

原 著

**bis-tetrahydrofuranylurethane (bis-THF) を含む新規のプロテアーゼ阻害剤
UIC-94017/TMC114 の同定と抗 HIV 活性の検討**関 康博¹⁾, Arun K. Ghosh²⁾, 満屋 裕明¹⁾¹⁾ 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科・感染免疫診療部²⁾ Department of Chemistry, University Illinois at Chicago

目的: 多剤併用療法 (HAART) が HIV 感染症の治療に成果を挙げる一方で薬剤耐性 HIV 株の出現に基づく治療失敗例が増加しており, 耐性変異株に有効でかつ HIV の耐性獲得に抵抗する新規の抗 HIV 剤の開発が急務となっている。我々は bis-tetrahydrofuranylurethane (bis-THF) を含む新規のプロテアーゼ阻害剤 (PI) UIC-94017/TMC114 を同定, ウイルス学的・薬理的・結晶解析学的検討を行った。

方法および結果: MT-2 細胞を用いた MTT assay では, UIC-94017 は HIV-2 を含む広いスペクトラムの HIV に対して (IC_{50} 値: 3-6 nM), また試験管内で誘導した複数の PI (SQV, IDV, NFV, RTV) 耐性変異株に対して (IC_{50} 値: 3-29 nM) 高い活性を発揮した。PHA-PBM を用いた p24 assay でも, 複数の逆転写酵素阻害剤および PIs に対して高度の耐性を有する多剤耐性臨床分離株に対して高い抗 HIV 活性 (IC_{50} 値: 3-4 nM) を発揮した。結晶構造解析では, UIC-94017 はプロテアーゼの主要な活性部位である Asp-29 と Asp-30 の主鎖と極めて強固な水素結合を形成していることが明らかとなった。

結論: UIC-94017 は薬剤耐性 HIV 感染症例での治療剤として有望であると思われる。

キーワード: プロテアーゼ阻害剤, 多剤耐性 HIV-1 変異株, 結晶構造解析, ドラッグデザイン, 臨床試験

日本エイズ学会誌 7: 17-22, 2005

緒 言

1990 年初頭に HIV-1 に対して強力な活性を有するプロテアーゼ阻害剤 (PI) が報告され, 逆転写酵素阻害剤 (RTI) との併用療法 (HAART) が開始されて, AIDS と HIV-1 感染症の病態は大きく改善した¹⁾。しかし, この 1990 年代に開発された PI は種々の臨床的に扱いにくい副作用 (消化器症状, 腎結石, 脂肪代謝異常 *etc*) を有するうえに, 大量・頻回・複雑な服用が必要で, コンプライアンスが悪化, そのため薬効が失われ, HIV-1 の PI に対する耐性発現を助長して, そうした患者での treatment failure (治療の失敗) につながっている²⁾。そのような状況で, ここ数年は 1 日 1, 2 回の服用で PI-耐性変異株にも活性を発揮する PI の開発が進められて来ている。2003 年 6 月に米国等で認可された 1 日 1 回投与の Reyataz (atazanavir: ATV) はその一員である³⁾。しかし, ATV の抗ウイルス活性は強力とは言えず, また既存の PI-耐性株が ATV に対して交叉

耐性を有するなどの報告が見られるようになり, ATV 等より更に強力な活性を多剤耐性株に対して発揮し, しかも耐性の発現しにくい PI の開発が急務となっている。今回我々はユニークな bis-THF グループを有し, 耐性が発現しにくく, 優れた薬理動態を有し, しかも多剤耐性変異株にも極めて高い活性を発揮する UIC-94017/TMC114 を同定し⁴⁾, ウイルス学的・薬理的・結晶解析学的検討を行った。

方 法

化合物の抗 HIV-1 活性の評価法

化合物の抗 HIV-1 活性の評価は MT-2 細胞を用いた MTT assay を行った⁵⁾。また, 多剤耐性臨床分離株を含む複数のウイルス株での活性を検討するためヒト末梢血リンパ球 (PBM), あるいは MT-4 細胞を用いた p24 assay を行った⁶⁾。

PI 耐性誘導変異株の作成

MT-4 細胞に HIV-1_{NL4-3} を感染させ, 種々の濃度 (はじめは各 PI の IC_{50} 値) の PI 存在下で培養, 1 週間ごとにウイルス複製能を培養液中の p24 産生量を測定し, 薬剤存在下でのウイルスの増殖を確認後, 新たな MT-4 細胞を加え

著者連絡先: 関 康博 (〒860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科・感染免疫診療部)

Fax: 096-363-5265

2004 年 7 月 29 日受付; 2004 年 11 月 1 日受理

UIC-94017とamprenavirの構造式

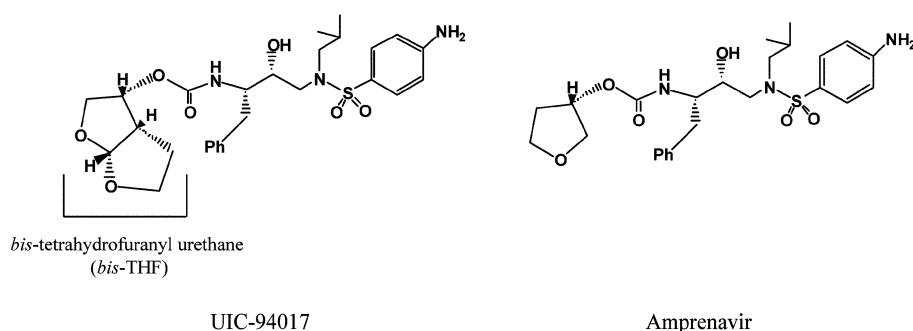


図 1 UIC-94017 と amprenavir の構造

UIC-94017 は P2 部位に *bis*-THF というユニークな構造を有し、amprenavir と共通した sulfonamide isostere 構造を有する。

表 1 UIC-94017 の HIV-1_{LAI} に対する抗ウイルス活性と細胞毒性

compound	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI
UIC-94017	0.003	74.4	24800
SQV	0.017	11.3	660
APV	0.036	>100	>2800
IDV	0.047	70.3	1500

抗 HIV-1 活性、細胞毒性は MT-2 細胞を用いた MTT assay により評価した。HIV-1 感染による MT-2 細胞死を 50% 阻害する濃度を IC₅₀ (μM)、ウイルス非存在下での各薬剤による 50% の MT-2 細胞が傷害される濃度を CC₅₀ (μM) とした。SI: selectivity index (CC₅₀/IC₅₀)

継代し、徐々に薬剤濃度を上昇させ、各 PI (saquinavir (SQV), amprenavir (APV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV)) 耐性変異株を作成した⁷⁾。

結晶構造解析

DMSO に溶解したプロテアーゼ阻害剤と精製した野生型 HIV-1 プロテアーゼの複合体を hanging drop 蒸気拡散法により結晶化、その X 線回折 data をソフトウェア SHELX-97 を用いて結晶構造の解析を行った⁸⁾。

結 果

我々は *bis*-tetrahydrofuranylurethane (*bis*-THF) を有する約 200 種類の *bis*-THF 誘導体より抗 HIV-1 活性の強力な PI, UIC-94017/TMC114 (図 1) を同定した。MT-2 細胞を用いた MTT assay において UIC-94017 は野生株 HIV-1_{LAI} に対して IC₅₀ 値が 0.003 μM と既存の PI と比較して強力

であり、またその細胞毒性 (CC₅₀ 値) は 74.4 μM, selectivity index (CC₅₀/IC₅₀) は 24,800 と既存の PI と比べ非常に大きいことがわかった (表 1)。また、HIV-2 を含む広いスペクトラムの HIV に対し、UIC-94017 は非常に高い活性を発揮した (IC₅₀ 値: 0.003–0.006 μM) (表 2)。

次に薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス活性を検討した。試験管内で 5 μM の各種 PI 存在下で増殖可能となった複数の PI (SQV, IDV, NFV, RTV) 耐性誘導変異 HIV-1 に対して UIC-94017 は高い活性を発揮した (IC₅₀ 値: 0.003–0.029 μM) (表 3)。しかしながら、P2' 部位が 4-aminobenzenesulfonamide と構造の共通している APV の 5 μM 耐性誘導変異 HIV-1 に対しては活性の低下を認めた (IC₅₀ 値: 0.22 μM)。また、過去に 32~83 か月の抗 HIV-1 療法を受けた後治療に失敗し、複数の RTIs および PIs に対して高度の耐性を有するようになった多剤耐性臨床分離株に対する抗ウイルス活性を PHA-PBM を用いた p24 assay を用い検討した。表 4 に示すように、例えば Patient 1 において、野生型の HIV-1 である HIV-1_{ERS104pre} と比較して SQV は 23 倍、APV は 17 倍の IC₅₀ 値の上昇が認められるのに対して UIC-94017 は 0.004 μM と野生型 HIV-1 に対してとほぼ同等の高い抗 HIV 活性を認め、同様に複数の多剤耐性臨床分離株に高い抗ウイルス活性を発揮した (IC₅₀ 値: 0.003–0.004 μM)。

UIC-94017 と野生型 HIV-1 プロテアーゼとの結晶構造解析では、既存の PI が主としてプロテアーゼの活性部位の側鎖に結合するのと異なり、UIC-94017 の *bis*-THF 部位が HIV-1 プロテアーゼの主要な活性部位である Asp-29 と Asp-30 の主鎖 (backbone) と極めて強固な水素結合を形成していることが明らかとなった (図 2)⁹⁾。多くのプロテアーゼ阻害剤はプロテアーゼの活性部位のアミノ酸の側鎖

表 2 種々の HIV に対する UIC-94017 の抗ウイルス活性 (IC_{50} : μM)

Virus	Cell	APV	IDV	NFV	RTV	UIC-94017
HIV-1 _{Ba-L}	PBMC	0.026	0.025	0.017	0.039	0.003
HIV-2 _{ROD}	MT-2	0.23	0.014	0.019	0.13	0.003
HIV-2 _{EHO}	MT-2	0.17	0.011	0.029	0.24	0.006

HIV-1_{Ba-L} に対する抗ウイルス活性は PHA-PBM を用いた p24 assay により, HIV-2 に対する抗ウイルス活性は MT-2 細胞を用いた MTT assay により評価した。p24 assay の場合, 細胞培養ウエル上清中の p24 Gag 蛋白の産生を 50% 阻害する薬剤濃度を IC_{50} (μM) とした。

表 3 UIC-94017 の PI 耐性誘導変異 HIV-1 に対する抗ウイルス活性 (IC_{50} : μM)

Virus	SQV	IDV	NFV	RTV	APV	UIC-94017
HIV-1 _{NL4-3}	0.009	0.011	0.02	0.018	0.027	0.003
HIV-1 _{SQV5μM}	>1 (>111)	>1 (>91)	0.30 (15)	>1 (>56)	0.17 (6)	0.005 (2)
HIV-1 _{IDV5μM}	0.015 (2)	>1 (>91)	0.74 (37)	>1 (>56)	0.33 (12)	0.029 (10)
HIV-1 _{NFV5μM}	0.031 (3)	0.28 (25)	>1 (>50)	0.09 (5)	0.093 (3)	0.003 (1)
HIV-1 _{RTV5μM}	0.013 (1)	0.31 (28)	0.24 (12)	>1 (>56)	0.61 (23)	0.025 (8)
HIV-1 _{APV5μM}	0.02 (2)	0.31 (28)	0.21 (11)	>1 (>56)	>1 (>37)	0.22 (73)

各 PI 耐性変異株のプロテアーゼ領域のアミノ酸変異は以下の通りである。HIV-1_{SQV5 μM} : L10I, G48V, I54V, L90M, HIV-1_{IDV5 μM} : L10F, L24I, M46I, L63P, A71V, G73S, V82T, HIV-1_{NFV5 μM} : L10F, D30N, K45I, A71V, T74S, HIV-1_{RTV5 μM} : M46I, V82F, I84V, HIV-1_{APV5 μM} : L10F, V32I, M46I, I54M, A71V, I84V。MT-2 細胞を感染細胞として用い, p24 assay により抗ウイルス活性を評価した。括弧内の数字は野生株である HIV-1_{NL4-3} に対する IC_{50} 値と比較して何倍 IC_{50} 値が上昇したかを示す。

表 4 多剤耐性臨床分離株に対する UIC-94017 の抗 HIV-1 活性 (IC_{50} : μM)

Patients	SQV	APV	IDV	NFV	RTV	UIC-94017
HIV-1 _{ERS104pre} (wild-type)	0.010	0.023	0.018	0.019	0.027	0.003
1	0.23 (23)	0.39 (17)	>1 (>56)	0.54 (28)	>1 (>37)	0.004 (1)
2	0.14 (14)	0.16 (7)	>1 (>56)	0.36 (19)	>1 (>37)	0.004 (1)
3	0.037 (4)	0.28 (12)	>1 (>56)	0.44 (23)	>1 (>37)	0.003 (1)
4	0.029 (3)	0.25 (11)	0.39 (22)	0.32 (17)	0.44 (16)	0.004 (1)

今回実験に用いた多剤耐性臨床分離株のプロテアーゼ領域のアミノ酸変異を以下に示す。HIV-1_{ERS104pre}: L63P, patient 1: L10I, K14R, R41K, M46L, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M, I93L, patient 2: L10I, I15V, E35D, N37E, K45R, I54V, L63P, A71V, V82T, L90M, I93L, C95F, patient 3: L10I, I15V, K20R, L24I, M36I, M46L, I54V, I62V, L63P, K70Q, V82A, L89M, patient 4: L10I, V11I, T12E, I15V, L19I, R41K, M46L, L63P, A71T, V82A, L90M。PHA-PBM を用いた p24 assay により抗ウイルス活性を評価した。括弧内の数字は各薬剤が野生株 HIV-1_{ERS104pre} と比較して耐性株に何倍 IC_{50} 値が上昇したかを示す。

に結合するため, 同部位でのアミノ酸置換 (変異) を起こして HIV のプロテアーゼは容易にプロテアーゼ阻害剤の結合を回避して耐性を発現するが, 活性部位のアミノ酸の主鎖と結合する UIC-94017 については側鎖の変異を起こし得てもそのプロテアーゼへの結合態様には大きな変化は起こらないと考えられる。恐らくこのことが UIC-94017 の複数のプロテアーゼ阻害剤への耐性を示す変異株に対する

強力な抗 HIV 活性発揮と関連していると思われる。

考 察

本研究において我々は新規の PI UIC-94017 のウイルス学的, 結晶解析学的解析を行った。UIC-94017 の有する bis-THF 部位が HIV-1 プロテアーゼの活性中心のアミノ

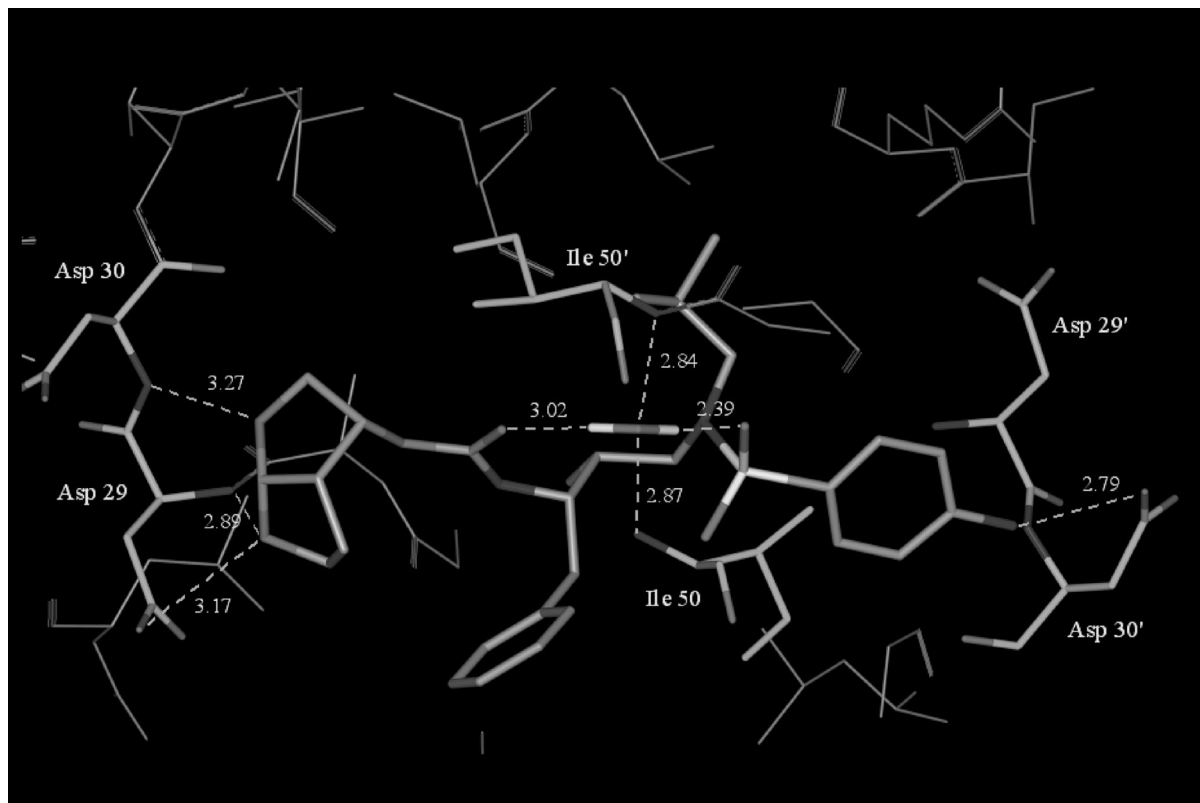


図 2 UIC-94017 と HIV-1 プロテアーゼとの X 線結晶構造
水素結合を点線で示す。結晶構造解析にて UIC-94017 は HIV プロテアーゼの主要な活性部位である Asp-29 と Asp-30 の主鎖と極めて強固な水素結合を形成している。

酸である Asp-29, Asp-30 の主鎖 (backbone) に極めて強固に結合, そのため野生株のみならず多剤耐性ウイルスに対しても有効であることが考えられた。現在 UIC-94017/TMC114 は Tibotec-Virco/Johnson and Johnson に licence されており, 低容量 RTV 併用下での UIC-94017 のヒトでの血中動態の検討では, 1 日 2 回投与で全日にわたって有効血中濃度が維持されることが明らかとなっている¹⁰⁾。また, ヨーロッパで展開されている第 II a 相臨床試験では, 複数の PI 耐性変異を有する症例で UIC-94017/RTV 投与開始 2 週間後のウイルス量は平均 1.35 log と有意に減少したという¹¹⁾。このような臨床試験の結果を考え併せると, UIC-94017 が薬剤耐性 HIV 感染症例での治療剤として極めて有望であると解される。

文 献

- 1) Mitsuya H, Erickson J : Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection. Merigan TC, Bartlett JG, Bolognesi D eds, Textbook of AIDS Medicine, Williams & Wilkins, Baltimore, p 751-p 780, 1999.
- 2) Richman DD : HIV chemotherapy. Nature 410 : 995-1001, 2001.
- 3) Haas DW, Zala C, Schrader S, Piliero P, Jaeger H, Nunes D, Thiry A, Schnittman S, Sension M ; Protocol AI424-009 Study Group : Therapy with atazanavir plus saquinavir in patients failing highly active antiretroviral therapy : a randomized comparative pilot trial. Aids 17 : 1339-1349, 2003.
- 4) Koh Y, Nakata H, Maeda K, Ogata H, Bilcer G, Devasamudram T, Kincaid JF, Boross P, Wang YF, Tie Y, Volarath P, Gaddis L, Harrison RW, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H : Novel *bis*-tetrahydrofuranlyurethane-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, 2003.
- 5) Yoshimura K, Kato R, Kavlick MF, Nguyen A, Maroun V, Maeda K, Hussain KA, Ghosh AK, Gulnik SV,

- Erickson J, Mitsuya H : 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, 2002.
- 6) Yoshimura K, Kato R, Yusa K, Kavlick MF, Maroun V, Nguyen A, Mimoto T, Ueno T, Shintani M, Falloon J, Masur H, Hayashi H, Erickson J, Mitsuya H : JE-2147 : A dipeptide protease inhibitor (PI) that potently inhibits multi-PI-resistant HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 8675-8680, 1999.
- 7) Gatanaga H, Suzuki Y, Tsang H, Yoshimura K, Kavlick MF, Nagashima K, Gorelick RJ, Mardy S, Tang C, Summers MF, Mitsuya H : 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, 2002.
- 8) Sheldrick GM, Schneider TR : High resolution refinement. *Methods Enzymol* 277 : 319-343, 1997.
- 9) Tie Y, Boross PI, Wang YF, Gaddis L, Hussain AK, Leshchenko S, Ghosh AK, Louis JM, Harrison RW, Weber IT : 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, 2004.
- 10) Hoetelmans R, Van der Sandt I, De Pauw M, Struble K, Peeters M, Van der Geest R : TMC114, A next generation HIV protease inhibitor : Pharmacokinetics and safety following oral administration of multiple doses with and without low doses of ritonavir in healthy volunteers. 10th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections : February 10-14, 2003, Boston, MA. (abstract 549)
- 11) Arasteh K, Clumeck N, Pozniak A, Jaeger H, De Pauw M, Muller H, Peeters M, Hoetelmans R, De Meyer S, van der Sandt I, Comhaire S, van der Geest R : First clinical results on antiretroviral activity, pharmacokinetics, and safety of TMC114, an HIV-1 protease inhibitor, in multiple PI-experienced patients. 10th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections : February 10-14, 2003, Boston, MA. (abstract 8)

UIC-94017/TMC114 : A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor Containing *bis*-Tetrahydrofuranyl Urethane (*bis*-THF) Potent against Multi-PI-Resistant HIV *In Vitro*

Yasuhiro KOH¹⁾, Arun K. GHOSH²⁾ and Hiroaki MITSUYA¹⁾

¹⁾ Departments of Hematology and Infectious Diseases,
Kumamoto University School of Medicine

²⁾ Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago

Objective : The rapid rise of multi-protease inhibitor (PI)-resistant HIV variants urges the development of new classes of PIs which are potent against existing resistant HIV variants and do not allow or delay the emergence of resistance. We generated UIC-94017/TMC114, a novel non-peptidic PI containing 3(R),3a(S),6a(R)-*bis*-tetrahydrofuranyl urethane (*bis*-THF) and a sulfonamide isostere, which exerted potent activity against a wide spectrum of HIV including multi-drug-resistant HIV variants (HIV_{MDR}).

Materials and Methods : The inhibitor was synthesized in a convergent manner by coupling optically active P2-*bis*-THF ligand and (R)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere. Antiviral activity of the compound against various HIV_{MDR} was determined using MTT assay employing MT-2 cells and p24 assay using PHA-stimulated PBM and MT-4 cells. PI-resistant HIV variants were selected *in vitro* by propagating HIV in the presence of increasing concentrations of each of existing PIs including saquinavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, and amprenavir.

Results : UIC-94017/TMC114 was identified to be extremely potent against various laboratory HIV strains and primary clinical isolates (IC₅₀ : ~0.003 μM) with minimal cytotoxicity (CC₅₀ : 74 μM) when tested in CD4⁺ MT-2 cells. TMC114, at relatively low concentrations (IC₅₀ : 0.003–0.029 μM), blocked the infection and replication of each of HIV-1_{NL4-3} variants exposed to and selected by up to 5 μM of saquinavir, indinavir, nelfinavir, or ritonavir. TMC114 was also potent (IC₅₀ values ranging 0.003 to 0.004 μM) against multi-PI-resistant clinical HIV-1 variants, isolated from patients who had no response to any existing antiviral regimens after having received a variety of antiviral agents. Structural analysis revealed that the close contact of TMC114 with the main chains of the protease active site amino acids (Asp29 and Asp30) differed from that of other PIs and was thought to be important for its potency and activity against a wide spectrum of HIV_{MDR}.

Conclusion : These data warrant UIC-94017/TMC114 being further developed as a potential therapeutic agent for treatment of infection with primary HIV and HIV_{MDR}.

Key words : protease inhibitor, multi-drug-resistant HIV variants, crystallography, drug design, clinical trials