

総 説

HIV エンベロープの治療標的構造研究
—新規治療法における侵入阻害剤と中和抗体の関係—Driving HIV-1 Envelope into a Susceptible Corner by
Taking Advantage of Viral Adaptation and Evolution

原田 恵嘉, 吉村 和久

Shigeyoshi HARADA and Kazuhisa YOSHIMURA

国立感染症研究所エイズ研究センター

AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

キーワード: Env, 逃避変化, 新規治療

日本エイズ学会誌 19: 1-8, 2017

はじめに

次々と開発され続ける強力な抗 HIV 薬を組み合わせる多剤併用療法 (cART) の成果により, HIV 感染症はコントロール可能な慢性感染症へと変貌を遂げた。加えて, 新規治療戦略およびワクチンデザインの切り札として期待が高まる次世代広域中和抗体の開発および解析も, 現在, 急速に進められている¹⁻⁷⁾。しかしながら, 多くの RNA ウイルス同様に, HIV はその高い変異原性により, 薬剤, 免疫, および宿主馴化などの各種選択圧に迅速に対応し, そのような障壁から容易に逃げ切る能力を有していることを考えると, 現在そして今後の強力な治療戦略をもってしてもけっして油断はできないことは自明の理であろう。実際, HIV はその遺伝子の持つ多様性 (逃避変化) により, これまでどんなに選択圧 (障壁) が高くても逃げおおせてきたという事実が, それを如実に物語っている。そのなかでも, エンベロープ蛋白 (Env) をコードする遺伝子の多様性は, 他の HIV 遺伝子に比べて群を抜いて高いことが知られている⁸⁾。このことは, これまでに Env が最も多くの選択圧を受けながら, 逃げ続けていることの証左に他ならない。また, HIV の複製能に, 侵入効率が大きく影響することからも^{9,10)}, 侵入過程を担う Env の逃避変化 (進化) に対する理解は, 新規治療戦略を立案するうえできわめて重要となる。

われわれの研究室では中和抗体や侵入阻害剤をはじめとするさまざまな選択圧が Env に与える影響, およびそれ

ら選択圧逃避 Env に対応した新規戦略など, Env と逃避進化に関する包括的な研究をこれまで進めてきた。そこで本稿では, われわれの研究成果を中心に最新の知見を交えて, HIV の免疫および薬剤からの逃避進化の特性を利用し, 最終的に HIV を追い込むことを目指す新規治療戦略について概説したい。

HIV の侵入過程

HIV Env は, 2つの宿主受容体 CD4^{11,12)} およびケモカインレセプター (主に CCR5 または CXCR4)¹³⁻¹⁵⁾ と結合する外皮糖蛋白 gp120 と, 細胞融合を担う膜貫通蛋白 gp41 から構成される¹⁶⁾ (図 1)。

外皮糖蛋白 gp120 は, 5つの C (conserved) 領域 (C1 から C5) の間に, 5つの多様性が高いループ形状の V (variable) 領域 (V1 から V5) が散在する¹⁷⁾ (図 1)。高次構造は, 三量体形成時に内側に位置するインナードメイン, ループ V 領域を含む外側領域アウトドメイン, およびコレセプターの結合部位となるブリッジングシートの三領域に分けられる¹⁸⁾。多様性が高い Env においても, 侵入過程で CD4 が結合する領域 (CD4 binding site, CD4bs) は比較的多様性が低く, 広域中和抗体の代表的な標的部位としても重要である。さらに, この比較的保存性が高い CD4bs 領域のなかでも, 「Phe43 キャビティ」と呼ばれる CD4 の 43 番目フェニルアラニン側鎖がはまり込む疎水性ポケットはきわめて保存性が高く^{18,19)}, われわれはこの Phe43 キャビティを標的とする, 新規侵入阻害剤 CD4 ミミックの研究開発を展開している。

HIV の侵入過程は, この CD4bs に CD4 が結合することから開始する。まず CD4 が結合することにより, gp120

著者連絡先: 吉村和久 (〒162-0052 東京都新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所エイズ研究センター)

2016年12月22日受付

コアの高次構造変化が誘導され、V3 領域の露出およびブリッジングシートの形成などを含めたコレセプター結合への展開（準備）が進む²⁰⁾ (図 1)。次に、コレセプターと gp120 の結合は、まずコレセプターの ECL2 (second extracellular loop) 領域が露出した gp120 V3 先端部位と結合した後に、コレセプターの N 末端領域がブリッジングシートおよび V3 基部領域に結合することで成立する、と考えられている^{21~24)}。コレセプターが gp120 に結合すると、さらなる高次変化が誘導され、gp41 の N 端部分に存在する融合ペプチドが活性化され、標的細胞と膜融合が生じ、侵入過程が完了する¹²⁾。

中和抗体選択圧逃避と CCR5 阻害剤感受性

近年、分離および解析技術の向上に伴い、HIV 感染者から次世代広域中和抗体の単離が盛んに行われている。これら次世代広域中和抗体は、標的領域（エピトープ領域）を基に、(1) Env 三量体の先端部の V2 糖鎖領域を認識する V2 apex, (2) V3 基部の糖鎖を認識する V3-high mannose patch, (3) CD4 結合領域を認識する CD4bs, (4) gp120 と gp41 の境界面を認識する gp120/41 interface, (5) gp41 の融合ペプチドを認識する FP, そして、(6) gp41 の膜貫通部位近傍を認識する MPER, の 6 つのカテゴリーに分けられる^{1,2,5,6,25)} (図 1)。また古くから研究および解析がされている、CD4 結合後に露出される V3 領域を認識する V3 抗体、および同じく CD4 結合後に形成されるコレセプター結合領域を認識する CD4i (CD4-induced) 抗体も、最近の受動免疫戦略とともに再脚光を浴びている^{1,2)} (図 1)。

このように次世代広域中和抗体を用いた新規治療戦略を中心に、中和抗体に関する研究が盛んに行われているが、残念ながらこれまでの経験上 HIV は高い変異原性によりこれら強力な中和抗体からでさえ、容易に逃避する可能性が高い。そこで、その逃避能力を見極めるために、R5 ウイルスである JR-FL 株を用いて、抗 V3 抗体 KD-247 に対する *in vitro* 耐性誘導解析を試みた²⁶⁾。KD-247 は V3 先端部位の IGPR 配列を認識し、サブタイプ B ウイルスの約半分の多様性をカバーする中和抗体で、最近行われたフェーズ 1b 臨床試験 (KD-1002) においても、慢性感染者の血中ウイルス量を有意に下げることが得られている²⁷⁾。この KD-247 に対する耐性誘導で得られた KD-247 逃避ウイルスは、V3 先端部位に G314E 変異を獲得することで高度耐性を示すことが明らかになった²⁶⁾。ところが、興味深いことにこの中和抗体選択圧から逃げ切ったウイルスは、コレセプター CCR5 阻害剤 (TAK-779, aplaviroc および SCH-C) に対しては、変異前に比べて高度感受性を示したのである²⁶⁾。もともと、KD-247 と CCR5 阻害剤は、きわめて強力な相乗効果を示すことも分かっており²⁶⁾、*in*

vitro の実験では中和抗体と CCR5 阻害剤の組み合わせの相性のよさが強く示唆された。

近年、KD-247 や VRC01 などの広域中和抗体を用いた感染者に対する受動免疫試験が行われはじめている^{4,27)}。いずれにおいても、中和抗体感受性株に対してはきわめて強力に血中ウイルス量を下げ、その有効性が示された。しかし、中和抗体単剤投与ではすべてのウイルスを抑えきれず、耐性株の出現が *in vivo* でも確認された^{4,27)}。これらの結果から、複数の中和抗体を組み合わせる戦略も提唱されているが、高価な中和抗体の組み合わせだけでなく、われわれが示した中和抗体と CCR5 阻害剤との組み合わせが、今後の新規治療戦略の一助になるのではないかと考えている。

CCR5 阻害剤選択圧逃避と中和抗体感受性

中和抗体選択圧からの逃避の結果、ウイルスは中和抗体に対して耐性を獲得するが、一方で CCR5 阻害剤に対しては高度感受性になることが明らかとなった。それでは逆に CCR5 阻害剤選択圧から逃避する場合は、どうなるであろうか。

そこで、CCR5 阻害剤からの逃避能力を見極めるために、臨床分離 R5 ウイルスである KP-5 株を用いて、CCR5 阻害剤マラビロク (MVC) に対する *in vitro* 耐性誘導解析を試みた²⁸⁾。MVC は、現在、唯一認可されている CCR5 阻害剤で、国内の臨床現場でも使用されている抗 HIV 剤である²⁹⁾。この MVC に対する耐性誘導では、MVC 濃度を 10 μ M まで上昇させた 48 パッセージ目において MVC 高度耐性株を得ることに成功した²⁸⁾。得られた MVC 耐性株には CCR5 N 末端結合領域および V3 領域に位置する 4 つのアミノ酸 (V200I, T297I, K305R および M434I) が変異していることが明らかとなった。この MVC を含めた CCR5 阻害剤の耐性機序は、多くの抗 HIV 剤で認められる 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の上昇ではなく、阻害曲線のプラトーの高さ (MPI) の低下という特徴を有し、阻害剤が結合した CCR5 レセプターをウイルスが利用可能となる耐性機序となる^{30~34)}。今回、われわれの研究で得られた 4 つの変異を有する MVC 逃避ウイルスでも、同様な MPI の低下が確認された²⁸⁾。次に、この MVC 耐性株における中和抗体感受性を解析してみると、b12 (CD4bs), 4E9C (CD4i) および KD-247 (V3) の各中和抗体に対して高度感受性を示すことが明らかとなった。すなわち、4 つの MVC 逃避変異が gp120 の構造を変化させ、中和抗体エピトープの露出に寄与している可能性を示唆された²⁸⁾。これは MVC に特異的な現象ではなく、CCR5 阻害剤全般の事象である可能性が高いことが他のグループの結果から見てとれる。たとえば、Pugach らは、CCR5 阻害 AD101 に対

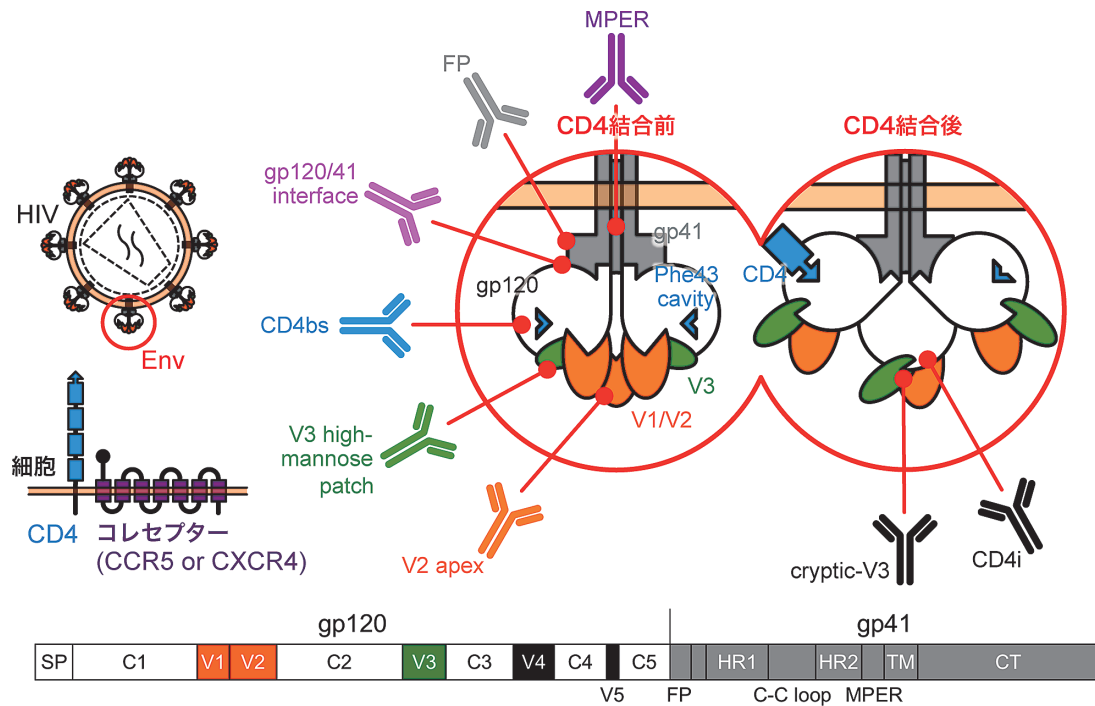


図 1 HIV Env の二次および高次構造略図

次世代広域中和抗体は、標的領域を基に、V2 apex, V3-high mannose patch, CD4bs, gp120/41 interface, FP, および MPER, の6つのカテゴリーに分けられる。また、CD4 結合後に露出される V3 領域を認識する V3 抗体、および同じく CD4 結合後に形成されるコレセプター結合領域を認識する CD4i 抗体も古くから研究および解析がされている。

する耐性株が、同じく V3 および CD4i 抗体に対して高度感受性を示す結果を報告し、桑田らは、現在臨床試験中の CCR5 阻害剤セニクリビロク逃避株が、中和抗体 VRC01 (CD4bs), 4E9C (CD4i) および 0.5 γ (V3) に感受性となることを報告している³⁵⁻³⁷⁾。

このように CCR5 阻害剤による選択圧からの逃避の結果、中和抗体に対しては感受性になり、中和抗体耐性変異と CCR5 阻害剤耐性変異は表裏の関係という結果が得られた。この耐性プロファイルが真逆となる中和抗体と CCR5 阻害剤の組み合わせは、コンビネーションによる高度ジェネティックバリア化 (耐性になりづらい) という新たなコンセプトを打ち出し、中和抗体を用いた新規治療戦略の要になると考えている (図2)。

Pol 阻害剤選択圧逃避と Env の選択

中和抗体および侵入阻害剤からの逃避メカニズムの解析で示したように、Env を標的 (間接的も含む) とする選択圧は、逃避変異出現を経て、Env の多様性および進化をもたらす^{26,28,35-40)}。一方、pol 阻害剤 (インテグラーゼ阻害剤, 逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤) の使用で、感染者体内の HIV 多様性 (クワシスピーシーズ) が

減少するボトルネック現象が、以前から報告されている。このボトルネック現象は、阻害剤標的領域 (インテグラーゼ, 逆転写酵素またはプロテアーゼ) だけでなく、他のウイルスゲノム領域にも影響し、実際、多くの感染症例で、pol 阻害剤により誘引された Env 領域のボトルネック現象が示されている⁴¹⁻⁴⁸⁾。すなわち、Env 以外を標的とする選択圧が、Env 変化 (進化) に影響する可能性は、今後の新規治療戦略において、特に侵入阻害効果を主作用とする、中和抗体や結合・融合阻害剤などを他の薬剤と併用する場合に、重要な知見となる。しかしながら、生体内においては薬剤や免疫反応および標的細胞への馴化も含めた複数の選択圧が存在するため、各薬剤がもたらす Env ボトルネック進化を解析することは非常に困難である。そこで、われわれはバルク臨床分離株と *in vitro* 耐性誘導法を組み合わせ、各薬剤選択圧における Env 領域に対するボトルネック進化を解析した⁴⁹⁾。その結果、X4 および R5 ウイルスが混在する臨床分離株 KP-1 において、インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビル (RAL), 逆転写酵素阻害剤ラミブジン (3TC), およびプロテアーゼ阻害剤サキナビル (SQV) による選択圧から逃避した各株は、薬剤非存在下のコントロール株と異なる Env ボトルネック進化を遂げるだけで

なく、薬剤ごとに異なる Env ボトルネックルートを辿ることが明らかとなった。遺伝子配列解析により、各ルートで大きく異なる箇所は、gp120 の V1/V2 および V4 領域の配列と、N 型糖鎖の数であることが明らかとなった。また、程度の差はあるが、試した異なる 4 つの臨床分離株すべてで同様の傾向が認められた⁴⁹⁾。このように、薬剤以外の選択圧の影響を排除した *in vitro* の解析から、直接 Env に関係しない薬剤の選択圧によっても、異なる Env シークエンスをクワシスピーシーズから選択すること（ボトルネック進化）が明らかとなった。さらに最近の Mesplède らの報告により、インテグラーゼ阻害剤ドルテグラビル (DTG) が Env を含むウイルス変化（進化）を阻害し、中和抗体からの逃避阻止に関与することが報告された⁵⁰⁾。

このように、Env を標的（間接的も含む）としない薬剤が、Env 領域の変化（進化）に影響し、結果として、中和抗体や侵入阻害剤の逃避を抑制する可能性が示唆された。すなわち、このような第三の選択圧がもたらす Env への影響を見極めることは、Env 変化（進化）からウイルスを追い込む新規治療戦略において非常に重要であると考えられる。

Bi-functional Env 阻害剤と中和抗体感受性

これまで、新規治療法のなかでも重要な役割を担うと考えられる中和抗体の効果を維持するために、逃避ウイルスを出させない戦略について述べてきた。しかし、それでも逃避ウイルスの出現が避けられないとしたら、他にどのような手段があるだろうか。

感染者体内では、程度の差はあるが中和抗体は誘導されている。しかし、感染者から分離した血清は、血清と同じ時期に分離したウイルスをほとんど中和できない。理由は、誘導した中和抗体が選択圧として機能し、ウイルスが迅速に逃避しているためである。結果、感染者体内のほと

んどの抗 HIV 抗体が非中和抗体もしくは非常に弱い中和抗体となっている。これら多くの中和抗体逃避機序は、糖鎖の位置・数の変化、V 領域の長さの変化、三量体全体での構造変化など方法は違えども、Env 構造を変化させて中和抗体のエピトープ領域を構造的に遮蔽するという意味においては同じである。たとえば、CD4 結合後に形成されるコレセプター結合領域を認識する CD4i 中和抗体が、感染初期に多くの感染者体内で確認される事実は、ウイルスが感染初期から経時的に Env 構造を変化させて、CD4i エピトープを遮蔽してきたこととの関係が示唆される⁵¹⁾。実際、可溶性 CD4 (sCD4) をアッセイ系に加えることで、CD4 結合前に遮蔽されていた領域をエピトープとする CD4i および V3 抗体の中和活性が増強されることが知られている^{52,53)}。

現在、われわれは Env を標的とする Bi-functional 阻害剤の開発を進めている^{54~63)}。具体的には、Env 阻害剤の本来の役割である侵入阻害効果に加え、結合後に Env 構造変化活性を持つことで中和抗体増強作用を有する、いわゆる 2 つの機能を持つ Env 標的阻害剤の開発である。そこで、CD4 ミミック NBD-556 が、CD4 結合中心の Phe43 キャビティに結合し、CD4 結合時と類似した構造変化を誘起することに着目し、最初の Bi-functional 阻害剤のリード化合物として NBD-556 を用いた研究を開始した^{64,65)} (図 1)。NBD-556 は sCD4 との熱力学的挙動における類似性が高いことから、sCD4 同様に低分子化合物である CD4 ミミック NBD-556 が、中和抗体活性を増強できると考えたためである。実験の結果、予想どおり NBD-556 と CD4i または V3 抗体の組み合わせは、きわめて高い抗 HIV 相乗効果を示すことが明らかとなった^{62,63)} (図 1)。また、感染者から分離した血清 IgG に NBD-556 を少量加えるだけで、それまで完全に耐性だった同時期に分離したウイルスも中和できるようになった⁶³⁾。このように CD4 ミミックは、侵入阻

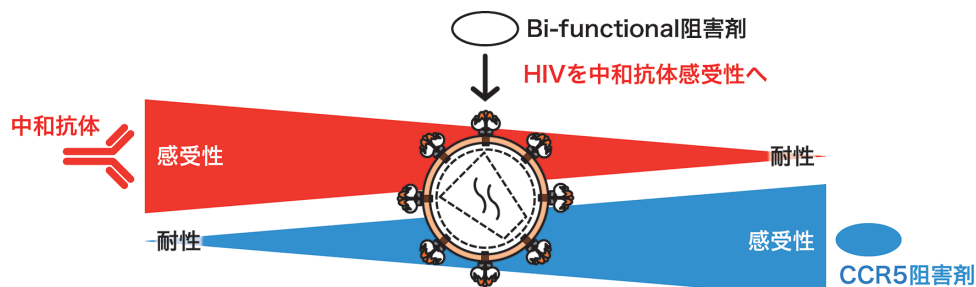


図 2 Env に対する各選択圧の模式図

中和抗体逃避は CCR5 阻害剤感受性をもたらす。反対に CCR5 阻害剤逃避は中和抗体感受性をもたらす。また CD4 ミミックをはじめとする bi-functional 阻害剤は、中和抗体逃避株を再度感受性に戻すユニークな機能を有する。

害活性だけでなく、Env 構造変化活性を兼ね備えた中和抗体増強剤としての機能も有する bi-functional 阻害剤であることが明らかとなった。また、最近、Madani らは、ワクチン接種したサルおよびヒトの血清サンプルに CD4 ミミック (BNM-II-170) を加えることで、同様に中和抗体活性が大幅に増強されることを報告している^{60,61)}。

これまで述べてきたように、近い将来に、中和抗体を用いた新たな治療方法が実現する可能性は高いといえる。その際、われわれが研究開発を進めている bi-functional Env 阻害剤を併用することで、中和抗体逃避ウイルスを再度中和感受性に戻すだけでなく、中和抗体増強剤結合 Env を抗原として広範囲中和抗体を誘導するという新たな役割を担う可能性も視野に入れている。そのためわれわれの研究室では、CD4 ミミックより広範囲 (V3 や CD4i だけでなく、V2 apex, V3-high mannose patch, CD4bs, MPER) の中和抗体に対して増強作用を有する、新規 bi-functional Env 阻害剤の研究開発をすでに開始している。

おわりに

現在、多くの次世代広域中和抗体の登場により、ワクチンを含めた新規治療法開発が盛んに行われている。しかし、HIV はその最大の特徴である易変異性により、これまでいかなる選択圧からも逃避してきたという事実をけっして忘れてはいけない。単純な選択圧では、どんなに強力であってもいつかは逃げられてしまうため、二重三重の仕掛けが必要となる。今回本総説で示した各研究成果のように、それぞれの選択圧のもとらす包括的な影響を理解し、逃避の方向を意図的に誘導できれば、ウイルスを袋小路に追い詰めることが可能となるかもしれない。また、中和抗体と CCR5 阻害剤のように、耐性変異の方向が真逆である 2 つの選択圧を組み合わせることで、コンビネーションジェネティックバリアを高め、逃避不能に陥らせることも期待できる。また、それでも逃避できるウイルスが現れたときの備え (bi-functional Env 阻害剤) も、おさおさ怠りない。この囲みを突破してくるウイルスが果たして現れるかどうか、興味深いところであるが、われわれはそれさえも予測して新たな仕掛けを開発することを怠ってはいけないのである。

利益相反： 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ : Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat Rev Immunol* 13 : 693-701, 2013. doi : 10.1038/nri3516 nri3516 [pii]
- 2) Kwong PD, Mascola JR : Human antibodies that neutralize HIV-1 : identification, structures, and B cell ontogenies. *Immunity* 37 : 412-425, 2012. doi : 10.1016/j.immuni.2012.08.012 S1074-7613 (12) 00378-0 [pii].
- 3) West AP, Jr, *et al* : Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. *Cell* 156 : 633-648, 2014. doi : 10.1016/j.cell.2014.01.052 S0092-8674 (14) 00146-9 [pii]
- 4) Lynch RM, *et al* : Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci Transl Med* 7 : 319ra206, 2015. doi : 10.1126/scitranslmed.aad5752 7/319/319ra206 [pii]
- 5) Burton DR, Hangartner L : Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design. *Annu Rev Immunol* 34 : 635-659, 2016. doi : 10.1146/annurev-immunol-041015-055515
- 6) Burton DR, Mascola JR : Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat Immunol* 16 : 571-576, 2015. doi : 10.1038/ni.3158 ni.3158 [pii]
- 7) Barouch DH, *et al* : Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. *Cell* 155 : 531-539, 2013. doi : 10.1016/j.cell.2013.09.061 S0092-8674 (13) 01280-4 [pii]
- 8) Goulder PJ, Watkins DI : Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol* 8 : 619-630, 2008. doi : 10.1038/nri2357 nri2357 [pii]
- 9) Arts EJ, Quinones-Mateu ME : Sorting out the complexities of HIV-1 fitness. *AIDS* 17 : 780-781, 2003. doi : 10.1097/01.aids.0000050881.72891.32
- 10) Rangel HR, *et al* : Role of the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene in viral fitness. *J Virol* 77 : 9069-9073, 2003.
- 11) Pierson TC, Doms RW : HIV-1 entry and its inhibition. *Curr Top Microbiol Immunol* 281 : 1-27, 2003.
- 12) Chan DC, Kim PS : HIV entry and its inhibition. *Cell* 93 : 681-684, 1998. doi : S0092-8674 (00) 81430-0 [pii]
- 13) Trkola A, *et al* : CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384 : 184-187, 1996. doi : 10.1038/384184a0
- 14) 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.
- 15) Moore JP : Coreceptors : implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 276 : 51-52, 1997.
- 16) Sattentau QJ, Moore JP : Human immunodeficiency virus

- type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J Exp Med* 182 : 185–196, 1995.
- 17) Starcich BR, *et al* : Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45 : 637–648, 1986. doi : 0092-8674 (86) 90778-6 [pii]
- 18) Kwong PD, *et al* : Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393 : 648–659, 1998. doi : 10.1038/31405
- 19) Madani N, *et al* : Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J Virol* 78 : 3742–3752, 2004.
- 20) Myszka DG, *et al* : Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 9026–9031, 2000. doi : 97/16/9026 [pii]
- 21) Huang CC, *et al* : Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310 : 1025–1028, 2005. doi : 310/5750/1025 [pii] 10.1126/science.1118398
- 22) Farzan M, *et al* : Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96 : 667–676, 1999. doi : S0092-8674 (00) 80577-2 [pii]
- 23) Cormier EG, Dragic T : The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* 76 : 8953–8957, 2002.
- 24) BreLOT A, *et al* : Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J Virol* 73 : 2576–2586, 1999.
- 25) Andrabi R, *et al* : Identification of common features in prototype broadly neutralizing antibodies to HIV envelope V2 apex to facilitate vaccine design. *Immunity* 43 : 959–973, 2015. doi : 10.1016/j.immuni.2015.10.014 S1074-7613 (15) 00439-2 [pii]
- 26) Yoshimura K, *et al* : Resistance profile of a neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favourable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS* 20 : 2065–2073, 2006. doi : 10.1097/01.aids.0000247587.31320.fe 00002030-200610240-00008 [pii]
- 27) Matsushita S, Yoshimura K, Ramirez KP, Pisupati J, Murakami T : Passive transfer of neutralizing mAb KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1. *AIDS* 29 : 453–462, 2015. doi : 10.1097/QAD.0000000000000570 00002030-201502200-00007 [pii]
- 28) Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S : Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by *in vitro* passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *J Gen Virol* 95 : 1816–1826, 2014. doi : 10.1099/vir.0.062885-0 vir.0.062885-0 [pii]
- 29) Gulick RM, *et al* : Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 359 : 1429–1441, 2008. doi : 359/14/1429 [pii] 10.1056/NEJMoa0803152
- 30) Dragic T, *et al* : A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 5639–5644, 2000. doi : 10.1073/pnas.090576697 090576697 [pii]
- 31) Tsamis F, *et al* : Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 77 : 5201–5208, 2003.
- 32) Roche M, *et al* : HIV-1 escape from the CCR5 antagonist maraviroc associated with an altered and less-efficient mechanism of gp120-CCR5 engagement that attenuates macrophage tropism. *J Virol* 85 : 4330–4342, 2011. doi : 10.1128/JVI.00106-11 JVI.00106-11 [pii]
- 33) Maeda K, *et al* : Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem* 281 : 12688–12698, 2006. doi : M512688200 [pii] 10.1074/jbc.M512688200
- 34) Maeda K, *et al* : Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol* 381 : 956–974, 2008. doi : 10.1016/j.jmb.2008.06.041 S0022-2836 (08) 00743-2 [pii]
- 35) Berro R, Sanders RW, Lu M, Klasse PJ, Moore JP : Two HIV-1 variants resistant to small molecule CCR5 inhibitors differ in how they use CCR5 for entry. *PLoS Pathog* 5 : e1000548, 2009. doi : 10.1371/journal.ppat.1000548
- 36) Pugach P, *et al* : HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* 361 : 212–228, 2007. doi : S0042-6822 (06) 00824-5 [pii] 10.1016/j.virol.2006.11.004
- 37) Kuwata T, Enomoto I, Baba M, Matsushita S : Incompatible natures of the HIV-1 envelope in resistance to the CCR5 antagonist cenicriviroc and to neutralizing antibodies. *Antimicrob Agents Chemother* 60 : 437–450, 2015. doi : 10.1128/AAC.02285-15 AAC.02285-15 [pii]
- 38) Bouvin-Pley M, *et al* : Drift of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 toward increased neutralization resistance

- over the course of the epidemic: a comprehensive study using the most potent and broadly neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* 88 : 13910–13917, 2014. doi : 10.1128/JVI.02083-14 JVI.02083-14 [pii]
- 39) Liao HX, *et al* : Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* 496 : 469–476, 2013. doi : 10.1038/nature12053 nature12053 [pii]
- 40) Moore PL, *et al* : Evolution of an HIV glycan-dependent broadly neutralizing antibody epitope through immune escape. *Nat Med* 18 : 1688–1692, 2012. doi : 10.1038/nm.2985 nm.2985 [pii]
- 41) Delwart EL, Pan H, Neumann A, Markowitz M : Rapid, transient changes at the env locus of plasma human immunodeficiency virus type 1 populations during the emergence of protease inhibitor resistance. *J Virol* 72 : 2416–2421, 1998.
- 42) Charpentier C, Nora T, Tenaillon O, Clavel F, Hance AJ : Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *J Virol* 80 : 2472–2482, 2006. doi : 80/5/2472 [pii] 10.1128/JVI.80.5.2472-2482.2006
- 43) Sheehy N, Desselberger U, Whitwell H, Ball JK : Concurrent evolution of regions of the envelope and polymerase genes of human immunodeficiency virus type 1 during zidovudine (AZT) therapy. *J Gen Virol* 77 (Pt 5) : 1071–1081, 1996.
- 44) Nora T, *et al* : Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol* 81 : 7620–7628, 2007. doi : JVI.00083-07 [pii] 10.1128/JVI.00083-07
- 45) Nijhuis M, *et al* : Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during suboptimal protease-inhibitor therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 14441–14446, 1998.
- 46) Kitrinou KM, Nelson JA, Resch W, Swanstrom R : Effect of a protease inhibitor-induced genetic bottleneck on human immunodeficiency virus type 1 env gene populations. *J Virol* 79 : 10627–10637, 2005. doi : 79/16/10627 [pii] 10.1128/JVI.79.16.10627-10637.2005
- 47) Zhang YM, Dawson SC, Landsman D, Lane HC, Salzman NP : Persistence of four related human immunodeficiency virus subtypes during the course of zidovudine therapy : relationship between virion RNA and proviral DNA. *J Virol* 68 : 425–432, 1994.
- 48) Ibanez A, Clotet B, Martinez MA : Human immunodeficiency virus type 1 population bottleneck during indinavir therapy causes a genetic drift in the env quasispecies. *J Gen Virol* 81 : 85–95, 2000.
- 49) Harada S, *et al* : Impact of antiretroviral pressure on selection of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences *in vitro*. *J Gen Virol* 94 : 933–943, 2013. doi : 10.1099/vir.0.047167-0 vir.0.047167-0 [pii]
- 50) Mesplède T, *et al* : Dolutegravir inhibits HIV-1 Env evolution in primary human cells. *AIDS* 29 : 659–665, 2015. doi : 10.1097/QAD.0000000000000606 00002030-201503270-00003 [pii]
- 51) Decker JM, *et al* : Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *J Exp Med* 201 : 1407–1419, 2005. doi : jem.20042510 [pii] 10.1084/jem.20042510
- 52) Thali M, *et al* : Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol* 67 : 3978–3988, 1993.
- 53) Lusso P, *et al* : Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 79 : 6957–6968, 2005. doi : 79/11/6957 [pii] 10.1128/JVI.79.11.6957-6968.2005
- 54) Narumi T, *et al* : CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorg Med Chem* 21 : 2518–2526, 2013. doi : 10.1016/j.bmc.2013.02.041 S0968-0896 (13) 00174-0 [pii]
- 55) Narumi T, *et al* : Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19 : 6735–6742, 2011. doi : 10.1016/j.bmc.2011.09.045S0968-0896 (11) 00780-2 [pii]
- 56) Narumi T, *et al* : CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 20 : 5853–5858, 2010. doi : 10.1016/j.bmcl.2010.07.106 S0960-894X (10) 01075-9 [pii]
- 57) Hashimoto C, *et al* : A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor : pharmacokinetics. *Bioorg Med Chem* 21 : 7884–7889, 2013. doi : 10.1016/j.bmc.2013.10.005 S0968-0896 (13) 00861-4 [pii]
- 58) Ohashi N, *et al* : Small-molecule CD4 mimics containing mono-cyclohexyl moieties as HIV entry inhibitors. *Chem Med Chem* 11 : 940–946, 2016. doi : 10.1002/cmde.201500590

- 59) Mizuguchi T, *et al* : A minimally cytotoxic CD4 mimic as an HIV entry inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 26 : 397–400, 2016. doi : 10.1016/j.bmcl.2015.11.103 S0960-894X (15) 30311-5 [pii]
- 60) Madani N, *et al* : Antibodies elicited by multiple envelope glycoprotein immunogens in primates neutralize primary human immunodeficiency viruses (HIV-1) sensitized by CD4-mimetic compounds. *J Virol* 90 : 5031–5046, 2016. doi : 10.1128/JVI.03211-15 JVI.03211-15 [pii]
- 61) Madani N, *et al* : CD4-mimetic small molecules sensitize human immunodeficiency virus to vaccine-elicited antibodies. *J Virol* 88 : 6542–6555, 2014. doi : 10.1128/JVI.00540-14 JVI.00540-14 [pii]
- 62) Yamada Y, *et al* : CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorg Med Chem Lett* 20 : 354–358, 2010. doi : 10.1016/j.bmcl.2009.10.098 S0960-894X (09) 01509-1 [pii]
- 63) Yoshimura K, *et al* : Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol* 84 : 7558–7568, 2010. doi : 10.1128/JVI.00227-10 JVI.00227-10 [pii]
- 64) Kwon YD, *et al* : Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 : 5663–5668, 2012. doi : 10.1073/pnas.1112391109 1112391109 [pii]
- 65) Lalonde JM, *et al* : Design, synthesis and biological evaluation of small molecule inhibitors of CD4-gp120 binding based on virtual screening. *Bioorg Med Chem* 19 : 91–101, 2011. doi : 10.1016/j.bmc.2010.11.049 S0968-0896 (10) 01073-4 [pii]