

FIG. 2. GRL-216 and GRL-286 potentially block the dimerization of HIV-1 protease. To examine whether GRL-216 and GRL-286 inhibited HIV-1 protease dimerization, the FRET-based HIV-1 expression system was employed (23). COS7 cells were transfected with pHIV-PR_{WT}^{CFP} and pHIV-PR_{WT}^{NFP} and exposed to various concentrations of either of the drugs, and the CFP^{A/B} ratios (y axis) were determined at the end of a 72-h culture. All average CFP^{A/B} ratios were less than 1.0 in the presence of >0.1 μM GRL-216 and GRL-286, indicating that both compounds effectively blocked HIV-1 protease dimerization.

several passages with GRL-216 selection. It was found that by passage 10, the virus had acquired the E107D substitution. By passage 25 and beyond, V35I, R275K, and the p1/p6 cleavage site substitution L449F had emerged. By passage 50, V390D emerged and persisted (data not shown).

We also determined the amino acid sequences of the *gag* regions of each of the selected HIV variants by direct base sequencing. Two amino acid substitutions were seen in common: the V35I substitution was identified in GRL-216-, GRL-246-, and GRL-286-selected variants (by 25, 10, and 20 passages, respectively); and the L449F substitution, reported by

Doyon et al. (7), was identified in GRL-216- and GRL-286-selected variants (by 25 and 20 passages, respectively). Other than these two amino acid substitutions, only sporadic substitutions were identified in the *gag* region of the four variants (data not shown).

Susceptibilities of mcPI-selected HIV-1 variants to various PIs. We finally examined the susceptibilities of the four PI-selected HIV-1 variants to six FDA-approved PIs along with the four mcPIs using MT-4 cells (24) as target cells (Table 4), as described previously. HIV_{216-P50} was substantially resistant to GRL-216, with a 24-fold-greater EC₅₀ (0.094 μM) than the EC₅₀ of GRL-216 against HIV-1_{NL4.3}. HIV_{216-P50} was more resistant to the other three mcPIs examined, with the fold differences in EC₅₀s against HIV selected with GRL-246 at 1 μM (HIV₂₄₆₋₁ μM), HIV₂₈₆₋₁ μM, and HIV₃₉₆₋₁ μM being 75, >250, and 18, respectively. However, HIV_{216-P50} was still susceptible to DRV, with the difference in the EC₅₀ for HIV_{216-P50} relative to that for HIV-1_{NL4.3} being 3-fold. Interestingly, all four PI-selected HIV-1 variants, including HIV_{216-P50} were, paradoxically, more susceptible to TPV by factors of 3.3 to 10 relative to the susceptibility of HIV-1_{NL4.3} to TPV (Table 4), suggesting that the combination of GRL-216 (and the other three PIs as well) and TPV could exert complementarily augmented activity against mcPI-resistant HIV-1 variants. It is not clear at this time how the increased sensitivity to TPV was brought about in those variants. The replication fitness of the GRL-286-resistant variant was examined, and the variant was found to be almost as replication competent as wild-type isolate HIV-1_{NL4.3} (Fig. 5), suggesting that the possibly compromised replication fitness of the GRL-286-resistant variant was well compensated for by other amino acid substitutions.

Substitutions V82I and I84V prevent GRL-216 from blocking protease dimerization and play a role in HIV-1 resistance to GRL-216. Our observation that the GRL-216- and GRL-396-selected HIV-1 variants had acquired various amino acid substitutions prompted us to examine whether such amino acid

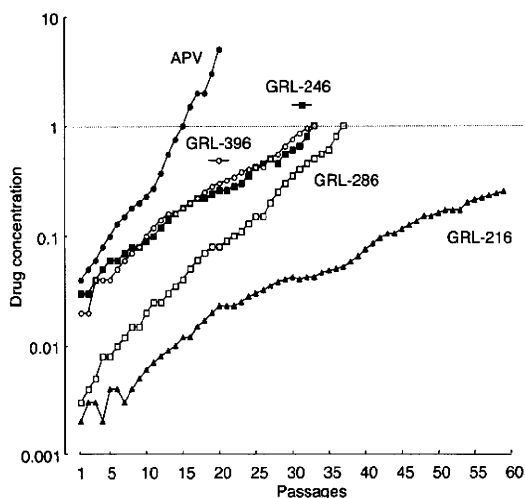


FIG. 3. *In vitro* selection of HIV-1 variants resistant to GRL-216, GRL-246, GRL-286, and GRL-396. HIV-1_{NL4.3} was propagated in MT-4 cells in the presence of increasing concentrations of APV (●), GRL-216 (▲), GRL-246 (■), GRL-286 (□), or GRL-396 (○). Each passage of HIV-1 was conducted in a cell-free fashion. APV was employed as a reference compound.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
pNL4-3 PR	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMNLPG	RWKPKMIGGI	GGFIKVRQYD	QILIEICGCHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF
HIV APV P10XXXXX
	(L<F)		(V<I)		(M>I)				(I>V)	
HIV APV P20FIIV
HIV 216 P10I
HIV 216 P30II.V
HIV 216 P40II.V
HIV 216 P50IILI.V
HIV 216 P60IILPI.V
HIV 246 P10I
HIV 246 P20FS
HIV 246 P30FS
HIV 246 P33FIS
HIV 286 P10
HIV 286 P20LV
HIV 286 P30LVV
HIV 286 P37FLVV
HIV 396 P10LV
HIV 396 P20FLV
HIV 396 P30FXXI.V
					(M=I)		(Q=K)			
HIV 396 P33FXXI.V
					(M=I)		(Q=K)			

FIG. 4. Amino acid sequences of protease-encoding regions of HIV-1_{NL4.3} variants selected in the presence of GRL-216, GRL-246, GRL-286, or GRL-396. The amino acid sequence of protease, deduced from the nucleotide sequence of the protease-encoding region of each proviral DNA isolated at each time indicated, is shown. The amino acid sequence of wild-type HIV-1_{NL4.3} protease is illustrated at the top as a reference.

substitutions affected the protease dimerization inhibition of GRL-216. We generated in the setting of the FRET-based HIV-1 expression assay (23) a pair of recombinant clones (one with CFP and the other with YFP) containing one of the following mutations: L24I, V82I, I84V, V82I/I84V, or L10I/L24I/M46L/L63P/V82I/I84V. With L24I, V82I, or I84V alone, the protease dimerization-blocking activity of 0.1 μ M GRL-216 was not affected; however, with either set of the V82I/I84V or L10I/L24I/M46L/L63P/V82I/I84V substitutions, GRL-216 failed to block the dimerization (Fig. 6). Thus, the V82I and I84V substitutions prevented GRL-216 from blocking protease dimerization and played a role in the emergence of HIV-1 resistance to GRL-216.

Structural analysis of interactions with GRL-216 with HIV-1 protease. The crystal structures of GRL-216 (PDB accession number 3I6O) and DRV (PDB accession number 2IEN) (34) were analyzed to gain insight into the similarities and differences in their interactions with HIV-1 protease (Fig. 7). Hydrogens were added to the coordinates obtained from PDB and minimized with constraints on the heavy atoms in an OPLS2005 force field using the Maestro (version 9.0) program (Schrödinger, LLC).

The *bis*-THF component of GRL-216 forms a hydrogen-bonding interaction with D29 and D30 of the protease. Hydrogen bond interactions with D25 and D25' and water molecule-mediated hydrogen bond interactions with I50 and I50' were also observed (Fig. 7A). These hydrogen bond interactions were also observed for DRV (Fig. 7-B). The P2' ligands of DRV and GRL-216 were different, and both of them formed hydrogen bond interactions with different backbone atoms of D30'. The oxygen atom in the methoxybenzene of GRL-216 formed a hydrogen bond with the backbone NH of D30', while the aniline nitrogen of darunavir forms a hydrogen bond with the oxygen of the backbone carbonyl. While the polar interac-

tions of these molecules were similar, there appeared to be subtle differences in the nonpolar interaction due to the presence of the macrocyclic ring in GRL-216.

The macrocyclic ring occupied more volume at the S1'-S2' binding cavity of the protease and formed more van der Waals interactions with V82 and I84 than the corresponding isopropyl group of the structurally related *bis*-THF-containing compound DRV (Fig. 7C and D), strongly suggesting that the binding of GRL-216 to V82 and V84 along with the polar interactions described earlier significantly contribute to its activity against HIV-1 protease. This finding should explain well why the V82I and I84V substitutions emerged during the *in vitro* selection process (Fig. 4). However, the observation that the V82I and I84V substitutions prevented GRL-216 from blocking protease dimerization cannot be explained by structural analysis of the interactions of GRL-216 with the mature and dimerized protease discussed above. Elucidation of the mechanism by which the V82I and I84V substitutions results in the loss of the dimerization blockade of GRL-216 requires detailed structural data on the interactions of GRL-216 and the monomer protease subunit.

DISCUSSION

Macrocycles represent a group of functional moieties inherent to a number of bioactive natural products.

We have designed and synthesized a series of PIs containing functionalities (such as *bis*-THF) that interact with the amino acid backbones of the catalytic site of the HIV-1 protease along with flexible macrocyclic groups involving P1'-P2' ligands for effective repacking of the altered PI-binding cavity of protease that emerges upon side chain mutations in PI-resistant HIV-1 variants (16). Here, we report on a novel potent PI, GRL-216, which exerted potent activity against wild-type

TABLE 4. Activities of various PIs against GRL-216-, GRL-246-, GRL-286-, and GRL-396-selected HIV-1 isolates^a

Virus	EC ₅₀ (μM)									
	APV	NFV	LPV	AZV	TPV	DRV	GRL-216	GRL-246	GRL-286	GRL-396
HIV-1 _{INT4-3}	0.032 ± 0.001	0.040 ± 0.007	0.035 ± 0.004	0.0032 ± 0.0001	0.29 ± 0.05	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.033 ± 0.003	0.006 ± 0.005	0.017 ± 0.005
HIV-1 _{216-P50}	0.26 ± 0.03 (8)	0.13 ± 0.04 (4)	0.19 ± 0.06 (5)	0.014 ± 0.003 (4)	0.029 ± 0.0004 (0.1)	0.009 ± 0.006 (3)	0.094 ± 0.075 (24)	0.26 ± 0.05 (8)	0.19 ± 0.06 (32)	0.24 ± 0.06 (14)
HIV-1 _{246-1 μM}	0.34 ± 0.015 (11)	0.29 ± 0.006 (7)	0.33 ± 0.04 (8)	0.032 ± 0.003 (10)	0.095 ± 0.089 (0.3)	0.029 ± 0.001 (10)	0.30 ± 0.01 (75)	0.42 ± 0.09 (12)	0.33 ± 0.03 (55)	0.37 ± 0.013 (22)
HIV-1 _{286-1 μM}	>1 (>31)	0.37 ± 0.003 (9)	>1 (>23)	0.021 ± 0.012 (7)	0.037 ± 0.001 (0.1)	0.20 ± 0.05 (67)	>1 (>250)	>1 (>30)	>1 (>167)	>1 (>59)
HIV-1 _{396-1 μM}	0.35 ± 0.0002 (11)	0.22 ± 0.02 (6)	0.28 ± 0.05 (6)	0.024 ± 0.002 (8)	0.042 ± 0.002 (0.1)	0.016 ± 0.001 (5)	0.073 ± 0.011 (18)	0.37 ± 0.002 (11)	0.25 ± 0.05 (42)	0.52 ± 0.07 (31)

^a The amino acid substitutions identified in the protease-encoding region of HIV-1_{216-P50}, HIV-1_{246-1 μM}, HIV-1_{286-1 μM}, and HIV-1_{396-1 μM} compared to the consensus type B sequence cited from the Los Alamos database include L101L/24I/M46I/V82I/I84V; L10E/M46I/I79I/S; L10E/M46I/I50V/A71V; and L10F/M46M; I/O61G, or K/V82I/I84V, respectively. MT-4 cells (10⁴) were exposed to 100 TCID₅₀s of each HIV-1 isolate, and inhibition of p24 Gag protein production by each drug was used as the end point. Numbers in parentheses represent the *n*-fold changes in EC₅₀s for each isolate compared to the EC₅₀s for wild-type isolate HIV-1_{INT4-3}. All assays were conducted in duplicate or triplicate, and the data shown represent the mean values (±1 standard deviation) derived from the results of three independent experiments.

HIV-1 as well as a wide spectrum of PI-resistant HIV-1 variants *in vitro*.

We first chose four PIs (GRL-216, GRL-246, GRL-286, and GRL-396) and subsequently focused on GRL-216 and -286, which contain 8 and 9 carbon atoms in the macrocyclic moiety, respectively. Both of these compounds turned out to be reasonably active against HIV-2 (Table 1). Against laboratory-generated PI-resistant HIV-1 variants, both GRL-216 and -286 were somewhat less potent than DRV against a few HIV-1 variants (Table 2); however, GRL-216 had potency comparable to that of DRV against the multidrug-resistant clinical HIV-1 strains examined (Table 3). When we attempted to select HIV-1 variants resistant to each of the four PIs, HIV-1 acquired moderate levels of resistance to GRL-246, -286, and -396. It was noted that the acquisition of resistance to these three PIs was significantly delayed compared to that to APV (Fig. 3). The acquisition of resistance to GRL-216 was the most delayed, and even at passage 60, HIV-1 was only poorly replicating in the presence of 0.26 μM GRL-216 (Fig. 3). As expected, all four PIs were much less active against the HIV-1 variants selected with GRL-246, -286, and -396 (designated HIV-1_{246-1 μM}, HIV-1_{286-1 μM}, and HIV-1_{396-1 μM}, respectively), although the four PIs remained relatively active against the HIV-1 isolates selected with GRL-216 (HIV-1_{216-P50}) (Table 4). It was of note that all FDA-approved PIs employed in this study (APV, NFV, LPV, AZV, and DRV) remained substantially active against HIV-1_{216-P50}, HIV-1_{246-1 μM}, and HIV-1_{396-1 μM}, although APV, LPV, and DRV were much less active against HIV-1_{286-1 μM}. These different resistance profiles between the conventional PIs and the PIs examined are likely to stem at least in part from the presence of the macrocyclic moiety. The four PIs drove the evolution of the resistance mutations commonly observed with FDA-approved PIs (e.g., V82I and I84V). However, since the GRL compounds do interact with the catalytic site amino acids, such as V82 and I84 (Fig. 7), it is expected that mutations in such amino acid residues would occur. Nevertheless, the antiviral activities of the GRL compounds appear to differ from the antiviral activity of DRV (see below).

Interestingly, all four mcPI-selected variants were significantly more susceptible to TPV by 3.3- to 10-fold. Of note, none of the mcPI-selected variants carried any of the three major amino acid substitutions, L33I/V/F, I54V, and V82T/L (31), which confer on HIV-1 resistance to TPV. Although the exact mechanism for the enhanced activity of TPV against PI-resistant HIV-1 variants remains to be determined, it is suggested that combination chemotherapy with PI and TPV may bring about favorable clinical efficacy, considering that the combination of 3'-thia-2',3'-dideoxycytidine (3TC) and azidothymidine, which shows increased potency against M184V-containing HIV-1 variants (4, 18, 19, 26), still plays a crucial role in effective HAART regimens.

Dimerization of the HIV-1 protease subunits is essential for the proteolytic activity of HIV-1, which plays a critical role in HIV-1 replication (23). Hence, the inhibition of protease dimerization represents a unique target for potential intervention against HIV-1. We previously developed a FRET-based HIV-1 expression system employing cyan and yellow fluorescent protein-tagged protease monomers. Using this system, in 2007, we reported on a group of nonpeptidyl small-molecule

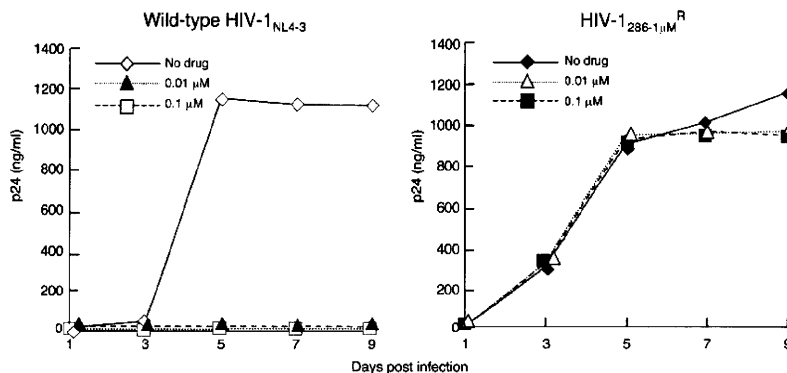


FIG. 5. Replication kinetics of GRL-286-resistant HIV-1. MT-4 cells (2.4×10^5) were exposed to an HIV-1_{286-1,μM}^R or a wild-type HIV-1_{NL4-3} preparation containing 30 ng p24 in six-well culture plates for 3 h, and the MT-4 cells were divided into three fractions, each of which was cultured with or without GRL-286 (10^4 MT-4 cells/ml and drug concentrations of 0, 0.01, and 0.1 μM). The amounts of p24 were measured every 2 days for up to 9 days.

inhibitors of protease, including DRV (23). We therefore asked in the present study whether GRL-216 and GRL-286, both of which contain the *bis*-THF moiety, like DRV does, could block the dimerization of the HIV-1 protease in the system. All average CFP^{A/B} ratios proved to be less than 1.0 in the presence of certain concentrations of GRL-216 and GRL-286, indicating that both compounds effectively blocked HIV-1 protease dimerization. It is thought that this protease dimerization activity, along with protease catalysis-inhibitory activity, should render GRL-216 and GRL-286 potent against diverse HIV-1 variants and cause a substantial delay in the time to the emergence of resistance to the compounds (Fig. 3).

The crystal structure of GRL-216 revealed that, as in the case of DRV (16, 25), the *bis*-THF moiety of GRL-216 forms strong hydrogen-bonding interactions with the backbones of D29 and D30 of protease and the compound has good inter-

actions with D25 and I50, which should give GRL-216 significantly potent activity against diverse wild-type and multidrug-resistant HIV-1 strains. However, the macrocyclic ring was found to occupy more of the binding cavity of protease and form more van der Waals interactions with V82 and I84 than the corresponding isopropyl group of DRV (Fig. 7C and D). This observation should explain why HIV-1 selected with GRL-216 acquired V82I and I84V substitutions early in the selection, although GRL-216 remained fairly potent against HIV-1 variants containing these two substitutions (Table 4) (34).

Of note, if GRL-216 and GRL-286 are directly compared with DRV on the basis of the EC₅₀s alone, the compounds do not appear to possess significant advantages over DRV. However, HIV selected with the PIs examined in the present study had increased susceptibility to TPV, suggesting that combination of such mcPIs and TPV may achieve synergism. Further-

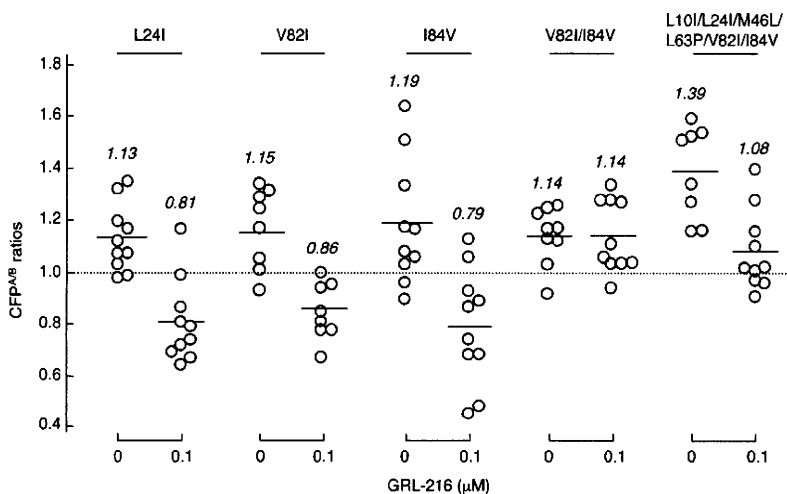


FIG. 6. GRL-216 fails to block protease dimerization with V82I and I84V substitutions. To examine whether an amino acid substitution(s) emerged upon selection of HIV-1_{NL4-3} with GRL-216, recombinant clones containing the L24I, V82I, I84V, V82I/I84V, or L10I/L24I/M46L/L63P/V82I/I84V mutation(s) were generated in the setting of the FRET-based HIV-1 expression assay (23). With L24I, V82I, or I84V alone, the protease dimerization-blocking activity of 0.1 μM GRL-216 was not affected; however, with either set of the V82I/I84V or L10I/L24I/M46L/L63P/V82I/I84V substitutions, GRL-216 failed to block the dimerization.

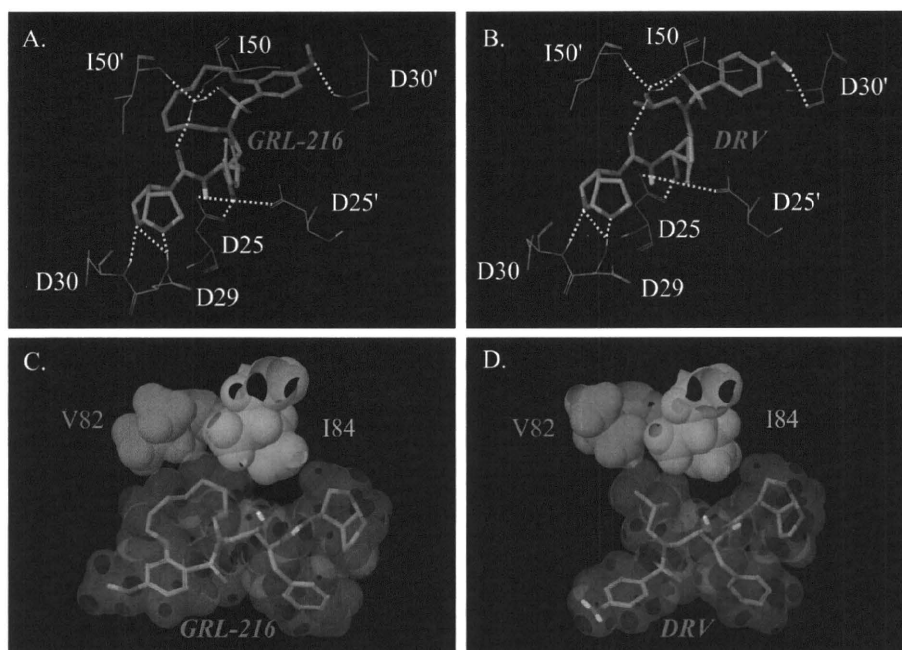


FIG. 7. Interactions of GRL-216 with HIV-1 protease compared to those of DRV. (A and B) Selected hydrogen bond interactions of GRL-216 and DRV. Both inhibitors have hydrogen bond interactions with Asp29, Asp30, Asp25, and Asp25' and water-mediated hydrogen bond interactions with Ile50 and Ile50' in the flap. Both inhibitors form hydrogen bond interactions with different backbone atoms of Asp30'; GRL-216 forms a hydrogen bond with the NH, while DRV forms hydrogen bonds with the oxygen of the carbonyl. (C and D) The van der Waals surfaces of GRL-216, DRV, and protease residues V82 and I84 are shown. The macrocyclic ring of GRL-216 appears to have greater van der Waals contact with V82 and I84 than the corresponding isopropyl of darunavir. All figures were generated using the Maestro (version 9.0) program (Schrödinger, LLC).

more, macrocycles represent a group of functional moieties derived from natural products, and PIs might have advantages over other PIs, including DRV.

In conclusion, the data obtained in the present study showed that GRL-216, which has dual anti-HIV-1 activity, inhibition of protease dimerization and the catalytic activity of HIV-1 protease, exerts potent activity against a wide spectrum of multi-drug-resistant HIV-1 variants and that its macrocyclic moiety contributes to its increased anti-HIV-1 potency compared to that of its structurally related, *bis*-THF-containing PI DRV. The present data suggest that macrocyclic moieties may play a role in improving the anti-HIV-1 profile of PIs and in the future may contribute to the design of anti-HIV-1 compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Intramural Research Program of the Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health; a grant from the National Institutes of Health (grant GM 53386 to A.K.G.); a grant from the Kumamoto University Global Center of Excellence Program, Global Education and Research Center Aiming at the Control of AIDS, supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (Monbu-Kagakusho); a Grant-in-Aid for Scientific Research (Priority Areas) from Monbu-Kagakusho of Japan; and a Grant for Promotion of AIDS Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare (Kosei-Rodosho) of Japan.

REFERENCES

- Amano, M., Y. Koh, D. Das, J. Li, S. Leschenko, Y. F. Wang, P. I. Boross, I. T. Weber, A. K. Ghosh, and H. Mitsuya. 2007. A novel bis-tetrahydrofuranlyurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI), GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2143–2155.
- Bhaskaran, K., O. Hamouda, M. Sannes, F. Boufassa, A. M. Johnson, P. C. Lambert, and K. Porter. 2008. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *JAMA* **300**:51–59.
- Carr, A. 2003. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**:624–634.
- Chamberlain, P. P., J. Ren, C. E. Nichols, L. Douglas, J. Lennerstrand, B. A. Larder, D. I. Stuart, and D. K. Stammers. 2002. Crystal structures of zidovudine- or lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases containing mutations at codons 41, 184, and 215. *J. Virol.* **76**:10015–10019.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Daugeat, C. Katlama, C. Rouzioux, et al. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343–346.
- De Clercq, E. 2010. Highlights in the discovery of antiviral drugs: a personal retrospective. *J. Med. Chem.* **53**:1438–1450.
- 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**:3763–3769.
- Driggers, E. M., S. P. Hale, J. Lee, and N. K. Terrett. 2008. The exploration of macrocycles for drug discovery—an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**:608–624.
- Fang, G., B. Weiser, A. Visosky, T. Moran, and H. Burger. 1999. PCR-mediated recombination: a general method applied to construct chimeric infectious molecular clones of plasma-derived HIV-1 RNA. *Nat. Med.* **5**:239–242.
- Ferrer, E., D. Podzamczar, M. Arnedo, E. Fumero, P. McKenna, A. Rinehart, J. L. Perez, M. J. Barbera, T. Pumarola, J. M. Gatell, and F. Gudiol. 2003. Genotype and phenotype at baseline and at failure in human immunodeficiency virus-infected antiretroviral-naive patients in a randomized trial comparing zidovudine and lamivudine plus nelfinavir or nevirapine. *J. Infect. Dis.* **187**:687–690.
- Fumero, E., and D. Podzamczar. 2003. New patterns of HIV-1 resistance during HAART. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:1077–1084.
- Gatanaga, H., Y. Suzuki, H. Tsang, K. Yoshimura, M. F. Kavlick, K. Nagashima, R. J. Gorelick, S. Mardy, C. Tang, M. F. Summers, and H. Mit-

- suva. 2002. Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* **277**:5952–5961.
13. Ghosh, A. K., and J. H. Kim. 2004. Stereoselective chloroacetate aldol reactions: syntheses of acetate aldol equivalents and darzens glycidic esters. *Org. Lett.* **6**:2725–2728.
 14. 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**:687–690.
 15. 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 nonpeptidic P2-ligands for HIV protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**:979–982.
 16. Ghosh, A. K., S. Kulkarni, D. D. Anderson, L. Hong, A. Baldrige, Y. F. Wang, A. A. Chumanovich, A. Y. Kovalevsky, Y. Tojo, M. Amano, Y. Koh, J. Tang, I. T. Weber, and H. Mitsuya. 2009. Design, synthesis, protein-ligand X-ray structure, and biological evaluation of a series of novel macrocyclic human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors to combat drug resistance. *J. Med. Chem.* **52**:7689–7705.
 17. Ghosh, A. K., S. Leshchenko, and M. Noetzel. 2004. Stereoselective photochemical 1,3-dioxolane addition to 5-alkoxymethyl-2(5H)-furanone: synthesis of bis-tetrahydrofuran ligand for HIV protease inhibitor UIC-94017 (TMC-114). *J. Org. Chem.* **69**:7822–7829.
 18. Girouard, M., K. Diallo, B. Marchand, S. McCormick, and M. Gotte. 2003. Mutations E44D and V118I in the reverse transcriptase of HIV-1 play distinct mechanistic roles in dual resistance to AZT and 3TC. *J. Biol. Chem.* **278**:34403–34410.
 19. Gotte, M., D. Arion, M. A. Parniak, and M. A. Wainberg. 2000. The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J. Virol.* **74**:3579–3585.
 20. Gupta, R., A. Hill, A. W. Sawyer, and D. Pillay. 2008. Emergence of drug resistance in HIV type 1-infected patients after receipt of first-line highly active antiretroviral therapy: a systematic review of clinical trials. *Clin. Infect. Dis.* **47**:712–722.
 21. Hog, R. 2008. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* **372**:293–299.
 22. Koh, Y., D. Das, S. Leschenko, H. Nakata, H. Ogata-Aoki, M. Amano, M. Nakayama, A. K. Ghosh, and H. Mitsuya. 2009. GRL-02031, a novel non-peptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused cyclopentanyltetrahydrofuran potent against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:997–1006.
 23. Koh, Y., S. Matsumi, D. Das, M. Amano, D. A. Davis, J. Li, S. Leschenko, A. Baldrige, T. Shioda, R. Yarchoan, A. K. Ghosh, and H. Mitsuya. 2007. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J. Biol. Chem.* **282**:28709–28720.
 24. Koh, Y., H. Nakata, K. Maeda, H. Ogata, G. Bilcer, T. Devasamudram, J. F. Kincaid, P. Boross, Y. F. Wang, Y. Tse, 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**:3123–3129.
 25. Kovalevsky, A. Y., A. K. Ghosh, and I. T. Weber. 2008. Solution kinetics measurements suggest HIV-1 protease has two binding sites for darunavir and amprenavir. *J. Med. Chem.* **51**:6599–6603.
 26. Larder, B. A., S. D. Kemp, and P. R. Harrigan. 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* **269**:696–699.
 27. 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**:385–394.
 28. 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**:35194–35200.
 29. Mitsuya, H., and J. Erickson. 1999. Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection, p. 751–780. *In* T. C. Merigan, J. G. Bartlett, and D. Bolognesi (ed.), *Textbook of AIDS medicine*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
 30. Murphy, E. L., A. C. Collier, L. A. Kalish, S. F. Assmann, M. F. Para, T. P. Flanagan, P. N. Kumar, L. Mintz, F. R. Wallach, and G. J. Nemo. 2001. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. *Ann. Intern. Med.* **135**:17–26.
 31. Naeger, L. K., and K. A. Struble. 2007. Food and Drug Administration analysis of tipranavir clinical resistance in HIV-1-infected treatment-experienced patients. *AIDS* **21**:179–185.
 32. Shirasaka, T., R. Yarchoan, M. C. O'Brien, R. N. Husson, B. D. Anderson, E. Kojima, T. Shimada, S. Broder, and H. Mitsuya. 1993. Changes in drug sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 during therapy with azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine: an in vitro comparative study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:562–566.
 33. Siliciano, J. D., and R. F. Siliciano. 2004. A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:6–9.
 34. Tse, 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**:341–352.
 35. Walensky, R. P., A. D. Paltiel, E. Losina, L. M. Mercincavage, B. R. Schackman, P. E. Sax, M. C. Weinstein, and K. A. Freedberg. 2006. The survival benefits of AIDS treatment in the United States. *J. Infect. Dis.* **194**:11–19.
 36. 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**:1349–1358.
 37. 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**:8675–8680.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands

Arun K. Ghosh^{a,*}, Sandra Gemma^a, Elena Simoni^a, Abigail Baldrige^a, D. Eric Walters^b, Kazuhiko Ide^c, Yasushi Tojo^c, Yasuhiro Koh^c, Masayuki Amano^c, Hiroaki Mitsuya^{c,d}

^a Departments of Chemistry and Medicinal Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, United States

^b Departments of Biochemistry and Molecular Biology, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, IL 60064, United States

^c Departments of Hematology and Infectious Diseases, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860-8556, Japan

^d Experimental Retrovirology Section, HIV and AIDS Malignancy Branch, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2009

Revised 20 November 2009

Accepted 23 November 2009

Available online 5 December 2009

Keywords:

HIV protease

Inhibitors

Darunavir

Allophenylnorstatine

Design

Synthesis

ABSTRACT

A series of stereochemically defined cyclic ethers as P2-ligands were incorporated in an allophenylnorstatine-based isostere to provide a new series of HIV-1 protease inhibitors. Inhibitors **3b** and **3c**, containing conformationally constrained cyclic ethers, displayed impressive enzymatic and antiviral properties and represent promising lead compounds for further optimization.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The introduction of protease inhibitors into highly active anti-retroviral treatment (HAART) regimens with reverse transcriptase inhibitors represented a major breakthrough in AIDS chemotherapy.¹ This combination therapy has significantly increased life expectancy, and greatly improved the course of HIV management. Therapeutic inhibition of HIV-1 protease leads to morphologically immature and noninfectious viral particles.² However, under the selective pressure of chemotherapeutics, rapid adaptation of viral enzymes generates strains resistant to one or more antiviral agents.³ As a consequence, a growing number of HIV/AIDS patients harbor multidrug-resistant HIV strains. There is ample evidence that such strains can be readily transmitted.⁴ Therefore, one of the major current therapeutic objectives has been to develop novel protease inhibitors (PIs) with broad-spectrum activity against multidrug-resistant HIV-1 variants. In our continuing interest in developing concepts and strategies to combat drug-resistance, we have reported a series of novel PIs including Darunavir, TMC-126, GRL-06579, and GRL-02031.^{5–8} These inhibitors have shown exceedingly potent enzyme inhibitory and antiviral activity as well as exceptional broad spectrum activity against highly cross-resistant mutants. Darunavir, which incorporates a (*R*)-(hydroxymethyl)-sulfonamide isostere and a stereochemically defined bis-tetrahy-

drofurane (bis-THF) as the P2-ligand, was initially approved for the treatment of patients with drug-resistant HIV and more recently, it has been approved for all HIV/AIDS patients including pediatrics⁹ (Fig. 1).

Darunavir was designed based upon the 'backbone binding' concept developed in our laboratories. Darunavir-bound X-ray structure revealed extensive hydrogen bonding with the protease backbone throughout the enzyme active site.¹⁰ The P2-bis-THF ligand is responsible for its superior drug-resistance properties. The bis-THF ligand has been documented as a privileged ligand for the S2-subsite. Incorporation of this ligand into other transition-state isosteres also resulted in significant potency enhancement.¹¹ Besides 3(*S*)-THF, and [3*aS*,5*S*,6*R*]-bis-THF, we have designed a number of other novel cyclic ether-based high affinity ligands. Incorporation of these ligands in (*R*)-(hydroxyethyl)-sulfonamide isosteres provided PIs with excellent potency and drug-resistance properties.^{6–8} We then investigated the potential of these structure-based designed P2-ligands in a KNI-764-derived isostere designed by Mimoto and co-workers.¹² This PI incorporates an allophenylnorstatine isostere. Interestingly, KNI-764 has maintained good activity against HIV-1 clinical strains resistant to several FDA-approved PIs. The flexible *N*-(2-methyl benzyl) amide P2'-ligand may have been responsible for its activity against drug-resistant HIV-1 strains as the flexible chain allows better adaptability to mutations.^{12,13} The bis-THF and other structure-based designed P2-ligands, make several critical

* Corresponding author. Tel.: +1 765 494 5323; fax: +1 765 496 1612.
E-mail address: akghosh@purdue.edu (A.K. Ghosh).

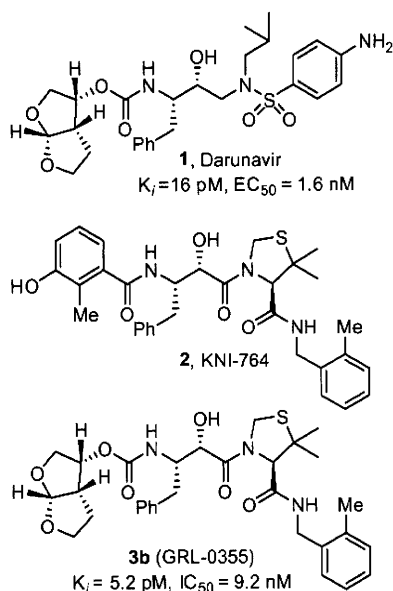
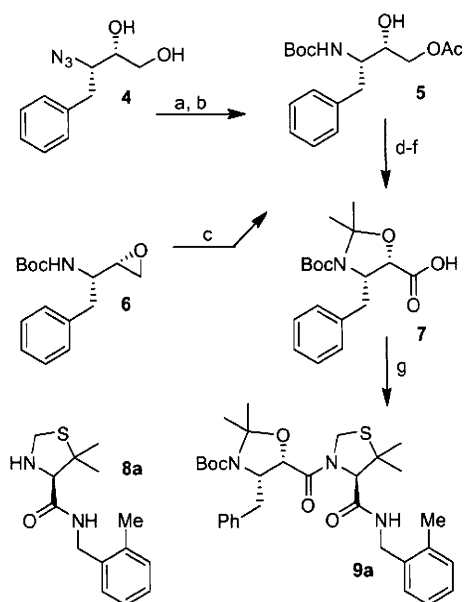


Figure 1. Structures of inhibitors **1**, **2**, and **3b**.

hydrogen bonds with the protein backbone, particularly with Asp-29 and Asp-30 NH's.¹¹ Therefore, incorporation of these ligands into the KNI-764-derived isostere, may lead to novel PIs with improved potency and efficacy against multidrug-resistant HIV-1 variants. Furthermore, substitution of the P2-phenolic derivative in KNI-764 with a cyclic ether-based ligand could result in improved metabolic stability and pharmacological properties since phenol glucuronide is readily formed when KNI-764 is exposed to human hepatocytes *in vitro*.¹²

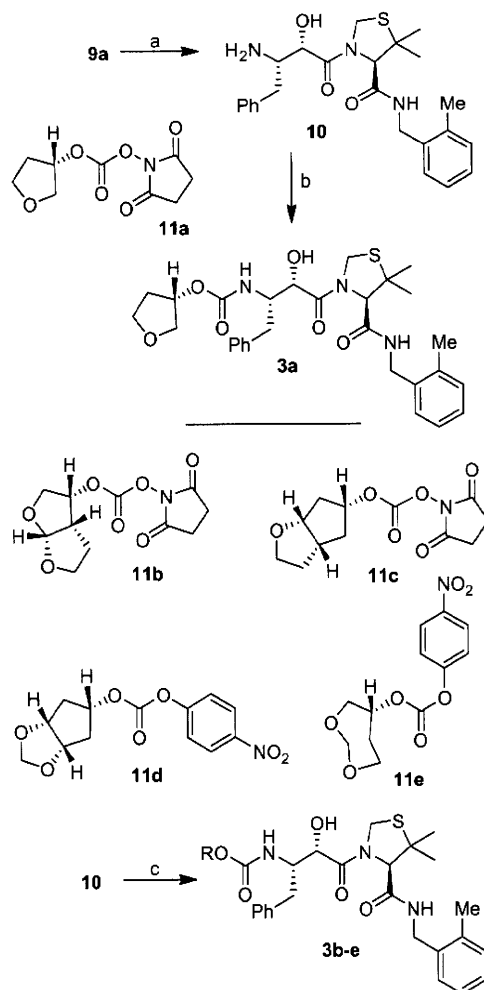
The synthesis of target compounds **3a–e** was accomplished as described in Scheme 1. Our synthetic plan for carboxylic acid **7** (Scheme 1) involved the preparation of the key intermediate **5** through two different synthetic pathways. In the first approach,



Scheme 1. Reagents: (a) H_2 , Pd/C, Boc_2O , $EtOAc$; (b) Ac_2O , Pyr, DMAP; (c) $LiCO_3$, $AcOH$, DMF; (d) 2-methoxypropene, CSA, DCM; (e) K_2CO_3 , MeOH; (f) $RuCl_3$, $NaIO_4$, CCl_4 -MeCN- H_2O (2:2:3); (g) *N*-methylmorpholine, *i*BuOCOC1, **8a**, THF.

known optically active azidodiol **4**¹⁴ was first hydrogenated in the presence of Boc_2O . The resulting diol was converted to **5** by selective acylation of the primary alcohol with acetic anhydride in the presence of pyridine and a catalytic amount of DMAP at $0^\circ C$ for 4 h to provide **5** in 77% overall yield. As an alternative approach, commercially available optically active epoxide **6** was exposed to lithium acetate, formed *in situ* from lithium carbonate and acetic acid in DMF. This resulted in the regioselective opening¹⁵ of the epoxide ring and afforded compound **5** in 62% yield. The alcohol **5** thus obtained was protected as the corresponding acetonide by treatment with 2-methoxypropene in the presence of a catalytic amount of CSA. The acetate group was subsequently hydrolyzed in the presence of potassium carbonate in methanol to afford the corresponding alcohol. This was subjected to an oxidation reaction using ruthenium chloride hydrate and sodium periodate in a mixture of aqueous acetonitrile and CCl_4 at $23^\circ C$ for 10 h. This resulted in the formation of the target carboxylic acid **7** in 61% yield. Amide **9a** was prepared by activation of carboxylic acid **7** into the corresponding mixed anhydride by treatment with isobutylchloroformate followed by reaction with amine **8a**.^{16,17}

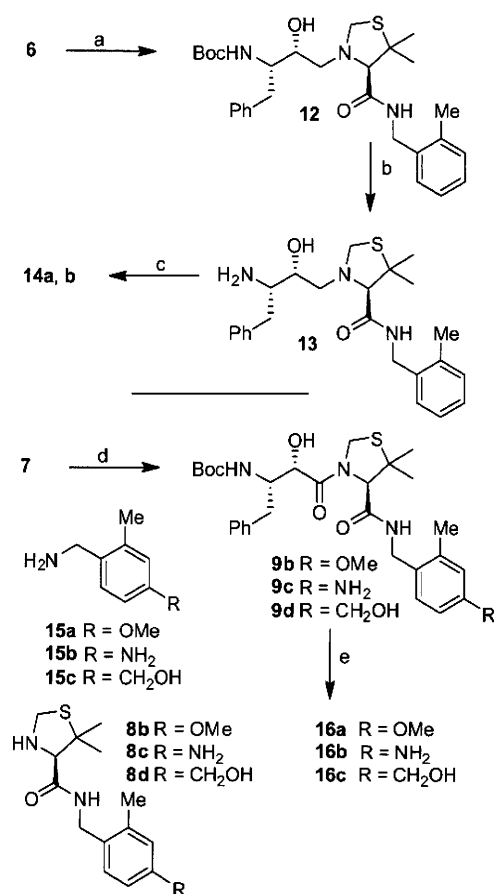
Synthesis of various inhibitors was carried out as shown in Scheme 2. Deprotection of the Boc and acetonide groups was carried out by exposure of **9** to a 1 M solution of hydrochloric acid in methanol at $23^\circ C$ for 8 h. This provided amine **10** in quantitative



Scheme 2. Reagents: (a) 1 M HCl, MeOH; (b) **11a**, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (c) **11b,c**, Et_3N , CH_2Cl_2 ; or, **11d,e**, DIPEA, THF.

yield. Reaction of **11a** with amine **10** in CH_2Cl_2 in the presence of Et_3N at 23°C for 6 h, provided inhibitor **3a** in 62% yield. The 3(*S*)-tetrahydrofuranyl carbonate **11a** was prepared as described previously.¹⁸ Similarly, allophenylnorstatine-based inhibitors **3b–e** were synthesized. As shown, carbonates **11b**,¹⁹ **11c**,⁷ and **11d–e**¹⁹ were prepared as previously described. Reaction of these carbonates with amine **10** furnished the desired inhibitors **3b–e** in 45–62% yield.

The syntheses of inhibitors **14a,b** and **16a–c** were carried out as shown in Scheme 3. Inhibitors **14a,b**, containing hydroxyethylamine isostere were prepared by opening epoxide **6** with amine **8a** in the presence of lithium perchlorate in diethyl ether at 23°C for 5 h to provide amino alcohol **12** in 64% yield. Removal of the Boc-group by exposure to 1 M HCl in MeOH at 23°C for 12 h afforded amine **13**. Reactions of amine **13** with activated carbonates **11a** and **11b** afforded urethane **14a** and **14b** in 44% and 59% yields, respectively. For the synthesis of inhibitors **16a–c**, commercially available (*R*)-5,5-dimethyl-thiazolidine-4-carboxylic acid was protected as its Boc-derivative. The resulting acid was coupled with amines **15a–c** in the presence of DCC and DMAP in CH_2Cl_2 to provide the corresponding amides. Removal of the Boc-group by exposure to 30% trifluoroacetic acid afforded **8b–d**. Coupling of these amines with acid **7** as described in Scheme 1, provided the corresponding products **9b–d**. Removal of Boc-group and reactions of the resulting amines with activated carbonate **11b** furnished inhibitors **16a–c** in good yields (55–60%).



Scheme 3. Reagents: (a) **8a**, $\text{Li}(\text{ClO}_4)$, Et_2O ; (b) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, CH_2Cl_2 ; (c) **11a** or, **11b**, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (d) *N*-methylmorpholine, isobutylchloroformate, **8b–d**, THF; (e) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, CH_2Cl_2 , then **11b**, Et_3N , CH_2Cl_2 .

Inhibitors **3a–e** were first evaluated in enzyme inhibitory assay utilizing the protocol described by Toth and Marshall.²⁰ Compounds that showed potent enzymatic K_i values were then further evaluated in antiviral assay. The inhibitor structure and potency are shown in Table 1. As shown, incorporation of a stereochemically defined 3(*S*)-tetrahydrofuran ring as the P2-ligand provided inhibitor **3a**, which displayed an enzyme inhibitory potency of 0.2 nM and antiviral IC_{50} value of 20 nM. The corresponding derivative **14a** with a hydroxyethylamine isostere exhibited over 400-fold reduction in enzyme inhibitory activity. Introduction of a stereochemically defined bis-THF as the P2-ligand, resulted in inhibitor **3b**, which displayed over 40-fold potency enhancement with respect to **3a**. Inhibitor **3b** displayed a K_i of 5.2 pM in the enzyme inhibitory assay. Furthermore, compound **3b** has shown an impressive antiviral activity with an IC_{50} value of 9 nM. Inhibitor **14b** with hydroxyethylamine isostere is significantly less potent than the corresponding norstatine-derived inhibitor **3b**. Inhibitor **3c** with a (3*aS*, 5*R*, 6*aR*)-5-hydroxy-hexahydrocyclopenta[*b*]furan as the P2-ligand has displayed excellent inhibitory activity, and particularly, antiviral activity, showing an IC_{50} value of 13 nM. Other structure-based designed ligands in inhibitors **3d** and **3e** have shown subnanomolar enzyme inhibitory activity. However, inhibitor **3b** with a bis-THF ligand has shown the most impressive activity.

To obtain molecular insight into the possible ligand-binding site interactions, we have created energy-minimized models of a number of inhibitors based upon protein-ligand X-ray structure of KNI-764 (**2**).²¹ An overlaid model of **3b** with the X-ray structure of 2-bound HIV-1 protease is shown in Figure 2. This model for inhibitor **3b** was created from the X-ray crystal structure of KNI-764 (**2**)-bound HIV-1 protease (KNI-764, pdb code 1MSM²¹) and the X-ray crystal structure of darunavir (pdb code 2IEN²²), by combining the P2-end of the darunavir structure with the P2'-end of the KNI-764 structure, followed by 1000 cycles of energy minimization. It appears that both oxygens of the bis-THF ligand are suitably located to form hydrogen bonds with the backbone atoms of Asp-29 and Asp-30 NH's, similar to darunavir-bound HIV-1 protease.¹⁰ Furthermore, the KNI-764-X-ray structure-derived model of **3b** suggested that the incorporation of appropriate substituents on the phenyl ring could interact with Asp-29' and Asp-30' in the S2'-subsite. In particular, it appears that a 4-hydroxymethyl substituent on the P2'-phenyl ring could conceivably interact with backbone Asp-30' NH in the S2'-subsite. Other substituents such as a methoxy group or an amine functionality also appears to be within proximity to Asp-29' and Asp-30' backbone NHs. Based upon these speculations, we incorporated *p*-MeO, *p*-NH₂ and *p*-CH₂OH substituents on the P2'-phenyl ring of inhibitor **3b**. As shown in Table 1, neither *p*-MeO nor *p*-NH₂ groups improved enzyme inhibitory potency compared to inhibitor **3b**. Of particular note, compound **16a**, displayed a good antiviral potency, possibly suggesting a better penetration through the cell membrane. Inhibitor **16c** with a hydroxymethyl substituent showed sub-nanomolar enzyme inhibitory potency but its antiviral activity was moderate compared to unsubstituted derivative **3b**. As it turned out, inhibitor **3b** is the most potent inhibitor in the series. We subsequently examined its activity against a clinical wild-type X₄-HIV-1 isolate (HIV-1_{ERS104pre}) along with various multidrug-resistant clinical X₄- and R₅-HIV-1 isolates using PBMCs as target cells.^{5b} As can be seen in Table 2, the potency of **3b** against HIV-1_{ER104pre} (IC_{50} = 31 nM) was comparable to the FDA approved PI, amprevanir with an IC_{50} value of 45 nM. Darunavir and atazanavir on the other hand, are significantly more potent with IC_{50} values of 5 nM and 3 nM, respectively. Inhibitor **3b**, while less potent than darunavir, maintained 5-fold or better potency over amprevanir against HIV-1_{MDR/G}, HIV-1_{MDR/G}, HIV-1_{MDR/TM} and HIV-1_{MDR/MM}. It maintained over a 2-fold potency against HIV-1_{MDR/SL}. In fact, inhibitor **3b** maintained comparable potency to atazanavir against all

Table 1
Enzymatic inhibitory and antiviral activity of allophenylnorstatine-derived inhibitors

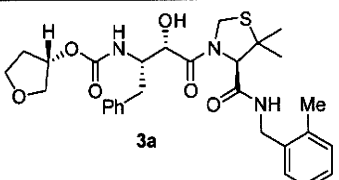
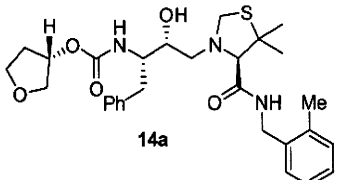
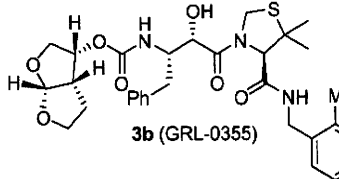
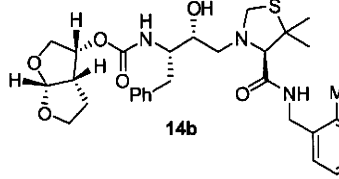
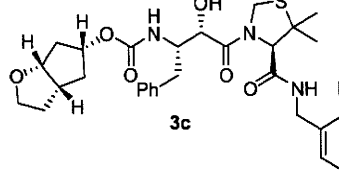
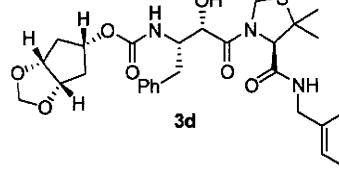
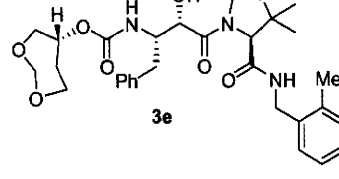
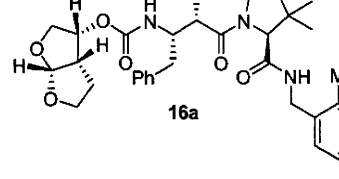
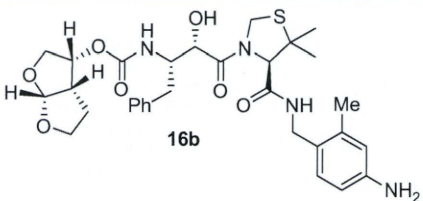
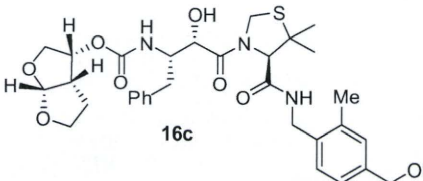
Entry	Inhibitor	K_i (nM)	IC_{50}^{ab} (μ M)
1	 3a	0.21	0.02
2	 14a	86.2	nt
3	 3b (GRL-0355)	0.0052	0.009
4	 14b	2.6	nt
5	 3c	0.29	0.013
6	 3d	0.65	nt
7	 3e	0.78	nt
8	 16a	2.03	0.051

Table 1 (continued)

Entry	Inhibitor	K_i (nM)	$IC_{50}^{a,b}$ (μ M)
9	 16b	1.01	0.53
10	 16c	0.31	0.23

^a Values are means of at least three experiments.

^b Human lymphoid (MT-2) cells were exposed to 100 TCID₅₀ values of HIV-1_{LA1} and cultured in the presence of each PI, and IC₅₀ values were determined using MTT assay. Darunavir exhibited K_i = 16 pM, IC₅₀ = 1.6 nM.

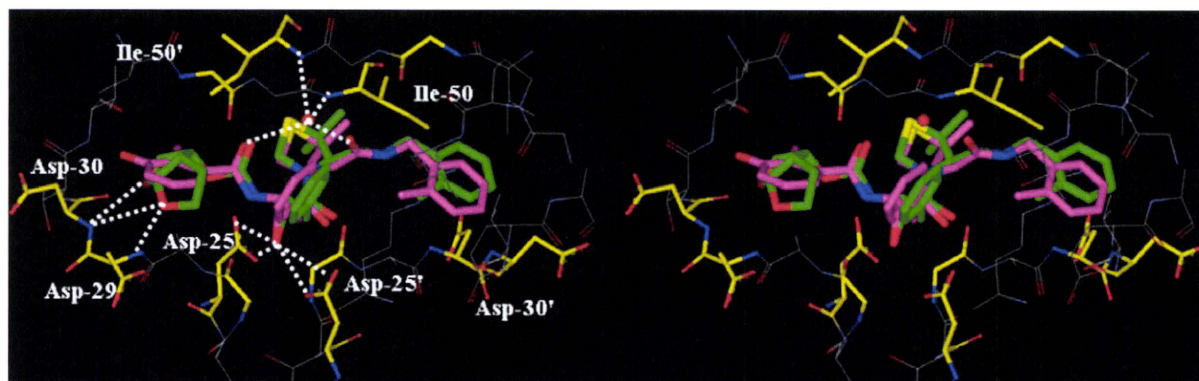


Figure 2. Structure of inhibitor **3b**, modeled into the active site of HIV-1 protease, superimposed on the X-ray crystal structure of KNI-764. Inhibitor **3b** carbons are shown in green and KNI-764 carbons are shown in magenta.

Table 2

Antiviral activity of **3b** (GRL-0355) against multidrug-resistant clinical isolates in PHA-PBMs.

Virus	IC_{50} (μ M)			
	3b (GRL-0355)	APV	ATV	DRV
HIV-1 _{ERS104pre} (wild-type: X4)	0.031 ± 0.002	0.045 ± 0.014	0.003 ± 0.003	0.005 ± 0.001
HIV-1 _{MDR/C} (X4)	0.061 ± 0.005 (2)	0.346 ± 0.071 (8)	0.045 ± 0.026 (15)	0.010 ± 0.006 (2)
HIV-1 _{MDR/G} (X4)	0.029 ± 0.002 (1)	0.392 ± 0.037 (9)	0.029 ± 0.020 (10)	0.019 ± 0.005 (4)
HIV-1 _{MDR/TM} (X4)	0.064 ± 0.032 (2)	0.406 ± 0.082 (9)	0.047 ± 0.009 (16)	0.007 ± 0.003 (1)
HIV-1 _{MDR/MM} (R5)	0.042 ± 0.001 (1)	0.313 ± 0.022 (7)	0.040 ± 0.002 (13)	0.027 ± 0.008 (5)
HIV-1 _{MDR/JSL} (R5)	0.235 ± 0.032 (8)	0.531 ± 0.069 (12)	0.635 ± 0.065 (212)	0.028 ± 0.008 (6)

The amino acid substitutions identified in the protease-encoding region of HIV-1_{ERS104pre}, HIV-1_C, HIV-1_G, HIV-1_{MM}, HIV-1_{JSL} compared to the consensus type B sequence cited from the Los Alamos database include L63P; L101, I15V, K20R, L24I, M36I, M46L, I54V, I62V, L63P, K70Q, V82A, L89M; L101, V11I, T12E, I15V, L19I, R41K, M46L, L63P, A71T, V82A, L90M; L101, K14R, R41K, M46L, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M; L101, K43T, M46L, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M, Q92K; and L101, L24I, I33F, E35D, M36I, N37S, M46L, I54V, R57K, I62V, L63P, A71V, G73S, V82A, respectively. HIV-1_{ERS104pre} served as a source of wild-type HIV-1. The IC₅₀ values were determined by using PHA-PBMs 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 IC₅₀ values for each isolate compared to the IC₅₀ values for wild-type HIV-1_{ERS104pre}. All assays were conducted in duplicate, and the data shown represent mean values (±1 standard deviations) derived from the results of two or three independent experiments. Amprenavir = APV; Atazanavir = ATV; Darunavir = DRV.

multidrug-resistant clinical isolates tested. The reason for its impressive potency against multidrug-resistant clinical isolates is possibly due to its ability to make extensive hydrogen-bonds with the protease backbone in the S2 subsite and its ability to fill in the hydrophobic pockets in the S1'–S2' subsites effectively.

In conclusion, incorporation of stereochemically defined and conformationally constrained cyclic ethers into the allophenyl-norstatine resulted in a series of potent protease inhibitors. The promising inhibitors **3b** and **3c** are currently being subjected to further in-depth biological studies. Design and synthesis of new

classes of inhibitors based upon above molecular insight are currently ongoing in our laboratories.

Acknowledgement

The financial support of this work is provided by the National Institute of Health (GM 83356).

References and notes

- Sepkowitz, K. A. *N. Eng. J. Med.* **2001**, *344*, 1764–1772.
- Kohl, N. E.; Emini, E. A.; Schleif, W. A.; Davis, L. J.; Heimbach, J. C.; Dixon, R. A. F.; Scolnick, E. M.; Sigal, I. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 4686–4690.
- (a) Pillay, D.; Bhaskaran, K.; Jurriaans, S.; Prins, M.; Masquelier, B.; Dabis, F.; Gifford, R.; Nielsen, C.; Pedersen, C.; Balotta, C.; Rezza, G.; Ortiz, M.; de Mendoza, C.; Kücherer, C.; Poggensee, G.; Gill, J.; Porter, K. *AIDS* **2006**, *20*, 21–28; (b) Grabar, S.; Pradier, C.; Le Corfec, E.; Lancar, R.; Allavena, C.; Bentata, M.; Berlureau, P.; Dupont, C.; Fabbro-Peray, P.; Poizot-Martin, I.; Costagliola, D. *AIDS* **2000**, *14*, 141–149.
- Wainberg, M. A.; Friedland, G. *JAMA* **1998**, *279*, 1977–1983.
- (a) Ghosh, A. K.; Kincaid, J. F.; Cho, W.; Walters, D. E.; Krishnan, K.; Hussain, K. A.; Koo, Y.; Cho, H.; Rudall, C.; Holland, L.; Buthod, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 687–690; (b) Koh, Y.; Maeda, K.; Ogata, H.; Bilcer, G.; Devasamudram, T.; Kincaid, J. F.; Boross, P.; Wang, Y.-F.; Tje, Y.; Volarath, P.; Gaddis, L.; Louis, J. M.; Harrison, R. W.; Weber, I. T.; Ghosh, A. K.; Mitsuya, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3123–3129; (c) Ghosh, A. K.; Pretzer, E.; Cho, H.; Hussain, K. A.; Duzgunes, N. *Antiviral Res.* **2002**, *54*, 29–36.
- Yoshimura, K.; Kato, R.; Kavlick, M. F.; Nguyen, A.; Maroun, V.; Maeda, K.; Hussain, K. A.; Ghosh, A. K.; Gulnik, S. V.; Erickson, J. W.; Mitsuya, H. *J. Virol.* **2002**, *76*, 1349–1358.
- Ghosh, A. K.; Sridhar, P. R.; Leshchenko, S.; Hussain, A. K.; Li, J.; Kovalevsky, A. Y.; Walters, D. E.; Wedekind, J. K.; Grum-Tokars, V.; Das, D.; Koh, Y.; Maeda, K.; Gatanaga, H.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5252.
- Koh, Y.; Das, D.; Leshchenko, S.; Nakata, H.; Ogata-Aoki, H.; Amano, M.; Nakayama, M.; Ghosh, A. K.; Mitsuya, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 997–1006.
- (a) FDA approved Darunavir on June 23, 2006: FDA approved new HIV treatment for patients who do not respond to existing drugs. Please see: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108676.htm> (b) On October 21, 2008, FDA granted traditional approval to Prezista (darunavir), co-administered with ritonavir and with other antiretroviral agents, for the treatment of HIV-1 infection in treatment-experienced adult patients. In addition to the traditional approval, a new dosing regimen for treatment-naïve patients was approved.
- Ghosh, A. K.; Chapsal, B. D.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 78–86.
- Ghosh, A. K.; Ramu Sridhar, P.; Kumaragurubaran, N.; Koh, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 939–950.
- Mimoto, T.; Terashima, K.; Nojima, S.; Takaku, H.; Nakayama, M.; Shintani, M.; Yamaoka, T.; Hayashi, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 281–293.
- Yoshimura, K.; Kato, R.; Yusa, K.; Kavlick, M. F.; Maroun, V.; Nguyen, A.; Mimoto, T.; Ueno, T.; Shintani, M.; Falloon, J.; Masur, H.; Hayashi, H.; Erickson, J.; Mitsuya, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 8675–8680.
- Ghosh, A. K.; Thompson, W. J.; Holloway, M. K.; McKee, S. P.; Duong, T. T.; Lee, H. Y.; Munson, P. M.; Smith, A. M.; Wai, J. M.; Darke, P. L.; Zugay, J.; Emini, E. A.; Schleif, W. A.; Huff, J. R.; Anderson, P. S. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2300–2310.
- Ohmoto, K.; Okuma, M.; Yamamoto, T.; Kijima, H.; Sekioka, T.; Kitagawa, K.; Yamamoto, S.; Tanaka, K.; Kawabata, K.; Sakata, A., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *9*, 1307–1323.
- Ikunaka, M.; Matsumoto, J.; Nishimoto, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1201–1208.
- Iwona Kudyba, I.; Raczko, J.; Jurczak, J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2844–2850.
- Ghosh, A. K.; Duong, T. T.; McKee, S. P. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2781–2784.
- (a) Ghosh, A. K.; Leshchenko, S.; Noetzel, M. J. *Org. Chem.* **2004**, *69*, 7822–7829; (b) Ghosh, A. K.; Gemma, S.; Takayama, J.; Baldrige, A.; Leshchenko-Yashchuk, S.; Müller, H. B.; Wang, Y.-F.; Kovalevsky, A. Y.; Koh, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3703–3713; (c) Ghosh, A. K.; Gemma, S.; Baldrige, A.; Wang, Y.-F.; Kovalevsky, A. Y.; Koh, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6021–6033.
- Toth, M. V.; Marshall, G. R. A. *Int. J. Pep. Protein Res.* **1990**, *36*, 544–550.
- Vega, S.; Kang, L.-W.; Velazquez-Campoy, A.; Kiso, Y.; Amzel, L. M.; Freire, E. *Proteins* **2004**, *55*, 594–602.
- Kovalevski, A. Y.; Louis, J. M.; Aniana, A.; Ghosh, A. K.; Weber, I. T. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 178–192.

第 23 回日本エイズ学会シンポジウム記録

シンポジウム「これからの抗 HIV 薬研究の進むべき方向」

Perspectives of Anti-HIV Research

馬場 昌範¹⁾, 中田 浩智²⁾, 朝光かおり³⁾, 駒野 淳⁴⁾, 岡本 実佳¹⁾, 杉浦 亙⁵⁾
*Masanori BABA*¹⁾, *Hiroto NAKATA*²⁾, *Kaori ASAMITSU*³⁾, *Atsushi KOMANO*⁴⁾,
*Mika OKAMOTO*¹⁾ and *Wataru SUGIURA*⁵⁾

¹⁾ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター, ²⁾ Experimental Retrovirology Section, Medicine Branch, NCI, NIH, USA, ³⁾ 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学, ⁴⁾ 国立感染症研究所エイズ研究センター, ⁵⁾ 国立病院機構名古屋医療センター/国立感染症研究所

はじめに (馬場昌範)

1985年に満屋博士らによって、最初の抗 HIV 効果である zidovudine が同定されて以来、核酸系逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬、そして非核酸系逆転写酵素阻害薬と、異なる作用機序を持った薬剤が次々と実用化された。複数の抗 HIV 薬が出そろったことにより、これらを組み合わせた多剤併用療法が確立され、エイズは「不治の病」から「制御可能な慢性疾患」へと、その姿を大きく変えるに至った。一方で、種々の薬剤を長期間使用することによる、多剤耐性ウイルス出現や長期毒性などの問題が次第に明らかとなってきた。HIV は変異しやすく、これを阻止するためには服薬アドヒランスを高く保つ必要があり、アドヒランスを高く保つためには、服薬回数が少なくすむ、長期毒性が低い治療薬であることが求められる。つまり、この2つの問題点はお互いに密接な関係を持って存在している。最近では、これらの欠点を改良した新世代の逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬が開発されるとともに、インテグラーゼやウイルス侵入機構を標的とした、新しい抗 HIV 薬も実用化され、臨床の現場で使用されるようになった。このように、成熟期に達した感のある抗 HIV 化学療法であるが、既存の耐性ウイルスに有効な新薬が登場したとしても、それに対する薬剤耐性ウイルスの発生を阻止できないと思われる。つまり、新薬開発と耐性ウイルスのいわゆる「いたちごっこ」は当分の間続くと思われる。そこで、本シンポジウムでは、新しいアプローチに基づく治療法の研究をテーマとして、この分野において精力的に研究活動を行っている若手研究者4名に、それぞれの研究成果について発表をして頂き、これからの抗 HIV 薬研究の

進むべき方向について考えてみた。

新しい抗 HIV 薬の標的分子 (駒野 淳, 馬場昌範)

新しい抗 HIV 薬開発には大別して2つの方向性がある。既存の薬剤と同じ分子を標的とするが、既存の治療薬よりも耐性ウイルスに対する効果の点から優れた薬剤の開発と、新規治療標的分子を狙った薬剤の開発である。前者は新世代の非核酸系逆転写酵素阻害薬である etravirine (TMC125) やプロテアーゼ阻害薬である dolutegravir、後者は最近我が国でも認可された CCR5 阻害薬がその代表例にあたる。新規標的分子を狙った薬剤の開発を考えた場合、標的分子としてのウイルス遺伝子産物には、逆転写酵素に内在する RNase H ドメイン、Env、Gag、Tat、Rev、Vpr、Nef、Vpu、Vif などがある。RNase H ドメイン以外は酵素活性がない。そのため、阻害薬の作用メカニズムはこれらの標的分子に結合してその分子機能を阻害するか、標的分子が機能を発揮するために相互作用する分子との結合を阻害することを狙った薬剤開発になる。前者の例としては Env 機能阻害薬がある。後者は相互作用パートナーがウイルスか宿主遺伝子産物によってさらに2つに分類される。相互作用パートナーがウイルス遺伝子産物の例として、Gag-Gag、Tat-TAR、Rev-RRE などがある。一方、相互作用パートナーが宿主遺伝子産物の例として、Env-CCR5、Env-CD4、Gag-Tsg101、Tat-Cyclin T1、(CycT1)、Rev-CRM1、Vpu-Tetherin/BST-2、Vif-APOBEC3G/F などがある。CCR5 阻害薬はここに分類される。これらの分子間相互作用はウイルス複製にとって必須であるため、相互作用阻害薬には選択的な抗 HIV 効果が期待できる。また、現在の薬剤と作用メカニズムが異なるため、既存の薬剤に対する耐性ウイルスにも効果が期待できる。CCR5 阻害薬の臨床的成功を受けて、今後の新規 HIV 感染症治療薬開発はウイルスと宿主因子の相互作用を断ち切るような薬剤の開発に向かうことが予想される。中でも宿主遺伝子産物に結合する阻害薬への期待は高い。

著者連絡先: 馬場昌範 (〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1
 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター)

2010年4月19日受付

HIV 感染における CCR5 の挙動 (中田浩智)

CCR5 は 7 回膜貫通型構造の G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) スーパーファミリーの一員であり, CC ケモカインに対する受容体 (ケモカインレセプター) として機能する一方で, 同じく GPCR ファミリーに属する CXCR4 と共に HIV 感染の主要なコレセプターの一つとなっている^{1,2)}. 近年, HIV の CCR5 への結合を阻害する抗 HIV 薬 maraviroc が米国食品医薬品局 (FDA) で認可され日本でも臨床に供されるなど³⁾, CCR5 は HIV 感染に関連する重要な宿主因子として, 様々な側面から研究がなされている。しかしながら, HIV の侵入・接着のステップにおける CCR5 の詳細な動態については, 未だに明らかになっていない部分が多い。我々は一アミノ酸置換で HIV に対する感染性が著明に低下する 4 種類の変異型 CCR5 を同定, これらの変異を用いて, 変異型 CCR5 と野生型 CCR5 を様々な比率で共発現させた細胞株を作成した。これらの細胞株に CCR5 指向性 HIV を感染させ, 変異型 CCR5 の発現比率が細胞株の HIV 感染性に与える影響を調べることで, HIV 感染における CCR5 の動態解明を試みた。まず, 野生型 CCR5 のみを発現させた細胞株で, 発現している CD4 数または CCR5 数と HIV 感染性の間どのような相関があるかを調べると, 我々の感染実験系では CCR5 が十分 (10^4 ABS 以上, ABS : antibody binding site) に発現している細胞株では HIV 感染性は主に CD4 数に依存していることがわかった。そこで, CD4 の発現レベルがほぼ等しく, 本来同程度の HIV 感染性が期待される数十種の細胞株を用い, 変異型 CCR5 と野生型 CCR5 の発現比率を変化させ, 細胞株の HIV 感染性がどのように変化するかを調べた。その結果, いずれの変異型 CCR5 を用いた場合でも, 変異型 CCR5 の発現比率の増加に伴い細胞株の HIV 感染性の低下が認められた。HIV 感染性の低下は, 野生型 CCR5 数が維持されている (10^4 ABS 以上) 細胞株でも観察され, 感染性の低下は, 野生型 CCR5 数の減少ではなく変異型 CCR5 の発現比率の増加に起因していると考えられた。特に変異型 CCR5 の比率が 50% 近くまで増加すると, 野生型 CCR5 数が十分維持されていても, 感染性が変異型 CCR5 のみを発現させた細胞株とほぼ同程度まで低下することが分かった。これらの感染実験の結果を詳細に解析することで, 我々は (1) HIV の侵入に複数の CCR5 の関与 (cluster 形成) が必要であることを明らかにし (CCR5 cluster モデルの提唱), 更に (2) CCR5 cluster モデルを基にした数学モデルによる, HIV 感染に要する CCR5 数の推定, (3) CCR5 cluster モデルを応用した CCR5 阻害剤の作用発現機序の解明についても検討を行った (図 1)。今回得られた知見は HIV 感染における CCR5 の動態

解明に有用であるだけでなく, CCR5 阻害剤を始めとする侵入阻害剤の開発にも応用可能であると考えられる。

HIV 転写を標的とした新規治療法の開発 (朝光かおり)

HIV 感染症の治療は, HAART 療法が確立され画期的な進歩を遂げた。現在, 治療に用いられている薬剤は, 逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が主流であり, 最近ではインテグラーゼ阻害剤も上市され臨床応用が可能となっている。しかしながら, これらの薬剤はウイルスの酵素を標的としているため耐性ウイルスの出現を抑えることができず, またその重篤な副作用などからも依然として新規作用機構を持つ抗 HIV 薬が求められているのが現状である。そこで我々が注目したのが HIV プロウイルスからの遺伝子増幅過程である。HIV のライフサイクルを HIV 遺伝子の増幅過程という観点からみると, HIV-RNA から DNA が合成される逆転写の段階と, DNA に組み込まれた HIV プロウイルスからの転写活性化過程に分けることができる。逆転写の段階では, ウイルス RNA は逆転写酵素のもつ RNase H によってただちに分解されるため遺伝情報量の増大は見られないが, HIV プロウイルスからの転写過程ではウイルスの遺伝情報量は何千倍にも増大されるため, この転写過程がウイルス複製の律速段階となる。このプロウイルス DNA から転写は, 宿主内転写因子 NF- κ B とウイルス由来転写活性化因子 Tat の作用により綿密に制御されており, これらの転写因子により HIV はレトロウイルスとしては例外的にきわめて多量のウイルス産生がされる。その結果, HIV は様々な病原性や強い伝播性の獲得, 容易な宿主免疫や治療薬への耐性の出現が可能となっている。

HIV プロウイルスからの転写を標的とした抗 HIV 戦略を考えた場合, 標的分子としてあげられるのは上記の Tat と NF- κ B であり, それぞれ Tat 阻害剤, NF- κ B 阻害剤と定義することができる。これらを標的とした阻害剤の長所として, (1) 現行の HAART 療法と併用可能であり副作用等の軽減をすることができること, (2) 遺伝子の増幅過程をターゲットとしているため, 薬剤耐性ウイルス等の出現を抑えることができることがあげられる。Tat 阻害剤に関する短所としては, 有効な化合物が得られていないこと, NF- κ B 阻害剤に関しては NF- κ B の作用が多岐にわたるためしばしば副作用が問題になることがあげられる。我々は, これら Tat 阻害剤, NF- κ B 阻害剤のについて日々研究を行っているが, 本稿では以下に Tat 阻害薬について紹介する。

Tat はウイルス mRNA の 5' 端にできる TAR と呼ばれるステム・バルジ・ループ構造に, CycT1 と CDK9 からなる P-TEFb と共に複合体を形成し, HIV 遺伝子の転写伸

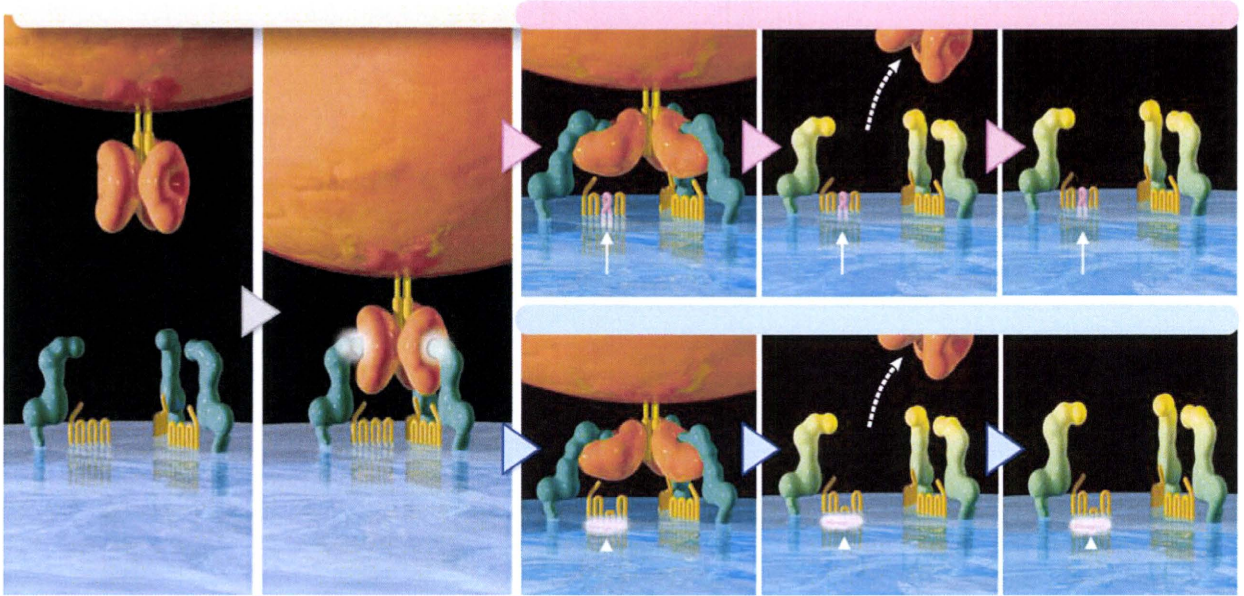


図 1

図 1 CCR5 阻害剤の作用発現機序のモデル。
HIV 感染に関与する複数の CCR5 (CCR5 cluster) の一部に変異型 CCR5 (白矢印) が混入すると、標的細胞の感染に対する感受性が低下する (パネル上段) のと同様に、CCR5 cluster の一部に阻害剤が結合した CCR5 (白矢頭) が存在すると、CCR5 と gp120 との相互作用が阻害され HIV 感染が効果的にブロックされる (パネル下段)。

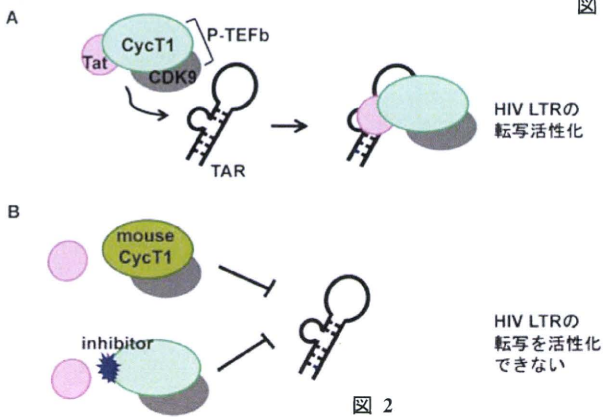


図 2

図 2 Tat による HIV LTR の転写活性化機構。
A) Tat は CycT1 と CDK9 からなる P-TEFb とともに HIV LTR 上の形成される TAR と結合し、HIV 遺伝子の転写を活性化する。B) Tat と結合できないマウス型 CycT1 や、Tat と CycT1 の結合を阻害する阻害剤の存在下では、Tat は TAR と結合できず、従って HIV 遺伝子の転写を活性化できない。

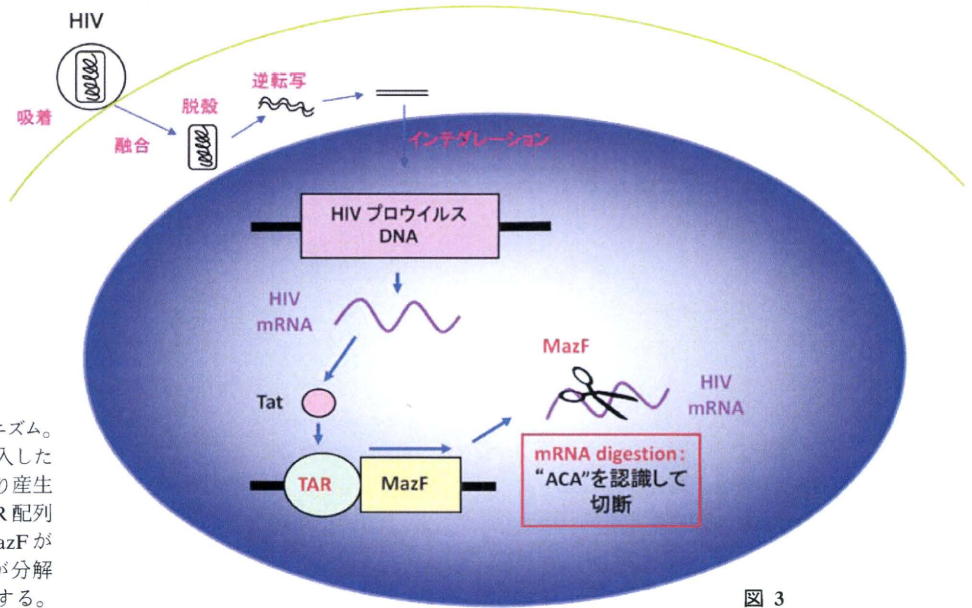


図 3

図 3 MazF の抗 HIV 作用メカニズム。
MazF 発現ベクターを導入した細胞では、HIV 感染により産生された Tat 蛋白質が TAR 配列に結合することにより MazF が発現して HIV mRNA が分解され HIV の産生を抑制する。

長レベルで活性化する(図2A)⁴⁾。この複合体の形成には CycT1 上の TRM と呼ばれる領域が重要であり、この領域に変異があるマウス型 CycT1 が Tat と結合できず、そのため HIV-LTR からの転写を誘導できない(図2B)。Tat の機能は CycT1 との結合により初めて発揮されるといえ、この結合を阻害できる薬剤が開発できれば、有効な抗 HIV 薬として作用することが期待できる。そこで、Tat との結合に必要な CycT1 のタンパク質立体構造を標的とした *in silico* スクリーニングにより、CycT1 と Tat の相互作用を標的とした抗 HIV 薬の開発を試みることにした。現在、活性化化合物を得ており、さらなる検討を行っている。今後、転写を標的とした新規抗 HIV 薬の開発を進めることにより、爆発的なウイルス複製を背景に出現する薬剤耐性ウイルスの出現を阻止できるのみならず、HIV 潜伏感染細胞からのウイルス再活性化を有効な阻止となることが期待される。

オーミクス解析手法による治療分子標的の同定 (駒野 淳)

宿主因子を標的にする抗レトロウイルス薬の開発は、既知の HIV 複製制御因子を対象にした開発研究と、新規の創薬分子標的を同定する研究を並行して行う必要がある。これを基にして次世代、次々世代の抗レトロウイルス薬を開発していくためである。既知の創薬分子標的に関する研究は他項に譲り、ここでは新規創薬分子標的の発掘研究に焦点を当てる。

近年、ヒト全ゲノムが明らかとなり、分子生物学研究法がより一層の進歩を見せ、ゲノムワイドな網羅的研究手法が成熟してきた。これは新規創薬分子標的を同定する研究

に大きな影響を与えている。新しい研究手法は HIV 複製制御因子を機能的なアッセイ系を利用してゲノムワイドに探索する「機能的オーミクス研究」である。オーミクス解析は細胞に発現している全てのヒト遺伝子について評価を行うことを意味する。機能的オーミクス研究とはヒト細胞を使用した cell-based アッセイに基づいて、ヒト遺伝子発現レベルを増減させたときにウイルス複製に与える影響を直接評価する研究を指す。酵母細胞を利用した two-hybrid アッセイを代表とするウイルスタンパク質への結合因子スクリーニングとは「機能的」という意味で一線を画す。全ての研究例を当稿で網羅することは困難であるが、その一部を紹介しつつ機能的オーミクス研究による新たな HIV 感染症治療の創薬標的の同定に関する問題点と将来像を展望しよう(表1)。

機能的オーミクス研究は内在性遺伝子発現抑制型と遺伝子強制発現型の2種類に大別される。内在性遺伝子発現抑制型は全てのヒト遺伝子に対する siRNA/shRNA を構築し、一つずつ細胞に導入し、ウイルス複製へのインパクトを評価する方法である。このアプローチを用いて HIV の複製を制御する候補遺伝子をゲノムワイドに評価した論文が近年3つの研究グループから発表された⁵⁻⁷⁾。それぞれ約100種類程度の宿主因子を HIV 複製制御因子として同定している。それらは HIV 複製阻害剤の創薬分子標的候補に位置づけられる。これらの研究結果は HIV-宿主相互作用の全体像を把握するために多くの情報をもたらしてくれる。しかし、問題点も存在する⁸⁾。例えば、3つの報告の HIV 複製制御遺伝子の多くは重複していない。また、HIV 複製に必須とされる既知の宿主因子が含まれていない。この原因の一つとして指摘されているのは実験条件と使用された細胞

表 1 HIV-1 複製制御因子を同定するための代表的な機能的スクリーニング系

実験系の分類		代表例
上皮系細胞	遺伝子発現抑制型 siRNA/shRNA ライブラリー, 一過性発現	Zhou et al., Cell Host Microbe 2008 Brass et al., Science 2008 Konig et al., Cell 2008
	遺伝子発現増強型 cDNA ライブラリー, 恒常的発現	Stremmler et al., Nature 2004 Valente et al., Mol Cell 2006 Valente et al., PNAS 2009
ヒト T 細胞	遺伝子発現増強型 cDNA ライブラリー, 恒常的発現	Kawano et al., J Virol 2004 Yoshida et al., Traffic 2008 Urano et al., FEBS Lett 2008 Urano et al., Vaccine, in press

の種類である。遺伝子発現の抑制効率は siRNA/shRNA ライブラリーの質、標的 mRNA の量、半減期、siRNA/shRNA 導入からの時間に大きく左右される。細胞株によっても遺伝子発現抑制の効率は異なる。つまり、それぞれの実験結果は正しいが、それを再現するためには非常に厳密な条件設定を求められるということである。siRNA/shRNA を細胞に効率よく導入するためには上皮系細胞を対象にしなければならないという制約もある。3つの研究で使用されている細胞は上皮系細胞で、本来 HIV が複製増殖する細胞ではないのはこのためである。HIV が主として感染する CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルは上皮系細胞とは異なる。そのため、上皮系の細胞で得られた実験結果が CD4 陽性 T 細胞において再現できるのかを改めて評価する必要がある。網羅性についてはどう評価されるのであろうか。siRNA/shRNA による研究アプローチでは、実験に使用する細胞に標的遺伝子発現が認められないと評価できない。CD4 陽性 T 細胞と上皮系細胞の遺伝子発現プロファイルは異なる上、両者に同じ遺伝子が発現していても遺伝子発現レベルや発現制御機構が同じとは限らない。内在性遺伝子発現抑制型アプローチによる HIV 複製制御因子同定研究は、魅力的な反面、潜在的な問題点も多く内包していることがわかる。

一方、遺伝子強制発現型の例としては、全遺伝子の全長 ORF を持つ哺乳類細胞発現ベクターを準備し、一つずつ細胞に導入して、ウイルス複製へのインパクトを評価する方法がある。HSV-1 感染に対する宿主防御反応因子 STING はこのような方法で同定された^{9,10}。同様のアプローチを HIV に対して施行した例はない。より古典的な方法として、哺乳類細胞 cDNA 発現ライブラリーを用いた研究も遺伝子強制発現型に分類される。この研究手法では cDNA ライブラリーの中から HIV 複製過程を最も強く制御する因子を選択して同定する。CXCR4 がウイルスの受容体として同定されたのはこの手法の代表的な研究成果である¹¹。機能的スクリーニングによって cDNA ライブラリーから候補遺伝子を同定する研究手法の問題点は、cDNA ライブラリーの品質 (complexity, 平均鎖長など)、cDNA ライブラリーが由来する細胞/組織によって実験結果が大きく左右されることである。例えば、CD4 陰性の細胞から得られた cDNA ライブラリーを材料に使用すれば、HIV 複製制御因子として CD4 を回収することは不可能である。もう一つの問題点は、この手法では最終的に一握りの候補遺伝子が濃縮されることである。これは大きな特徴である反面、中程度～弱い活性がある遺伝子は見逃されてしまう危険性がある。これらの中にも優れた創薬分子標的がある可能性は否定できない。また、候補遺伝子として選択されなかった遺伝子が HIV 複製と無関係かも厳密には評価で

きない。遺伝子導入が容易であるため多くの研究で上皮系細胞が使われていることも内在性遺伝子発現抑制型アプローチと同じ問題点である。

機能的オーミクス研究を論じるうえで重要な3つの要点、使用する細胞、遺伝的多様性、発現制御の時間的制御についてさらに考察を深めてみよう。本来 HIV が感染し増殖する細胞の背景を用いなければ、真に重要な創薬分子標的を見逃してしまう危険性があることは先に述べた。一方、CD4 陽性 T 細胞を代表とする HIV 感染標的細胞は遺伝子導入が容易ではないため、スクリーニングの使用には適していない。このような背景から、現実的に機能的オーミクス研究に適している研究対象はヒト T 細胞株と考えられる。しかし、ヒト T 細胞株を機能的オーミクス研究に使用している研究グループは世界でも稀である。

次に多様な遺伝子をカバーするためにどのような研究手法が適しているかを考えてみよう。全長 ORF を持つ哺乳類細胞発現ベクターや siRNA/shRNA を使用した研究アプローチでは、遺伝子発現を増減させることができる。これに対し、cDNA ライブラリーは遺伝子のドメインだけが発現することにより、遺伝子全長 ORF が発現することで得られる効果とは質的に異なる多様な生物活性を現す。創薬標的を考える上では、遺伝子断片が持つウイルス抵抗性も貴重な情報源となる。その典型的な例が hnRNP U の N 末端断片や Brd4 の C 末端ドメインである^{12,13}。この意味で cDNA ライブラリーによる研究手法は siRNA/shRNA アプローチは全長 ORF ほ哺乳類細胞発現ベクターにはない優位性がある。

遺伝子発現の時間的制御も研究結果を大きく左右する。一過性の遺伝子発現制御は細胞毒性などのリスクを伴うため、ウイルス複製への影響が特異的かの判断に注意を要する。一方、恒常的な遺伝子発現制御は、細胞増殖に影響を与えない条件下でウイルス複製を評価できる点で、ウイルス複製を特異的に制御する機能分子を得られる可能性が高い。抗レトロウイルス薬の創薬分子標的としては、細胞生理に影響を与えずにウイルス複製を抑制するほうが好ましい。従って、創薬標的の同定を目指すのであれば、恒常的な遺伝子発現制御系の方がより適していると考えられる。

これら全てを勘案し、我々は cDNA ライブラリーを恒常的に発現させたヒト T 細胞株を樹立して、その細胞から HIV 複製制御因子の同定を行っている^{13,14}。恒常的な遺伝子発現を達成するためにレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターにより cDNA ライブラリーを細胞に送達している。cDNA ライブラリーによるバイアスを軽減するために複数の cDNA ライブラリーを使用し、多様な遺伝子を弱い活性分子も見逃さないために優性形質を与える候補遺伝子が濃縮されないような工夫も行っている。我々はこの

実験系にて DNA J B6/HSP40 B6, bromodomain containing 4 (brd4) の C 末端ドメイン, SEC14-like 1a (SEC14L1a) の C 末端ドメインなどが HIV 複製制御因子であることを同定した。これらは siRNA/shRNA や cDNA ライブラリーを使用した他の研究では同定されていない。これは我々の研究アプローチが他の研究手法を補完する有用なものであることを示している。cDNA ライブラリーの合成, クローニング, ウイルスペクターの構築, ヒト T 細胞株への遺伝子導入を通じて, 特定の cDNA が脱落する可能性は否定できない。このような潜在的な問題点がある一方で, 新しい HIV 複製制御因子が同定されていることを考えると, 我々の実験系には潜在的な問題点を越えた有用性があると思われる。これらが HIV 感染症治療薬の創薬分子標的候補として価値が高いかを判断するための研究を重ねていくのと並行して, 多様な細胞や組織由来の cDNA ライブラリーを用いた新たなスクリーニングを系統的に行う必要もあると考えている。

RNA 分解酵素 MazF を発現する新規レトロウイルススペクターを用いたエイズ遺伝子治療法の開発 (岡本実佳)

多剤耐性 HIV や長期使用による薬剤の慢性毒性の出現などの理由による HAART 療法適合困難症例に対応する治療法の確立を目指し, タカラバイオ社において HIV の転写因子である Tat 依存性に RNA 分解酵素 MazF を発現するレトロウイルススペクターを用いた新規エイズ遺伝子治療法が開発された。

MazF は米国ニュージャージー医科歯科大学の井上正順教授らにより発見された, mRNA の ACA 配列の 5' 末端を特異的に認識して切断する大腸菌由来の RNA 分解酵素である^{15,16)}。ほとんどの細菌はそれらのゲノムにおいて多数の自殺遺伝子あるいは毒素遺伝子を持つ。通常の状態ではそれら毒素は抗毒素と複合体を形成しており毒性は生じないが, 様々なストレス環境下では, 毒素より安定性が低い抗毒素が ATP 依存性セリンプロテアーゼにより分解される結果, 毒素が放出され, ゆくゆくは細菌を殺す。MazF はそのような毒素の一つである。mRNA は切断するが, rRNA や tRNA, 一本鎖 DNA は ACA 配列が存在しても切断しない。また, タンパク合成は阻害するが, DNA あるいは RNA 合成は阻害しない。

タカラバイオ社では, HIV 遺伝子に ACA 配列が 240 箇所以上存在することに着目し, TAR 配列の下流に MazF 遺伝子を導入したレトロウイルススペクターを開発した。このベクターを導入した細胞では, HIV 感染により産生された Tat 蛋白質が TAR 配列に結合することにより MazF が発現して HIV mRNA が分解され HIV の産生を抑制する

ことが期待できる。そこで, MazF 発現ベクター導入細胞における抗 HIV 効果を in vitro において検討した。実験の結果, 複数の健常人ドナーから得られた PBMCs, CD4 陽性 T リンパ球いずれにおいても MazF 発現ベクター導入により, 実験室株, 臨床株を含めた HIV の X4, R5, R5X4 株すべてに対して著しい感染抵抗性を示した。さらに, 多剤耐性 HIV 株に対しても同様に強くウイルス産生を抑制した。しかし, MazF 発現ベクター導入自体による生細胞率への影響はなかった。

HIV は遺伝子変異出現頻度が非常に高いことからこれまで化学療法, 遺伝子治療どちらにおいても耐性 HIV の克服は困難であった。しかし, 本法では変異 HIV の mRNA も ACA 配列が存在する限り切断することが可能であるため, 耐性 HIV の出現を限りなく抑制できると考えられる。そこで, HIV 感染 CD4 陽性 T リンパ球と非感染 MazF 発現ベクター導入あるいは非導入 CD4 陽性 T リンパ球の長期共培養実験を行った。その結果, 約 60 日間において MazF 発現ベクター導入 CD4 陽性 T リンパ球との共培養サンプルにおける HIV 産生量は常に非導入 CD4 陽性 T リンパ球との共培養サンプルより低く抑えられた。これらの結果から, この MazF 発現ベクターは導入細胞において細胞毒性を示すことなく, HIV 複製に対して強い阻害効果を持ち, また, かなりの期間, 耐性ウイルスの出現を抑制することが明らかとなった。

遺伝子治療法は高価な治療法であることから, 現実的には多剤耐性 HIV などによる HAART 療法適合困難症例に対応する治療法となり, これからも HIV 感染症治療の第一選択は化学療法であり続けると考えられる。しかし, 本法のような遺伝子治療法によって, 多剤耐性 HIV 感染者の減少を導くことができれば, 結果的に HAART 療法による HIV 根絶推進に大きく寄与すると期待される。

(本研究はタカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター 蝶野英人氏らとの共同研究である)

おわりに (杉浦 互)

冒頭にも述べたように, 治療薬の進歩により多くの HIV 感染者は既存の薬剤の組み合わせだけで, 寿命を全う出来るであろう今日, 新薬の開発は何処を目指すべきなのだろうか。忘れてはいけないのは, 私たちは未だにワクチンによる prevention も薬剤による eradication も手にしてはいないことである。HIV は robustness (頑健性) の高い病原体である。しかしその度合いが高いほど, 必ず脆弱な部分を持っているはずである。インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの登場以降, しばしば eradication という封じられた言葉を耳にするようになった。今回の 4 名の若手研究者のうちどなたが実用化に一番乗りをするのか, そして eradi-

cation の未来へ希望の道をつないでいくのか今後の活躍を期待したい。

文 献

- 1) Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA : CC CKR5 : a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272 : 1955-1958, 1996.
- 2) Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ : Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273 : 1856-1862, 1996.
- 3) Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeiler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, Mayer H : Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 359 : 1429-1441, 2008.
- 4) Karn J : Tackling Tat. *J Mol Biol* 293 : 235-254, 1999.
- 5) Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ : Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319 : 921-926, 2008.
- 6) Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, Stec E, Ferrer M, Strulovici B, Hazuda DJ, Espeseth AS : Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4 : 495-504, 2008.
- 7) Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK : Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135 : 49-60, 2008.
- 8) Goff SP : Knockdown screens to knockout HIV-1. *Cell* 135 : 417-420, 2008.
- 9) Ishikawa H, Barber GN : STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455 : 674-678, 2008.
- 10) Ishikawa H, Ma Z, Barber GN : STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461 : 788-792, 2009.
- 11) Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA : HIV-1 entry cofactor : functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272 : 872-877, 1996.
- 12) Valente ST, Goff SP : Inhibition of HIV-1 gene expression by a fragment of hnRNP U. *Mol Cell* 23 : 597-605, 2006.
- 13) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J : Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* 582 : 4053-4058, 2008.
- 14) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J : T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*, in press.
- 15) Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, Ikura M, Qinq G, Inouye M : MazF cleavages cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 12 : 913-923, 2003.
- 16) Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M : Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J Biol Chem* 280 : 3140-3150, 2005.

7. HIV 感染症 / AIDS 治療の進歩の展望 ～ HIV のアキレス腱は他にもあるか～

馬場 昌範
Baba Masanori

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 附属難治ウイルス病態制御研究センター 教授

Summary 複数の逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬の組み合わせからなる antiretroviral therapy (ART) の確立により、HIV-1 感染症の様相は劇的に変化した。最近ではインテグラーゼ阻害薬が登場したことで、抗 HIV 化学療法は成熟期を迎えている。そのためか、多くの研究者や製薬企業が新規抗 HIV 薬の開発に関する情熱を失いつつあるように見える。しかし、抗 HIV 薬の長期服用に伴う毒性や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題が完全に克服された訳ではなく、新しい標的分子の同定を含め、今後も新しい抗 HIV 薬を求めて研究は継続されるべきであろう。

はじめに

1985年に満屋博士らによって、最初の抗 HIV 薬であるジドブジン(レトロビル®)が発見されて以来、HIVに関するウイルス学の進歩に伴い多くの抗 HIV 薬が同定され、開発が行われてきた。現在、米国 FDA が認可している抗 HIV 薬は、合剤を除いても、侵入阻害薬2剤、核酸系逆転写酵素阻害薬7剤、非核酸系逆転写酵素阻害薬4剤、プロテアーゼ阻害薬9剤、そしてインテグラーゼ阻害薬1剤の合計23剤に達する(表1)。わが国でも、ほぼ同様の数の薬剤が臨床使用可能である。このように、多数の抗 HIV 薬が出そろったことにより、これらの薬剤を複数組み合わせた多剤併用療法が確立され、エイズは「不治の病」から「制御

可能な慢性疾患」へと、全く別の疾患と言っても過言ではない位にその姿を大きく変えるに至った。では、HIV 感染症 / AIDS を完全に克服できたかと言うと、実際は必ずしもそうとは言い切れない。抗 HIV 薬の中には、不十分な薬効、長期連用による副作用の出現、あるいは薬剤耐性ウイルスの誘導などの問題点などを抱えている。さらに最近では、アドヒアランス(服薬を遵守すること)に優れた、1日1回の服用ですむ薬剤が要求されるという傾向にある。一方、現時点において第Ⅱ相および第Ⅲ相臨床試験中の薬剤、いわゆる「新薬パイプライン」の数が、表2に示すように、過去に比べてかなり減少している。これは「新たな薬剤を開発するコストやリスクを考えると、HIV 感染症 / AIDS 治療は現存の薬剤で十分である」という一

ART (antiretroviral therapy)