

TABLE 4. Mutations at least partially responsible for the subtype dependent behavior of genotypic interpretation algorithms for a drugs and algorithms responsible for the observed discordances

Drug <sup>a</sup>	Subtype	Mutation patterns (score) <sup>b</sup>	Algorithm responsible <sup>c</sup>
Naive population			
Nelfinavir	C	82I/V + 63P + 36I/V (SISS)	HIVDB (all sequences also 93L, taken into account by only HIVDB)
	G	82I + 63P + 36I (SISS) and 82I + 63mt + 20I (SISS)	HIVDB (high weight for 82I)
Ritonavir	F	20R + 10V/I (nrSIS)	Rega (all sequences also 36I, three secondary PI mutations scored as I by only Rega)
Treated population			
Saquinavir	G	90M + 82I (SRIR)	ANRS (does not score this as resistant)
Indinavir	G	90M + 82I + 54V (RRSI) and	HIVDB and ANRS (all sequences also 36I, pattern scored as R by HIVDB and ANRS)
		90M + 82I + 71T + 20I (RISI)	Rega (L90M not scored as R)
Nelfinavir	F	88S (RRSI) and 82A + 54V (IRRR)	Rega (scores this as S) ANRS (all sequences also 36I, not scored as R by ANRS)
Lamivudine	CRF01_AE	65R + 151M (IRRI)	ANRS and VGI (do not have a rule for the presence of both)
Emtricitabine	CRF01_AE	118I + 215Y (SSInr)	Rega (all sequences also 41L and 67N, 67N scored only by Rega)

<sup>a</sup> Only drugs for which the subtype dependence was proven and for which we found subtypes that displayed significantly more or fewer discordances than subtype B are shown. As explained in the text, the decision trees for the drugs where subtype B displayed more discordances were often too complex. Those are not included in this table.

<sup>b</sup> Positions at which mutations are responsible for discordances as revealed by data mining analysis. The order of the scores is shown alphabetically according to the algorithm name (ANRS, HIVDB, Rega, and VGI). Only the scoring patterns that accounted for most of the discordances (>85%) are shown. nr, no rule available for the drug.

<sup>c</sup> Algorithm(s) responsible for the observed discordances. Some information is provided in parentheses as to why these algorithms cause a discordance.

sequences with the second pattern also harbor a mutation at position PRO 36. Again, these discordances were due to the HIVDB algorithm, which is the only one that takes into account mutations at position PRO 20 and gives a rather high weight for the PRO 82I mutation for nelfinavir.

For ritonavir, subtype F caused more discordances than subtype B. We found a rule, PRO 20R + 10V/I, in the decision tree explaining significantly more subtype F partial discordances than those observed in subtype B. An example of the

Weka decision tree with subsequent statistical analyses is shown in Fig. 2. Those subtype F sequences all had the PRO 36I mutation and thus harbored three secondary PI mutations. The Rega algorithm scores this as intermediate for ritonavir, while all other algorithms score this as susceptible.

For NRTIs, subtype B gave a lot of discordant interpretations. The rule predictive for this discordance in the decision tree was any mutation at RT 215, but this was not significant ( $P = 0.07$ ). When examining the data, we found that the dis-

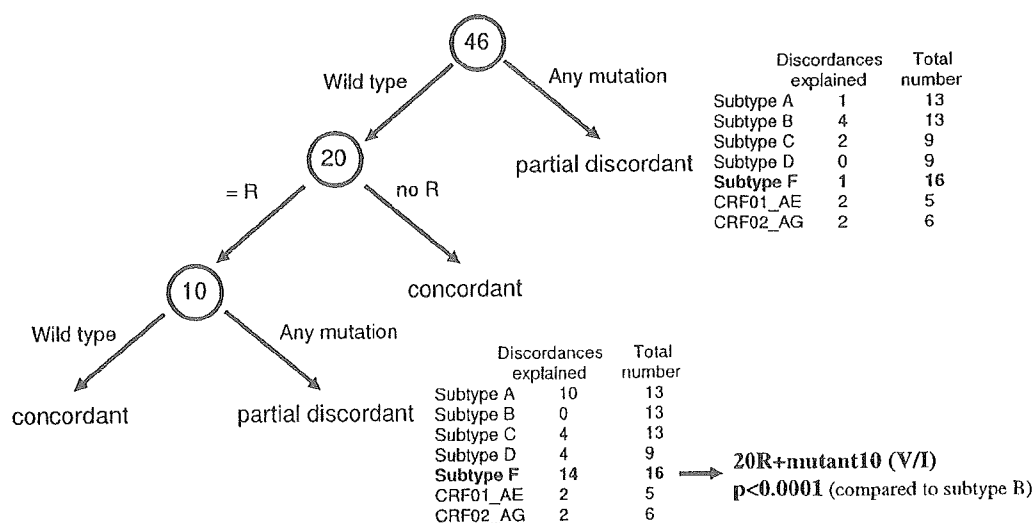


FIG. 2. Representation of the Weka decision tree for ritonavir in our untreated population. In the circles, the amino acid position is represented and, along the arrows, the mutation present is shown. R, arginine. We found that subtype F displayed more discordance. In the Weka decision tree, two rules were found, i.e., (i) any mutations at position PRO 46 and (ii) 20R + mutant 10. We calculated the number of discordances found that were explained by these rules and compared these numbers for subtype F and subtype B. Only the second rule explained significantly more discordances for subtype F than for subtype B.

cordances for stavudine were due to the ANRS system, which scores the presence of a mutation at 215 by itself as intermediately susceptible; all the other systems score this as susceptible. We found that subtype B more often had a mutation at this position than did subtype C, although this was not significant.

For the PI saquinavir in therapy-experienced patients, the full discordances observed in subtype G sequences could be attributed to mutations PRO 90 M + 82I. This was due to the ANRS interpretation system, which does not score this as resistant (as HIVDB and VGI did) if PRO 82I is present. Only PRO 82A is taken into account by ANRS.

For indinavir, subtype G also displayed more discordances than subtype B, apparently due to PRO 90 M + 82I + 54V, which was scored as resistant by HIVDB and ANRS because all these samples also had the PRO 36I mutation. Another rule predictive for discordance was PRO 90 M + 82I + 71T + 20I. The Rega system scores this pattern as susceptible, since the PRO 90 M mutation by itself is not scored as resistant by this algorithm.

Subtype F causes more discordances for nelfinavir in treated patients. The PRO 88S mutation was partially responsible for these discordances. The Rega algorithm considers these isolates to be susceptible, while the score from other algorithms was at least intermediate resistant. The partial discordances for subtype F are explained by PRO 82A + 54V. All these sequences had also PRO 36I, which is not considered resistant by ANRS relative to the other algorithms.

Subtype B displayed a lot of discordances for amprenavir. In fact, the decision tree incorporated subtype in this model. The resulting rule was PRO 90 M + 54V + 20R + 82A. All these sequences had an additional PRO 36I mutation, which is not included in the amprenavir rules of the Rega algorithm. This mutation pattern scored as intermediate for this system, while for the other algorithms, the additional PRO 36I mutation is responsible for the resistant score.

For atazanavir, subtype B caused a lot of discordances. The decision tree was very complex, and no clear rule had a high coverage and was predictive for the observed discordances in all subtypes. The atazanavir rules incorporate a number of mutations also observed for other PIs. Patients harboring a subtype B virus are probably treated with protease inhibitors more often and for a longer time, since subtype B has dominated since the beginning of the epidemic in countries where treatment was available and subsequently has been subject to drug selective pressure earlier. In these sequences, the large background of PI resistance mutations probably causes the discordances observed for atazanavir.

For lamivudine and emtricitabine (FTC), CRF01\_AE scored more discordances than subtype B. For lamivudine resistance interpretation, this was caused by RT 65R + 151 M ( $P < 0.05$ ). ANRS scores the presence of both mutations separately as intermediate but does not provide a rule for the presence of both of them, while the Rega algorithm for example scores this combination as resistant.

For emtricitabine, no clear rules were found in the tree, although it seemed that RT 41L + 67N + 118I + 215Y caused most of the partial discordances observed for CRF01\_AE. The Rega algorithm is the only one that scores the RT 67N mutation for FTC. VGI does not provide rules for FTC.

For didanosine, tenofovir, and zalcitabine, subtype B had a lot more discordant interpretations than a number of non-B subtypes. The decision trees were very complex and also for these drugs, no clear rules could be deduced.

## DISCUSSION

HIV genotypic information has led to an improved understanding of mutations in *pol*, which is associated with virological failure. Although resistance genotyping still has some limitations, it is often used to guide therapy start or change. One of the major problems is the interpretation of genotypic results. The knowledge on which such interpretation systems are built is based mainly on subtype B data. Considering the possible differences in therapy response in other subtypes, it would be interesting to verify whether our genotypic interpretation systems are equally valid for all subtypes. A first approach is to map discrepancies in drug resistance interpretation algorithms between subtypes and to identify which mutational patterns are responsible for such discrepancies. Such patterns can then further be investigated by, for example, *in vitro* mutagenesis and measuring the associated phenotype, taking into account that virus replication under drug selective pressure not only is a matter of protease and RT mutations but also is determined by the whole viral genome.

In this study, performed on sequences obtained from 5,030 patients, we investigated subtype-dependant discrepancies between four commonly used interpretation systems (Rega 6.3, HIVDB-08/04, ANRS [07/04], and VGI 8.0). The versions analyzed were the ones available to us at the time of analysis. In the meantime, updates have become available for all of these systems. None of these systems include subtype-dependant rules.

We did find drug- and subtype-dependent differences in the drug susceptibility/therapy response predictions of commonly used interpretation algorithms. We also identified mutational patterns that seemed to be partially responsible for the observed discordances.

Concordance was the lowest in the interpretation of therapy-experienced sequences, which means that it is less clear which mutations are really important for resistance development. This may explain some of the differences seen between algorithms in predicting treatment outcome (6). For lopinavir especially, the pathway towards resistance is unclear, which explains the high number of discordant results between the interpretation systems found in therapy-experienced patients (26, 27).

Our analyses revealed that the proportion of discordances between commonly used algorithms is subtype dependent for many drugs, in naive as well as in therapy-experienced patients. Concordance was higher in naive patients. However, non-B subtype sequences and subtype B sequences overall had equal numbers of resistance mutations. Both groups had mostly "wild-type" sequences. Therefore, the higher number of concordances is probably due to a larger agreement on what is a wild-type sequence.

In naive patients, discordances were found for nelfinavir (subtypes C and G). Incidentally, it is known that the pathway towards resistance for nelfinavir differs for subtypes C and G from that for subtype B. The PRO D30N mutation is not the

preferred one as in subtype B; it seems that, rather, the PRO L90M is selected (15) (P. Gomes, I. Diogo, M. F. Gonves, et al., Abstr. 9th Conf. Retrovir. Opportunistic Infect., abstr. 46, 2002). We found mutational patterns that partially explained these discordances. Those were mostly due to combinations of secondary PI mutations, which are often present as a polymorphism in non-B subtypes. Some algorithms include these mutations in their rules, while others do not. The PRO 93L mutation for example, is included by only HIVDB and not by the other systems. This mutation was present in all subtype C sequences with the pattern PRO 82I/V + 63P + 36I/V. Similarly for subtype G, the PRO 20I mutation is incorporated by only HIVDB.

For subtype F and ritonavir, the pattern PRO 20R + 10V/I also included the PRO 36I mutation. Three secondary PI mutations are scored as intermediate by only the Rega Algorithm.

For NNRTIs, we did not find any subtype-dependent discordances in resistance scoring, although some differences in resistance development have already been reported for subtype C under efavirenz treatment (2).

For NRTIs, only in naive patients did we find that the proportion of discordances is subtype dependent for stavudine. Subtype C had significantly less discordances than subtype B due to a mutation on RT 215 that occurred more frequently in subtype B sequences.

For PI resistance in treated patients, a lot of discordances are observed for subtype G in predicting resistance for saquinavir and indinavir and in subtype F for nelfinavir resistance prediction. The patterns observed here are related to a single algorithm that scores this differently. Differences often occur due to the presence of the PRO 36I mutation, which is present as a polymorphism in non-B subtypes. This mutation often triggers the switch to score an isolate as intermediate, while other systems do not take into account the substitution and consider the isolate to be susceptible. Apparently, there is no agreement on the role of some of these polymorphic resistance mutations in PI resistance.

For amprenavir and atazanavir, subtype B displayed a lot of discordances for treated patients. The decision trees for these drugs were very complex. The tree for amprenavir included subtype as a node, so a rule, PRO 90 M + 54V + 20R + 82A, could be deduced. For atazanavir, no clear rule was found. These two drugs are only recently being used in clinical practice, and the pathway towards resistance is not fully understood yet. The presence of a number of PI mutations, instead of some clear rules, is mostly used in the algorithms.

For lamivudine and emtricitabine in treated patients, CRF01\_AE scored more discordances than subtype B. Although resistance for both drugs are predicted by the same rules in the algorithms, different mutation patterns are found in the decision trees. For lamivudine resistance interpretation, this was caused by RT 65R + 151 M. For emtricitabine, this was RT 41L + 67N + 118I + 215Y (although not statistically supported).

Tipranavir has a low number of discordances for naive patients as well as treated patients. This is mainly due to the limited amount of information that is available on resistance towards this drug (9). All algorithms are based on the same available information and thus predict the same level of resistance.

The four evaluated algorithms, in fact, belong to two different models. The Stanford algorithm assigns a score to each of the observed mutations and uses the sum to decide on the level of resistance, allowing complex patterns of mutations to be taken into account. The VGI, ANRS, and Rega algorithms are restrained to specific rules that describe specific mutational patterns. Therefore, the discordance for complex patterns is especially inevitable since both models use different ways to take these into account.

This study is not intended to draw conclusions on the validity of the different algorithms, but rather to identify mutation patterns that result in divergence between the algorithms, among different subtypes. The mutations and particularly the patterns of polymorphisms in non-B subtypes that are associated with viral resistance warrant further in vitro studies and ultimately need to be confirmed by clinical observation. We acknowledge, as a limitation of this study, the absence of measures of either in vitro or clinical resistance, which are phenotype and therapy outcome, respectively. However, the mutation patterns associated with discordance between the algorithms may identify the sequences of interest in larger datasets, obtained prospectively, and linked to viral load and/or CD4 data to correlate treatment outcomes.

In conclusion, the different algorithms agreed quite well on the level of resistance scored. However, where there are differences, in many cases these can be attributed to specific subtype-dependent combinations of mutations. The mutations found here should further be investigated as to whether they contribute to differences in resistance and therapy response between different subtypes. Our expertise in interpretation of genotypic resistance will increase with a scale-up of treatment to include millions of individuals with non-subtype B virus infections.

#### REFERENCES

1. Abecasis, A. B., K. Deforche, J. Snoeck, L. Bachelier, P. McKenna, P. Carvalho, P. Gomes, R. Camacho, and A.-M. Vandamme. 2005. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *AIDS* 19:1799-1806.
2. Ariyoshi, K., M. Matsuda, H. Miura, S. Tateishi, K. Yamada, and W. Sugiura. 2003. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01\_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33:336-342.
3. Betts, B. J., and R. W. Shafer. 2003. Algorithm specification interface for human immunodeficiency virus type 1 genotypic interpretation. *J. Clin. Microbiol.* 41:2792-2794.
4. Brenner, B., D. Turner, M. Oliveira, D. Moisi, M. Deterio, M. Carobene, R. G. Marlink, J. Schapiro, M. Roger, and M. A. Wainberg. 2003. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 17:F1-F5.
5. Cohen, C. J., S. Hunt, M. Sension, C. Farthing, M. Conant, S. Jacobson, J. Nadler, W. Verbiest, K. Hertogs, M. Ames, A. R. Riechart, and N. M. Graham. 2002. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 16:579-588.
6. De Luca, A., A. Cingolani, S. Di Giambenedetto, M. P. Trotta, F. Baldini, M. G. Rizzo, A. Bertoli, G. Liuzzi, P. Narciso, R. Murri, A. Ammassari, C. F. Perno, and A. Antinori. 2003. Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J. Infect. Dis.* 187:1934-1943.
7. de Oliveira, T., K. Deforche, S. Cassol, M. O. Salminen, D. Paraskevis, C. Seebregts, J. Snoeck, E. J. van Rensburg, A. M. J. Wensing, D. A. M. C. van de Vijver, C. A. Boucher, R. Camacho, and A.-M. Vandamme. 2005. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 21:3797-3800.
8. De Wit, S., R. Boulmé, B. Poll, J.-C. Schmit, and N. Clumeck. 2004. Viral load and CD4 cell response to protease inhibitor-containing regimens in subtype B versus non-B treatment-naive HIV-1 patients. *AIDS* 18:2330-2331.

9. Doyon, L., S. Tremblay, L. Bourgon, E. Wardrop, and M. G. Cordingley. 2005. Selection and characterization of HIV-1 showing reduced susceptibility to the non-peptidic protease inhibitor tipranavir. *Antivir. Res.* 68:27-35.
10. Durant, J., P. Clevenbergh, P. Halfon, P. Delgiudice, S. Porsia, P. Simonet, N. Montagne, C. A. Boucher, J. M. Schapiro, and P. Dellamonica. 1999. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353:2195-2199.
11. Fontaine, E., C. Riva, M. Peeters, J.-C. Schmit, E. Delaporte, K. Van Laethem, K. Van Vaerenbergh, J. Snoeck, E. Van Wijngaerden, E. De Clercq, E. M. Van Ranst, and A.-M. Vandamme. 2002. Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug-resistance on a panel of human immunodeficiency virus type-1 subtypes A-J. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 28:254-258.
12. Frater, A. J., A. Beardall, K. Ariyoshi, D. Churchill, S. Galpin, J. R. Clarke, J. N. Weber, and M. O. McClure. 2001. Impact of baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients. *AIDS* 15:1493-1502.
13. Frater, A. J., D. T. Dunn, A. J. Beardall, K. Ariyoshi, J. R. Clarke, M. O. McClure, and J. N. Weber. 2002. Comparative response of African HIV-1-infected individuals to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 16:1139-1146.
14. Gonzalez, L. M. F., R. M. Brindeiro, M. Tarin, A. Calazans, M. A. Soares, S. Cassol, and A. Tanuri. 2003. In vitro hypersusceptibility of human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease to lopinavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2817-2822.
15. Grossman, Z., E. E. Paxinos, D. Averbuch, S. Maayan, N. T. Parkin, D. Engelhard, M. Lorber, V. Istomin, Y. Shaked, E. Mendelson, D. Ram, C. J. Petropoulos, and J. M. Schapiro. 2004. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2159-2165.
16. Haubrich, R., and L. M. Demeter. 2001. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 26:S51-S59.
17. Hirsch, M. S., F. Brun-Vezinet, C. Bonaventura, B. Conway, D. R. Kuritzkes, R. T. D'Aquila, L. M. Demeter, S. M. Hammer, V. A. Johnson, C. Loveday, J. W. Mellors, D. M. Jacobsen, and D. D. Richman. 2003. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin. Infect. Dis.* 37:113-128.
18. Holguin, A., K. Hertogs, and V. Soriano. 2003. Performance of drug resistance assays in testing HIV-1 non-B subtypes. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:323-326.
19. Jagodzinski, L. L., J. D. Cooley, M. Weber, and N. L. Michael. 2003. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J. Clin. Microbiol.* 41:998-1003.
20. Kantor, R., D. Katzenstein, B. Efron, P. Carvalho, B. Wynhoven, P. Cane, J. R. Clarke, S. Sirivichayakul, M. A. Soares, J. Snoeck, C. Pillay, H. Rudich, R. Rodrigues, A. Holguin, K. Ariyoshi, P. Weidle, M. B. Bouzas, P. Cahn, W. Sugiura, V. Soriano, L. F. Brigido, Z. Grossman, L. Morris, A. M. Vandamme, A. Tanuri, P. Phanuphak, J. Weber, D. Pillay, P. R. Harrigan, R. Camacho, J. M. Schapiro, and R. W. Shafer. 26 April 2005. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med.* 2:e112. [Epub ahead of print.]
21. Kijak, G. H., A. E. Rubio, S. E. Pampuro, C. Zala, P. Cahn, R. Galli, J. S. Montaner, and H. Salomon. 2003. Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms. *HIV Med.* 4:72-78.
22. Korn, K., H. Reil, H. Walter, and B. Schmidt. 2003. Quality control trial for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing using clinical samples reveals problems with detecting minority species and interpretation of test results. *J. Clin. Microbiol.* 41:3559-3565.
23. Loveday, C., D. Dunn, H. Green, A. R. Rinehart, and P. McKenna on behalf of the ERA Steering Committee. 2003. A randomized controlled trial of phenotypic resistance testing in addition to genotypic resistance testing: the ERA trial. *Antivir. Ther.* 8(Suppl. 1):S188.
24. Maes, B., Y. Schrooten, J. Snoeck, I. Derdelinckx, M. Van Ranst, A. M. Vandamme, and K. Van Laethem. 2004. Performance of Viroseq HIV-1 genotyping system in routine practice at a Belgian clinical laboratory. *J. Virol. Methods* 119:45-49.
25. Meynard, J. L., M. Vray, L. Moraud-Joubert, E. Race, D. Descamps, G. Peytavin, S. Matheron, C. Lamotte, S. Guiramand, D. Costagliola, F. Brun-Vezinet, F. Clavel, P. M. Girard, and the Narval Trial Group. 2002. Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS* 16:727-736.
26. Mouno, L., A. Saracino, L. Scudeller, G. Pastore, S. Bonora, A. Cargnel, G. Carosi, and G. Angarano. 2003. HIV-1 phenotypic susceptibility to lopinavir (LPV) and genotypic analysis in LPV/r-naïve subjects with prior protease inhibitor experience. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33:439-447.
27. Parkin, N. T., C. Chappey, and C. J. Petropoulos. 2003. Improving lopinavir genotype algorithm through phenotype correlations: novel mutation patterns and amprenavir cross-resistance. *AIDS* 17:955-961.
28. Perno, C. F., A. Cozzi-Lepri, F. Forbici, A. Bertoli, M. Violin, M. Stella Murra, G. Cadeo, A. Orani, A. Chirianni, C. De Stefano, C. Balotta, A. d'Arminio Monforte, and the Italian Cohort Naive Antiretrovirals Study Group. 2004. Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed. *J. Infect. Dis.* 189:1983-1987.
29. Ravela, J., B. J. Betts, F. Brun-Vezinet, A.-M. Vandamme, D. Descamps, K. Van Laethem, K. Smith, J. M. Schapiro, D. L. Winslow, C. Reid, and R. W. Shafer. 2003. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33:8-14.
30. Reid, C. L., R. Bassett, S. Day, B. Larder, V. De Gruttola, and D. L. Winslow. 2002. A dynamic rules-based interpretation system derived by an expert panel is predictive of virological failure. *Antivir. Ther.* 7:S121.
31. Sarmati, L., E. Nicastri, M. A. Montano, L. Dori, A. R. Buonomi, G. d'Ettoire, F. Gatti, S. G. Parisi, V. Vullo, and M. Andreoni. 2004. Decrease of replicative capacity of HIV isolates after genotypic guided change of therapy. *J. Med. Virol.* 72:511-516.
32. Schuurman, R., D. Brambilla, T. de Groot, D. Huang, S. Land, J. Bremer, I. Benders, C. A. Boucher, and the ENVA Working Group. 2002. Underestimation of HIV type 1 drug resistance mutations: results from the ENVA-2 genotyping proficiency program. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 18:243-248.
33. Shafer, R. W., R. J. Duane, B. J. Betts, Y. Xi, and M. J. Gonzales. 2000. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* 28:346-348.
34. Stürmer, M., H. W. Doerr, and W. Preisser. 2003. Variety of interpretation systems for human immunodeficiency virus type 1 genotyping: confirmatory information or additional confusion? *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3:255-262.
35. Stürmer, M., H. W. Doerr, S. Staszewski, and W. Preisser. 2003. Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping. *Antivir. Ther.* 8:55-60.
36. Torti, C., E. Quiros-Roldan, W. Keulen, L. Scudeller, S. Lo Caputo, C. A. Boucher, F. Castelli, F. Mazzotta, P. Pierotti, A. M. Been-Tiktak, G. Buccolieri, M. De Gennaro, G. Carosi, C. Tinelli, and the GenPhex Study Group of the MaSTeR Cohort. 2003. Comparison between rules-based human immunodeficiency virus type 1 genotype interpretations and real or virtual phenotype: concordance analysis and correlation with clinical outcome in heavily treated patients. *J. Infect. Dis.* 188:194-201.
37. Tural, C., L. Ruiz, C. Holtzer, J. Schapiro, P. Viciano, J. Gonzales, P. Domingo, C. A. Boucher, C. Rey-Joly, B. Clotet, and the Havana Study Group. 2002. The clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 16:209-218.
38. Vandamme, A. M., A. Sonnerborg, M. Ait-Khaled, J. Albert, B. Asjo, L. Bachelier, D. Banhegyi, C. A. Boucher, F. Brun-Vezinet, R. Camacho, P. Clevenbergh, N. Clumeck, N. Dedes, A. De Luca, H. W. Doerr, J. L. Faudon, G. Gatti, J. Gerstoft, W. W. Hall, A. Hatzakis, N. S. Hellmann, A. Horban, J. D. Lundgren, D. J. Kempf, D. Miller, V. Miller, T. W. Myers, C. Nielsen, M. Opravil, L. Palmisano, C. F. Perno, A. N. Phillips, D. Pillay, T. Pumarola, L. Ruiz, M. O. Salminen, J. M. Schapiro, B. Schmidt, J.-C. Schmit, R. Schuurman, E. Shulze, V. Soriano, S. Staszewski, S. Vella, R. Ziermann, and L. Perrin. 2004. Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir. Ther.* 9:829-848.
39. Van Laethem, K., A. De Luca, A. Antinori, A. Cingolani, C. F. Perno, and A.-M. Vandamme. 2002. A genotypic drug resistance algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1 infected patients. *Antivir. Ther.* 7:123-129.
40. Van Laethem, K., K. Van Vaerenbergh, J.-C. Schmit, S. Sprecher, P. Hermans, V. De Vroey, R. Schuurman, T. Harrer, M. Witvrouw, E. Van Wijngaerden, L. Stuyver, M. Van Ranst, J. Desmyter, E. De Clercq, and A.-M. Vandamme. 1999. Phenotypic assays and sequencing are less sensitive than point mutation assays for detection of resistance in mixed HIV-1 genotypic populations. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 22:107-118.

## 6 HIV-1 の薬剤耐性 についての最近 の知見

にしざわ まさこ すぎうら わたる  
■西澤 雅子 杉浦 互  
国立感染症研究所  
エイズ研究センター第2研究グループ



西澤 雅子  
国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ 研究官。  
2000年東北大学大学院農学研究科終了、農学博士。同年より神奈川県衛生研究所にレジデントとして勤務。2003年より現職。研究テーマはhu-PBL SCIDマウスを用いた新規抗HIV-1薬剤評価。趣味はバイク、写真。

Key words : HIV-1, anti-HIV drugs, drug resistance

### Abstract

HAARTが本邦で導入されて以来HIV-1感染症治療の発展には著しいものがある。現在17種類の抗HIV薬剤が使用されAIDSによる死亡数を減少させるなど大きな効果をあげてきた。しかしその一方でHIV-1は自らの遺伝子にアミノ酸置換を誘導して薬剤耐性を獲得し、これがHAARTの効果を減弱させる原因となっている。現在新規抗HIV薬剤の開発と共にHIV-1の薬剤耐性に関する研究が盛んに行われ新しい事実が次々と明らかになった。本稿ではHIV-1薬剤耐性に関する新知見を紹介する。

### はじめに

Human immunodeficiency virus type-1, HIV-1感染症の治療は、多剤併用療法：highly active antiretroviral therapy(HAART)の開発・導入と新薬開発により目覚ましい進歩を遂げてきた。日本でも1997年にHAARTが開始されて以後AIDS(後天性免疫不全症候群)による患者の死亡例は減少を認めた。最近登場してきた新薬は経口吸収性と体内における薬物動態が大幅に改善され、1日1回の服用で有効血中濃度が維持できる様になってきた。このような

新薬をHAARTの中核にすることにより、厳格な服薬による患者側の負担も減りQOLが改善された。今やHIV-1感染症は慢性疾患であると言う楽観的な意見すら聞かれることがある。しかし忘れてはならないのはHIV-1が感染症であることと、現代のHAARTではHIV-1感染症の治療は望めないことである。仮に薬剤により体内におけるHIV-1の増殖を完全に押さえ込んだとしてもHIV-1を体内から完全に排除するためには約60年間の投薬が必要と試算されている。またHIV-1はその活発な増殖と低い逆転写精度(fidelity)のために高頻度で変異を起こす特徴を持ち、抗HIV薬に対しても容易に薬剤耐性を獲得する。また同じ作用機序の薬剤間では交叉耐性が顕著なことから、初回の治療に失敗してしまうと、それに代わる薬剤の選択幅が狭まってしまう。本稿ではHIV-1の薬剤耐性についての最近の知見を登場してきた薬剤を例に挙げながら紹介する。

### 1. 抗HIV薬剤と作用機序

HIV-1の増殖には逆転写酵素(reverse transcriptase: RT), インテグラーゼ(integrase:

Recent progress in anti-HIV drug resistance : Masako Nishizawa, Wataru Sugiura, National Institute of Infectious Diseases

## A SPECIAL EDITION

IN), そしてプロテアーゼ(protease: PR)という3つのウイルス由来の酵素が重要な役割を果たしている。その中でもRTとPRの2つが抗HIV薬開発の主要なターゲットとされてきた。現在使用されている抗HIV薬はRTに対する阻害剤(RT inhibitor: RTI)とプロテアーゼに対する阻害剤(PR inhibitor: PI)の2つに大別される。RTIはその阻害機序に基づき、さらにヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(nucleoside(nucleotide) analogue reverse transcriptase inhibitor: NRTI)と非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(non-nucleoside reverse transcriptase: NNRTI)に分類される。

### 1) ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)

基本構造はヌクレオシド(ヌクレオチド)のホモログ(類似体)で、デオキシリボースの3'のOH基がH基に置換された構造を持つ。日本では現在までにzidovudine(AZT), didanosine(ddI), zalcitabine(ddC), stavudine(d4T), abacavir(ABC), tenofovir(TDF)の計7剤が認可承認され使用されている(図1-1)。経口で摂取されたNRTIは標的細胞内で種々のヌクレオシドリン酸化酵素によって3リン酸化されて(NRTI-TP)活性型となる。NRTI-TPは逆転写酵素の基質としてdNTPの結合部位に取り込まれ、逆転写されたDNAの端に本来のdNTPの代わりに取り込まれる。しかしNRTIは3'のOH基を欠いているために次に結合する3リン酸化ヌクレオシドとの間のリン酸ジエステル結合が形成されず、NRTI-TPが取り込まれた時点でDNA鎖の伸張が止まる。このDNA伸張阻害作用によってNRTIは抗HIV効果を発揮する(図2-1)。2004年に認可されたTDFは他のNRTIsとは異なりすでにリン酸化を受けた構造を持ち、他

のNRTIで律速となるヌクレオシド→ヌクレオチドの段階をスキップし速やかに2リン酸が付与されて効果を発揮する事が出来るnucleotide reverse transcriptase inhibitorである。

### 2)非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)

NRTIとは異なり逆転写酵素のp66サブユニットのポリメラーゼ活性中心部位の近傍のhydrophobic pocketに結合し非拮抗阻害剤として逆転写反応を阻害する。現在nevirapine(NVP), efavirenz(EFV), delavirdine(DLV)の3薬剤が認可承認され使用されている(図1-2)。

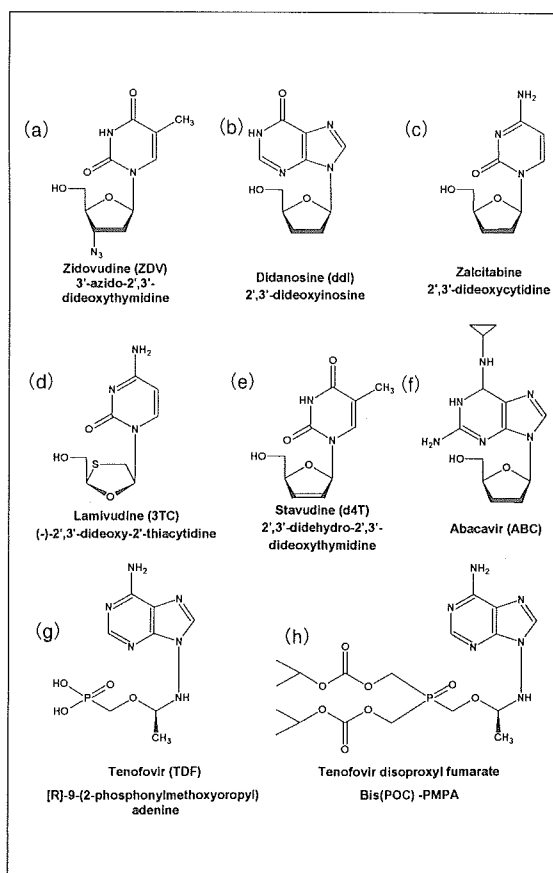


図1-1 ヌクレオシドヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤

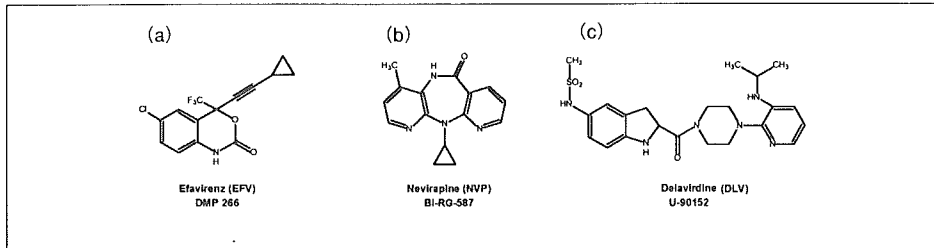


図1-2 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

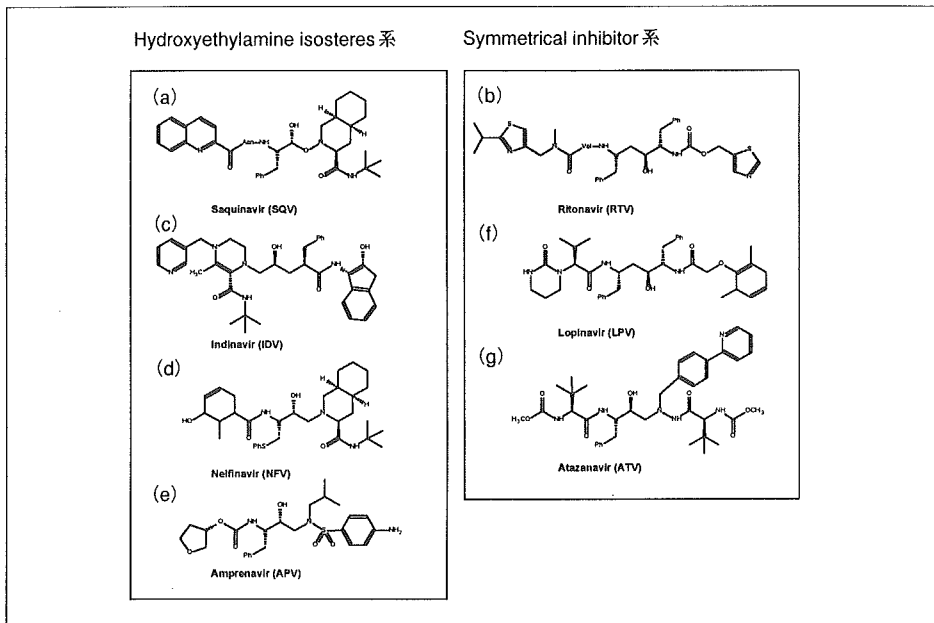


図1-3 プロテアーゼ阻害剤

3) プロテアーゼ阻害剤(PI)

HIV-1のPRはaspartic proteaseであり基質である HIV-1 Gag 前駆体の切断部分に存在する Phenilalanine-Proline 配列, あるいはチロシンプロリン配列を認識し切断する活性を持っている。PIは HIV-1 のPRの切断認識部位が哺乳動物の aspartic protease とは異なっている事を利用して設計されている。このためPIは宿主細胞の aspartic protease を阻害することなく HIV Gag 前駆体の切断を阻害し HIV の成熟・感染性獲得を阻止する。現在 nelfinavir(NFV), saquinavir(SQV), ritonavir(RTV), indinavir(IDV), lopinavir(LPV),

amprenavir(APV), atazanavir(ATV)の7剤が認可使用されている (図1-3)。

2. 抗HIV薬剤に対する耐性変異とその作用機序

1) 核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)

1987年に抗HIV薬として最初に開発された AZTは当初単剤治療で用いられ, 抗HIV-1効果を発揮した。しかしその効果は維持されず, 程なく患者体内には AZT に対して感受性低下したウイルスが出現してしまうことが明らかになった。このような AZT 感受性をなくしたウイルスを解析して見ると, 逆転写酵素領域

## A SPECIAL EDITION

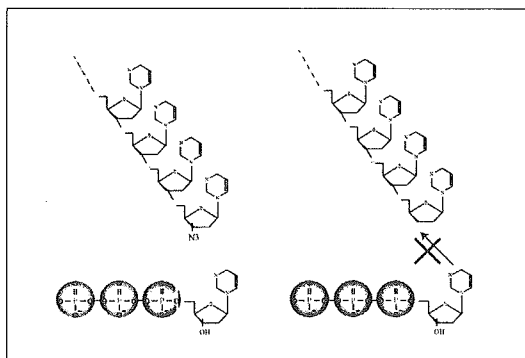


図2-1 NRTIによるDNA伸張阻害の機序  
NRTIはリボースの3位の水酸基がXに置換されているため次のデオキシリボヌクレオシド3リン酸に結合しリン酸ジエステル結合を形成できないためDNAの伸張が阻害される。

に特有の変異が誘導されていることが確認された。AZTとd4Tはどちらも deoxythymidine をベースとして開発された薬剤でAZTに対する耐性変異である M41L, D67N, K70R, I210W, T215YF, K219QEはd4Tに対し交差耐性を示す。この6個の耐性変異を TAM(thymidine-associated mutation)と総称する。TAMは単独では高い耐性度を示さないが、長期に渡る薬剤投与によって変異が集積すると耐性度が増強する事が知られている。その耐性メカニズムはNRTIが取り込まれて伸張反応が停止したDNA鎖からNRTIを切り出す事 (excision) によると考えられている<sup>1) 3)</sup>。NRTIの多剤耐性変異(MDR)変異としては69-insertion<sup>4)</sup>とQ151M complex<sup>5)</sup>が知られている。69-insertionはT69S置換を伴うSS, SG, SA挿入変異でTAMと共存する事によりAZT, d4Tを始めとしたNRTIに対し高度耐性を示す。これはDNA鎖に取り込まれたAZT-MPあるいはNRTI-MPのexcisionを促進する事によって耐性を発揮する。Q151M complexはA65V, V75L, F77L, F116Y, Q151Mの5アミノ酸の置換が関連し、最初にQ151Mが誘導されるとHIVの増殖能(fitness)が損なわれるが、残りの

4アミノ酸変異が次々と蓄積する事によってfitnessの回復が起こりNRTIへの高度耐性を獲得する。M184Vは3TCによって誘導されるがこの変異はexcision活性ではなくNRTIのDNA鎖への取り込みを直接阻害していると考えられている。M184VはTAMとは異なり単独で3TCに対して数百倍の感受性低下を誘導する。M184Vは3TCの他にddC, ddIに対して交叉耐性を示すが興味深い事にT215Yを持つウイルスにM184Vが加わるとAZTに対する感受性が回復する。またT215YにddI耐性に関連するL74Vが加わっても同様の効果が見られる。K65RはTDFに参与する耐性変異として知られるが、in vitroにおける実験とmacaque/SIVmacを用いたin vivo感染実験からM184VとK65Rは排他的変異である事が示されている<sup>6)</sup>。これはM184VがTDFに対する感受性を高める事やM184V/K65Rの共存がウイルスの増殖能力を損なうためと考えられる<sup>7)</sup>。TDFは69-insertion 多剤耐性株に対しては感受性低下を示すが、Q151M complexを持つHIVに対しては感受性が維持される<sup>8) 9)</sup> ことからTDFはNRTI多剤耐性症例にも有効である事が期待される。NRTIの薬剤耐性獲得に関して

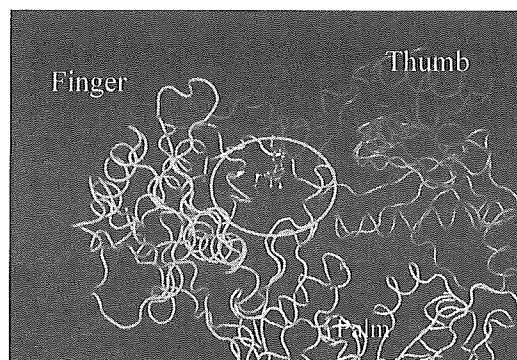


図2-2 逆転写酵素とNNRTIの結合部位  
NNRTIは逆転写酵素の活性中心付近(円内)に結合し逆転写酵素とRNAプライマーとの結合を阻害する。薬剤耐性変異部位は活性中心の近傍に存在する。



表1 抗HIV-1薬剤と誘導される耐性変異のまとめ

codon No.		41	44	62	65	67	69	70	74	75	77	100	103	106	108	115	116	118	151	184	210	215	219						
A.A in wild type		M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	L	K	V	V	Y	F	V	Q	M	L	T	K						
NRTIs	zidovudine(AZT)	L	D			N		R													W	YF	QE						
	didanosine(ddI)				R				V																				
	zalcitabine(ddC)				R		D		V																				
	stavudine(d4T)	L	D			R	N		R												W	YF	QE						
	lamivudine(3TC)				R																								
	abacavir(ABC)				R				V						F														
	Tenofovir(TDF)				R																								
151 complex				V					I	L						Y		M											
69 ins complex		L		V			ins	R													W	YF	QE						
multi-NRTI		L	D			N		R													W	YF	QE						
A.A in wild type		M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	L	K	V	V	Y	F	V	Q	Y	M	Y	G	L	T	K	P	M	P
codon No.		41	44	62	65	67	69	70	74	75	77	100	103	106	108	115	116	118	151	181	184	188	190	210	215	219	225	230	236
A.A in wild type		M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	L	K	V	V	Y	F	V	Q	Y	M	Y	G	L	T	K	P	M	P
NNRTIs	nevirapine(NVP)											I	N	AM	I					CI		QH	A						
	efavirenz(EFV)											I	N	M	I					CI		L	SA				H		
	delavirdine(DLV)											N	M							C		L					L		
	multi-NNRTI											N	M									L							
	multi-NNRTI											I		A						CI		SA					L		
A.A in wild type		M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	L	K	V	V	Y	F	V	Q	Y	M	Y	G	L	T	K	P	M	P
codon No.		41	44	62	65	67	69	70	74	75	77	100	103	106	108	115	116	118	151	181	184	188	190	210	215	219	225	230	236
PIs	saquinavir(SQV)	RV										V				VL		VT	S	I	A	V					M		
	ritonavir(RTV)	FRV	MR			I	F	I	IL							VL		VT		I	47S	V					M		
	indinavir(IDV)	RV	MR	I		I		I	IL							V		VT	SA	I	AFT	V					M		
	nelfinavir(NFV)	FI			N			I	IL									VT		I	47S	V	DS				M		
	amprenavir(APV)	FRV							IL	V		V			LVM			S				V					M		
	Lopinavir/ritonavir	FRV	MR	I		I	F	I	IL	VA		V	L			P	VT	S		47S	V					M			
	Atazanavir(ATV)	IFV	MR	I		I	IF	I		V	L					L		V	47A		A	V	S			M			
	multi-PI	FRV								IL						V4A					47S	VAC					M		
	A.A in wild type		L	K	L	D	V	L	M	M	I	G	I	F	I	L	A	G	V	V	I	N	L						
codon No.		10	20	24	30	32	33	36	46	47	48	50	53	54	63	71	73	77	82	84	88	90							

  一次変異：薬剤投与後最初に出現することが多い変異であり、且つ薬剤感受性に大きく影響を及ぼすもの  
  二次変異：一次変異に続いて出現してくる変異であり、一次変異と組み合わせることにより耐性レベルを上げる（プロテアーゼのみ）

は新たな知見も報告されている。逆転写反応ではHIV RNAテンプレートはDNA合成反応が起こった後逆転写酵素に結合したRNase Hの働きにより分解されるが、このRNase Hに活性を低下させるH539N, D549Nを導入するとAZTやd4Tに対して10倍~100倍以上の耐性が誘導され、TAMと同時に存在する事でその耐性度は1000倍以上に増強される<sup>10)</sup>。また、このRNase Hの変異はddI, ddC, 3TCに対しては耐性を呈さない。このことからRNaseHの

変異はexcision活性と関連すると考えられている。

## 2)非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)

NNRTIの薬剤耐性変異はNRTIとは異なり、NNRTIの結合部位であるポケットと呼ばれる部位近傍に集中して誘導される事が知られ、逆転写酵素の活性部に歪みを起こすことにより酵素活性を失活させると考えられている(図2-2)。耐性機序はRTとNNRTI間の親和性

## A SPECIAL EDITION

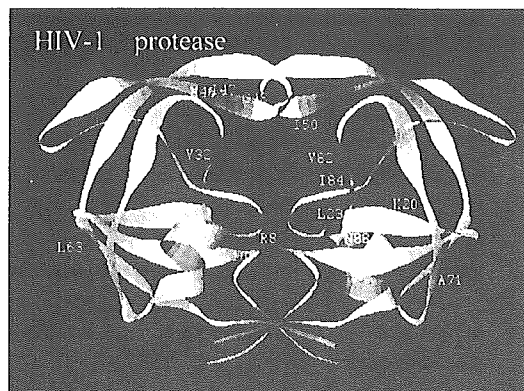


図2-3 プロテアーゼの構造と薬剤耐性変異部位  
PIはプロテアーゼと基質が結合するポケットに結合しプロテアーゼの活性を阻害する。薬剤耐性変異部位（一次変異）は活性中心の近傍に存在する。

の低下であり、1つの変異が耐性に大きく影響を及ぼす。例えば181番目のチロシンがシステインに置換される事でNVPに対して100倍以上の耐性を獲得する。この耐性はDLVやEFVに対しても耐性を発揮する。NNRTIによって誘導される変異には他にL100I, K103N, V106AM, V108I, Y188CI, G190Aが知られ<sup>11)</sup>、いずれも単一の変異で高度耐性を示し、また薬剤間の交叉耐性が顕著であるという特徴がある(図2-2)。

### 3) プロテアーゼ阻害剤(PI)

PIの薬剤耐性変異は一次変異(major mutation)と二次変異(minor mutation)に分類される(表1)一次変異とはPI投与後、比較的早い時期に出現する耐性変異で薬剤毎に特有なものが多い。SQVに対するG48V, IDVに対するM46I/L, NFVに対するD30N, RTVに対するV82A/F/T/S, APVに対するI50Vなどがよく知られている耐性変異である。またNFV, SQVの一次変異であるL90MはD30Nと排他的関係にあることが報告されている<sup>12)</sup>。これらの一次変異はプロテアーゼの活性中心

近傍に位置する事が多く(図2-3)、プロテアーゼの構造を変化させる事でプロテアーゼとPIの結合を回避していると考えられるが、一方でこの構造変化のためプロテアーゼの活性低下を起しウイルスの増殖能力が低下する場合も多い。この一次変異に続いて出現してくるアミノ酸置換を二次変異と称し一次変異とは区別する(表1)。二次変異はそれ自体で大きく耐性度を上昇させる事は無いが一次変異によって低下した増殖能力の回復、あるいはより高度耐性の獲得に働いていると考えられている。LPVはRTVを元に設計され2000年に認可されたPIである。当初P450による代謝を受けるためバイオアベイラビリティが低い事が問題であったが、その後RTVとの併用で効果的な血中濃度を保つ事が可能となった<sup>13)</sup>。LPVはRTVによって誘導される一次変異V82Aを避けるような形で開発した結果、明らかな一次変異は存在せず8個以上の耐性変異が集積して高度耐性を発揮すると思われる<sup>14)</sup>。ATZは2003年に発売された最も新しいPIである。ATVによって誘導される一次変異はI50Lである。興味深いことにI50Lを獲得したHIV-1は他のPIに対して交叉耐性ではなく高感受性を呈すると報告されている<sup>15)</sup>。ATVは1日1回の服薬で十分な効果が得られ副作用が従来のPIと比べ弱い点からも今後抗HIV治療で多く使用されていく事が予想される。

上述した薬剤耐性の情報はIAS-USAガイドラインで発表されるUpdate of the Drug Resistance Mutations in HIV-1で参照する事が可能である。ウェブサイト<http://www.isausa.org/>から直接ダウンロードする事も出来る<sup>11)</sup>。2005年4月に公開されたものが2005年5月現

在最新バージョンとなっている。また抗 HIV 薬と薬剤耐性についての総説が刊行されているので参照されたい<sup>16)</sup>。

### おわりに

現在日本で認可されている抗 HIV 薬は NRTI, NNRTI そして PI の 3 クラスだが, アメリカでは HIV-1 の宿主細胞への侵入を防ぐ融合阻害剤 Enfuvirtide(T-20)が新たなクラスとして登場している。またこれまでの RT や PR 以外の HIV-1 酵素・タンパクを標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発も活発に行われているが, その中でも有望とされるのはインテグラーゼに対する阻害剤であろう。現在各国の製薬会社で開発が行われており, 既存の薬剤に対して多剤耐性に陥り治療困難となった症例の福音として期待されている。しかし HIV は新規抗 HIV 薬剤に対しても新たな耐性変異を獲得してその抗 HIV 効果を掻い潜って行く事は明らかであり, HIV の薬剤耐性獲得のメカニズムの解明は今後も HIV-1 研究の中で重要な鍵になると予測される。

### 参考文献

- 1) Naeger LK, Margot NA, Miller MD.: ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(7): 2179-2184, 2002.
- 2) Meyer PR, Matsuura SE, *et al.*: A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell.* 4(1): 35-43, 1999.
- 3) Arion D, Kaushik N, *et al.*: Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry.* 37(45): 15908-15917, 1998.
- 4) Larder BA, Bloor S, *et al.*: A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(8): 1961-1967, 1999.
- 5) Shirasaka T, Kavlick MF, *et al.*: 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(6): 2398-2402, 1995.
- 6) Murry JP, Higgins J, *et al.*: Reversion of the M184V mutation in simian immunodeficiency virus reverse transcriptase is selected by tenofovir, even in the presence of lamivudine. *J Virol.* 77(2): 1120-1130, 2003.
- 7) Deval J, Alvarez K, *et al.*: Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase using alpha-boranophosphate nucleoside analogs. *J Biol Chem.* 280(5): 3838-3846, 2005. Epub Nov 17, 2004.
- 8) Wolf K, Walter H, *et al.*: Tenofovir resistance and re-sensitization. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(11): 3478-3484, 2003.
- 9) White KL, Chen JM, *et al.*: Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a diserine insertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(3): 992-1003, 2004.
- 10) Nikolenko GN, Palmer S, *et al.*: Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(6): 2093-2098, 2005.
- 11) Johnson VA, Brun-Vezinet F, *et al.*: Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2005. *Top HIV Med.* 13(1): 51-57, 2005.
- 12) Sugiura W, Matsuda Z, *et al.*: Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(3): 708-15, 2002.
- 13) Kempf DJ, Marsh KC, *et al.*: Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(3): 654-660, 1997.
- 14) Masquelier B, Breilh D, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(9): 2926-2932, 2002.
- 15) Colonna R, Rose R, *et al.*: Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naive HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J Infect Dis.* 189(10): 1802-1810.2004. Epub Apr 27, 2004.
- 16) Imamichi T.: Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr Pharm Des.* 10(32): 4039-4053, 2004.

## 特集2 抗ウイルス薬の現状と将来

## 3. 抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開

杉浦 亙

国立感染症研究所エイズ研究センター第二研究グループ

HIV-1 感染症は 1980 年代初頭に男性同性愛者の中で広がり、その後急速に感染が拡大し、今日世界には 4000 万人の感染者がいると推測されている。HIV/AIDS の薬剤治療の歴史は 1985 年の zidovudine の登場に始まる。以降今日まで抗 HIV-1 薬剤開発は積極的に行われており、平成 17 年現在 3 クラス 17 種類の抗 HIV-1 薬剤が認可され使用されている。ここでは抗 HIV-1 薬剤の開発史、治療薬の現状と問題点、そして今後の展望について簡単にまとめてみた。

## はじめに

HIV/AIDS の薬剤治療の歴史は 1985 年の zidovudine の登場に始まる<sup>1)</sup>。以降今日まで抗 HIV-1 薬剤開発は積極的に行われており、平成 17 年現在 3 クラス 17 種類の抗 HIV-1 薬剤が認可され使用されている (図 1)。開発された抗 HIV-1 薬剤の中でも治療戦略の転換ポイントとして重要なのは 1995 年末のプロテアーゼ阻害剤の登場である<sup>2)</sup>。プロテアーゼ阻害剤の登場により、異なる HIV-1 の酵素を標的とした薬剤を組み合わせた多剤併用療法が標準的な治療法として実施されるようになった。複数の抗 HIV 薬剤を組み合わせることにより、感染者体内の HIV-1 増殖を強力に押さえ込むことに成功しただけでなく、個々の薬剤の減量による副作用リスクの軽減と薬剤耐性出現リスクの低下も合わせて実現した。多剤併用療法の治療効果は先進諸国において導入以後 AIDS 死亡者数が著しく低下したことが物語っている<sup>3)</sup>。

多剤併用療法の成功により HIV/AIDS の薬剤治療は一応の完成の域に到達したと言えよう。しかしながら初回治療から脱落する頻度は高く、まだ改善すべき課題が残されている。まず重要なことは薬理動態の改善である。血中薬物半減期の長い薬剤の開発による服薬回数の減少は感染者の

負担を減らし、アドヒアランスと QOL の改善が期待される。そしてアドヒアランスの改善は当然のことながら薬剤耐性 HIV の出現抑制にも効果があると考えられる。次に重要なことは薬剤耐性 HIV-1 獲得症例の救済である。治療脱落の主要な原因に薬剤耐性の獲得があるが、既存の薬剤は同一クラスの薬剤間での交叉耐性が著しいため、薬剤耐性を獲得した後の薬剤の選択肢は大きく狭まってしまう。このような薬剤耐性症例の救済には既存の薬剤の耐性変異と交叉をしない新薬が必要であり、その開発が切望されている。抗 HIV-1 薬剤の現状と今後の展開について薬剤クラス毎にまとめてみた。

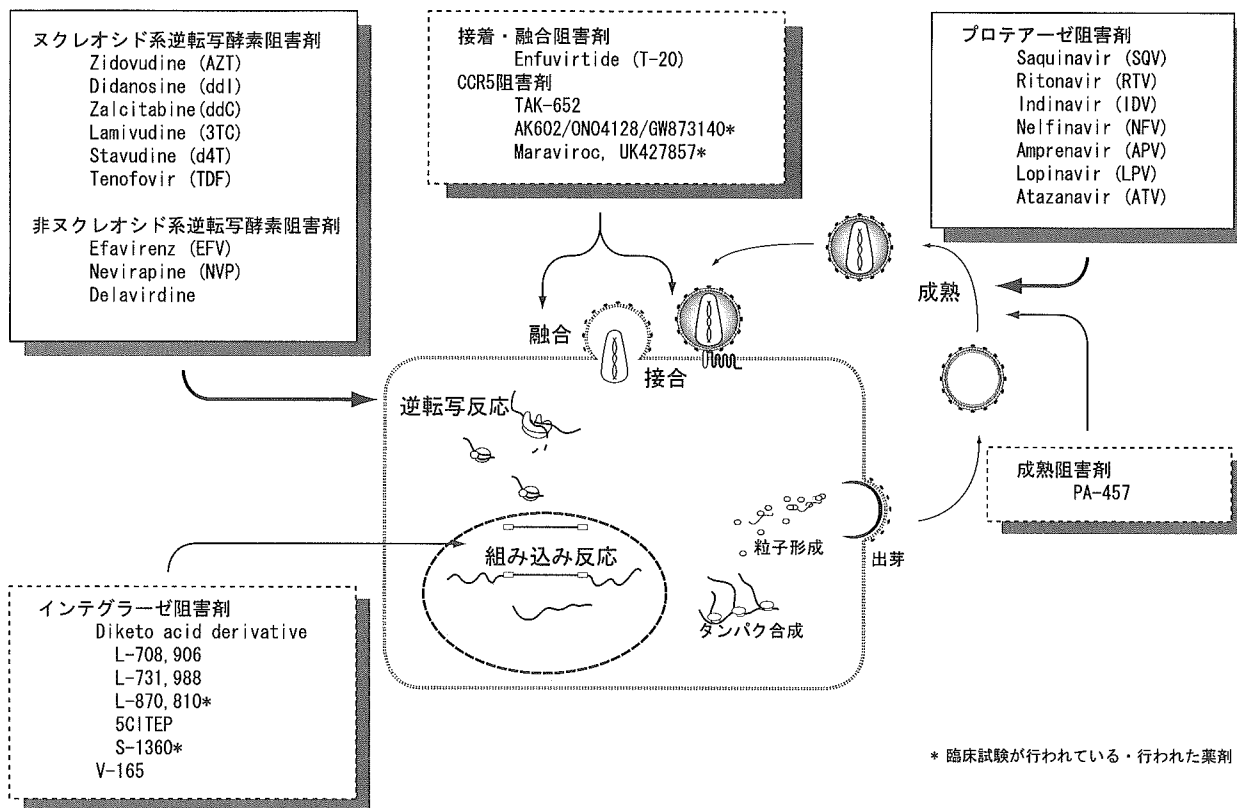
## 抗 HIV 薬剤の現状と新たな展開

## (1) ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (Nucleoside Analogue Reverse transcriptase Inhibitor : NRTI)

最初に実用化された抗 HIV-1 薬剤クラスであり、(a) zidovudine (AZT), (b) didanosine (ddI), (c) zalcitabine (ddC), (d) lamivudine (3TC), (e) stavudine (d4T), (f) abacavir (ABC) そして (g) tenofovir (TDF) の合計で 7 種類の薬剤が認可されている<sup>1, 4-9)</sup>。このクラスの薬剤は nucleoside を模倣したものであり、構造式をみるといづれの化合物も DNA 伸長の際の基質となる 2'-Deoxyribose 3'位の OH 基が欠損している (図 2)。阻害機序は細胞内で 3 リン酸を付与され逆転写の際に本来の 2'-deoxynucleotide-5'-triphosphate の代わりに DNA に取り込まれることによる伸長反応の停止 (chain termination) である。NRTI は多剤併用療法の柱となる重要な位置付けの薬剤であるが、多剤併用療法以前にも単剤もしくは 2 剤療法として用いられてきたために NRTI 耐性を獲得した症例が

## 連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1  
TEL : 042-561-0771  
FAX : 042-561-7746  
E-mail : wsugiura@nih.go.jp



\* 臨床試験が行われている・行われた薬剤

図1 HIV-1の複製サイクルと抗HIV-1薬剤の作用点

実線で囲まれたボックス内の薬剤は既に使用されているもの。破線で囲まれたボックス内の薬剤は現在開発中のものである。

多数認められている。特に AZT 耐性変異を獲得している症例の頻度は多く、このような症例を救済するために交叉耐性の無い新薬開発が求められてきた。その意味において 2004 年に認可された TDF は他の NRTI と一線を画す特徴を持っており、期待される新薬である。TDF は 2'-Deoxyribose が acyclic nucleoside phosphonate (ANP) に置換された構造を持つ (図 2-(g))。ANP 構造を持った抗ウイルス剤の歴史は意外と古く、1980 年代後半にはすでに EB に対する阻害効果が確認されている<sup>10)</sup>。その後この構造を持つ類縁化合物が多くの Herpes virus および retrovirus に対しても効果を示すことが明らかにされた<sup>11)</sup>。特に [R]-9-[2-phosphonylmethoxypropyl]adenine (PMPA) は retrovirus と hepadnavirus に作用する化合物として見出された<sup>9, 12)</sup>。PMPA は SIV を用いた in vitro 実験で優れた阻害効果を実証したが<sup>13, 14)</sup>、これは薬剤を注射により投与した場合の結果であり、PMPA は低い経口吸収性のために実用化されるまでに時間が費やされた。その後、経口吸収性を大幅に改善したプロドラッグ bis(isopropylloxycarbonyloxymethyl)-PMPA (bis[POC]-PMPA) が完成し、7 番目の NRTI として登場してきた (図 2-(h))<sup>15-17)</sup>。TDF には他の NRTI と異なる次のような特徴を持っている。① nucleotidase あるいは esterase 等により分解されなくなり、生体内において長

時間安定した血中濃度を維持することが可能となった<sup>18)</sup>。②他の NRTI と異なる機序で細胞内に取り込まれる。Dipyridamole で細胞内取り込みが阻害されないことから、TDF は nucleoside carrier pathway とは異なる別のルートで細胞内に取り込まれると推測される<sup>19, 20)</sup>。③すでにリン酸が 1 つ付与された構造をしており (TDF は正確には nucleotide analogue である)、他の NRTI では薬理効果発現の律速となっている最初のリン酸化反応をスキップして 2 リン酸の付与だけで阻害活性を呈することが出来る。④さらにいったん取り込まれた TDF は AZT 耐性変異の機序として知られている excision の標的となりにくいことが明らかにされている。これは TDF が AZT 耐性とは交叉しにくいことを意味している<sup>17, 21)</sup>。⑤さらに好都合なことに TDF で誘導される耐性変異 K65R は AZT 耐性変異 T215Y と基本的に排他的な関係にあることが報告されている<sup>22)</sup>。このことから TDF は first line の薬剤としてだけでなく、AZT 耐性獲得症例のサルヴェージ療法の切り札としても期待されている。

(2) 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor : NNRTI)

NNRTI もその名が示すとおり逆転写酵素を阻害する薬

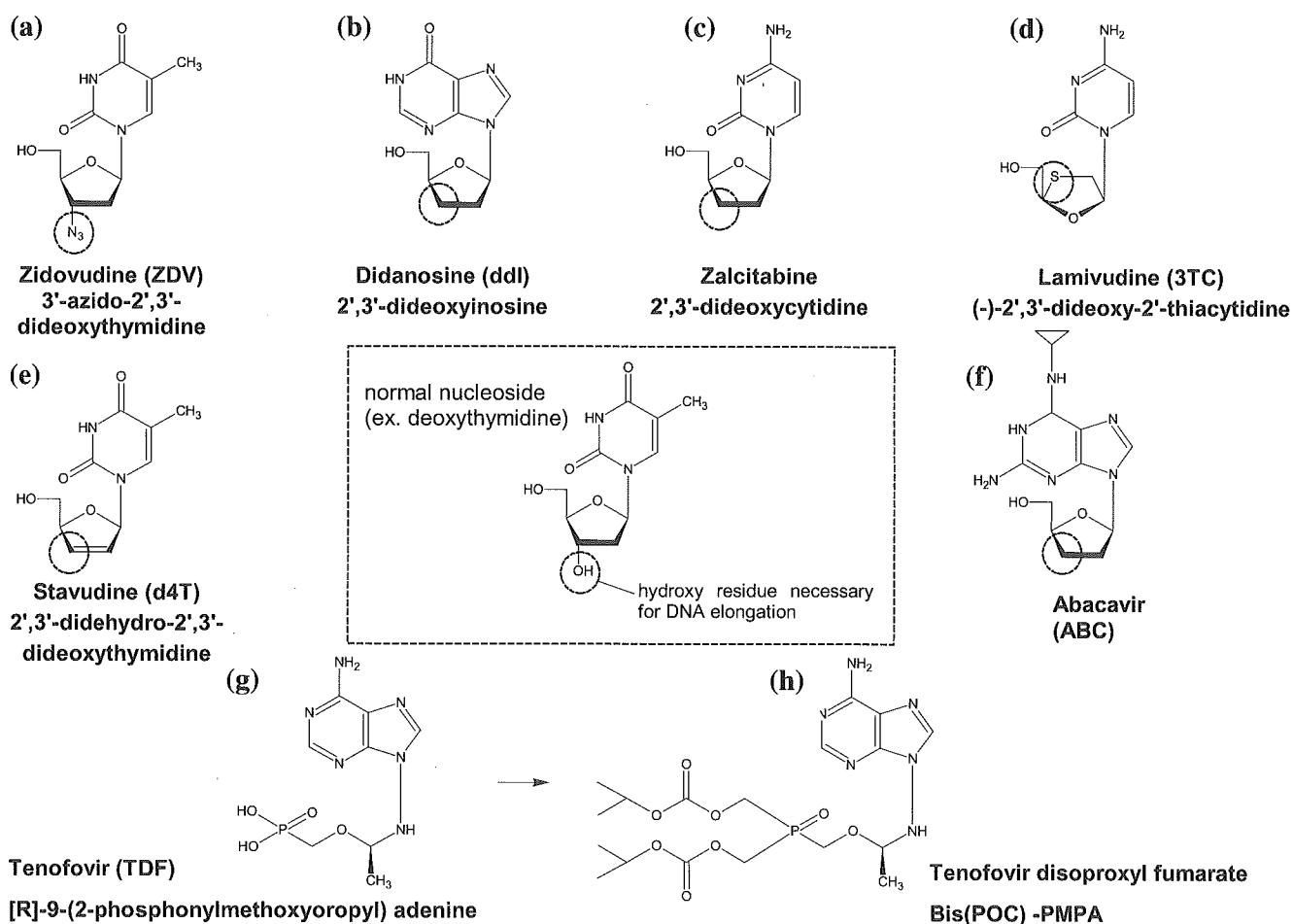


図2 ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

剤である。現在 (a) nevirapine (NVP), (b) efavirenz (EFV), (c) delavirdine (DLV) の3薬剤が認可され使用されているが、わが国では efavirenz が群を抜いて多く使用されている<sup>23-25)</sup>。NNRTIの構造をみると先に記載したNRTIとは全く異なる構造をしており(図3)、逆転写酵素の阻害機序も大きく異なっている。NNRTIは逆転写酵素の活性中心部近傍に結合し、酵素活性中心である Asp110, Asp183と Asp185の位置をずらし、ひずみを作り出すことにより逆転写活性を失活させてしまう<sup>26)</sup>。現在使用されている薬剤の化合物は構造式ではかなり異なっているが、結合した状態では類似しており、蝶がはねを広げたような形にたとえられている<sup>27)</sup>。結合した形状が類似していることは、既存の3薬剤間の交叉耐性が著しいことを意味している。この3つのNNRTIはその結合形式から大きく次の二つのタイプに分けることが出来る<sup>28)</sup>。① tight-binding inhibitor: 薬剤がRTに結合すると外れない薬剤であり、efavirenzがこの対応に該当する。Tight-binding inhibitorは、HIVの感染予防に用いる殺菌剤としての使用することが検討されている<sup>29)</sup>。② rapid-equilibrium inhibitor: 薬剤

は可逆的にRTに結合しており、RTと薬剤が結合している側に極端に平衡が偏っているために抗HIV-1効果を呈するが、殺菌剤としては作用しない薬剤である。nevirapineとdelavirdineがこのタイプになる。

NNRTIも積極的な新薬開発が行われているが、既存薬との交叉耐性を回避することが大きな課題である。NNRTIは単剤で使用した場合、容易に高度耐性を獲得するために、使用され始めた当初は寿命の短い薬剤と予想されていたが、実際に使用されるようになると、長い血中半減期と大変優れた治療効果を発揮し、プロテアーゼ阻害剤に代わりうる多剤併用療法の要となっている。

### (3) プロテアーゼ阻害剤 (Protease Inhibitor: PI)

プロテアーゼ阻害剤は1995年末に登場してから今日までに (a) saquinavir (SQV), (b) ritonavir (RTV), (c) indinavir (IDV), (d) nelfinavir (NFV), (e) amprenavir (APV), (f) lopinavir (LPV) そして (g) atazanavir (ATV) の7種類が認可され使用されている<sup>2, 30-34)</sup>(図4)。最初に登場した3つのプロテアーゼ阻害剤 SQV, RTV,

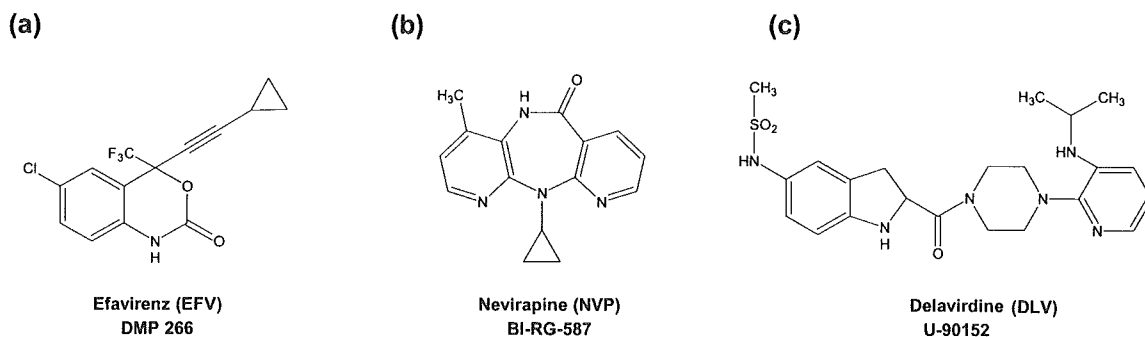


図3 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

## Hydroxyethylamine isosteres 系

## Symmetrical inhibitor 系

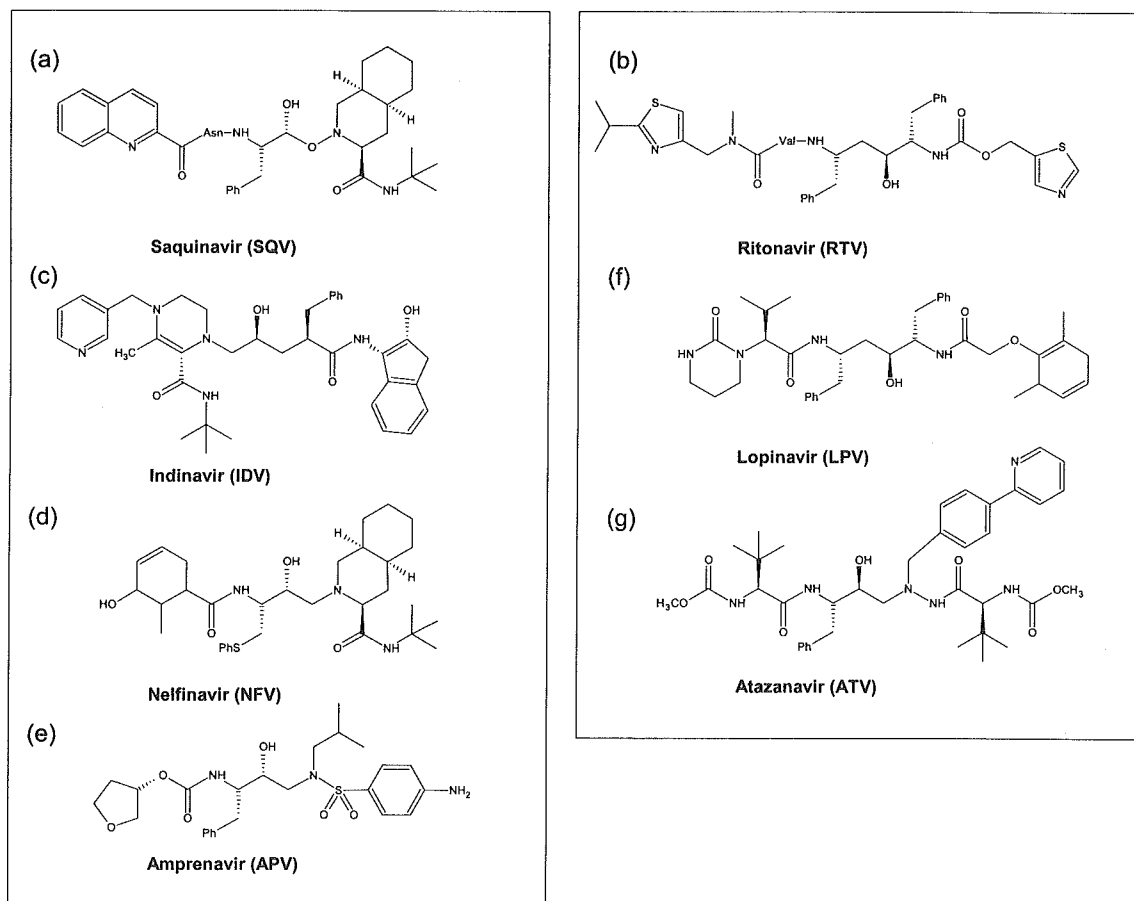


図4 プロテアーゼ阻害剤

IDVはそれぞれ異なる開発戦略から生み出された<sup>35)</sup>。SQVはphenylalanine-prolineを模倣したhydroxyethylamine isosteres構造を持つ薬剤である。これはGag p17-p24, Pol p6\*-protease, proase-RT間の切断部に見るTyrosine/Phenylalanine-Proline配列がHIV-1プロテアーゼに特異的で、哺乳類のアスパラギン酸プロテアーゼでは認識・切

断できないことを応用したものである<sup>2)</sup>。これに対してIDV阻害剤開発の基盤となったのは、同じアスパラギン酸プロテアーゼであるレニンに対する薬剤開発戦略である。レニン阻害剤開発では本来の基質を模倣した化合物を阻害剤の候補としたが、HIV-1プロテアーゼにおいても同様に本来の基質であるGagタンパクの切断配列を模倣した化合物が

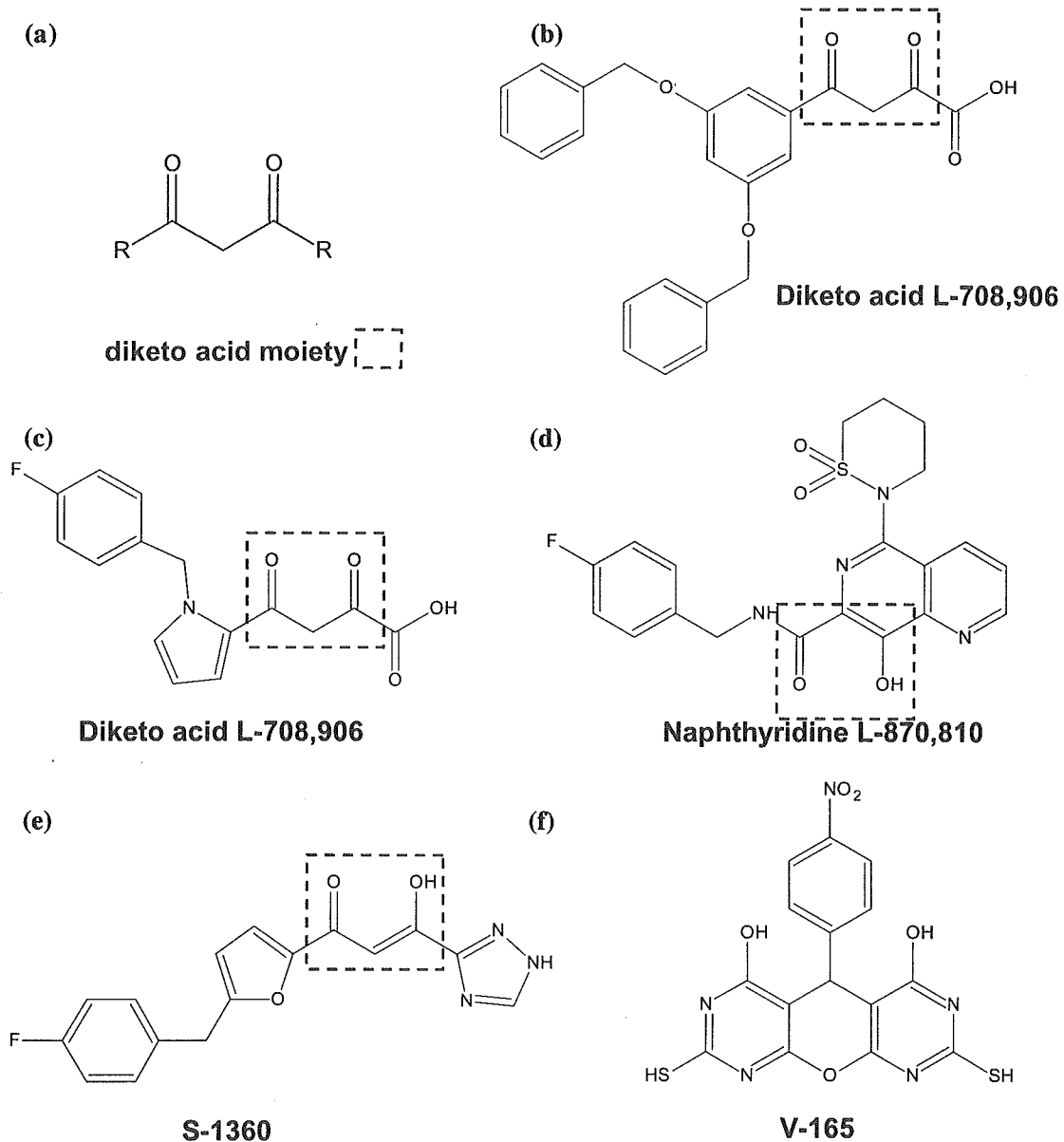


図5 現在までに報告されているインテグラーゼ阻害剤候補

取り上げられた。その結果 hydroxyethylamine isosteres 構造を持つ化合物 IDV が生み出された<sup>36)</sup>。このように 1995 年末から 1996 年にかけて登場したプロテアーゼ阻害剤のうち SQV と IDV の 2 化合物は開発戦略が異なっていたにもかかわらず、いずれも hydroxyethylamine isosteres 構造をもつ化合物にたどり着いたことは興味深いことである。これに対して RTV は結晶構造解析から得られたプロテアーゼ活性中心部の構造を元に設計された薬剤である。プロテアーゼの基質を結合する S1-S1' が活性中心に対して対称構造をとっていることから、切断部を境に P1-P1' に相当する部位が対称になるように薬剤の設計が行われた<sup>37)</sup>。これ以降のプロテアーゼ阻害剤は大まかに SQV・IDV の hydroxyethylamine isosteres 系と RTV の symmetrical

inhibitor 系の二つに分類することができる。初期の 3 剤の登場以降、新たなプロテアーゼ阻害剤の開発には①高い経口吸収性、②長い血中半減期、③低いタンパク結合率、そして④交叉耐性のない薬剤耐性プロファイルが求められるようになった。1997 年に登場した NFV は SQV と C 末側半分は全く同じ構造をもつ薬剤である。SQV との違いは N 末側の構造を小さくしたことであり、これにより経口吸収性の改善に成功した。また他のプロテアーゼ阻害剤とは異なる NFV に特有の耐性変異 D30N と N88D を誘導することとなった<sup>38)</sup>。APV もまた hydroxyethylamine isostere を基本構造を持つ hydroxyethylamine isosteres 系列の薬剤である。1999 年に認可された時点では経口吸収性に問題があり、あまり使用されなかったが、2004 年になり経口吸収



性を改善させた pro-drug の fosamprenavir が認可された。Fosamprenavir は腸管上皮において alkaline phosphatase により APV に変換されて吸収される<sup>39)</sup>。LPV は RTV が元になって作り出された薬剤である。開発に当たっては RTV の耐性変異である 82 番の変異誘導を回避する様に設計された。その結果 LPV は特異的な耐性変異を誘導せず、耐性変異の集積数が耐性度を左右するユニークな薬剤耐性プロファイルを持っている<sup>40)</sup>。最近登場してきたのが ATV であり、この薬剤も RTV、LPV 同様に P1-PI' の対称性を念頭に開発された薬剤である。ATV は大変優れた経口吸収性を示し、血中の薬剤半減期も長いことから一日一回の服用が可能な薬剤である。また薬剤耐性 HIV-1 のプロファイルも既存の PI とは異なり、初回治療に失敗した症例では I50L が 100% の確立で認められた。I50L は ATV に特徴的な変異であり、他の PI に対しては殆ど影響しないことが知られている。また 1~2 剤の PI に対して耐性を獲得したウイルスであれば十分 ATV の効果が期待される<sup>41,42)</sup>。

#### 今後登場が見込まれる新しい薬剤

現在使用されている薬剤の標的である逆転写酵素とプロテアーゼ以外のウイルスタンパクあるいは宿主のレセプターを標的にした新薬開発も活発に行われている。図 1 に示したように HIV-1 複製過程の全てのステップが新薬開発の標的となりうる。その中でも実用化に近い下記薬剤について簡単に記す。

##### (1) 融合阻害剤

HIV-1 envelope の gp41 を標的にした T-20 (enfuvirtide) が米国では認可されている<sup>43,44)</sup>。この薬剤は gp41 の leucine zipper like domain である heptad repeat 2 (HR2) の C 末 36 アミノ酸配列と相同のペプチドであり、HR2 の相方である HR1 に結合することによりウイルス粒子と宿主細胞の融合を阻害する。わが国ではまだ認可されていない薬剤である。T-20 はペプチドのため大量生産に適さないこと、高価であること、そして現段階では注射薬であることがその普及を妨げている。

##### (2) インテグラーゼ阻害剤 (図 5)

インテグラーゼは逆転写酵素、プロテアーゼと共に HIV-1 の増幅・複製に必須の酵素であり、新薬開発の有望な標的とされ活発な開発が行われてきた。数多くのスクリーニングが行われた中で最初に HIV-1 インテグラーゼに特異的な化合物として報告されたのが diketo acid 構造をもつ化合物である (図 5(a))。Diketo acid は組み換え酵素活性に必須の  $Mg^{2+}$  のキレートとして働くことにより酵素活性を失活させると考えられている<sup>45)</sup>。2000 年に報告された L-708,906 と L-731,988 の二つは強い抗 HIV-1 効果を呈したが臨床試験にまでには至らなかった (図 5-(b)(c))<sup>46)</sup>。その後、diketo 構造を持つ S-1360 が登場し、このクラスでは初めて臨床試験にまで駒を進めたが、その後実用化には至っ

ていない (図 5-(e))<sup>47)</sup>。S-1360 の後、L-870,810 が臨床試験に入っている (図 5(d))<sup>48)</sup>。Diketo acid とは異なるタイプのインテグラーゼ阻害剤としては pyrano dipyrimidine (V-165) が報告されている (図 5(f))<sup>49)</sup>。ここ 1-2 年、臨床試験まで到達するインテグラーゼ阻害剤候補化合物が増えている。このことは薬剤開発とともにインテグラーゼの構造および機能への理解が深まり、化合物の開発が新たな段階に入りつつあることを反映しているのであろう。近い将来インテグラーゼ阻害剤が登場してくることが大いに期待される状況である。

##### (3) ケモカインレセプター阻害剤 (CXCR4 阻害剤, CCR5 阻害剤)

HIV-1 のタンパクあるいは酵素ではなく、宿主細胞のケモカインレセプターを標的にした薬剤である。CXCR4 あるいは CCR5 を標的にしたものが開発されている。現在開発中の CCR5 阻害剤には TAK-652, AK602/ONO4128/GW873140 などがある。CCR5 阻害剤は現在開発が行われている様々な新薬候補の中で、最も実用化に近い薬剤である<sup>50,51)</sup>。

##### (4) 成熟阻害剤

2003 年に PA-457 という HIV-1 阻害活性を呈する薬剤が報告された。その阻害機序は今まで開発が行われてきたいずれのクラスにも当てはまらない新しいものである。電子顕微鏡による解析、薬剤耐性変異の出現箇所から Gag の CA-p1 の基質領域に結合し、プロテアーゼによる加水分解を阻害すると考えられている。現在 Phase I/II 臨床試験が行われている<sup>52)</sup>。

## 結 語

先進諸国における多剤併用療法の成功は HIV 感染症に“慢性感染症”という地位を与えることとなった。しかし HIV/AIDS が増加を続けている発展途上国では治療薬剤へのアクセスがないために、いまま死に至る感染症である。世界保健機構が推し進めてきた 3 by 5 戦略の成果として発展途上国にも抗 HIV-1 薬剤が普及しつつあるが、まだまだ先進国並みには至っていない。ここで述べてきたように抗 HIV-1 薬剤は確実に進歩をしている。より強力な、より簡単な、より安全な、そしてより安価な治療を目指し薬剤開発は続けられているが、その恩恵を先進諸国だけではなく発展途上国の感染者とも分かち合いたいものである。

## 文 献

- 1) Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in

- vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7096-100, 1985.
- 2) Roberts, N. A., J. A. Martin, D. Kinchington, A. V. Broadhurst, J. C. Craig, I. B. Duncan, S. A. Galpin, B. K. Handa, J. Kay, A. Krohn, R. W. Lambert, J. H. Merrett, J. S. Mills, K. E. B. Parkes, S. Redshaw, A. J. Ritchie, D. L. Taylor, G. J. Thomas, and P. J. Machin. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 248: 358-61, 1990.
  - 3) CDC. 1999. HIV/AIDS Surveillance Report.
  - 4) Mitsuya, H., and B. Samuel. Inhibition of the in vivo infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus(HTLV-III/LAV) by 2', 3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1911-1915, 1986.
  - 5) Baba, M., R. Pauwels, P. Herdewijn, E. De Clercq, J. Desmyter, and M. Vandeputte. Both 2', 3'-dideoxythymidine and its 2', 3'-unsaturated derivative (2', 3'-dideoxythymidinene) are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 128-34., 1987.
  - 6) Soudeyns, H., X. I. Yao, Q. Gao, B. Belleau, J. L. Kraus, N. Nguyen-Ba, B. Spira, and M. A. Wainberg. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and in vitro toxicity of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleoside analog. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1386-90, 1991.
  - 7) Daluge, S. M., S. S. Good, M. B. Faletto, W. H. Miller, M. H. St Clair, L. R. Boone, M. Tisdale, N. R. Parry, J. E. Reardon, R. E. Dornsife, D. R. Averett, and T. A. Krenitsky. 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1082-93., 1997.
  - 8) Balzarini, J., L. Naesens, P. Herdewijn, I. Rosenberg, A. Holy, R. Pauwels, M. Baba, D. G. Johns, and E. De Clercq. Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 332-6, 1989.
  - 9) Balzarini, J., A. Holy, J. Jindrich, L. Naesens, R. Snoeck, D. Schols, and E. De Clercq. Differential anti-herpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates : potent and selective in vitro and in vivo antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2, 6-diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 332-8, 1993.
  - 10) Lin, J. C., E. DeClercq, J. S. Pagano, Y. M. Mul, R. T. van Miltenburg, E. De Clercq, P. C. van der Vliet, M. S. Smith, and E. L. Brian. Novel acyclic adenosine analogs inhibit Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1431-3, 1987.
  - 11) Clercq, E. D. Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 1: 21-42, 2003.
  - 12) Smee, D. F., R. W. Sidwell, D. Kefauver, M. Bray, and J. W. Huggins. Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1329-35, 2002.
  - 13) Van Rompay, K. K., J. M. Cherrington, M. L. Marthas, P. D. Lamy, P. J. Dailey, D. R. Canfield, R. P. Tarara, N. Bischofberger, N. C. Pedersen, and N. L. Aguirre. 9-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) therapy prolongs survival of infant macaques inoculated with simian immunodeficiency virus with reduced susceptibility to PMPA. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 802-12, 1999.
  - 14) Van Rompay, K. K., J. M. Cherrington, M. L. Marthas, C. J. Berardi, A. S. Mulato, A. Spinner, R. P. Tarara, D. R. Canfield, S. Telm, N. Bischofberger, N. C. Pedersen, R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y. F. Gong, A. Fridland, J. Balzarini, A. Holy, J. Jindrich, L. Naesens, R. Snoeck, D. Schols, and E. De Clercq. 9-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine therapy of established simian immunodeficiency virus infection in infant rhesus macaques. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2586-91., 1996.
  - 15) Robbins, B. L., R. V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, and A. Fridland. Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 612-7, 1998.
  - 16) Naesens, L., N. Bischofberger, P. Augustijns, P. Annaert, G. Van den Mooter, M. N. Arimilli, C. U. Kim, and E. De Clercq. Antiretroviral efficacy and pharmacokinetics of oral bis(isopropylloxycarbonyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1568-73, 1998.
  - 17) Srinivas, R. V., and A. Fridland. Antiviral activities of 9-R-2-phosphonomethoxypropyl adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against various drug-resistant human immunodeficiency virus strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1484-7, 1998.
  - 18) Balzarini, J., and E. De Clercq. Nucleoside and Nucleotid Reverse Transcriptase Inhibitors. In E. De Clercq (ed.), *Antiretroviral therapy*. ASM press, Washington DC. 2001.
  - 19) Palu, G., S. Stefanelli, M. Rassa, C. Parolin, J. Balzarini, and E. De Clercq. Cellular uptake of phosphonylmethoxyalkylpurine derivatives. *Antiviral Res* 16: 115-9, 1991.
  - 20) Balzarini, J., Z. Hao, P. Herdewijn, D. G. Johns, and E. De Clercq. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1499-503, 1991.
  - 21) Naeger, L. K., N. A. Margot, and M. D. Miller. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2179-84, 2002.

- 22) Parikh, U., D. Barnas, C. Bixby, H. Faruki, and J. W. Mellors. Presented at the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston MA. 2005.
- 23) Merluzzi, V. J., K. D. Hargrave, M. Labadia, K. Grozinger, M. Skoog, J. C. Wu, C. K. Shih, K. Eckner, S. Hattox, J. Adams, and et al. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* 250: 1411-3., 1990.
- 24) Dueweke, T. J., S. M. Poppe, D. L. Romero, S. M. Swaney, A. G. So, K. M. Downey, I. W. Althaus, F. Reusser, M. Busso, L. Resnick, and et al. U-90152, a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1127-31., 1993.
- 25) Young, S. D., S. F. Britcher, L. O. Tran, L. S. Payne, W. C. Lumma, T. A. Lyle, J. R. Huff, P. S. Anderson, D. B. Olsen, S. S. Carroll, and et al. L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2602-5., 1995.
- 26) Esnouf, R., J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, and D. Stuart. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 2: 303-8, 1995.
- 27) Ding, J., K. Das, H. Moereels, L. Koymans, K. Andries, P. A. Janssen, S. H. Hughes, and E. Arnold. Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 2: 407-15, 1995.
- 28) Motakis, D., and M. A. Parniak. A tight-binding mode of inhibition is essential for anti-human immunodeficiency virus type 1 virucidal activity of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1851-6, 2002.
- 29) Van Herreweghe, Y., J. Michiels, J. Van Roey, K. Franssen, L. Kestens, J. Balzarini, P. Lewi, G. Vanham, and P. Janssen. In vitro evaluation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors UC-781 and TMC120-R147681 as human immunodeficiency virus microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 337-9, 2004.
- 30) Kempf, D. J., K. C. Marsh, J. F. Denissen, E. McDonald, S. Vasavanonda, C. A. Flentge, B. E. Green, L. Fino, C. H. Park, X. P. Kong, and et al. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2484-8, 1995.
- 31) Dorsey, B. D., R. B. Levin, S. L. McDaniel, J. P. Vacca, J. P. Guare, P. L. Darke, J. A. Zugay, E. A. Emini, W. A. Schleif, J. C. Quintero, and et al. L-735, 524 : the design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J Med Chem* 37: 3443-51, 1994.
- 32) Kaldor, S. W., V. J. Kalish, J. F. n. Davies, B. V. Shetty, J. E. Fritz, K. Appelt, J. A. Burgess, K. M. Campanale, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, B. A. Dressman, S. D. Hatch, D. A. Khalil, M. B. Kosa, P. P. Lubbehusen, M. A. Muesing, A. K. Patick, S. H. Reich, K. S. Su, and J. H. Tatlock. Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343) : a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J Med Chem* 40: 3979-85, 1997.
- 33) Sham, H. L., D. J. Kempf, A. Molla, K. C. Marsh, G. N. Kumar, C. M. Chen, W. Kati, K. Stewart, R. Lal, A. Hsu, D. Betebenner, M. Korneyeva, S. Vasavanonda, E. McDonald, A. Saldivar, N. Wideburg, X. Chen, P. Niu, C. Park, V. Jayanti, B. Grabowski, G. R. Granne-man, E. Sun, A. J. Japour, D. W. Norbeck, and et al. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3218-24., 1998.
- 34) Robinson, B. S., K. A. Riccardi, Y. F. Gong, Q. Guo, D. A. Stock, W. S. Blair, B. J. Terry, C. A. Deminie, F. Djang, R. J. Colonno, and P. F. Lin. BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2093-9, 2000.
- 35) Redshaw, S., and G. J. Thomas. Inhibitor of protease, p. 151-180. In R. Unger, J. Kreuter, and H. Rubsamens-Waigmann (ed.), *Antivirals Against AIDS*. Marcel Dekker, Inc., NY. 2000.
- 36) Tomasselli, A. G., J. O. Hui, T. K. Sawyer, D. J. Staples, C. Bannow, I. M. Reardon, W. J. Howe, D. L. DeCamp, C. S. Craik, and R. L. Heinrikson. Specificity and inhibition of proteases from human immunodeficiency viruses 1 and 2. *J Biol Chem* 265: 14675-83, 1990.
- 37) Kempf, D. J. Protease Inhibitor as anti-human immunodeficiency virus agents. In E. De Clercq (ed.), *Antiretroviral Therapy*. ASM press, Washington DC. 2001.
- 38) Patick, A. K., M. Duran, Y. Cao, D. Shugarts, M. R. Keller, E. Mazabel, M. Knowles, S. Chapman, D. R. Kuritzkes, and M. Markowitz. Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir [In Process Citation]. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2637-44, 1998.
- 39) Furfine, E. S., C. T. Baker, M. R. Hale, D. J. Reynolds, J. A. Salisbury, A. D. Searle, S. D. Studenberg, D. Todd, R. D. Tung, A. Spaltenstein, R. Wood, K. Arasteh, H. J. Stellbrink, E. Teofilo, F. Raffi, R. B. Pollard, J. Eron, J. Yeo, J. Millard, M. B. Wire, and O. J. Naderer. Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 791-8, 2004.
- 40) Kempf, D. J., J. D. Isaacson, M. S. King, S. C. Brun, Y. Xu, K. Real, B. M. Bernstein, A. J. Japour, E. Sun, and R. A. Rode. Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* 75: 7462-9, 2001.
- 41) Colonno, R. J., A. Thiry, K. Limoli, and N. Parkin. Activities of atazanavir (BMS-232632) against a large panel of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates resistant to one or more approved protease

- inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1324-33, 2003.
- 42) Colonna, R., R. Rose, C. McLaren, A. Thiry, N. Parkin, and J. Friborg. Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naive HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J Infect Dis* 189: 1802-10, 2004.
- 43) Lambert, D. M., S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, R. Medinas, D. E. Davis, T. Bucy, J. Erickson, G. Merutka, and S. R. Petteway, Jr. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2186-91, 1996.
- 44) Cervia, J. S., and M. A. Smith. Enfuvirtide (T-20) : a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis* 37: 1102-6, 2003.
- 45) Grobler, J. A., K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca, and D. J. Hazuda. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase : implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6661-6, 2002.
- 46) Hazuda, D. J., P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J. A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau, and M. D. Miller. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287: 646-50, 2000.
- 47) Yoshinaga, T., A. Sato, T. Fujishita, and T. Fujiwara. Presented at the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle WA. 2002.
- 48) Hazuda, D. J., N. J. Anthony, R. P. Gomez, S. M. Jolly, J. S. Wai, L. Zhuang, T. E. Fisher, M. Embrey, J. P. Guare, Jr., M. S. Egbertson, J. P. Vacca, J. R. Huff, P. J. Felock, M. V. Witmer, K. A. Stillmock, R. Danovich, J. Grobler, M. D. Miller, A. S. Espeseth, L. Jin, I. W. Chen, J. H. Lin, K. Kassahun, J. D. Ellis, B. K. Wong, W. Xu, P. G. Pearson, W. A. Schleif, R. Cortese, E. Emini, V. Summa, M. K. Holloway, and S. D. Young. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11233-8, 2004.
- 49) Pannecouque, C., W. Pluymers, B. Van Maele, V. Tetz, P. Cherepanov, E. De Clercq, M. Witvrouw, and Z. Debyser. New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr Biol* 12: 1169-77, 2002.
- 50) Baba, M., N. Kanzaki, H. Miyake, X. Wang, K. Takashima, K. Teshima, M. Shiraishi, and Y. Iizawa. Presented at the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2005.
- 51) Maeda, K., H. Nakata, Y. Koh, T. Miyakawa, H. Ogata, Y. Takaoka, S. Shibayama, K. Sagawa, D. Fukushima, J. Moravek, Y. Koyanagi, and H. Mitsuya. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J Virol* 78: 8654-62, 2004.
- 52) Li, F., R. Goila-Gaur, K. Salzwedel, N. R. Kilgore, M. Reddick, C. Matallana, A. Castillo, D. Zoumplis, D. E. Martin, J. M. Orenstein, G. P. Allaway, E. O. Freed, and C. T. Wild. PA-457 : a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13555-60, 2003.