

日本感染症医薬品協会奨励賞受賞講演会記録

2012年11月8日, 学士会館 202号室

【2012年度受賞講演, 座長: 清田 浩】

HIV プロテアーゼの2量体形成機構の解析と新規の HIV プロテアーゼ2量体形成阻害剤の開発

関 康博

熊本大学医学部血液内科学, 感染免疫診療部

はじめに

2012年度の日本感染症医薬品協会奨励賞の受賞内容は, 最近の筆者らの研究内容である1) 多剤耐性 HIV-1 に対して高い活性を発揮する HIV-1 プロテアーゼ阻害剤 darunavir (DRV) に対する高度耐性 HIV-1 の試験管内誘導, 2) DRV 高度耐性 HIV-1 に新たに出現した HIV-1 プロテアーゼ領域の変異が DRV のプロテアーゼ2量体形成阻害機構に与える影響の検討, の2つの研究から主になっている。本稿ではこれまで筆者らが行ってきた1) 多剤耐性 HIV-1 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-1 プロテアーゼの2量体形成機構の検出系の確立と阻害剤の開発過程も紹介し, 我々の一連の研究に対する理解がより深まれば幸いである。

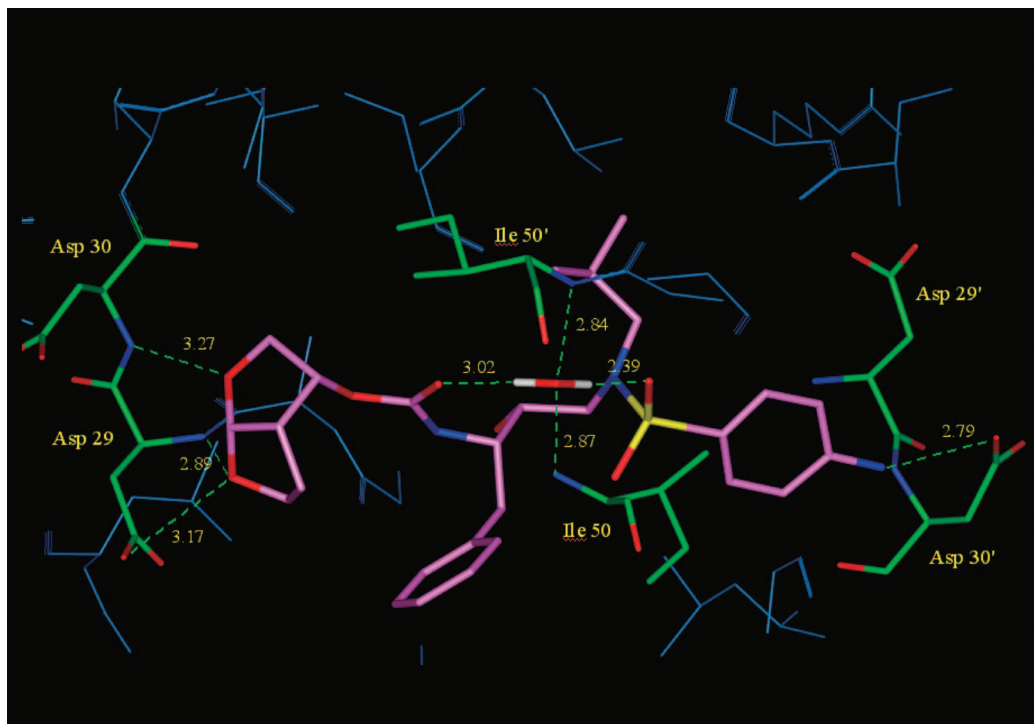
多剤耐性 HIV-1 に対して高い活性を発揮する プロテアーゼ阻害剤, DRV の開発

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 (reverse transcriptase inhibitors: RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitors: PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (combinational antiretroviral therapy: cART) に負うところが大である。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依然として急務の課題となっている。筆者は抗 HIV-1 剤開発研究, 特に薬剤耐性 HIV-1 にも有効な新規の PIs の開発, HIV-1 の PIs に対する耐性機構の解明等の研究をこれまで行ってきた。

我々のグループは化合物の P2 部位に *bis*-tetrahydrofuranylurethane (*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 (protease: PR) の活性部位の側鎖に結合するのと

図1. DRVと野生型 HIV-1 プロテアーゼ複合体のX線結晶構造



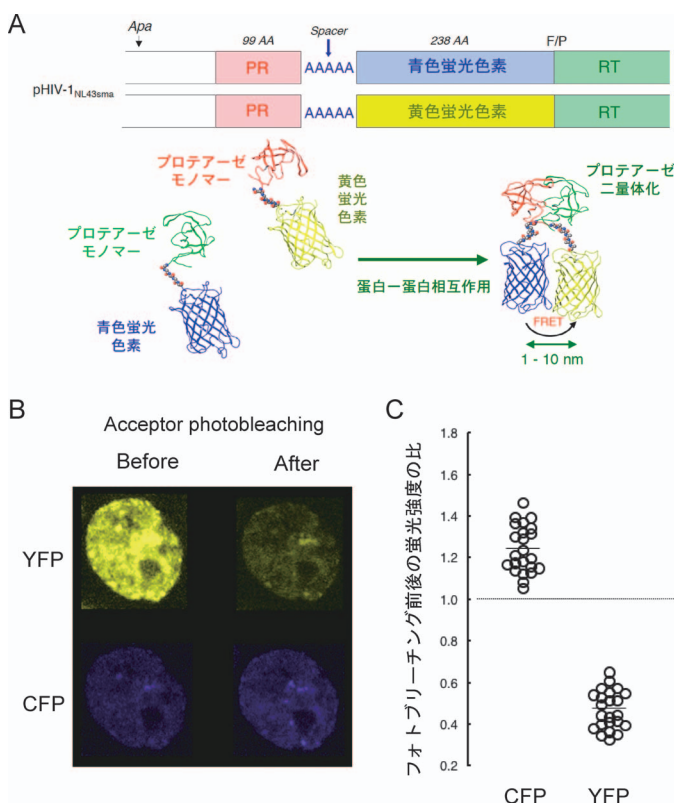
結晶構造解析によって、DRVのP2部位のbis-THF基がHIV-1プロテアーゼの主要な活性中心部位のアミノ酸であるAsp-29とAsp-30の主鎖と極めて強固な水素結合を形成していることが明らかとなった。水素結合を点線で示す。(文献1より改変して掲載)

異なり、PRの主要活性部位である Asp-29, Asp-30 の主鎖 (backbone) と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/PrezistaTM (DRV) についての細胞生物学的、ウイルス学的、結晶構造学解析を米国 Purdue University の Dr. GHOSH の研究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 (図1)¹⁾。DRV は2006年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年に認可され、臨床に供されている。

HIV-1 プロテアーゼ 2量体形成の検出系の確立と2量体形成阻害剤の開発

HIV-1 PRは2量体 (homodimer) を形成し、酵素活性を発揮、HIV-1 PRの2量体形成 (dimerization) はHIV-1の増殖、複製にとって、必須と考えられている^{2,3)}。これまでも HIV-1 PR dimerization の阻害は、PR 酵素活性を阻害し、HIV-1の複製も阻害、新規の薬剤標的部位と考えられてきたが、過去に報告された種々の化合物、物質がPR dimerization を阻害したという直接的な証拠はいままでなかった。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-1 PR dimerization を検出する系の確立を試みた。図2-Aに示すように

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 PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローン (pHIV-PR_{WT}^{CFP}, pHIV-PR_{WT}^{YFP}) 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。

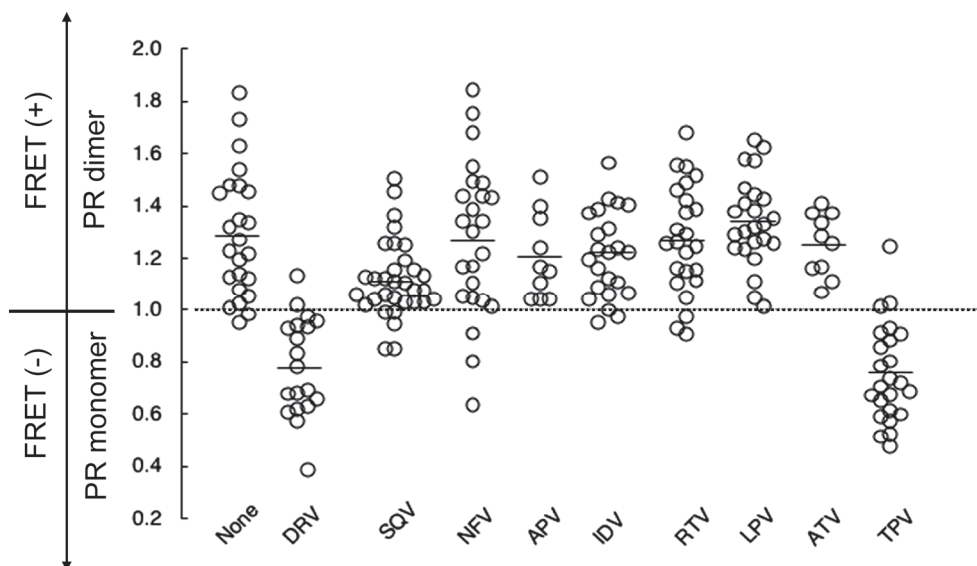
(B) アクセプター (YFP) フォトブリーチング前後における COS7 細胞の蛍光イメージ。CFP, YFP タグ付き野生型 PR を有する感染性クローン pHIV-PR_{WT}^{CFP} と pHIV-PR_{WT}^{YFP} を COS7 細胞に co-transfection し、72 時間後に走査型レーザ生物顕微鏡 Fluoview FV500 により観察した。CFP タグ付き野生型 HIV-1 PR と YFP タグ付き野生型 HIV-1 PR はフォトブリーチング前に発現が確認された。フォトブリーチングした細胞は YFP の蛍光が著明に減少し、フォトブリーチング前後の YFP 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 ($n=23$) だった。CFP^{A/B} ratio が 1.0 以上であれば、FRET が起こっていることを示す。(文献 6 を参考に改変して掲載)

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-1 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、走査型レーザ生物顕微鏡 (confocal laser scanning microscope) Fluoview FV500 を用いて細胞内で FRET が起こるかどうかを確認した。

FRET の定量化の方法として、以前にも種々の方法が報告されているが、我々はアクセプターフォトブリーチング法を用いた (図 2-B)^{4,5)}。すなわち、YFP を選択的にアルゴンレーザーによりフォトブリーチング、退色させた細胞において、ブリー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、

図3. DRV, TPV による HIV-1 PR 2量体形成の阻害



1 μ Mの各種PIs (DRV, SQV, NFV, APV, IDV, RTV, LPV, ATV, TPV) 存在下のCOS7細胞にpNL-PR_{WT}^{CFP}とpNL-PR_{WT}^{YFP}をco-transfectionした。72時間後、培養細胞を走査型レーザー生物顕微鏡Fluoview FV500を用いて観察し、CFP^{A/B} ratiosを決定した。CFP^{A/B} ratiosが1.0以上であれば、FRETが起こっており、HIV-1 PRが2量体形成していることを示す。比の平均値は横線で示す。(文献6を参考に改変して掲載)

CFP, YFP間の蛍光エネルギーの移行 (FRET) が起こっていたと考えられ、このことはPR_{WT}^{CFP}とPR_{WT}^{YFP}蛋白間の2量体が形成されていることを示している (図2-C)。

そこで我々は、このFRET-HIV-1 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) を開発し同定した⁶⁾。興味深いことに、amprenavir (APV), nelfinavir (NFV) 等の既存のPIsはPR dimerizationには影響を与えないのに対して、我々が開発し多剤耐性HIV-1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は成熟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dimerizationをも阻止するbifunctional PI (あるいはPDI) であることが明らかとなった (図3)。

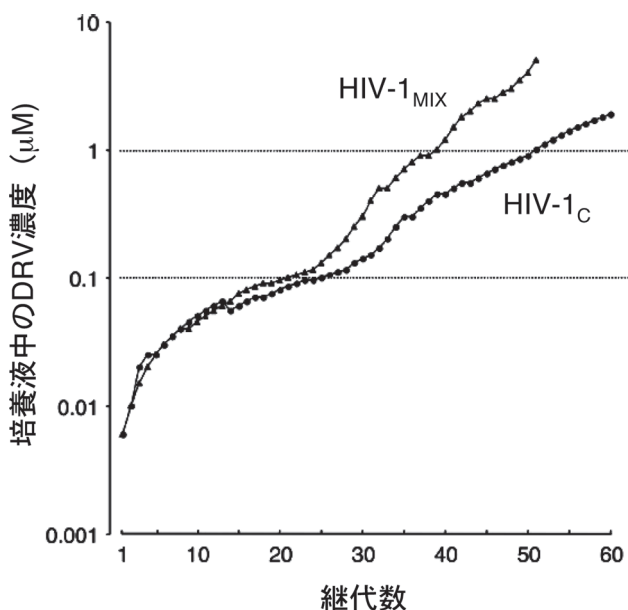
多剤耐性臨床分離株の混合株を用いたDRV高度耐性HIV-1の試験管内誘導

野生HIV-1株を用いた試験管内耐性誘導実験において、DRVの耐性発現は既存のPIsと比較して極めて遅延し、野生HIV-1株からのDRV高度耐性HIVの試験管内誘導は今までに成功した報告はなかった。そこで、我々はDRVが感受性を発揮、維持している多剤耐性臨床分離株を用いて、DRVに対する高度耐性HIV-1の誘導を試みた。8種類のmultidrug-resistant HIV-1 (HIV-1_{MDR}) を単一、あるいはmixtureした混合株を用いて、DRV耐性誘導実験を行った。単一のHIV-1_{MDR}をそれぞれ用いた耐性誘導実験ではHIV-1_Cを用いた実験のみでDRV耐性を誘導し得たが、その他の単一のHIV-1_{MDR}はDRV存在下では増殖、複製できなかった。8種類のHIV-1_{MDR}の混合株を用いた実験では、39 passageでDRV 1 μ M存在下、51 passageではDRV 5 μ M存在下で増殖、複製可能なHIV-1を誘導することに成功し、HIV-1_C単一株を用いた

DRV 耐性誘導実験と比較して、耐性発現遅延がより早く、高濃度 ($5\mu\text{M}$) の DRV 存在下まで誘導し得た (図4)。HIV-1_{MIX}^{P51} の PR 領域には、野生 HIV-1_{NL4-3} と比較して、14 個のアミノ酸変異の蓄

積が認められ、HIV-1 混合株の中で、主要株となっている HIV-1_C と比較して、新たに4つの変異の蓄積 (V32I, L33F, I54M, I84V) が認められた (図5: 太字で示す)。DRV 耐性誘導実験で得られ

図4. 多剤耐性臨床分離株を用いた DRV 耐性誘導実験



複数の PIs に対して耐性となった8種類の臨床分離株の混合株である HIV-1_{MIX} (▲) と単一の多剤耐性臨床分離株である HIV-1_C (●) をそれぞれ、DRV の濃度を徐々に上昇させながら、MT-4 細胞を用いて継代培養を続けた。耐性誘導実験は計60 passages まで続けられ、HIV-1_{MIX} は $0.006\mu\text{M}$ の DRV 存在下で継代を始め、51 passage では $5.0\mu\text{M}$ の DRV 存在下で増殖複製可能となった。(文献7を参考に改変して掲載)

図5. DRV 存在下で継代された HIV-1_{MIX} の PR 領域のアミノ酸変異の蓄積

	10	20	30	40	50
pNL4-3	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TV LEEMNLPG	RWKPKMIGGI
1P	I	...V...R	...I.....	I....	L....
10P	I	...V...R	...I.....	.I...I....	L....
30P	I	...V...R	...I.....	.I...I....	L....
51P	I	...V...R	...I.....	.I F ...I....	L....
	60	70	80	90	99
pNL4-3	GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF
1P	..SV.....	.VP.....Q		.A.....M.	
10P		..P.....		.A.....M.	
30P		..P.....Q		.A.V....M.	
51P	...M.....	..P.....Q		.I.V....M.	

DRV 存在下で継代培養された HIV-1_{MIX} の4つの異なる passages から得られた HIV-1 の PR 領域のアミノ酸変異を示す。対照として、野生 HIV-1_{NL4-3} の PR 全長 (99 アミノ酸) を上に示す。(文献7を参考に改変して掲載)

表 1. DRV 耐性誘導実験で得られた多剤耐性臨床分離混合株 (HIV-1_{MIX}) に対する種々のPIsの抗ウイルス活性 (EC₅₀: μ M)

ウイルス	SQV	NFV	APV	IDV	RTV	LPV	ATV	TPV	DRV
HIV-1 _{ERS104pre} (wild-type)	0.009	0.016	0.025	0.021	0.030	0.015	0.005	0.10	0.003
HIV-1 _{MIX} ^{P1}	0.034 (4)	0.66 (41)	0.28 (11)	>1 (>48)	>1 (>33)	0.26 (17)	0.021 (4)	0.060 (0.6)	0.005 (2)
HIV-1 _{MIX} ^{P10}	0.026 (3)	>1 (>63)	0.45 (18)	>1 (>48)	>1 (>33)	0.22 (15)	0.035 (7)	0.023 (0.2)	0.013 (4)
HIV-1 _{MIX} ^{P20}	0.30 (33)	>1 (>63)	>1 (>40)	>1 (>48)	>1 (>33)	>1 (>67)	>1 (>200)	0.33 (3)	0.31 (103)
HIV-1 _{MIX} ^{P39}	0.35 (39)	>1 (>63)	>1 (>40)	>1 (>48)	>1 (>33)	>1 (>67)	>1 (>200)	0.41 (4)	>1 (>333)
HIV-1 _{MIX} ^{P51}	0.30 (33)	>1 (>63)	>1 (>40)	>1 (>48)	>1 (>33)	>1 (>67)	>1 (>200)	1.79 (18)	>1 (>333)

多剤耐性臨床分離 HIV-1 の mixture を DRV の濃度を徐々にあげながら、継代培養を重ね、DRV 高度耐性 HIV-1 を誘導した。耐性誘導実験中の 1, 10, 30, 39, 51 各 passage の HIV-1 を分離、それらの誘導株に対する DRV 及び他の PIs の活性 (EC₅₀: μ M) は、MT-4 細胞を用いた p24 assay で検討された。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 EC₅₀ 値が上昇したかを示す。(文献 7 を参考に改変して掲載)

た HIV-1_{MIX} に対する種々の PIs の抗 HIV 活性を検討したところ、継代を経るにつれて HIV-1_{MIX} は、APV, IDV, NFV, RTV, LPV, ATV に対して高度耐性を獲得し、SQV, TPV に対して中等度耐性を認めた (表 1)。DRV に対しても徐々に耐性を獲得し、39 passage, あるいは 51 passage を経た HIV-1_{MIX} に対する DRV の抗ウイルス活性は EC₅₀ 値が 1 μ M 以上と DRV 高度耐性を獲得していることが明らかとなった。これらの研究から HIV-1 の DRV 耐性は極めて困難ではあるが、複数の PIs 耐性 HIV 変異体の homologous recombination が起これば、HIV-1 は DRV 高度耐性となりうる可能性を示した⁷⁾。

DRV 耐性関連変異と HIV protease dimerization の関連性

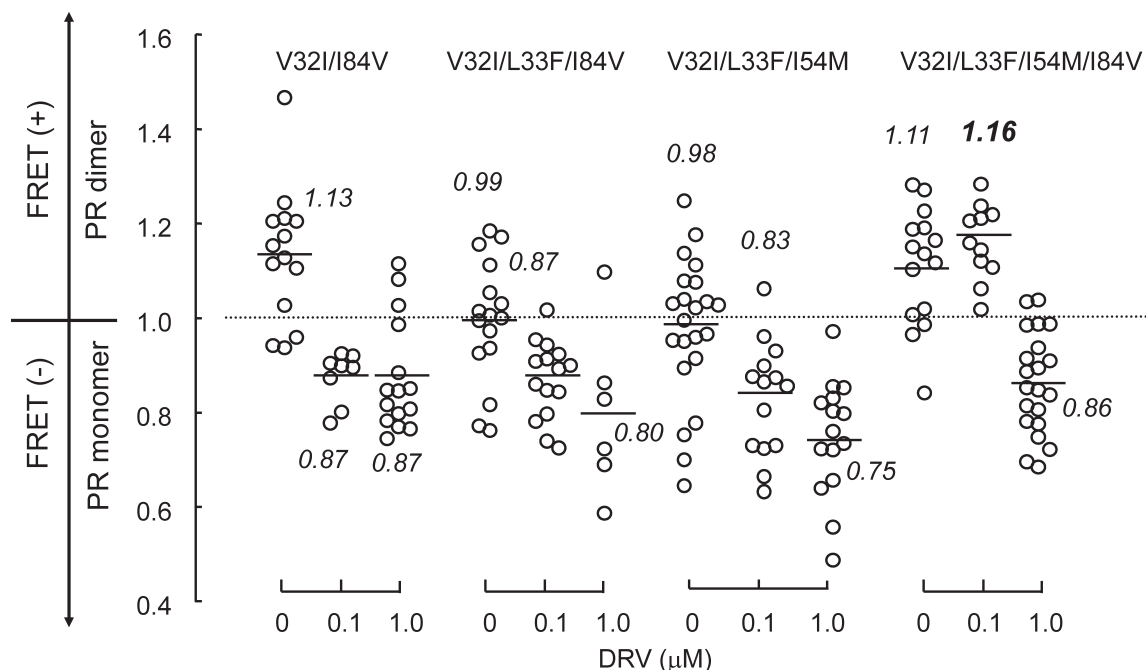
最後に、我々が誘導した DRV 高度耐性 HIV-1 に新たに出現した 4 つの PR 変異 (V32I, L33F, I54M, I84V) の DRV 耐性に与える影響について検討を重ねた。まず、これらの試験内で認められた変異が DRV 耐性臨床分離株にも共通して認められるかを検討したところ、PR 領域の 32, 33, 54, 84 番の変異は DRV 高度耐性となった複数の臨床分離株から認められていることを米国 Stanford 大学の Dr. SHAFER との共同研究で明らかとした (表 2: 太字で示す)。また、これら 4 つの変異 (V32I/L33F/I54M/I84V) を含んだ感染性組み換え HIV 変異体を作成し、DRV の抗 HIV-1 活性を検討したところ、これら 4 つの変異が蓄積すると DRV の EC₅₀ 値は 0.64 μ M と野生株に対する抗ウイルス活性 (EC₅₀ 値; 0.003 μ M) と比較して、213 倍もの高度耐性となることを明らかとした⁸⁾。更に、前述した FRET-HIV-1 発現系を用いて、これらの変異が DRV の PR dimerization 阻害活性に与える影響と検討した。V32I, L33F, I54M, I84V のそれぞれ単一の変異を導入した PR 変異体では DRV の dimerization 阻害活性に対して耐性とはならな

表2. DRV 耐性関連アミノ酸変異の同定

同定された DRV 耐性関連アミノ酸変異	分離株	DRV の抗 HIV 活性 (EC ₅₀ : μM) (fold change)
L10I, I15V, K20R, L24I, V32I, L33F , M36I, M46L, I54M , L63P, K70Q, V82I, I84V , L89M	HIV _{8MIX} ^{P51}	>1 (>333)
L10F, V11I, I13V, L19Q, K20M, V32I, L33F , E35A, M36I, M46I, I47V, I54M , R57K, I62V, L63P, I64V, G73T, T74A, I84V , L89V, L90M	rCL HIV _{F16}	0.30 (97)
L10F, V11I, T12P, I13V, I15V, L19P, K20T, V32I, L33F , E35G, M36I, I54V, I62V, L63P, K70T, A71I, G73S, P79A, I84V , L89V, L90M	rCL HIV _{T45}	0.33 (105)
L10I, I13V, I15V, L19V, L24I, V32I, L33F , K43E, M46L, I54L , D60E, L63P, A71V, I72V, V82A, I84V	rCL HIV _{T48}	0.17 (54)
V11I, V32I, L33F , I47V, I50V, I54L/M , G73S, L76V, I84V , L89V		
V32I, I50V, I54L, I54M , L76V, V82F		

DRV 高度耐性 HIV-1 から得られた PR 領域のアミノ酸変異を示す。HIV_{8MIX}^{P51} は我々が試験管内で誘導した DRV 高度耐性株⁷⁾, 3つの組み換え感染性クローン_{rCL HIV_{F16}, rCL HIV_{T45}, rCL HIV_{T48}} は DRV を含んだ抗 HIV 療法が失敗した患者から分離された臨床分離株を示す⁸⁾。表中の括弧 () 内の数字は各薬剤が野生株 HIV-1_{BR104095} と比較して耐性株に何倍 EC₅₀ 値が上昇したかを示す。表中の下から2番目のアミノ酸変異は, De MEYER⁹⁾, MITSUYA¹⁰⁾ らによって報告された変異, 1番下のアミノ酸変異は DRV 耐性に最も寄与すると VAN MARCK によって報告された変異を示す¹¹⁾。(文献8を参考に改変して掲載)

図6. PR領域の複数のアミノ酸変異の組み合わせがDRVのPR 2量体形成阻害能に与える影響



薬剤非存在下,あるいは0.1 μ M, 1 μ M DRV存在下のCOS7細胞にV32I/I84V, V32I/L33F/I84V, V32I/L33F/I54M, V32I/L33F/I54M/I84VのPR変異をそれぞれ有するpNL-PR^{MUTANT}_{CFP}とpNL-PR^{MUTANT}_{YFP}をペアでco-transfectionした。72時間後,培養細胞を走査型レーザー生物顕微鏡Fluoview FV500を用いて観察し,CFP^{A/B} ratiosを決定した。CFP^{A/B} ratiosが1.0以上であれば,FRETが起こっており,HIV PRが2量体形成していることを示す。比の平均値は横線で示す。(文献8を参考に改変して掲載)

かった。2つあるいは3つの変異の組み合わせを導入したPR変異体でもDRVのdimerization阻害活性に対して耐性とはならなかったが,V32I/L33F/I54M/I84Vの4つの変異を導入したところ,HIV-1 PR変異体はDRVのdimerization阻害活性からescapeしうることが明らかとなった(図6)⁸⁾。これらの実験データより,HIV-1はDRVが発揮するPR dimerization阻害効果を減弱させ,DRV高度耐性となりうるといったHIV-1の新しい薬剤耐性機構を明らかとなった。同時にPR領域の4つの変異(V32I/L33F/I54M/I84V)の組み合わせが,DRVのPR dimerization阻害効果の減弱に必要なことは,DRVに対するHIV-1の耐性発現は極めて遅延し,かつ困難であることを示すものであった。

まとめ,今後の研究計画

筆者らは,1) 多剤耐性HIV-1に対して高い抗ウイルス活性を発揮するPI; DRVの開発,2) HIV-1の複製,増殖に必須と考えられるHIV-1 PR dimerizationの検出系の確立とDRVを含んだ一連のPDIの同定,3) 多剤耐性臨床分離株の混合株を用いてDRV高度耐性HIV-1変異体の誘導に成功,4) DRV耐性関連変異がDRVの有するPR dimerization阻害活性に与える影響を検討し,4つの変異(V32I/L33F/I54M/I84V)の蓄積によって,HIV-1がDRVのdimerization阻害活性から耐性となりうるといった新しい薬剤耐性機構の解明,といった研究を一貫して行ってきた。今後は,質量分析(ESI-MS),結晶構造,ウイルス,酵素学的アプローチによるDRVのHIV-1 PRモノマーとの結合様式,結合部位の解析,DRV以外のPDIであり現在海外で認可されているPI,tipranavirのPR

dimerization 阻害機構の解析¹²⁾, DRV 高度耐性 HIV-1_{MDR} PR (本文中の HIV-1_{MIX}^{P51} 等) の結晶構造解析のデータに基づいた, より強力な新規の PDI の開発等を目指す。

謝辞

この度, 2012 年度の日本感染症医薬品協会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。本研究は, 熊本大学医学部血液内科学で主に行った研究であり, 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, 本賞の選考にあたられました選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) KOH, Y.; H. NAKATA, K. MAEDA, *et al.*: 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
- 2) WLODAWER, A.; M. MILLER, M. JASKÓLSKI, *et al.*: Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245: 616~621, 1989
- 3) KOHL, N. E.; E. A. EMINI, W. A. SCHLEIF, *et al.*: Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4686~4690, 1988
- 4) SEKAR, R. B. & A. PERIASAMY: Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J. Cell Biol.* 160: 629~633, 2003
- 5) BASTIAENS, P. I.; I. V. MAJOU, P. J. VERVEER, *et al.*: Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *Embo. J.* 15: 4246~4253, 1996
- 6) KOH, Y.; S. MATSUMI, D. DAS, *et al.*: Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J. Biol. Chem.* 282: 28709~28720, 2007
- 7) KOH, Y.; M. AMANO, T. TOWATA, *et al.*: *In vitro* selection of highly darunavir-resistant and replication-competent HIV-1 variants by using a mixture of clinical HIV-1 isolates resistant to multiple conventional protease inhibitors. *J. Virol.* 84: 11961~11969, 2010
- 8) KOH, Y.; M. AOKI, M. L. DANISH, *et al.*: Loss of protease dimerization inhibition activity of darunavir is associated with the acquisition of resistance to darunavir by HIV-1. *J. Virol.* 85: 10079~10089, 2011
- 9) DE MEYER, S.; T. VANGENEUGDEN, B. VAN BAELEN, *et al.*: Resistance profile of darunavir: combined 24-week results from the POWER trials. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24: 379~388, 2008
- 10) MITSUYA, Y.; T. F. LIU, S. Y. RHEE, *et al.*: Prevalence of darunavir resistance-associated mutations: patterns of occurrence and association with past treatment. *J. Infect. Dis.* 196: 1177~1179, 2007
- 11) VAN MARCK, H.; I. DIERYNCK, G. KRAUS, *et al.*: The impact of individual human immunodeficiency virus type 1 protease mutations on drug susceptibility is highly influenced by complex interactions with the background protease sequence. *J. Virol.* 83: 9512~9520, 2009
- 12) AOKI, M.; M. L. DANISH, H. AOKI-OGATA, *et al.*: Loss of the protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) and its association with the acquisition of resistance to TPV by HIV-1. *J. Virol.* 86: 13384~13396, 2012