

第8回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

薬剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する新規の
プロテアーゼ阻害剤の開発と HIV プロテアーゼ
2 量体形成機構の研究Development of Anti-HIV-1 Protease Inhibitors against
Multi-PIs-Resistant HIV-1 and Study of Inhibition and
Dynamics of HIV-1 Protease Dimerization

関 康 博

Yasuhiro KOH

熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部

Departments of Infectious Diseases and Hematology, Kumamoto University
Graduate School of Medicinal and Pharmaceutical Sciences

日本エイズ学会誌 10 : 99-106, 2008

はじめに

第8回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞内容は、1) 多剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する新規のプロテアーゼ阻害剤の開発、2) HIV プロテアーゼの2量体形成機構の研究と2量体形成を阻害する新規の抗 HIV 剤の開発、の2つの研究からなっている。本稿では、1) の内容をふまえ、2) を主に述べる。

研究の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得してその多くが交差耐性であって治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を発揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通

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

Fax : 096-363-5265

2008年4月30日受付

り急務の課題となっている^{1,2)}。私は抗 HIV 剤開発研究、特に薬剤耐性 HIV にも有効な新規のプロテアーゼ阻害剤の開発、耐性解明のための研究を中心に行ってきた。我々のグループは化合物の P2 部位に *bis*-tetrahydrofuranlyurethane (*bis*-THF) というユニークな構造を有し、既存の PIs が HIV-1 プロテアーゼ (PR) の活性部位の側鎖に結合するのと異なり、PR の主要活性部位である Asp-29, Asp-30 の主鎖 (backbone) と極めて強固な水素結合を形成し、広いスペクトラムの薬剤耐性 HIV 株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir/Prezista™ (DRV) についての細胞生物学的、ウイルス学的な解析を米国 Purdue University の Dr. Ghosh のグループとの共同研究で世界に先駆けて進め、2003年この物質の標的である HIV PR の結晶解析の結果まで含めて世界で初めて発表した (表1, 図1)³⁾。DRV は2006年6月に米国食品医薬品局 (FDA) で処方薬として認可、米国とヨーロッパの主要各国で臨床に供されて薬剤耐性ウイルス保持者で著しい臨床効果をもたらしており、本邦においても2007年12月に認可され、臨床に供されることとなった。

最近、我々は HIV の増殖、複製に重要である HIV PR の2量体形成 (dimerization) に注目し、新規の薬剤標的部位と成りうる PR dimerization の形成機構の解析と PR dimerization を阻害する新規の低分子化合物 (PR dimerization inhibitors ; PDIs) の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・細胞生物学・結晶解析学的な研究を行ってきたので⁴⁾、以下に述べる。

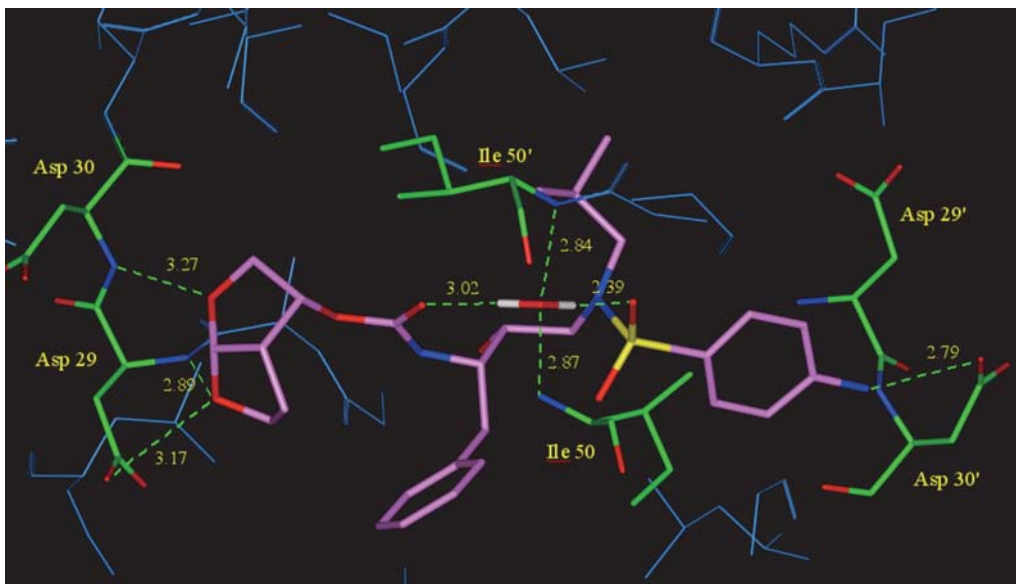


図 1 DRV と野生型 HIV-1 プロテアーゼとの X 線結晶構造

水素結合を点線で示す。結晶構造解析にて DRV の P2 部位の bis-THF 基が HIV プロテアーゼの主要な活性中心部位である 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。

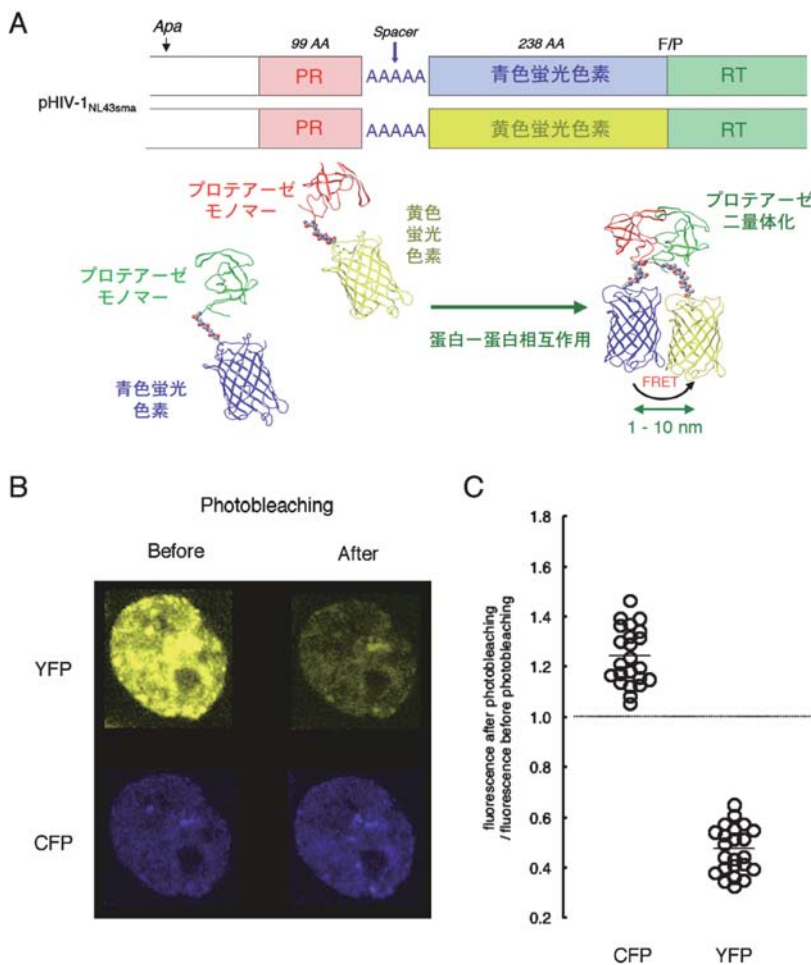


図 2 FRET-HIV-1 発現系の確立

(A) FRET HIV-1 発現系の確立。CFP, YFP タグ付き protease (PR) を有する感染性組み換え HIV-1 クローン (HIV-1_{NL4.3}) を作成した。5つのアラニンからなるリンカーを PR と蛍光蛋白の間に挿入し、HIV-1 PR が切断する phenylalanine-proline site を蛍光蛋白と逆転写酵素の間に導入した。図にリンカーと蛍光蛋白を有するプロテアーゼのモノマーとダイマーを示す。FRET は蛍光蛋白が 1~10 nm と近接する場合に起こる。(B) アクセプター (YFP) フォトブリーチング前後における COS7 細胞の蛍光イメージ。CFP, YFP タグ付き野生型 PR を有する感染性クローン pNL-PR_{WT}^{CFP} と pNL-PR_{WT}^{YFP} を COS7 細胞に co-transfection し、72 時間後に Fluoview FV500 confocal laser scanning microscope により観察した。CFP タグ付き野生型 HIV-1 PR と YFP タグ付き野生型 HIV-1 PR はフォトブリーチング前に発現が確認された。フォトブリーチングした細胞は YFP の蛍光が著明に減少し、フォトブリーチング前後の YFP の蛍光の比は 0.17 と減少したが、一方 CFP の蛍光の前後比は 1.38 と増加した。このことは、YFP, CFP タグ付き PR monomer サブユニットが 2 量体を形成していることを示す。(C) フォトブリーチング前後の蛍光強度の比。CFP タグ付き野生型 HIV-1 PR と YFP タグ付き野生型 HIV-1 PR を co-transfection した各細胞の蛍光強度をフォトブリーチング前後で測定した。フォトブリーチング前後の比を測定した CFP^{A/B} ratio は 1.24±0.11 (n=23) であり、一方 YFP^{A/B} ratio は 0.47±0.09 (n=23) であった。

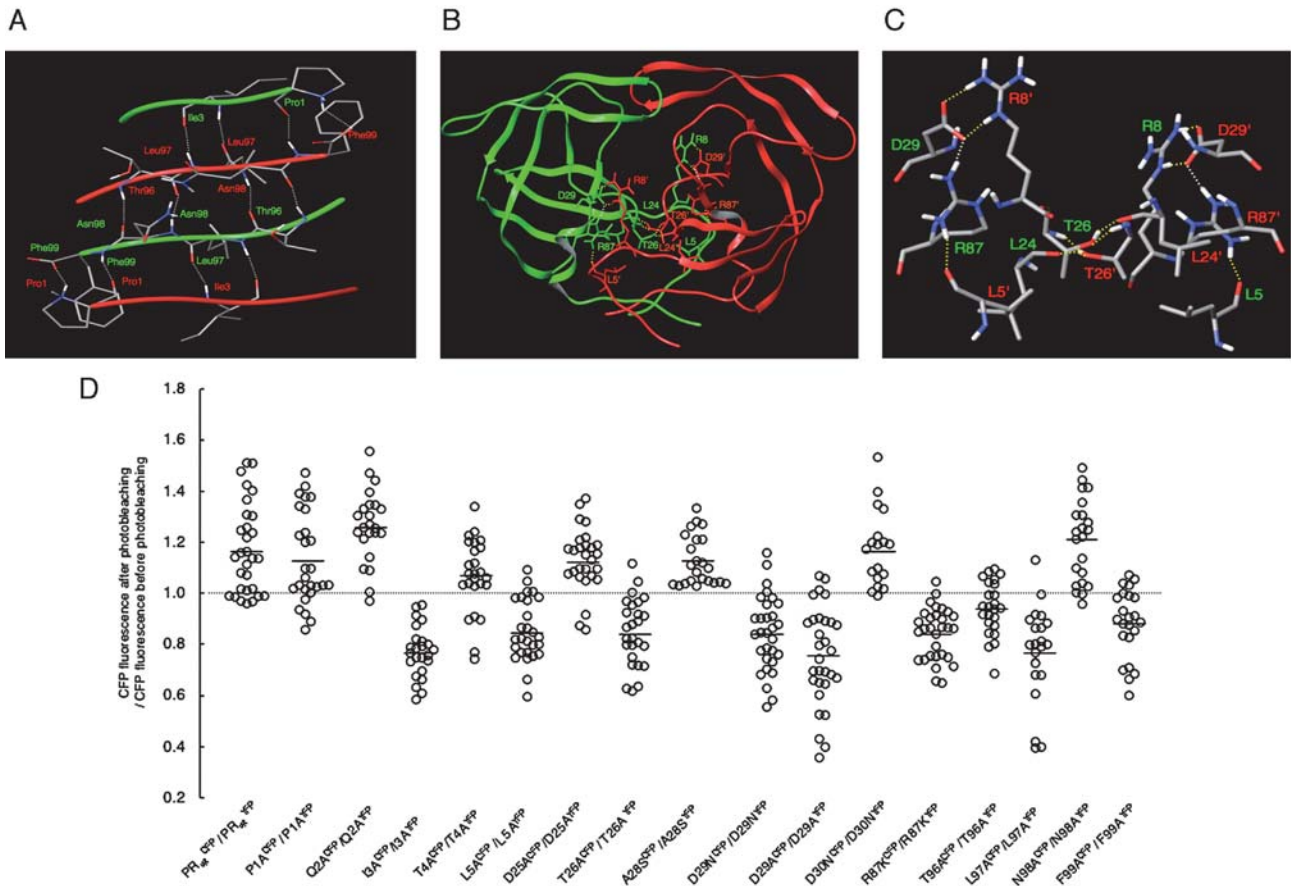


図 3 HIV-1 PR の 2 量体形成に重要なアミノ酸の解析

(A) 2つの PR モノマーサブユニットの N-, C-末端からなる 4つの anti-parallelβ シートを示す。2つの HIV-1 PR モノマーサブユニットはそれぞれの N-, C-末端から形成される anti-parallelβ シートによって結合する。2量体を形成した成熟 PR は N および C 端の部位に 12 個もの水素結合を有しており、これらの相互作用が 2量体形成に必須と考えられた。1つのモノマーサブユニットは緑色のリボンで、もう片方のモノマーサブユニットは赤色のリボンで示す。これらの PR モノマー間の水素結合を阻害する分子は PR2 量体形成を阻害しようと考えられた。

(B と C) 2つの HIV-1 PR モノマーサブユニット間の分子間水素結合を示す。図は 2つの PR モノマーサブユニット間の分子間水素結合を示す。緑色で示された PR モノマーと赤色で示された PR モノマー間の水素結合は、D29-R8', R87-L5', L24-T26', T26-T26' 間にある (黄色の点線で示す)。D29-R87 間の 1 分子内水素結合は白色の点線で示す。2つのモノマーサブユニット間の重要な分子間相互作用を形成しているアミノ酸は各原子に色をつけて (炭素原子: 灰色, 窒素原子: 青色, 酸素原子: 赤色, 水素原子: 白色) 示す。L5, D29, T26, R87 に変異を導入すると、PR の 2 量体形成を阻害する可能性が示唆された。

(D) アミノ酸置換による蛍光強度の比 (CFP^{A/B} ratio) の変化。COS7 細胞に野生型あるいは 1つのアミノ酸置換を有する PR を有する HIV-PR^{CFP} と HIV-PR^{YFP} を組みで co-transfection し、CFP^{A/B} ratios を決定した。縦軸の CFP^{A/B} ratio が 1 以上の場合には PR が 2 量体形成したことを示し、一方 1 以下の場合には 2 量体形成が阻害されたことを示す。図 A-C で示されたように、一方の PR モノマーとの分子間水素結合を形成している Ile-3 や Asp-29 といったアミノ酸に変異を導入すると 2 量体形成が阻害されることがわかる。平均値を横線で示す。

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

Virus	SQV	APV	IDV	NFV	RTV	DRV
HIV-1 _{ERS104pre} (wild-type)	0.010	0.023	0.024	0.019	0.025	0.003
1	0.23 (23)	0.39 (17)	>1 (>42)	0.54 (28)	>1 (>40)	0.004 (1)
2	0.14 (14)	0.16 (7)	>1 (>42)	0.36 (19)	>1 (>40)	0.004 (1)
3	0.037 (4)	0.28 (12)	>1 (>42)	0.44 (23)	>1 (>40)	0.007 (2)
4	0.029 (3)	0.34 (15)	0.39 (16)	0.32 (17)	0.44 (18)	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 HIV 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。

FRET の系を用いた HIV-1 PR 2 量体形成の検出系の確立

HIV-1 プロテアーゼは 2 量体 (homodimer) を形成し、酵素活性を発揮、HIV-1 プロテアーゼの 2 量体形成 (dimerization) は HIV-1 の増殖、複製にとって、必須とされる^{5,6)}。これまでも HIV-1 PR dimerization の阻害は、酵素活性を阻害し、HIV の複製も阻害、新規の薬剤標的部位と考えられてきた。2 つの PR モノマーサブユニットは極性、非極性の相互作用を形成することによって、2 量体を形成している。両方のモノマーサブユニットは N 端、C 端からなる 4 つの anti-parallel β シートを形成し、dimerization に重要とされる⁷⁾。この β シート構造はいくつかの研究グループによって 2 量体形成阻害部位として、研究されてきた^{8,9)}。我々のグループは最近、HIV PR の dimer interface の 1-5, 95-99 のアミノ酸配列を含んだペプチド型化合物が HIV-1 の感染を阻害するという報告をしたが¹⁰⁾、そのような化合物が 2 量体形成を阻害したという直接的な証拠はいままでなかった。

そこで、我々は、ある蛍光分子の他の分子への励起エネルギーの移動する現象で、細胞内で起こる蛋白質間の相互作用や分子レベルでの事象を検出する手段となりうる FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV PR dimerization を検出する系の確立を試みた。図 2A に示すように蛍光色素である青色蛍光色素 (cyan fluorescent protein; CFP) あるいは黄色蛍光色素 (yellow fluorescent protein; YFP) タグ付き PR を有する組み換え感染性 HIV クローン pNL-PR_{WT}^{CFP}, pNL-PR_{WT}^{YFP} plasmids を作成し、COS7 細胞に pNL-PR_{WT}^{CFP} と pNL-PR_{WT}^{YFP} plasmids を co-transfection し、72 時間後、Fluoview FV500 confocal laser scanning microscope を用いて細胞内で FRET が起こるかどうかなを確認した。FRET の定量化の方法として、

我々はアクセプターフォトリチング法を用いた (図 2B)^{11,12)}。すなわち、YFP を選択的にアルゴンレーザーによりフォトリチング、退色させた細胞において、リチング前後における CFP の蛍光強度を測定し、CFP の蛍光強度の前後比である CFP fluorescence after photobleaching/CFP fluorescence before photobleaching (CFP^{A/B} ratio) が 1.0 以上であれば、CFP, YFP 間の蛍光エネルギーの移行 (FRET) が起こっていたものと考えられ、このことは PR_{WT}^{CFP} と PR_{WT}^{YFP} 蛋白質間の 2 量体が形成されていることを示している (図 2C)。

HIV PR モノマーサブユニットの分子内、分子間相互作用の解析

次に、我々は、確立した FRET-HIV 発現系が HIV-1 PR dimerization に対する阻害効果を検出できるかどうかを確認した。99 個のアミノ酸からなる HIV-1 PR の N 末端の 5 つのアミノ酸と C 末端の 5 つのアミノ酸は PR dimerization に必須であることが以前より示されてきた (図 3A)¹³⁾。また、X 線構造解析等の研究で、N-, C-末端以外の PR 活性中心近傍のアミノ酸である Thr-26, Asp-29, Arg-87 等も PR dimerization に重要な役割を果たすと報告されている (図 3B, C)^{14,15)}。そこで、我々は、N 末端の 1 番目のアミノ酸 Proline を Alanine へ置換 (P1A)、同様に Q2A, I3A, T4A, L5A, T96A, L97A, N98A, F99A 置換をそれぞれ組み換え感染性 HIV クローン pNL-PR^{CFP}, pNL-PR^{YFP} plasmids に導入し、各変異体の CFP, YFP plasmids の組み合わせで co-transfection し、FRET の実験を行ったところ、I3A, L5A, T96A, L97A, F99A 置換を導入した際、CFP^{A/B} ratio の平均は 1 以下と PR dimerization は阻害され、N-, C-端の他のアミノ酸変異は PR dimerization に影響を与えなかった (図 3D)。また、N-, C-末端以外の PR 活性中心近傍のアミノ酸である Thr-26, Asp-29, Arg-87 等に変異を導入 (T26A,

D29N, D29A, R87K) すると, PR dimerization が阻害された (図 3D)。これらのデータより, FRET-HIV-1 assay system が PR dimerization の検出に有用であり, 阻害剤の同定, 開発に有力な系であることが示唆された。

HIV PR 2 量体形成を阻害する新規の非ペプチド型化合物の同定, 開発

更に, 我々は, この FRET-HIV PR 発現系を用いて, 種々の既存の抗 HIV-1 剤, 新規に合成した化合物を検討し, PR dimerization を阻害する一群の新規低分子化合物 (PR dimerization inhibitors ; PDIs) を開発, 同定した。図 4 に新たに同定した PDIs の構造式を示す。これらの薬剤 DRV^{3,16)}, TMC126¹⁷⁾, GRL-06579A¹⁸⁾, GRL-98065¹⁹⁾, GRL-0036A, brecanavir (BCV)²⁰⁾, tipranavir (TPV) 等はこの FRET-HIV 発現系において, 1 μ M の濃度で PR dimerization を阻害した (図 5)。また, これらの化合物はすべて HIV-1 PR の酵素活性の阻害効果を有し, また MT-2 細胞を用いた MTT assay において野生株 HIV-1_{LAI} の感染を IC₅₀ 値 0.0002–0.48 μ M の範囲で阻害した (表 2)。興味深いことに, 我々が開発, 2006 年に FDA に認可された多剤耐性 HIV に対

して高い活性を発揮する新規のプロテアーゼ阻害剤である DRV や, P2 部位に DRV と同様の bis-THF 基を有し, 試験管内での野生 HIV-1 に対する抗ウイルス活性が DRV の約 10 倍強力である BCV (薬剤の formulation の問題で現在海外での臨床試験が中断中), 構造が DRV や BCV とは明らかに相違する TPV 等が成熟 PR 活性の阻害効果のみならず, PR 前駆体が成熟するために必須の過程である 2 量体化をも阻止することを見いだした (図 4, 5)。

新規の PI, DRV は感染性 HIV-1 粒子を産生する細胞内で一旦 2 量体化した PR の解離はしない

最後に, DRV が HIV PR dimerization をどの段階で阻害するのかを検討した (図 6)。COS7 細胞に pNL-PR_{WT}^{CFP}, pNL-PR_{WT}^{YFP} plasmids を co-transfection し, transfection 後 24, 48, 72, 96 時間後といった種々の時間に蛋白合成阻害剤である cycloheximide (CHX ; 最終濃度 50 μ g/ml) を加えた。細胞培養後 day5 に DRV を最終濃度 1 μ M となるように培養液中加入した。HIV-1 蛋白産生量は培養上清中の p24 Gag 蛋白量を 24 時間毎に測定することによって決定した。Day2 に CHX を添加した細胞の培養上清において

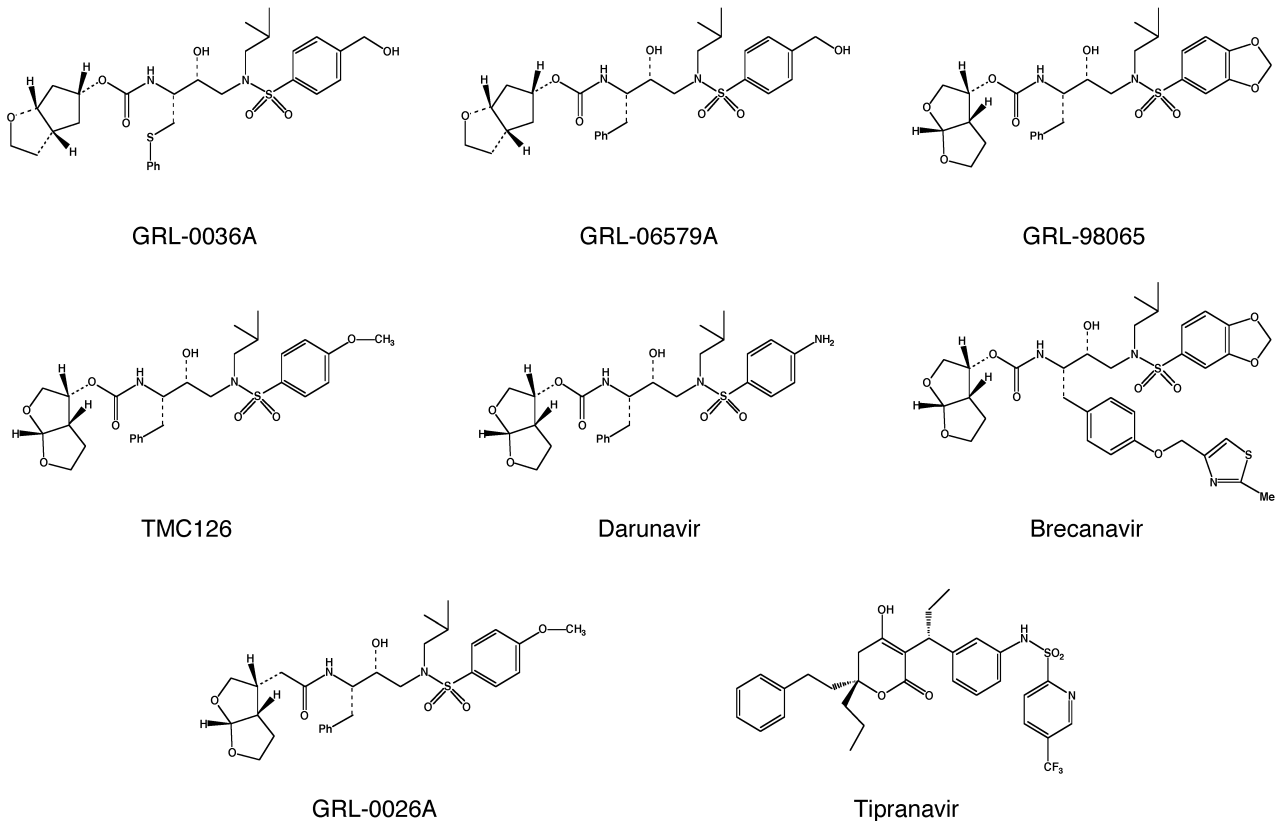


図 4 新たに同定した PR 2 量体形成阻害剤の構造式
我々が同定した 8 つの HIV PR 2 量体形成阻害剤の構造式を示す。

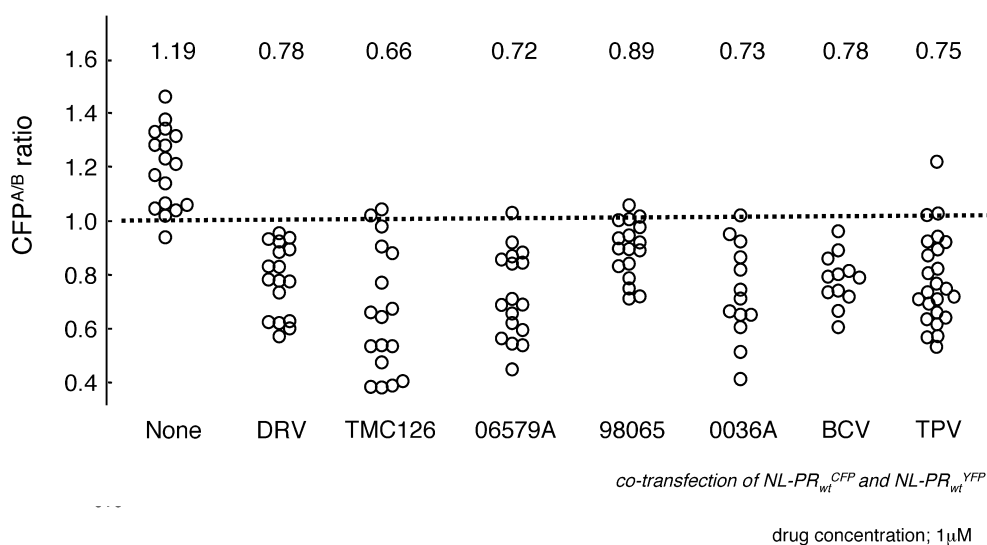


図 5 HIV-1 PR 2 量体形成の阻害

非ペプチド型化合物による PR 2 量体形成の阻害。COS7 細胞に 1μM の非ペプチド型の薬剤 (DRV, TMC126, GRL-06579A, GRL-98065, GRL-0036A, BCV, TPV) を加え, その後 pNL-PR_{wt}^{CFP} と pNL-PR_{wt}^{YFP} を co-transfection した。72 時間後, 培養細胞を Fluoview FV500 confocal laser scanning microscope を用いて観察し, CFP^{A/B} ratios を決定した。比の平均値を数値で示す。

表 2 PR 2 量体形成阻害剤の抗 HIV 活性と PR 酵素阻害活性

Drug	IC ₅₀ (μM)	K _i (pM)
GRL-0036A	0.005	29
GRL-06579A	0.0014	3.5
GRL-98065	0.0004	14
TMC126	0.0003	10
DRV	0.0034	16
BCV	0.0002	6.8
GRL-0026A	0.48	n.d.
TPV	0.10	n.d.

MT-2 細胞 (2 × 10³) に 100 TCID₅₀ s の野生株 HIV-1_{LAI} を感染させ, 各薬剤の種々の濃度の存在下で培養し, MTT assay を用いて, IC₅₀ 値を決定した。すべての assay は duplicate で行い, 3 回の独立した実験の結果より IC₅₀ 値を決定した。各薬剤の PR 酵素活性阻害能は基質に Lys-Ala-Arg-Val-Nle-pnitroPhe-Glu-Ala-Nle-amide を用いて決定した。K_i 値は以下の式によって決定した。K_i = (IC₅₀ - [E]/2)/(1 + [S]/K_m), [E]; PR の濃度, [S]; 基質の濃度。n.d.: not determined.

は, day2 以降, 新たな p24 蛋白の産生は認めなかった。Day3 あるいは day4 において, CHX を加えた細胞の培養上清においては, p24 蛋白産生は認めしたが, CHX 添加後, 蛋白産生は抑制された。図 6 のように day4, 5 の細胞の CFP^{A/B} ratio はすべて 1.0 以上であり, HIV-1 PR は産生さ

れ, dimerization が起こっていた。DRV 添加後の day6 においても CFP^{A/B} ratio は 1 以上であり, このことより, DRV は感染性 HIV-1 粒子を産生する細胞内で一旦 2 量体化した PR の解離は行わず, PR 前駆体から PR が成熟化する過程で dimerization を阻害することが示唆された。

ま と め

我々のグループと米国 Purdue 大学の Dr. Ghosh グループとで共同開発, 2006 年に FDA に認可, 臨床応用された bis-THF を「核」として有する PI DRV は既存の PIs 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, 主要活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖 (backbone) と極めて強固な水素結合を形成し, 多剤耐性株を含む広いスペクトラムの HIV に活性を発揮する。本研究では, HIV PR の 2 量体形成過程での新規の分子機構を明らかにすることを目的とし, 更に HIV 増殖抑制の標的となりうる新たな分子, 構造の同定, 治療法の確立を目指した。HIV の増殖, 複製に必須である HIV PR の 2 量体化を検出する系として, HIV PR とレポータータンパク (GFP とその誘導体) の融合タンパクの発現系とその解析系 (fluorescence resonance energy transfer/FRET 法) を我々は確立, 2 量体形成阻害効果を有する一連の低分子化合物 PDIs を米国の Dr. Ghosh の研究チームとの共同研究で同定, 開発, DRV が成熟 PR 活性の阻害効果のみならず, PR 前駆体が成熟するために必須の過程である二量体化をも阻止することを

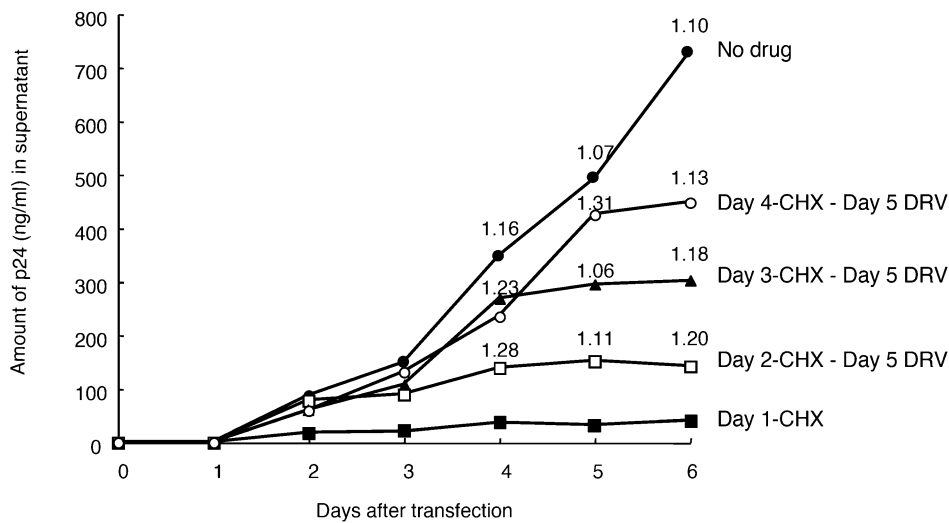


図 6 DRV は感染性 HIV-1 粒子を産生する細胞内で一旦 2 量体化した PR の解離はしない
COS7 細胞に, pNL-PR_{WT}^{CFP} と pNL-PR_{WT}^{YFP} の 2 つのプラスミドを co-transfection し, その後, cycloheximide (CHX, 50 μg/ml) を 24, 48, 72, 96 時間後に加え, day5 の培養液中に DRV を 1 μM となるように加えた。HIV-1 粒子産生は培養液中の p24 Gag 蛋白の量を 24 時間毎に測定し, 決定した。CFP^{A/B} ratios (図中の数字) を種々の時間で測定した。

見いだした。今後は DRV 等の PDI 耐性 HIV-1 で PR 領域に蓄積を認めたアミノ酸変異の解析や HIV-1 PR dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析, PR モノマーサブユニットと化合物との結合様式の解析等を進め, 新規の機序である PDI の開発・構造解析を行う。本計画で得られると思われるデータは, 臨床試験段階にある阻害薬の研究成果に耐性発現機序に関わる基礎研究の成果を付与するなど期待でき, PDI の骨格のデザイン, 再デザイン, 酵素学, ウイルス学的解析が強化, スピードアップされ, 新しい世代の PDI の開発が強力に推進されると思われる。

謝辞: この度, 第 8 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞することになりましたことを深く感謝致します。本賞の選考にあられました選考委員の先生方, これまで御指導頂きました熊本大学満屋裕明教授および諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Simon V, Ho DD : HIV-1 dynamics in vivo : implications for therapy. *Nat Rev Microbiol* 1 : 181-190, 2003.
- 2) Carr A : Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2 : 624-634, 2003.
- 3) 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-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, 2003.

- 4) Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldridge A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H : Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem* 282 : 28709-28720, 2007.
- 5) Wlodawer A, Miller M, Jaskólski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB : Conserved folding in retroviral proteases : crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245 : 616-621, 1989.
- 6) Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, Sigal IS : Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 4686-4690, 1988.
- 7) Todd MJ, Semo N, Freire E : The structural stability of the HIV-1 protease. *J Mol Biol* 283 : 475-488, 1998.
- 8) Bowman MJ, Byrne S, Chmielewski J : Switching between allosteric and dimerization inhibition of HIV-1

- protease. *Chem Biol* 12 : 439–444, 2005.
- 9) Bannwarth L, Kessler A, Pèthe S, Collinet B, Merabet N, Boggetto N, Sicsic S, Reboud-Ravaux M, Ongeri S : Molecular tongs containing amino acid mimetic fragments : new inhibitors of wild-type and mutated HIV-1 protease dimerization. *J Med Chem* 49 : 4657–4664, 2006.
 - 10) Davis DA, Brown CA, Singer KE, Wang V, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield P, Maeda K, Harada S, Yoshimura K, Kosalaraksa P, Mitsuya H, Yarchoan R : Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res* 72 : 89–99, 2006.
 - 11) Sekar RB, Periasamy A : Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* 160 : 629–633, 2003.
 - 12) Bastiaens PI, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM : Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *Embo J* 15 : 4246–4253, 1996.
 - 13) Babe LM, Rose J, Craik CS : Synthetic “interface” peptides alter dimeric assembly of the HIV 1 and 2 proteases. *Protein Sci* 1 : 1244–1253, 1992.
 - 14) Ishima R, Torchia DA, Lynch SM, Gronenborn AM, Louis JM : Solution structure of the mature HIV-1 protease monomer : insight into the tertiary fold and stability of a precursor. *J Biol Chem* 278 : 43311–43319, 2003.
 - 15) Louis JM, Ishima R, Nesheiwat I, Pannell LK, Lynch SM, Torchia DA, Gronenborn AM : Revisiting monomeric HIV-1 protease. Characterization and redesign for improved properties. *J Biol Chem* 278 : 6085–6092, 2003.
 - 16) De Meyer S, Azijn H, Surleraux D, Jochmans D, Tahri A, Pauwels R, Wigerinck P, de Béthune MP : TMC114, a novel human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor active against protease inhibitor-resistant viruses, including a broad range of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49 : 2314–2321, 2005.
 - 17) Yoshimura K, Kato R, Kavlick MF, Nguyen A, Maroun V, Maeda K, Hussain KA, Ghosh AK, Gulnik SV, Erickson JW, 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.
 - 18) Ghosh AK, Sridhar PR, Leshchenko S, Hussain AK, Li J, Kovalevsky AY, Walters DE, Wedekind JE, Grum-Tokars V, Das D, Koh Y, Maeda K, Gatanaga H, Weber IT, Mitsuya H : Structure-based design of novel HIV-1 protease inhibitors to combat drug resistance. *J Med Chem* 49 : 5252–5261, 2006.
 - 19) Amano M, Koh Y, Das D, Li J, Leschenko S, Wang YF, Boross PI, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H : A novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI), GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 51 : 2143–2155, 2007.
 - 20) Yates PJ, Hazen R, St Clair M, Boone L, Tisdale M, Elston RC : In vitro development of resistance to human immunodeficiency virus protease inhibitor GW640385. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 1092–1095, 2006.