヶ所の薬剤耐性変異を有する 6 種類の変異プロテアーゼと GRL-98065 間における水素結合を結晶構造解析で評価した。野生型プロテアーゼでみられた主鎖との 4 個の結合は変異プロテアーゼに対してもほぼ保たれていた。

表および図

表 1. HIV-1<sub>LAI</sub> および 2 種類の HIV-2 株に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性および細胞毒性の評価

Drug	IC <sub>50</sub> (μM)			CC <sub>50</sub> (μM)	Selectivity index
	HIV-1 <sub>LAI</sub>	HIV-2 <sub>EHO</sub>	HIV-2 <sub>ROD</sub>		
GRL-98065	0.0005 ± 0.0001	0.0032 ± 0.0007	0.0045 ± 0.0004	35.7	71400
SQV	0.008 ± 0.001	0.0030 ± 0.0004	0.0043 ± 0.0002	16.4	2050
RTV	0.054 ± 0.001	0.21 ± 0.05	0.26 ± 0.01	31.1	580
IDV	0.048 ± 0.007	0.024 ± 0.005	0.054 ± 0.003	69.8	1450
NFV	0.032 ± 0.004	0.030 ± 0.006	0.240 ± 0.009	8.1	250
APV	0.036 ± 0.002	0.25 ± 0.08	0.57 ± 0.01	>100	>2780
LPV	0.007 ± 0.001	0.0026 ± 0.0008	0.0049 ± 0.0008	>100	>14300
ATV	0.0048 ± 0.0001	0.005 ± 0.002	0.013 ± 0.006	27.6	5750
DRV	0.0039 ± 0.0009	0.0080 ± 0.0009	0.0068 ± 0.0004	83.1	21310

MT-2 cells ( $2 \times 10^3$ ) were exposed to 100 TCID<sub>50</sub>s of HIV-1<sub>LAI</sub> or each HIV-2 isolate and cultured in the presence of various concentrations of each PI, and the IC<sub>50</sub> values were determined by the MTT assay. All assays were conducted in duplicate, and the data shown represent mean values ( $\pm 1$  standard deviations) derived from the results of three independent experiments. \*Each selectivity index denotes a ratio of 50% cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) to IC<sub>50</sub> against HIV-1<sub>LAI</sub>.

表 2. 試験管内で既存の PIs に高度耐性を獲得した変異 HIV-1 株に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価

Virus	Amino acid substitutions in the protease-encoding region	EC <sub>50</sub> (μM)								
		SQV	RTV	IDV	NFV	APV	LPV	ATV	DRV	GRL-98065
HIV-1 <sub>NL4.3</sub>	Wild type	0.007 ± 0.002	0.033 ± 0.002	0.034 ± 0.004	0.033 ± 0.007	0.026 ± 0.007	0.031 ± 0.009	0.0042 ± 0.0004	0.0030 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0002
HIV-1 <sub>SQV504</sub>	L10I/G48V/I54V/L63P/A71V/G73S/V82T	>1 (>143)	>1 (>30)	>1 (>29)	0.48 ± 0.04 (15)	0.33 ± 0.03 (13)	0.27 ± 0.09 (9)	0.326 ± 0.001 (78)	0.0058 ± 0.0003 (2)	0.0057 ± 0.0027 (19)
HIV-1 <sub>RTV504</sub>	M46I/V82F/I84V	0.010 ± 0.008 (1)	>1 (>30)	0.25 ± 0.01 (7)	0.21 ± 0.05 (6)	0.28 ± 0.02 (11)	0.16 ± 0.02 (5)	0.018 ± 0.008 (4)	0.018 ± 0.004 (6)	0.0025 ± 0.0003 (8)
HIV-1 <sub>IDV504</sub>	L10F/L24I/M46I/I54V/L63P/A71V/G73S/V82T	0.059 ± 0.004 (8)	>1 (>30)	>1 (>29)	0.47 ± 0.07 (14)	0.17 ± 0.01 (7)	0.26 ± 0.01 (8)	0.06 ± 0.02 (14)	0.015 ± 0.007 (5)	0.0037 ± 0.0007 (12)
HIV-1 <sub>NFV504</sub>	L10F/K20T/D30N/K45I/A71V/V77I	0.024 ± 0.008 (3)	0.051 ± 0.005 (2)	0.27 ± 0.05 (8)	>1 (>30)	0.060 ± 0.004 (2)	0.024 ± 0.001 (1)	0.021 ± 0.006 (5)	0.0033 ± 0.0001 (1)	0.0024 ± 0.0008 (8)
HIV-1 <sub>APV504</sub>	L10F/M46I/I50V/A71V/I84V/L90M	0.031 ± 0.004 (4)	0.29 ± 0.02 (9)	0.200 ± 0.007 (6)	0.27 ± 0.05 (8)	>1 (>38)	0.23 ± 0.02 (7)	0.003 ± 0.001 (1)	0.33 ± 0.03 (110)	0.032 ± 0.004 (107)
HIV-1 <sub>LPV504</sub>	L10F/M46I/I54V/V82A	0.028 ± 0.006 (4)	>1 (>30)	>1 (>29)	0.48 ± 0.26 (15)	0.26 ± 0.07 (10)	>1 (>32)	0.036 ± 0.001 (9)	0.025 ± 0.007 (8)	0.0034 ± 0.0009 (11)
HIV-1 <sub>DRV504</sub>	L23I/K43I/M46I/I50L/G51A/A71V	0.037 ± 0.004 (5)	0.12 ± 0.06 (4)	0.388 ± 0.001 (11)	0.22 ± 0.04 (7)	0.20 ± 0.07 (8)	0.033 ± 0.006 (1)	0.33 ± 0.06 (79)	0.0034 ± 0.0001 (1)	0.0015 ± 0.0009 (5)

MT-4 cells (10<sup>4</sup>) were exposed to 100 TCID<sub>50</sub>s of each HIV-1, and the inhibition of p24 gag protein production by each drug was used as an endpoint. The numbers in parentheses represent the fold changes of IC<sub>50</sub> values for each isolate compared to the IC<sub>50</sub> values for wild-type HIV-1<sub>NL4.3</sub>. All assays were conducted in duplicate or triplicate, and the data shown represent mean values (± 1 standard deviations) derived from the results of three independent experiments. n.d.: not determined.

表 3. 種々の HIV-1 subtypes に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価

Virus	IC <sub>50</sub> (μM)							
	SQV	RTV	IDV	NFV	APV	LPV	ATV	GRL-98065
HIV-1 <sub>92UG029</sub> (subtype A: X4)	0.0048 ± 0.0005	0.071 ± 0.011	0.044 ± 0.009	0.043 ± 0.006	0.046 ± 0.006	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.002	0.0005 ± 0.0002
HIV-1 <sub>92UG037</sub> (subtype A: R5)	0.0032 ± 0.0003	0.041 ± 0.008	0.034 ± 0.003	0.056 ± 0.014	0.027 ± 0.005	0.005 ± 0.001	0.0025 ± 0.0002	0.0004 ± 0.0001
HIV-1 <sub>Ba-L</sub> (subtype B: R5)	0.0083 ± 0.0005	0.023 ± 0.006	0.022 ± 0.005	0.018 ± 0.004	0.025 ± 0.006	0.0053 ± 0.0004	0.0013 ± 0.0004	0.0002 ± 0.0001
HIV-1 <sub>97ZA003</sub> (subtype C: R5)	0.0067 ± 0.0008	0.039 ± 0.004	0.037 ± 0.006	0.037 ± 0.007	0.033 ± 0.005	0.0073 ± 0.0006	0.0034 ± 0.0001	0.0005 ± 0.0001
HIV-1 <sub>92TH019</sub> (subtype E: R5)	0.0030 ± 0.0001	0.030 ± 0.009	0.021 ± 0.001	0.029 ± 0.004	0.021 ± 0.006	0.0033 ± 0.0005	0.0027 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0001

The IC<sub>50</sub> values were determined by using PHA-PBMCs as target cells and the inhibition of p24 gag protein production by each drug was used as an endpoint. All assays were conducted in duplicate or triplicate, and the data shown represent mean values (± 1 standard deviations) derived from the results of three independent experiments. PHA-PBMCs were derived from a single donor in each independent experiment.

表 4. 複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対する GRL-98065 の抗ウイルス活性の評価

Virus <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)								
	SQV	RTV	IDV	NFV	APV	LPV	ATV	DRV	GRL-98065
HIV-1 <sub>ERS104pre</sub> (wild-type: X4)	0.008 ± 0.003	0.025 ± 0.005	0.024 ± 0.008	0.015 ± 0.004	0.029 ± 0.005	0.007 ± 0.001	0.0038 ± 0.0004	0.0038 ± 0.0007	0.0005 ± 0.0002
HIV-1 <sub>MDR/TM</sub> (X4)	0.18 ± 0.05 (23)	>1 (>40)	>1 (>42)	>1 (>67)	0.30 ± 0.04 (10)	0.36 ± 0.09 (51)	0.038 ± 0.009 (10)	0.0043 ± 0.0007 (1)	0.0032 ± 0.0006 (6)
HIV-1 <sub>MDR/MM</sub> (R5)	0.14 ± 0.04 (18)	>1 (>40)	>1 (>42)	>1 (>67)	0.48 ± 0.09 (17)	0.38 ± 0.08 (54)	0.045 ± 0.0001 (12)	0.016 ± 0.007 (4)	0.0038 ± 0.0006 (8)
HIV-1 <sub>MDR/SL</sub> (R5)	0.29 ± 0.05 (36)	>1 (>40)	>1 (>42)	>1 (>67)	0.43 ± 0.05 (15)	0.70 ± 0.19 (100)	0.54 ± 0.20 (142)	0.027 ± 0.009 (7)	0.0056 ± 0.0020 (11)
HIV-1 <sub>MDR/B</sub> (X4)	0.27 ± 0.06 (34)	>1 (>40)	>1 (>42)	>1 (>67)	0.36 ± 0.09 (12)	0.30 ± 0.03 (43)	0.25 ± 0.003 (66)	0.04 ± 0.01 (11)	0.0039 ± 0.0005 (8)
HIV-1 <sub>MDR/C</sub> (X4)	0.035 ± 0.004 (4)	>1 (>40)	>1 (>42)	0.42 ± 0.06 (28)	0.25 ± 0.05 (9)	0.31 ± 0.05 (44)	0.021 ± 0.006 (6)	0.009 ± 0.005 (2)	0.0027 ± 0.0003 (5)
HIV-1 <sub>MDR/G</sub> (X4)	0.033 ± 0.005 (4)	>1 (>40)	0.64 ± 0.11 (27)	0.37 ± 0.05 (25)	0.32 ± 0.02 (11)	0.16 ± 0.04 (23)	0.032 ± 0.002 (8)	0.007 ± 0.005 (2)	0.0034 ± 0.0003 (7)

<sup>a</sup>The amino acid substitutions identified in the protease-encoding region compared to the consensus type B sequence cited from the Los Alamos database include L63P in HIV-1<sub>ERS104pre</sub>; L10I, K14R, R41K, M46L, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M, I93L in HIV-1<sub>MDR/TM</sub>; L10I, K43T, M46L, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M, Q92K in HIV-1<sub>MDR/MM</sub>; L10I, L24I, I33F, E35D, M36I, N37S, M46L, I54V, R57K, I62V, L63P, A71V, G73S, V82A in HIV-1<sub>MDR/SL</sub>; L10I, K14R, L33I, M36I, M46I, F53I, K55R, I62V, L63P, A71V, G73S, V82A, L90M, I93L in HIV-1<sub>MDR/B</sub>; L10I, I15V, K20R, L24I, M36I, M46L, I54V, I62V, L63P, K70Q, V82A, L89M in HIV-1<sub>MDR/C</sub>; and L10I, V11I, T12E, I15V, L19I, R41K, M46L, L63P, A71T, V82A, L90M in HIV-1<sub>MDR/G</sub>. HIV-1<sub>ERS104pre</sub> served as a source of wild-type HIV-1. The IC<sub>50</sub> values were determined by using PHA-PBMCs as target cells and the inhibition of p24 gag protein production by each drug was used as an endpoint. The numbers in parentheses represent the fold changes of IC<sub>50</sub> values for each isolate compared to the IC<sub>50</sub> values for wild-type HIV-1<sub>ERS104pre</sub>. All assays were conducted in duplicate or triplicate, and the data shown represent mean values (± 1 standard deviations) derived from the results of three independent experiments. PHA-PBMCs were derived from a single donor in each independent experiment.



表 5. GRL-98065 耐性変異 HIV-1 株に対する既存 PIs の活性評価

Virus	Amino acid substitutions in the protease-encoding region	IC <sub>50</sub> (μM)								
		SQV	RTV	IDV	NFV	APV	LPV	ATV	DRV	GRL-98065
HIV-1 <sub>NL4-3</sub>	Wild type	0.007 ± 0.002	0.033 ± 0.002	0.034 ± 0.004	0.033 ± 0.007	0.026 ± 0.007	0.031 ± 0.009	0.0042 ± 0.0004	0.0030 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0002
HIV-1 <sub>GRL98065/20</sub>	A28S/K43I/C67Y/V82I/I85V/L89M	0.012 ± 0.005 (2)	0.13 ± 0.05 (4)	0.04 ± 0.02 (1)	0.08 ± 0.02 (2)	0.058 ± 0.009 (2)	0.034 ± 0.007 (1)	0.006 ± 0.002 (2)	0.021 ± 0.009 (7)	0.0038 ± 0.0006 (13)
HIV-1 <sub>GRL98065/30</sub>	T12I/E21K/A28S/E34K/K43I/M46I/V82I/I85V/L89M	0.022 ± 0.009 (3)	0.30 ± 0.03 (9)	0.059 ± 0.009 (2)	0.27 ± 0.07 (8)	0.33 ± 0.09 (13)	0.06 ± 0.003 (2)	0.008 ± 0.001 (2)	0.036 ± 0.001 (12)	0.008 ± 0.004 (27)
HIV-1 <sub>GRL98065/40</sub>	E21K/A28S/K43I/M46I/I50V/D60N/A71V/V82I/I85V/L89M	0.032 ± 0.002 (5)	0.38 ± 0.09 (12)	0.28 ± 0.02 (8)	0.34 ± 0.01 (10)	>1 (>38)	0.19 ± 0.07 (6)	0.011 ± 0.007 (3)	0.21 ± 0.03 (70)	0.18 ± 0.03 (600)

MT-4 cells ( $10^4$ ) were exposed to 100 TCID<sub>50</sub>s of each HIV-1, and the inhibition of p24 gag protein production by each drug was used as an endpoint. The numbers in parentheses represent the fold changes of IC<sub>50</sub> values for each isolate compared to the IC<sub>50</sub> values for wild-type HIV-1<sub>NL4-3</sub>. All assays were conducted in duplicate or triplicate, and the data shown represent mean values ( $\pm$  1 standard deviations) derived from the results of three independent experiments..

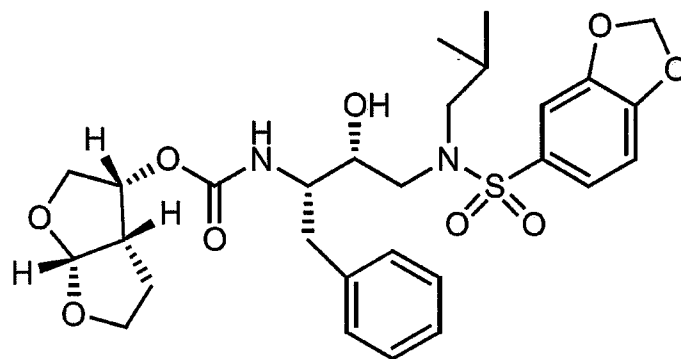
表 6. 種々の HIV-1 プロテアーゼ阻害剤と野生型プロテアーゼ活性中心の Asp29, Asp30, Asp30' の主鎖との水素結合

Drug	PDB ID	Hydrogen bond distance(s) (Å)		
		Asp29	Asp30	Asp30'
GRL-98065		1.9/2.4	2.4	2.5
DRV	1S6G	2.3/2.4	2.4	2.5
SQV	1HXB	1.9	2.2	NP
RTV	1HXW	2.1	NP	2.2
IDV	1SDT	2.1	NP	NP
NFV	1OHR	NP	NP	NP
APV	1HPV	2.8	2.6	NP
LPV	1MUI	1.7	NP	NP
ATV	2AQU	1.9	NP	NP

Hydrogen atoms were added and optimized with constraints on heavy atoms using OPLS2005 force field (MacroModel version 9.1, Schrödinger, LLC). Hydrogen bond tolerances used were: 3.0Å for H-A distance; D-H-A angle greater than 90°; and H-A-B angle greater than 60° where H is the hydrogen, A is the acceptor, D is the donor, and B is a neighbor atom bonded to the acceptor. NP (not present) denotes that hydrogen bond is not present between the inhibitor and the particular residue.

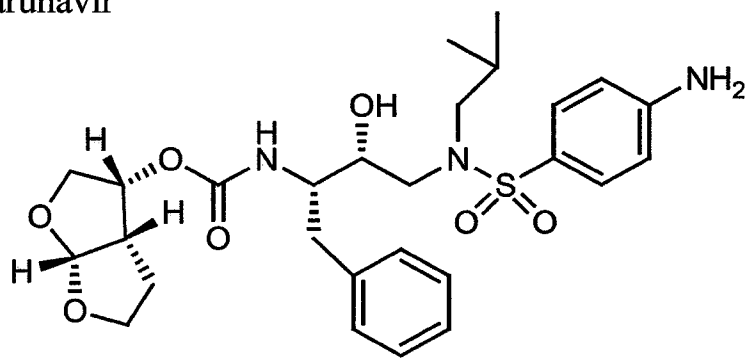
図1. GRL-98065と darunavir, amprenavirの化学構造

GRL-98065



MW: 576.7

Darunavir



Amprenavir

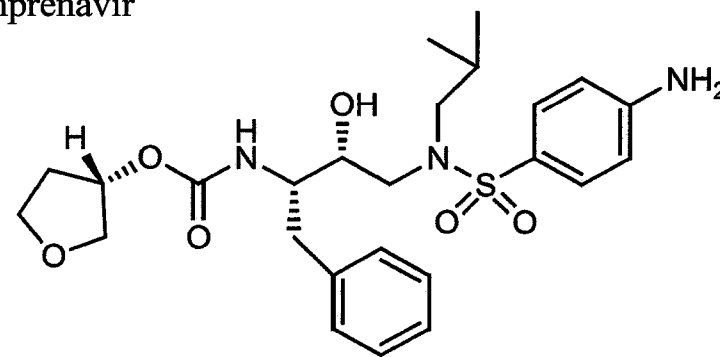
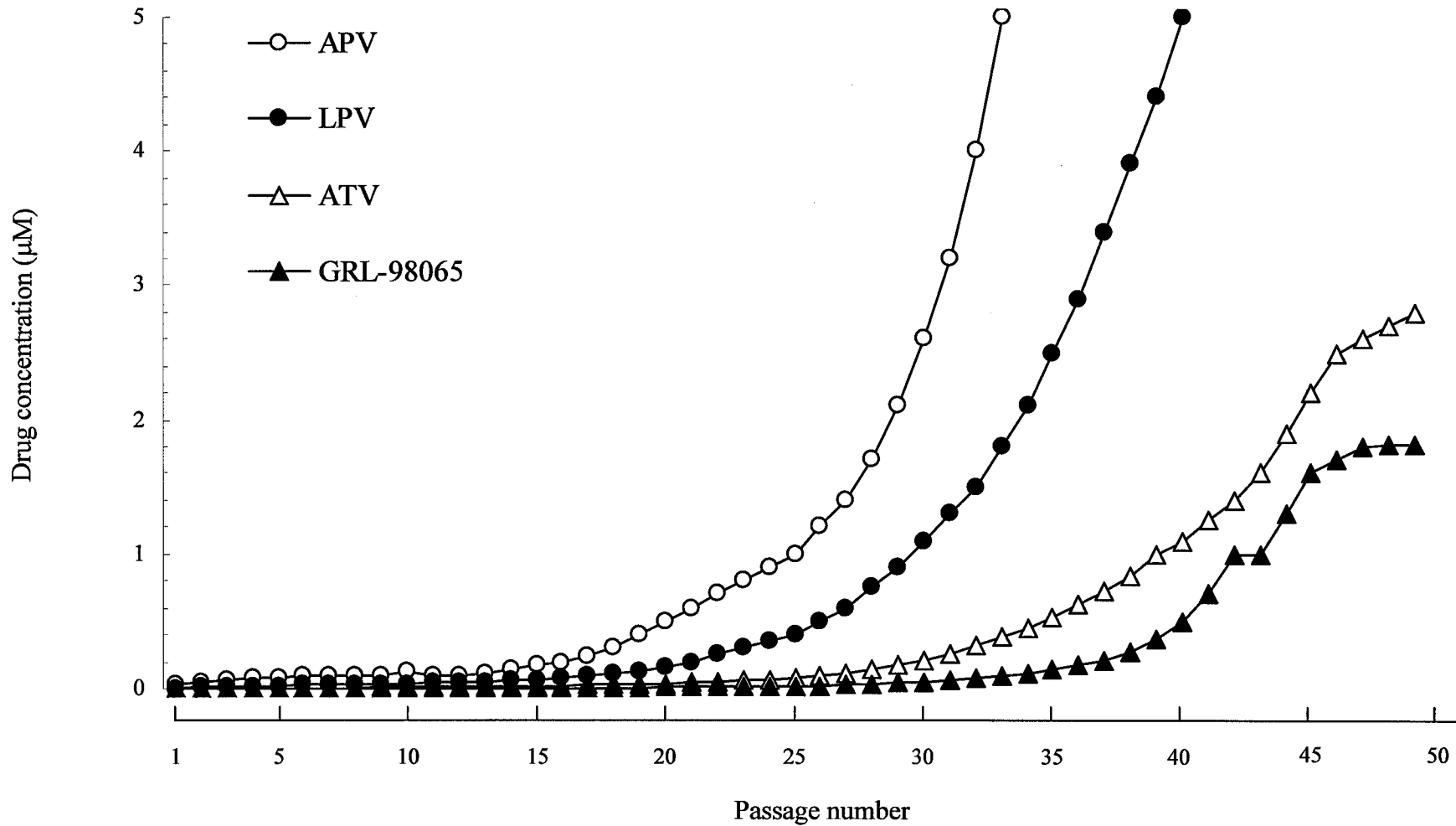


図2. HIV-1<sub>NL4-3</sub>を用いた試験管内でのPI耐性誘導



MT-4細胞( $10^5$ /ml)をHIV-1<sub>NL4-3</sub> (500 TCID<sub>50</sub>s)とともにIC<sub>50</sub>濃度の薬剤存在下で培養し、day 7における上清中のp24抗原量を測定することでウイルスの増殖を確認し、濃度を上げた薬剤の存在下で新たなMT-4細胞にウイルス上清のみを加えることで培養を継続した (cell free manner)。

図3. 試験管内でのGRL-98065耐性誘導中に認められたHIV-1<sub>NL4-3</sub>のプロテアーゼ領域における変異

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99					
pNL4-3 PR	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMNLPG	RWKFPMIGGI	GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF					
5P-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	9/13				
5P-2	.....	.....	.....	.....	.....	E.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
5P-3	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
5P-4	.....	.....	.....	.....	V.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
5P-5	.....	.....	.....	E.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
10P-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	8/13				
10P-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	H.....	1/13				
10P-3	.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
10P-4	.....	P.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
10P-5	.....	.....	.....	E.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/13				
10P-6	.....	.....	.....	.....	L.....	.....	.....	I.....	.....	.....	1/13				
15P-1	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	.....	.....	.....	5/11				
15P-2	.....	.....	.....	S.....	I.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/11				
15P-3	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	V.....	.....	.....	1/11				
15P-4	.....	.....	.....	.....	I.....	D.....	.....	.....	.....	.....	1/11				
15P-5	V.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/11				
15P-6	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	.....	.....	Y.....	1/11				
15P-7	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	L.....	.....	.....	1/11				
20P-1	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	.....	8/19				
20P-2	.....	.....	S.....	.....	I.....	.....	Y.....	I.....	M.....	.....	2/19				
20P-3	.....	.....	S.....	.....	I.....	.....	R.....	I.....	M.....	.....	1/19				
20P-4	.....	.....	S.....	.....	I.....	.....	Y.....	I.....	V.....	M.....	1/19				
20P-5	.....	R.....	E.....	.....	S.....	I.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/19				
20P-6	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	Y.....	I.....	M.....	.....	1/19				
20P-7	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	C.....	I.....	V.....	.....	1/19				
20P-8	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	I.....	M.....	.....	1/19				
20P-9	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	G.....	I.....	V.....	.....	1/19				
20P-10	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	.....	1/19				
20P-11	.....	.....	.....	.....	I.....	L.....	.....	I.....	V.....	.....	1/19				
25P-1	.....	.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	I.....	V.....	.....	4/20				
25P-2	.....	.....	S.....	.....	I.....	.....	.....	I.....	M.....	.....	3/20				
25P-3	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	V.....	I.....	.....	2/20				
25P-4	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	2/20				
25P-5	.....	.....	S.....	.....	I.....	.....	.....	T.....	I.....	M.....	1/20				
25P-6	.....	A.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	1/20				
25P-7	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	M.....	1/20				
25P-8	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	T.....	V.....	I.....	.....	1/20				
25P-9	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	.....	I.....	M.....	1/20				
25P-10	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	T.....	V.....	1/20				
25P-11	.....	.....	A.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	M.....	1/20				
25P-12	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	M.....	I.....	V.....	1/20				
25P-13	.....	.....	.....	.....	T.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	1/20				
30P-1	.....	I.....	.....	.....	K.....	.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	2/10			
30P-2	.....	I.....	K.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	I.....	V.....	.....	2/10			
30P-3	.....	R.....	.....	S.....	.....	I.....	.....	V.....	V.....	.....	.....	1/10			
30P-4	.....	.....	K.....	S.....	K.....	.....	I.....	.....	I.....	V.....	.....	1/10			
30P-5	.....	.....	K.....	S.....	.....	.....	I.....	.....	I.....	V.....	.....	1/10			
30P-6	.....	.....	.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	I.....	M.....	.....	1/10			
30P-7	.....	I.....	.....	.....	A.....	K.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/10			
30P-8	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/10			
33P-1	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	I.....	.....	M.....	2/11			
33P-2	.....	.....	K.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	I.....	V.....	M.....	2/11			
33P-3	.....	.....	K.....	S.....	.....	I.....	I.....	T.....	I.....	V.....	M.....	1/11			
33P-4	.....	I.....	K.....	S.....	A.....	.....	I.....	.....	N.....	.....	M.....	1/11			
33P-5	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	N.....	.....	M.....	1/11			
33P-6	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	N.....	G.....	.....	M.....	1/11			
33P-7	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/11		
33P-8	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/11		
33P-9	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	.....	M.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/11		
40P-1	.....	.....	K.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	N.....	V.....	.....	I.....	V.....	M.....	3/11
40P-2	.....	.....	K.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	.....	V.....	S.....	I.....	V.....	M.....	2/11
40P-3	.....	.....	K.....	S.....	.....	I.....	I.....	.....	N.....	V.....	I.....	I.....	V.....	M.....	1/11
40P-4	.....	.....	K.....	S.....	A.....	.....	I.....	.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	.....	1/11
40P-5	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	V.....	.....	N.....	.....	I.....	M.....	.....	1/11
40P-6	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	V.....	.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/11
40P-7	.....	.....	.....	.....	.....	I.....	I.....	V.....	.....	.....	.....	I.....	V.....	M.....	1/11
40P-8	.....	.....	NT.....	.....	.....	I.....	I.....	V.....	.....	N.....	.....	I.....	M.....	.....	1/11

試験管内での耐性誘導において、任意のpassageでのプロテアーゼ領域のアミノ酸配列を示す。上に野生型HIV-1<sub>NL4-3</sub>の配列を示し、変異を認めなかったところは点で示す。

図4. 試験管内でのGRL-98065耐性誘導中に認められたHIV-1<sub>NL4-3</sub>のgag領域における変異

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
pNL43 Gag	MGARASVLSG	GELDKWEKIR	LRPGGKKQYK	LKHIVWASRE	LERFAVNPGL	LETSEGCRCQI	LGQLQPSLQT	GSEELRSLYN	TIAVLYCVHQ	RIDVVKDTKEA	
5P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
10P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
15P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
20P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
25P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....P.....	.....	.....	.....	
30P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
33P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
40P-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	8/9
40P-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	1/9

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
pNL43 Gag	LDKIEEEQNK	SKKKAQQAAA	DTGNNSQVSQ	NYPIVQNLQG	QMVHQAI SPR	TLNAWVKVVE	EKAFSPEVIP	MFSALSEGAT	PQDLNLTMLNT	VGGHQAAQMOM	
5P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
10P	.....	.....	.....X.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
15P	.....	.....	.....G/S.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
20P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
25P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
30P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
35P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
40P-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	5/9
40P-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	1/9
40P-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....H.....	.....	1/9
40P-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....	.....G.....	1/9
40P-5	.....Y.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....	1/9

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
pNL43 Gag	LKETINEEAA	EWDRLHPVHA	GPIAPGQMR	PRGSDIAGTT	STLQEQIGWM	THNPPIPVGE	IYKRWIILGL	NKIVRMYSET	SILDIRQGGPK	EPFRDYVDRF	
5P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
10P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
15P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
20P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
25P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....X.....	.....	.....	
30P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K/R.....	.....	.....	
33P	.....	.....X.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	.....	
40P-1	.....	.....N/D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	5/9
40P-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....V.....	.....	.....	.....K.....	.....	1/9
40P-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	1/9
40P-4	.....	.....	.....Y.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	1/9
40P-5	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	1/9

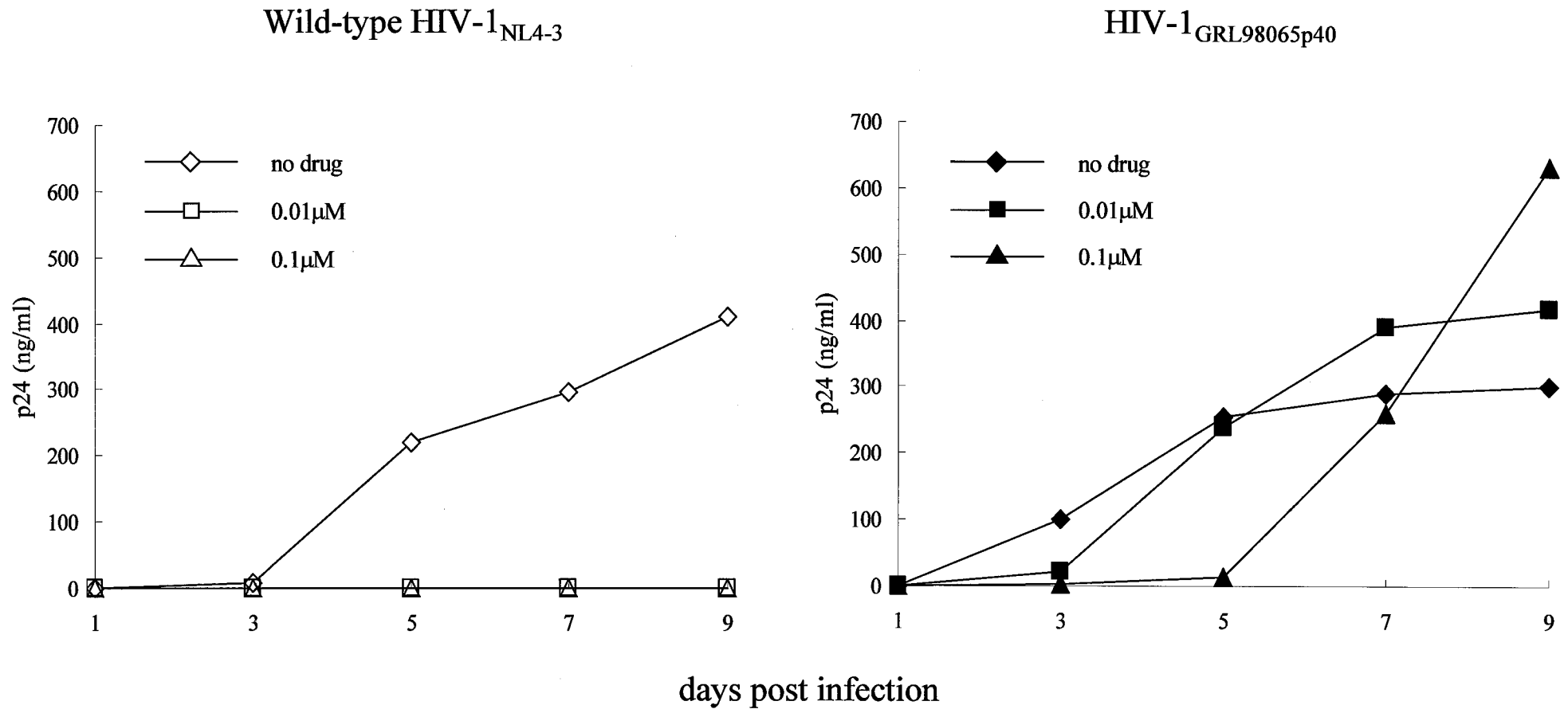
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
pNL43 Gag	YKTLRAEQAS	QEVKNWMTET	LLVQANPDC	KTILKALGPG	ATLEEMMTAC	QGVGGPGHKA	RVLAEAMSQV	TNPATIMIQQ	GNFRNRKRTV	KCFNCGKEGH	
5P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
10P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
15P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
20P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
25P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
30P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
35P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....X.....	
40P-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....D/V.....	3/9
40P-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....V.....	.....	.....	1/9
40P-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....R.....	.....	.....	.....	.....	1/9
40P-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....D.....	1/9
40P-5	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/9
40P-6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....K.....	.....	.....	.....	1/9
40P-7	.....	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....	.....	1/9

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
pNL43 Gag	IAKNCRAPRK	KGCWKCGKEG	HQMKDCTERQ	ANFLGKIWPS	HKGRPGNFLO	SRPEPTAPPE	ESFRFGEETT	TPSQKQEPID	KELYPLASLR	SLFGSDPSSQ	
5P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
10P	.....	.....	.....	.....X.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
15P	.....	.....	.....	.....L/P.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
20P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
25P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
30P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
35P	.....X.....	.....X.....	.....X.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
40P-1	.....H/P.....	.....D/G.....	.....I/N.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2/9
40P-2	.....	.....D.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2/9
40P-3	.....	.....D.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....E.....	.....F.....	.....	1/9
40P-4	.....	.....D.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....E.....	.....	.....	1/9
40P-5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....P.....	.....	.....	.....	1/9
40P-6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....M.....	.....	.....	1/9
40P-7	.....	.....	.....	.....	.....R.....	.....	.....	.....	.....R.....	.....	1/9

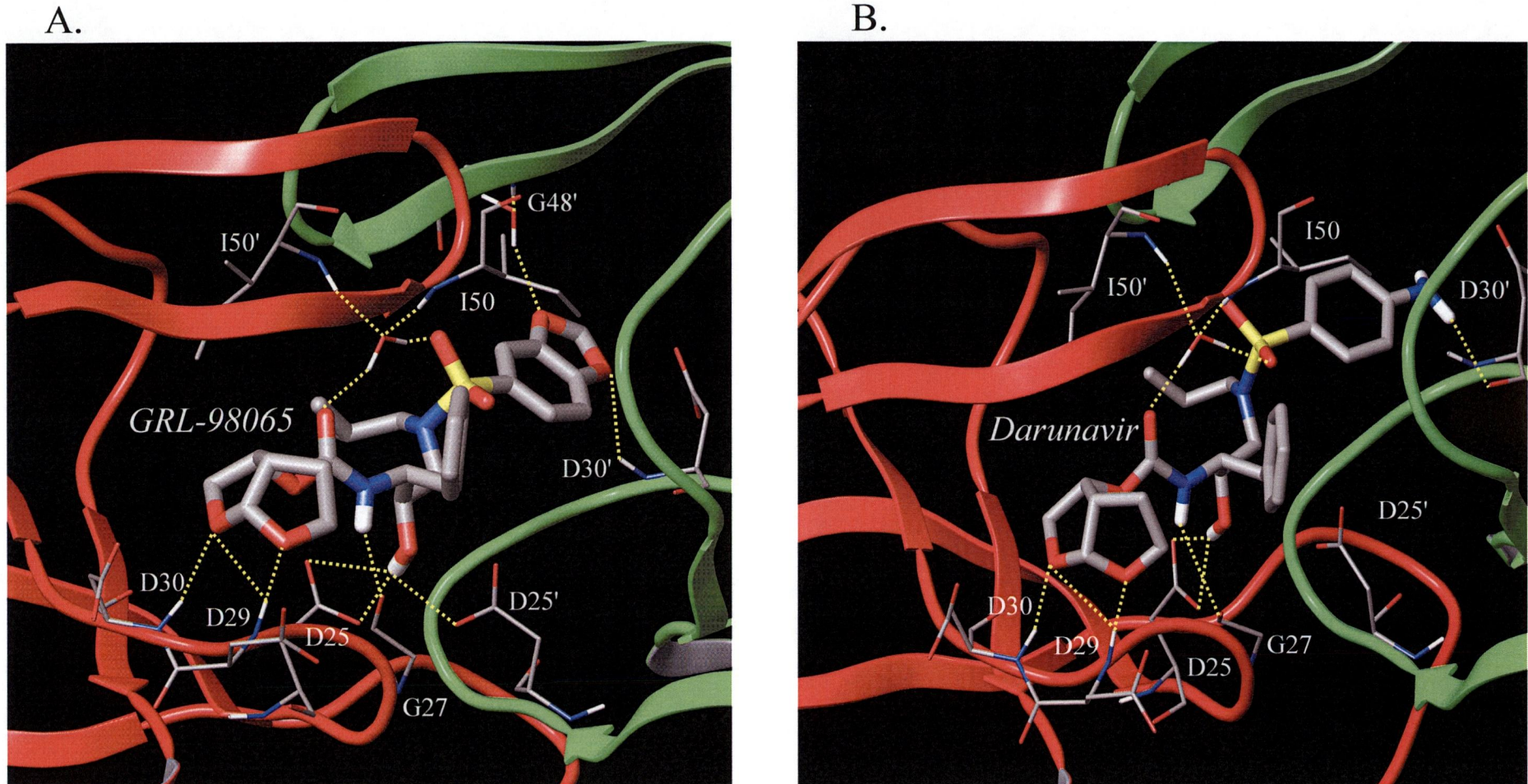
試験管内での耐性誘導において、任意のpassageでのgag領域のアミノ酸配列を示す。上に野生型 HIV-1<sub>NL4-3</sub>の配列を示し、変異を認めなかったところは点で示す。

図5. GRL-98065耐性変異HIV-1株の複製能評価



MT-4細胞( $2.4 \times 10^5$ )と30 ng p24抗原量のGRL-98065耐性変異HIV-1<sub>NL4-3</sub> (40 passage: HIV-1<sub>GRL98065p40</sub>)もしくは野生型HIV-1<sub>NL4-3</sub>を加えて3時間培養、MT-4細胞を回収した後にGRL-98065添加の有無で分けて9日間培養を行い ( MT-4細胞の最終濃度は $10^4$ /ml、GRL-98065の最終濃度は0, 0.01, 0.1 μM )、上清中のp24抗原量を1日おきに測定した。

図6. GRL-98065と野生型HIV-1 プロテアーゼ間の結晶構造解析



AではGRL-98065、BではDRVと野生型HIV-1プロテアーゼ間における水素結合を黄色の点線で示す。番号は薬剤と水素結合を有するアミノ酸のプロテアーゼ領域における位置を示す。窒素原子、酸素原子はそれぞれ青色と赤色で示す。



## 8 ) 考察

特徴的な *bis*-THF 構造を有する新規の HIV-1 PI である GRL-98065 は、多剤耐性変異株を含めた広いスペクトラムでの HIV-1 および HIV-2 の複製を、非常に低い濃度で阻害した(表 1-4)。

GRL-98065 は試験管内で誘導された各種既存 PI 耐性変異 HIV-1 に対して IC<sub>50</sub> 値が数 nM と高い活性を維持していたが、APV 耐性変異 HIV-1 に対して活性の低下を認めた(表 2)。この理由として両者ともに sulfonamide 構造を有しており、構造の類似性が交叉耐性に関与していると考えられた。既存の PIs のうち、SQV は我々および他の研究グループの以前の報告と一致するように SQV 耐性変異 HIV-1 以外の既存 PI 耐性変異 HIV-1 に対して強い活性を維持していたが(14, 41, 42)、その一方多剤耐性臨床分離 HIV-1 に対して、著明な活性の低下を認めた。これに比較して GRL-98065 は本実験で使用した 6 種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1 に対し、IC<sub>50</sub> 値が数 nM と高い活性を維持することが判った(表 4)。

試験管内での GRL-98065 耐性誘導実験において、PR 領域に 10 ヶ所のアミノ酸変異を確認した(図 3)。このうち passage 20 以降、50%前後のクローンにおいて特徴的な A28S 変異の出現を認めた。HIV-1 プロテアーゼに A28S 変異が入ることにより、プロテアーゼの酵素活性は 1,500 倍に低下するという報告がある(18)。GRL-98065 の prototype PI である TMC126 において、同様に 50%前後のクローンで A28S 変異を認め、野生型 A28 と変異

A28S protease subunit 同士が heterodimer を形成することにより野生型のプロテアーゼ活性を維持しつつ、A28S 変異による steric/electrostatic expulsion を起こすことで薬剤のプロテアーゼへの結合を阻害し耐性を獲得すると報告されたが(41)、同様の機序が GRL-98065 耐性に関与する可能性が示唆された。また、passage 40 において A28S を有しないクローンに I50V 変異を認めた。結晶構造解析において、GRL-98065 は Ile50 と水素結合を有しており(図 6)、この変異により GRL-98065 のプロテアーゼ flap 部位への結合が減弱することで、耐性化へ関与する可能性が推測された。結晶構造解析の結果、GRL-98065 は DRV と同様に *bis*-THF 構造の酸素原子がプロテアーゼ活性中心部位 (Asp29, Asp30) の主鎖と強く結合することが判明した(図 6)。HIV-1 プロテアーゼ活性部位のアミノ酸変異によって PI が結合するアミノ酸の側鎖が変化することにより、PI のプロテアーゼへの結合が減弱し HIV-1 は PI 耐性を獲得するが、この変異により主鎖が変化することはほとんど無く(13, 19, 22, 41)、この 2 剤においてプロテアーゼ活性中心の主鎖と結合することが薬剤耐性 HIV-1 に対する強い活性の維持に重要であると考えられる。例としてプロテアーゼ活性中心部位の Asp30 の側鎖と水素結合をもつ NFV に曝露された HIV-1 のプロテアーゼにおける主要な耐性変異として D30N があるが、これは 30 番のアスパラギン酸がアスパラギンに変化することで側鎖が変化して NFV との水素結合が損なわれ、結果として NFV への耐性を獲得する(33)。しかしこのアミノ酸変異によって主鎖はほとんど変化しない。このことは今回実験に使用したプロテアーゼ領域に D30N 変異を有する NFV 耐性変異 HIV-1 に対し、Asp30 ア

ミノ酸の側鎖には直接結合しない GRL-98065 が強い活性を維持していた結果への説明となりうる。また GRL-98065 では、プロテアーゼ flap 部位の Ile50 および Ile50' との水素結合に加え、P2' site の benzodioxole 構造が flap 部位の Gly48' と水素結合を有するのに対して、DRV では Gly48' との水素結合を認めなかった。この可動性に富んだ flap 部位の Gly48' との水素結合が GRL-98065 のプロテアーゼへの結合を DRV より更に安定化させ、本来の HIV-1 Gag 前駆蛋白 (基質) とプロテアーゼの相互作用に近づけることで、GRL-98065 の強力な抗 HIV 活性に関与していると考えられた。本研究における GRL-98065 の耐性誘導において Gly48 への変異出現は認めなかった。

HIV-1 の PI への耐性獲得は耐性関連アミノ酸変異出現による PI-プロテアーゼ間での水素結合の消失もしくは van der Waals 力の消失による。またアミノ酸変異出現による主鎖の変化は軽微なものである。もし、ある PI が野生型プロテアーゼにおける保存されたアミノ酸の主鎖と複数の水素結合を有する場合、耐性変異出現による van der Waals 力の減弱は PI-プロテアーゼ間における結合にほとんど影響しないと考えられる。GRL-98065 および DRV と既存の PIs において、野生型プロテアーゼ活性中心の Asp29, Asp30, Asp30' の主鎖との水素結合の数を結晶構造解析で評価したところ、既存 PIs より多くの水素結合を GRL-98065 と DRV は有しており(表 6)、この結果から 2 剤が既存 PIs と比べてより変異プロテアーゼとの水素結合を維持可能で、より強固に変異プロテアーゼへ結合しその酵素活性を阻害可能であることが示唆された

## 9 ) 結語

本研究により新規の HIV-1 PI である GRL-98065 において、①HIV-1 プロテアーゼ活性中心の主鎖に強固に結合し、更にプロテアーゼ flap 部位との結合によって薬剤の結合が安定化することで多剤耐性 HIV-1 を含む広いスペクトラムの抗 HIV 活性を発揮する②他の既存 PIs と異なる HIV-1 プロテアーゼへの結合様式を有する③GRL-98065 に対する HIV-1 の耐性獲得は遅延する④試験管内誘導によって得られた GRL-98065 耐性変異 HIV-1 は複数の既存 PIs に対する感受性を維持する、などの特性が明らかとなった。これらの結果より GRL-98065 は薬剤耐性 HIV 感染症例の有望な治療薬となる可能性が示唆された。

## 10 ) 参考文献

1. Barre-Sinoussi, F. 2003. The early years of HIV research: integrating clinical and basic research. *Nat Med* 9:844-6.
2. Briz, V., E. Poveda, and V. Soriano. 2006. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother* 57:619-27.
3. Carr, A. 2003. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2:624-34.
4. Chan, D. C., and P. S. Kim. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93:681-4.
5. Collins, J. R., S. K. Burt, and J. W. Erickson. 1995. Flap opening in HIV-1 protease simulated by 'activated' molecular dynamics. *Nat Struct Biol* 2:334-8.
6. Cooper, D. A., and J. M. Lange. 2004. Peptide inhibitors of virus-cell fusion: enfuvirtide as a case study in clinical discovery and development. *Lancet Infect Dis* 4:426-36.
7. Doyon, L., G. Croteau, D. Thibeault, F. Poulin, L. Pilote, and D. Lamarre. 1996. Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 70:3763-9.
8. Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D.

- Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278:1295-300.
9. Freed, E. O. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251:1-15.
10. Fumero, E., and D. Podzamczar. 2003. New patterns of HIV-1 resistance during HAART. *Clin Microbiol Infect* 9:1077-84.
11. Ghosh, A. K., J. F. Kincaid, W. Cho, D. E. Walters, K. Krishnan, K. A. Hussain, Y. Koo, H. Cho, C. Rudall, L. Holland, and J. Buthod. 1998. Potent HIV protease inhibitors incorporating high-affinity P2-ligands and (R)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere. *Bioorg Med Chem Lett* 8:687-90.
12. Ghosh, A. K., K. Krishnan, D. E. Walters, W. Cho, H. Cho, Y. Koo, J. Trevino, L. Holland, and J. Buthod. 1998. Structure based design: novel spirocyclic ethers as nonpeptidal P2-ligands for HIV protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 8:979-82.
13. Ghosh, A. K., G. Schiltz, R. S. Perali, S. Leshchenko, S. Kay, D. E. Walters, Y. Koh, K. Maeda, and H. Mitsuya. 2006. Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 16:1869-73.
14. Gong, Y. F., B. S. Robinson, R. E. Rose, C. Deminie, T. P. Spicer, D. Stock, R. J.

- Colonno, and P. F. Lin. 2000. In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2319-26.
15. Grabar, S., L. Weiss, and D. Costagliola. 2006. HIV infection in older patients in the HAART era. *J Antimicrob Chemother* 57:4-7.
  16. Hirsch, H. H., G. Kaufmann, P. Sendi, and M. Battegay. 2004. Immune reconstitution in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 38:1159-66.
  17. Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-6.
  18. Hong, L., J. A. Hartsuck, S. Foundling, J. Ermolieff, and J. Tang. 1998. Active-site mobility in human immunodeficiency virus, type 1, protease as demonstrated by crystal structure of A28S mutant. *Protein Sci* 7:300-5.
  19. Hong, L., X. C. Zhang, J. A. Hartsuck, and J. Tang. 2000. Crystal structure of an in vivo HIV-1 protease mutant in complex with saquinavir: insights into the mechanisms of drug resistance. *Protein Sci* 9:1898-904.
  20. Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Aldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A.

- Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4:1302-7.
21. Koh, Y., H. Nakata, K. Maeda, H. Ogata, G. Bilcer, T. Devasamudram, J. F. Kincaid, P. Boross, Y. F. Wang, Y. Tie, P. Volarath, L. Gaddis, R. W. Harrison, I. T. Weber, A. K. Ghosh, and H. Mitsuya. 2003. Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3123-9.
22. Kovalevsky, A. Y., Y. Tie, F. Liu, P. I. Boross, Y. F. Wang, S. Leshchenko, A. K. Ghosh, R. W. Harrison, and I. T. Weber. 2006. Effectiveness of nonpeptide clinical inhibitor TMC-114 on HIV-1 protease with highly drug resistant mutations D30N, I50V, and L90M. *J Med Chem* 49:1379-87.
23. Levy, A. R., D. James, K. M. Johnston, R. S. Hogg, P. R. Harrigan, B. P. Harrigan, B. Sobolev, and J. S. Montaner. 2006. The direct costs of HIV/AIDS care. *Lancet Infect Dis* 6:171-7.
24. Little, S. J., S. Holte, J. P. Routy, E. S. Daar, M. Markowitz, A. C. Collier, R. A. Koup, J. W. Mellors, E. Connick, B. Conway, M. Kilby, L. Wang, J. M. Whitcomb, N. S.



- Hellmann, and D. D. Richman. 2002. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347:385-94.
25. Maeda, K., D. Das, H. Ogata-Aoki, H. Nakata, T. Miyakawa, Y. Tojo, R. Norman, Y. Takaoka, J. Ding, G. F. Arnold, E. Arnold, and H. Mitsuya. 2006. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem* 281:12688-98.
26. Maeda, K., K. Yoshimura, S. Shibayama, H. Habashita, H. Tada, K. Sagawa, T. Miyakawa, M. Aoki, D. Fukushima, and H. Mitsuya. 2001. Novel low molecular weight spirodiketopiperazine derivatives potently inhibit R5 HIV-1 infection through their antagonistic effects on CCR5. *J Biol Chem* 276:35194-200.
27. Mitsuya, H., Erickson, J. 1999. Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection Textbook of AIDS medicine.
28. Nair, V., and G. Chi. 2007. HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS. *Rev Med Virol* 17:277-95.
29. Nakata, H., K. Maeda, T. Miyakawa, S. Shibayama, M. Matsuo, Y. Takaoka, M. Ito, Y. Koyanagi, and H. Mitsuya. 2005. Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J Virol* 79:2087-96.

30. Navaza, J. 1994. AMoRe: An automated package for molecular replacement.. *Acta Crystallogr A* 50:157-63.
31. Otwinowski, Z., and Minor, W. 1997. Processing of X-ray diffraction data in oscillation mode. *Methods in Enzymology*. 276:307-26.
32. Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, and S. D. Holmberg. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338:853-60.
33. Patick, A. K., H. Mo, M. Markowitz, K. Appelt, B. Wu, L. Musick, V. Kalish, S. Kaldor, S. Reich, D. Ho, and S. Webber. 1996. Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 40:292-7.
34. Preston, B. D., and J. P. Dougherty. 1996. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends Microbiol* 4:16-21.
35. Sakalian, M., C. P. McMurtrey, F. J. Deeg, C. W. Maloy, F. Li, C. T. Wild, and K. Salzwedel. 2006. 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid inhibits maturation of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor assembled in vitro. *J Virol* 80:5716-22.

36. Sheldrick, G. M., and Schneider, T.R. 1997. SHELXL: High resolution refinement. *Methods in Enzymology*. 277:319-43.
37. Shirasaka, T., M. F. Kavlick, T. Ueno, W. Y. Gao, E. Kojima, M. L. Alcaide, S. Chokekijchai, B. M. Roy, E. Arnold, R. Yarchoan, and et al. 1995. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2398-402.
38. Siliciano, J. D., R. F. Siliciano, J. N. Blankson, D. Persaud, R. F. Siliciano, T. Pierson, J. McArthur, R. F. Siliciano, and R. Siliciano. 2004. A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy Can antiretroviral therapy ever be stopped? *J Antimicrob Chemother* 54:6-9.
39. Tamiya, S., S. Mardy, M. F. Kavlick, K. Yoshimura, and H. Mistuya. 2004. Amino acid insertions near Gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol* 78:12030-40.
40. Tie, Y., P. I. Boross, Y. F. Wang, L. Gaddis, A. K. Hussain, S. Leshchenko, A. K.

- Ghosh, J. M. Louis, R. W. Harrison, and I. T. Weber. 2004. High resolution crystal structures of HIV-1 protease with a potent non-peptide inhibitor (UIC-94017) active against multi-drug-resistant clinical strains. *J Mol Biol* 338:341-52.
41. Yoshimura, K., R. Kato, M. F. Kavlick, A. Nguyen, V. Maroun, K. Maeda, K. A. Hussain, A. K. Ghosh, S. V. Gulnik, J. W. Erickson, and H. Mitsuya. 2002. A potent human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, UIC-94003 (TMC-126), and selection of a novel (A28S) mutation in the protease active site. *J Virol* 76:1349-58.
42. Yoshimura, K., R. Kato, K. Yusa, M. F. Kavlick, V. Maroun, A. Nguyen, T. Mimoto, T. Ueno, M. Shintani, J. Falloon, H. Masur, H. Hayashi, J. Erickson, and H. Mitsuya. 1999. JE-2147: a dipeptide protease inhibitor (PI) that potently inhibits multi-PI-resistant HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8675-80.