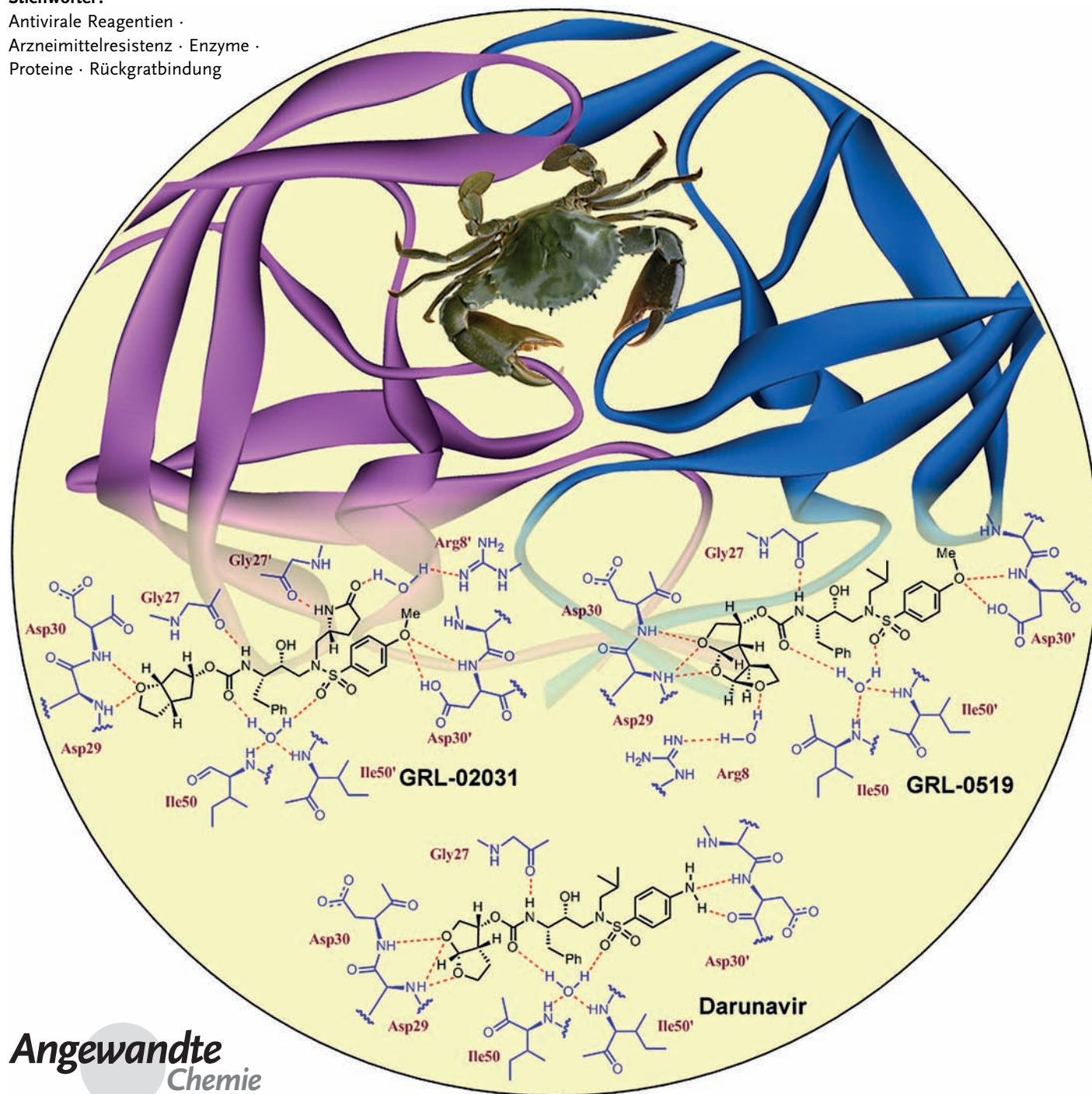


Verstärkung der Bindung an das Proteinerückgrat – ein fruchtbares Konzept gegen die Arzneimittelresistenz von HIV**

Arun K. Ghosh,* David D. Anderson, Irene T. Weber und Hiroaki Mitsuya

Stichwörter:

Antivirale Reagentien ·
Arzneimittelresistenz · Enzyme ·
Proteine · Rückgratbindung



Die Entstehung von Arzneimittelresistenzen ist eines der grundlegenden Probleme der Medizin. Dass sich bei HIV/AIDS so schnell resistente HIV-1-Varianten einstellen, ist ein großes Hindernis für die modernen Therapien. Wichtige Zielmoleküle der derzeitigen antiretroviralen Therapien sind Inhibitoren der HIV-1-Protease. Das Virus entwickelt Resistenzen, wenn Mutationen die Inhibitorbindung des Enzyms verändern und somit die Effizienz mindern. Um diese Resistenzbildung zu vermeiden, haben wir Inhibitoren erforscht, die am aktiven Zentrum der Protease Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat bilden. Weil sich die Geometrie am katalytischen Zentrum ohne Funktionsverlust nicht ändern kann, schränken solche Wechselwirkungen die Möglichkeiten der Protease zur Resistenzbildung erheblich ein. Hier diskutieren wir das enzymatische Strukturprinzip, auf dem unser Konzept der Rückgratbindung beruht. Besonderes Augenmerk richten wir auf die Anwendung des Konzepts in unseren jüngeren Arbeiten zu antiviralen Inhibitoren der HIV-1-Protease.

1. Einführung

„It has taken half a century for the selection of antibiotic-resistant bacteria to represent a widespread threat to humans, and yet it takes only weeks to months to select inhibitor-resistant immunodeficiency viruses in treated patients.“

Esteban Domingo, Christof Biebricher, Manfred Eigen und John Holland^[1]

1.1. Eine kurze Geschichte der Viren

Schon seit der Vorzeit werden die Menschen von Krankheiten geplagt, die von Viren verursacht werden.^[2] In alt-ägyptischen Hieroglyphen, die um 1150 v. Chr. datieren, finden sich Berichte über Viruserkrankungen, und charakteristische Narbenspuren an der Mumie von Pharao Ramses V. deuten stark auf eine Pockeninfektion hin. Im 15. Jahrhundert erschienen in China erste Aufzeichnungen über eine vorbeugende Impfung gegen das Pockenvirus.^[3] Jedoch erst nach den Arbeiten von Adolf Mayer, Dimitri Ivanovsky und Martinus Beijerinck über das Tabakmosaikvirus zu Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Viren als eigenständige pathogene Mikroorganismen erkannt.^[4] Durch die ganze Menschheitsgeschichte zieht sich die Rolle der Viren als im Wesentlichen gesundheitsschädigende Erreger. Pocken- und Influenzaviren verursachten globale Epidemien mit Millionen von Toten.^[5] Um die Ausbreitung des für die Maul- und Klauenseuche verantwortlichen Aphthovirus zu verhindern, mussten Millionen Tiere notgeschlachtet werden, was zu großen wirtschaftlichen Verlusten führte.^[6] In jüngster Zeit machte der SARS hervorrufende Coronavirus Schlagzeilen. Auf einen SARS-Ausbruch hin kam es zu einer raschen und nahezu pandemischen Ausbreitung, die 11 % Todesopfer unter den Infizierten forderte.^[7] Auch die Unterart H5N1 des stark pathogenen Influenza-A-Virus, häufig auch als aviärer

Aus dem Inhalt

1. Einführung	1813
2. Das Proteinrückgrat als Angriffspunkt gegen die Resistenzbildung	1815
3. Strukturbasiertes, auf das Proteinrückgrat ausgerichtetes Design	1817
4. Im Kampf gegen die Arzneimittelresistenz: mit der Strategie der Rückgratbindung zur klinischen Einführung von Darunavir	1820
5. Design von hochwirksamen Bis-THF-Pls unter Beibehaltung der Rückgratbindung	1823
6. Das Konzept der Rückgratbindung als Strategie gegen die Arzneimittelresistenz im Test	1827
7. P2-Liganden mit flexibler Konformation, die multiple Wechselwirkungen mit dem Rückgrat eingehen	1831
8. Weitere Verbesserung der Resistenzeigenschaften durch Maßnahmen zur Rückgratbindung und zu den Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand	1833
9. Zusammenfassung und Ausblick	1834

Influenzavirus bezeichnet, stellt eine mögliche pandemische Bedrohung dar und wird weltweit mit großer Sorge beobachtet.^[8] In den 1980er Jahren wurden wir Zeuge der Aus-

[*] Dr. A. K. Ghosh, D. D. Anderson
Department of Chemistry and Department of Medicinal Chemistry
Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907 (USA)
E-Mail: akghosh@purdue.edu
Homepage: <http://www.chem.purdue.edu/ghosh/>

Dr. I. T. Weber
Department of Biology, Molecular Basis of Disease
Georgia State University, Atlanta, Georgia 30303 (USA)

Dr. H. Mitsuya
Departments of Hematology and Infectious Diseases
Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860-8556 (Japan) und
HIV and AIDS Malignancy Branch, National Cancer Institute
Bethesda, Maryland 20892 (USA)

[**] Das Vortitelbild zeigt unsere „molekulare Krabbe“, die das Proteinrückgrat der HIV-1-Protease fest umklammert. Wir danken Dr. Xiaoming Xu für seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Graphik.

breitung des humanen Immundefizienzvirus (HIV). Seitdem hat sich die HIV-Infektion, die zum „Acquired Immune Deficiency Syndrom“ (AIDS) führt, zu einer globalen Krise von katastrophalen Ausmaßen ausgeweitet. Fast 2.6 Millionen Neuinfektionen werden jedes Jahr gezählt.^[9] Zwar existieren bereits effektive Behandlungsformen für HIV und AIDS, die den Krankheitsverlauf verzögern, aber weder eine Heilung noch eine Impfung sind bislang möglich.

1.2. Beginn der HIV-Infektion und ihre Ausbreitung

Den Anfang der HIV-Zeitrechnung markiert der Jahresbeginn 1981, und 1983 wurde das Virus zum ersten Mal isoliert.^[10,11] Seitdem haben sich Millionen Menschen mit HIV infiziert. Der darauf folgende AIDS-Ausbruch auf allen Kontinenten forderte schätzungsweise 25 Millionen Todesopfer und ließ Millionen von Kindern als Waisen zurück.^[9] Nach jüngsten Schätzungen des gemeinsamen Programms der Vereinten Nationen zu HIV/AIDS (UNAIDS) leben derzeit mehr als 33 Millionen Erwachsene und Kinder mit der Krankheit, und 1.8 Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen von AIDS.^[9] Trotz dieser alarmierenden Statistiken scheint sich im Kampf gegen AIDS möglicherweise doch etwas getan zu haben, denn allmählich sinkt die Zahl der jährlichen Todesfälle.^[9] Durch intensive Forschung, die Entwicklung von neuartigen antiviralen Medikamenten und durch Kombinationstherapien mit mehreren Präparaten ließ sich die Lebenserwartung derjenigen, die Zugang zu den

Therapien haben, beträchtlich steigern.^[12,13] Leider macht eine rasche Resistenzbildung die Effektivität der Behandlung vielfach wieder zunichte. Nach wie vor stellt die Entstehung von Resistenzen eine gewaltige Herausforderung für die Arzneimittelforschung dar.^[14,15]

Somit kann es sein, dass die Fortschritte, die bei der Bekämpfung von HIV/AIDS bereits erzielt worden sind, sich wieder in Nichts auflösen. Auch heute noch werden dringend neuartige Anti-HIV-Therapeutika und Strategien für das Medikamentendesign gesucht, die der Resistenzbildung dauerhaft Einhalt gebieten können.

1.3. Proteaseinhibitoren

Aufgrund von biochemischen Ereignissen während der HIV-Replikation kamen eine Reihe von möglichen Zielmolekülen in die nähere Wahl, die sich für therapeutische Maßnahmen eignen könnten. Rasch wurde das Enzym HIV-Protease als wichtiger therapeutischer Angriffspunkt erkannt.^[16] Offenbar ist eine effektive HIV-Protease unverzichtbar, um reife und infektiöse HIV-Virionen zu produzieren.^[17] Als logische Folge wurde die Inhibition der HIV-Protease Gegenstand intensiver pharmazeutischer Forschung. Aus der anschließenden Arzneimittelentwicklung ging dann die erste Generation von Proteaseinhibitoren (PIs) hervor, die eine neue Ära der AIDS-Chemotherapie einläutete.^[18] Als extrem effektive Behandlungsform, um die virale Reproduktion zu unterdrücken und Mutationen des Virus zu



Arun K. Ghosh erhielt einen BS in Chemie von der Universität Kalkutta und einen MS vom Indian Institute of Technology in Kanpur. Er promovierte 1985 an der University of Pittsburgh. Als Postdoktorand arbeitete er bei Professor E. J. Corey an der Harvard University (1985–1988). Nachdem er zunächst an den Merck Research Laboratories als Forscher angestellt war, ging er 1994 als Assistant Professor an die University of Illinois-Chicago. 2005 wechselte er an die Purdue University, wo er derzeit die Position des Ian P. Rothwell Distinguished Professor in Chemistry and Medicinal Chemistry innehat. Seine Forschungsinteressen liegen in der organischen, bioorganischen und medizinischen Chemie.



David Anderson erhielt einen BS in Chemie von der University of Wisconsin-Madison. Von Eli Lilly and Co. wurde er 2001 als Analytiker angestellt und unterstützte dort die kommerzielle Prozessentwicklung von klinischen Kandidaten. Er erhielt 2005 einen MS von der Indiana University-Purdue University Indianapolis und wechselte dann in die Gruppe von Professor Arun Ghosh an der Purdue University. 2009 wurde er zum AFPE-Doktorand ernannt, und 2010 erhielt er ein Doktorandenstipendium der ACS Division of Medicinal Chemistry. Seine Forschungsschwerpunkte sind das Design von HIV-1-Protease-Inhibitoren und die Totalsynthese von Pladienolid B.



Irene T. Weber erhielt einen BS und einen MS von der Cambridge University (England) und promovierte 1978 an der Oxford University. Als Postdoktorandin arbeitete sie bei Professor Thomas Steitz an der Yale University. Sie war ab 1991 Professorin für Mikrobiologie und Immunologie an der Thomas Jefferson University in Philadelphia und ging 2001 an die Georgia State University in Atlanta. Dort ist sie derzeit Professorin für Biologie und Chemie und hat die Position eines Georgia Cancer Coalition Distinguished Cancer Scientist inne. Ihr Forschungsschwerpunkt liegt auf der Struktur und Aktivität von Enzymen.



Hiroaki Mitsuya studierte und promovierte an der National Kumamoto University School of Medicine (Japan). Nach einer Weiterbildung als Onkologe/Hämatologe/Immunologe ging er 1982 zum National Cancer Institute in Bethesda, Maryland. Seit 1991 ist er dort Principal Investigator & Chief in der Sektion experimentelle Retrovirologie. Seit 1997 bekleidet er die Position des Professor of Medicine and Chairman der Abteilungen für Hämatologie, klinische Immunologie/Rheumatologie und Infektionskrankheiten an der Kumamoto University School of Medicine.

reduzieren, erwies sich dabei die Kombination von PIs mit Inhibitoren der reversen Transkriptase.^[19] Trotz des anfänglichen Erfolgs krankte die Behandlung mit PIs aber unter anderem an deren geringer metabolischer Stabilität, schlechter Bioverfügbarkeit, störenden Nebenwirkungen und ihrer Toxizität.^[20] Das wahrscheinlich beunruhigendste Hindernis war jedoch die rasche Bildung von resistenten Virusstämmen und die daraus folgende Ineffektivität der PIs.^[21] Derzeit erwartet man bei 40–50 % der Patienten, bei denen die Virusreplikation unterdrückt werden soll, keinen Behandlungserfolg.^[22] Auch können resistente Virusstämme auf andere Personen übergreifen.^[23] Inwieweit der Kampf gegen HIV/AIDS in Zukunft erfolgreich sein kann, hängt daher von der Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe ab, die auch bei resistenten Virusstämmen langfristig effektiv sind.

1.4. Mechanismus der Arzneimittelresistenz

HIV-1 hat eine erstaunliche Befähigung zur genetischen Evolution, die als treibende Kraft wesentlich zur Resistenzbildung beiträgt. Die unerbittliche Mutationsfähigkeit rührt aus einer hohen Fehlerrate (10^{-3} bis 10^{-5} Nukleotidbasen pro Zyklus) der reversen Transkriptase des Virus und dem Fehlen von Kontrollmöglichkeiten durch eine Exonuclease.^[24,25] Zusammen mit dem schnellen Replikationszyklus des Virus (1010 Virionen pro Tag) und dessen genetischer Rekombinationsfähigkeit ermöglichen diese Faktoren eine schier endlose genetische Diversifizierung.^[26,27] Eine Begrenzung der Zahl der Varianten innerhalb einer Quasispezies pro Zeiteinheit findet zum Beispiel durch natürliche Auslese, letale Mutationen, begrenzte Verfügbarkeit der Wirtszelle und Inaktivierung durch die Immunantwort des Wirts statt.^[28] Eine Viruspopulation besteht daher vorwiegend aus Stämmen mit Einzelmutationen und relativ wenigen Stämmen mit Doppelmutationen. Antiretrovirale Therapien erschaffen jedoch einen neuen Selektionsdruck, der zur Vermehrung von resistenten Stämmen führt. Durch die virale Evolution bilden sich dann neue Mutationen, die bei gleichbleibender Resistenz die virale Fitness wieder herstellen. Als Folge schnellte die Viruskonzentration auf die ursprüngliche Höhe, und die Behandlung ist gescheitert. Dass dieser Kampf gegen die Resistenzbildung eine gewaltige Herausforderung ist, gilt es beim Design von neuen antiviralen Reagentien genau zu bedenken.

Therapien, die die Bildung und das Wachstum von HIV-1 von vornherein verhindern, sind möglicherweise effektiver als die Bekämpfung von bereits vorhandenen Varianten. Ein wichtiger therapeutischer Ansatz ist die Entwicklung von neuen antiretroviralen Arzneimittelklassen, die sich durch eine neuartige, dauerhafte und nebenwirkungsarme Wirkungsweise auszeichnen. Grund für Optimismus gibt es bereits, wie die Fortschritte bei der Entwicklung und Anwendung von neuen und äußerst wirksamen Medikamenten mit hoher genetischer Resistenzbarriere zeigen. Kürzlich erst erwiesen sich eine Reihe von neu zugelassenen Arzneimitteln mit neuartigen Wirkungsmechanismen, darunter ein Integraseinhibitor^[29] und ein Inhibitor, der den Viruseintritt in die Zelle hemmt,^[30] als effizient gegen resistente Stämme. Al-

lerdings sind auch diese Arzneimittel machtlos, wenn sich plötzlich gegen sie Resistenzen bilden, und werden dann ebenfalls ineffektiv.^[31,32] Als recht vielversprechend gelten auch Reifungsinhibitoren sowie die Hemmung des viralen Prä-mRNA-Spleißens durch niedermolekulare Inhibitoren.^[33,34]

1.5. Evolution der Protease infolge eines vom Inhibitor ausgelösten Selektionsdrucks

Die Evolution der HIV-Protease infolge eines Therapie-drucks wurde bereits anderswo und im Detail abgehandelt und soll hier nur sehr kurz dargestellt werden.^[35–39] Mutiert die HIV-Protease als Reaktion auf die Behandlung, führt dies definitionsgemäß zu einem replikatorischen Vorteil. Die meisten Mutationen befinden sich in der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums, wie die Mutationen D30N, G48V, I50L/V, V82A/F/T, I84V und L90M zeigen.^[40] Sie betreffen hydrophobe, Van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor. Die Mutationen machen das Medikament weniger effektiv, indem sie die Bindungsaffinität des Inhibitors mindern.^[41,42] Da sich aber solche Mutationen auch negativ auf die Bindung und Prozessierung des eigentlichen Substrats auswirken, wird wiederum die Fitness und Replikationsfähigkeit des HIV herabgesetzt.^[43,44] Dies ist der Grund, warum die Mutationen meist stufenartig auftreten, denn so wird bei gleichbleibender Resistenz die katalytische Effizienz schrittweise wiederhergestellt.^[45] Häufig befinden sich die Sekundärmutationen dann in größerem Abstand vom aktiven Zentrum und gleichen durch weitreichende Strukturänderungen die Funktionsminderung durch die ersten Mutationen wieder aus. Zusätzlich kann auch eine Coevolution von *Gag* und *Gag-Pol* die Prozessierung durch die mutierte Protease erleichtern.^[46,47] Letztlich sind mehr als zehn verschiedene Mutationen möglich, um lebensfähige und mehrfach arzneimittel-resistente Viren zu erzeugen.

2. Das Proteinerückgrat als Angriffspunkt gegen die Resistenzbildung

2.1. Das Prinzip der Rückgratbindung

Um das Problem der Resistenzbildung anzugehen, haben wir ein neuartiges, strukturbasiertes Konzept des Medikamentendesigns entwickelt. Wir analysierten die Röntgenstrukturen von einer Vielzahl von HIV-1-Proteasemutanten und verglichen sie mit der der Wildtyp-Protease. Die Rückgratkonformation der Mutanten am aktiven Zentrum unterschied sich nur minimal von der des Wildtyps.^[48,49] Dies bedeutet, dass ein Inhibitor, der maximale Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum der HIV-1-Protease eingeht und dabei insbesondere Wasserstoffbrücken zum Rückgrat der Wildtyp-HIV-1-Protease bildet, diese auch bei den HIV-1-Proteasemutanten beibehalten sollte. Kurz gesagt sollte ein auf das Rückgrat der HIV-Protease gerichteter Inhibitor die Resistenzbildung von HIV stark erschweren, denn Mutatio-

nen des Rückgrats ziehen Konformationsänderungen nach sich, die wiederum die katalytische Leistungsfähigkeit herabsetzen.^[50] Ein solcher Inhibitor wird sich dann, so stellen wir es uns vor, als „molekulare Krabbe“ dauerhaft und fest an das Proteinrückgrat des aktiven Zentrums anklammern.

Unsere Strategie der Rückgratbindung führte zur Entwicklung von neuen PIs, die stärker mit dem aktiven Zentrum wechselwirken, insbesondere in Form von zusätzlichen Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat. Damit Resistenzen überhaupt auftreten können, müssen Mutationen die Bindung des Medikaments beeinträchtigen, dürfen sich aber nicht auf die virale Fitness auswirken. Mutationen, die direkt am aktiven Zentrum auftreten, oder solche, die genau dort Strukturveränderungen hervorrufen, sind daher wenig wahrscheinlich. Sie würden die Proteolyse des natürlichen Substrats, des Polyproteins, beeinträchtigen.^[43,44] Diese Überlegungen wurden bestätigt, als wir die Röntgenkristallstrukturen von mutierten HIV-1-Proteasen miteinander verglichen und somit Einblick in die Strukturveränderungen von resistenten Mutanten bekamen.^[51,52]

Ausgehend von der Strategie der Rückgratbindung richteten wir nun unser Moleküldesign darauf aus, dass der Inhibitor multiple Wasserstoffbrücken zu den Atomen des Proteinrückgrats im Bereich von der S2- bis zur S2'-Bindungstasche bildet. Während die S1- und S2-Subtaschen vor allem hydrophobe Reste enthalten, werden die S2- und S2'-Subtaschen von hydrophoben und hydrophilen Resten gebildet.^[53] Um dem Virus noch weiter die Möglichkeit zur Resistenzbildung zu nehmen, planten wir zusätzlich die Belegung sämtlicher hydrophober Taschen im aktiven Zentrum mit Inhibitorliganden. Ein weiteres Ziel, die Verbesserung der Bioverfügbarkeit unserer Inhibitoren, wollten wir durch Abschwächung des Peptidcharakters erreichen. Dafür wollten wir heterocyclische oder von cyclischen Polyethern abgeleitete Template und Liganden einsetzen. In diesem Aufsatz gehen wir zunächst auf die molekulare Grundlage des Konzepts der Rückgratbindung ein und erläutern dann die Eigenschaften unserer so entwickelten Inhibitoren. Gestützt wird unsere Strategie der Rückgratbindung als ein Konzept gegen Arzneimittelresistenzen durch Röntgenstrukturanalysen sowie detaillierte Analysen zur antiviralen Aktivität.

2.2. Die Struktur des Proteins definiert seine katalytische Aktivität

Untersuchungen zu den Faktoren, die die Enzymaktivität steuern, wiesen auf eine sehr enge Verbindung von Proteinstruktur und Enzymfunktion hin.^[54–56] Die meisten Enzyme enthalten Aminosäurestränge, die zu Polypeptidketten kombiniert sind. Lokal falten sich die Stränge spontan zu Sekundärstrukturen (α -Helix, β -Faltblatt, usw.), die wiederum eine definierte dreidimensionale Tertiärstruktur einnehmen. Viele Enzyme kombinieren multiple Proteinketten über nichtkovalente Wechselwirkungen zu einer Quartärstruktur mit mehreren Untereinheiten. Die Proteinstruktur wird durch eine Reihe von schwachen intramolekularen Wechselwirkungen stabilisiert, die unterbrochen und wieder aufgebaut werden können. Eine gewisse Dynamik ist somit möglich. Als

Bindungsstellen für die Substrate dienen häufig Einbuchtungen an der Oberfläche des Enzyms, die durch den Faltprozess entstanden sind. Interessanterweise nimmt das aktive Zentrum nur ein relativ kleines Volumen des Gesamtzyms ein, der Rest dient als Strukturgerüst.^[57] Für eine effektive Katalyse müssen die Aminosäurereste im aktiven Zentrum eine bestimmte dreidimensionale Konfiguration haben, die den Übergangszustand bei der chemischen Reaktion erleichtert.^[58–60] Störungen in dieser Konfiguration können sich schädlich auswirken und zum Verlust der katalytischen Funktion führen. Daher unterliegen Mutationen des Virus den Beschränkungen, die die natürliche Selektion auferlegt, dass nämlich bestimmte Schlüsselstrukturen im aktiven Zentrum des Enzyms erhalten bleiben müssen.

2.3. Die Substratbindungsstelle der HIV-1-Protease und konservierte Wechselwirkungen

Die HIV-1-Protease ist eine Aspartatprotease mit zwei katalytischen Aspartatresten im aktiven Zentrum. Diese Reste teilen sich ein Substratproton, und ohne Substrat oder Inhibitor binden sie gemeinsam ein Wassermolekül. Das katalytisch aktive Enzym ist ein Homodimer, dessen beide Monomere jeweils 99 Aminosäuren haben. Zwei katalytische Aspartatreste, jeder von einer Domäne (Monomer), bilden die eigentliche Spaltstelle. Die zu spaltende Bindung des Substratpeptids wird zunächst sehr dicht am aktiven Zentrum positioniert. Am Zugang zum aktiven Zentrum befindet sich ein Deckel, dessen beide Deckelhälften jeweils ein Monomer beisteuert.^[61] Bindet das Substrat, schließen sich die Deckelhälften. Sie schirmen das aktive Zentrum gegen Wasser ab und schaffen so eine für die Katalyse geeignete Umgebung. Die Deckelhälften sind flexibel und haben im Apoenzym eine offene Konformation.^[53,62] Das Substratpeptid besteht aus mindestens sieben Resten, von P4 bis P3', wobei die zu spaltende Bindung zwischen P1 und P1' liegt. Die Seitenketten des Substrats befinden sich in den von Proteaseresten geformten Subtaschen S4 bis S3'. Während die Reste der S1- und S1'-Subtaschen hydrophob sind, können die S2- und S2'-Subtaschen hydrophile Reste enthalten. Eine ganze Reihe von konservierten Wasserstoffbrücken verbindet das Rückgrat der Protease mit dem Substrat und trägt maßgeblich zur Bindungsaffinität bei (Abbildung 1).^[63] In der Kristallstruktur der HIV-Protease mit einem gebundenem Peptid (PDB-Code 2AOD), das als p2/NC-Spaltungsstellenanalog verwendet wird, sind diese Wechselwirkungen deutlich zu erkennen.^[64] Im aktiven Zentrum sind mehrere Aminosäurereste wie Asp25, Gly27, Ala28, Asp29 und Gly48 sehr stark konserviert. Folgerichtig führte unsere Strategie, das Design von Inhibitoren genau auf diese Reste auszurichten, zu hochwirksamen PIs.^[50,65–68]

2.4. Strukturnachweis einer nur minimalen Rückgratverzerrung bei mutierten HIV-1-Proteasen

Für unsere strukturbasierte Entwicklung von neuartigen antiviralen HIV-1-Proteaseinhibitoren verglichen wir die

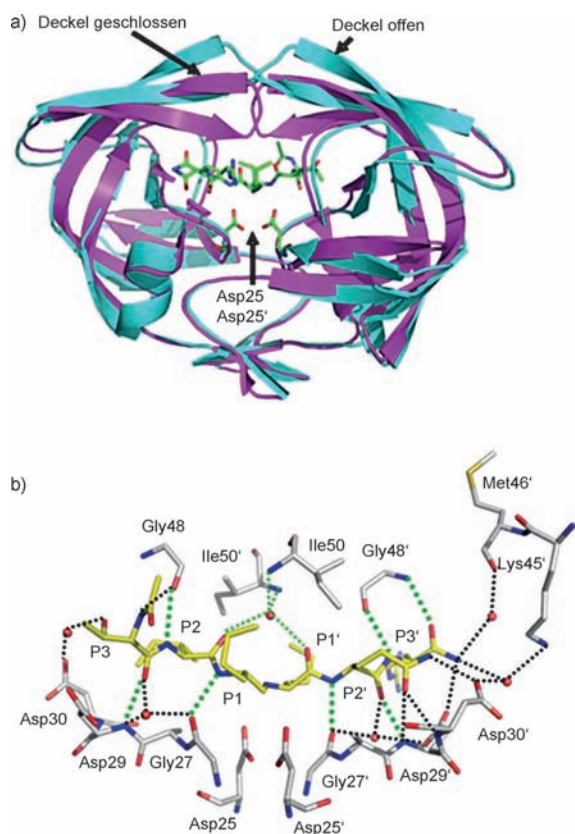


Abbildung 1. a) Vergleich von ligandenfreier Protease mit offenem Deckel (PDB-Nummer 1HHP,^[64] cyan) mit komplexierter Protease mit Substratanalog (PDB-Nummer 2AOD,^[64] magenta) und geschlossenem Deckel. Die katalytischen Reste Asp25 und Asp25' und das Peptidanal sind als Stabmodell dargestellt. b) Wechselwirkungen zwischen der Protease und einem Peptidanal der p2/NC-Spaltstelle (ace-Thr-Ile-Nle-r-Nle-Gln-Arg, wobei Nle Norleucin ist und Met in der natürlichen Peptidsequenz ersetzt; r zeigt die reduzierte Peptidbindung an). (PDB-Nummer 2AOD).^[64] Konservierte Wasserstoffbrücken sind als grüne gepunktete Linien dargestellt, nichtkonservierte Wasserstoffbrücken als schwarze gepunktete Linien.

Röntgenkristallstruktur der Wildtyp-HIV-1-Protease mit gebundenem Inhibitor mit den jeweiligen Strukturen von resistenten Proteasemutanten.^[48,49] Wie schon gesagt, war bei Überlagerung der Strukturen nur eine minimale Abweichung der Lage der Rückgratátome im Bereich des aktiven Zentrums zu erkennen. Aus diesen Strukturvergleichen ließen sich, wie wir unlängst in einer Übersicht dargestellt haben,^[50] wertvolle Erkenntnisse für das weitere Moleküldesign bei der Resistenzbekämpfung gewinnen. Die Proteasemutationen werden in zwei Überkategorien eingeteilt. Zum einen können Mutationen von Resten im aktiven Zentrum direkt die Wechselwirkungen zwischen Protease und Inhibitor betreffen. Dies ist bei den I84V- oder I50V-Mutanten der Fall, die mit vielen PIs schwächer wechselwirken.^[69–71] Alternativ können distale Mutationen durch Verringerung der Stabilität der Protease indirekt auch die Wechselwirkung mit dem Inhibitor beeinflussen. Dies wurde an den Mutanten L24I, F53L und L90M gezeigt.^[70,72,73] Dabei sind die Strukturänderungen am Rückgrat um das aktive Zentrum herum nur minimal. Selbst im flexiblen Deckel belaufen sich die Positi-

onsänderungen der Rückgratátome auf weniger als 1 Å. Eine Ausnahme ist die Mutation V82A, die zu Verschiebungen in der Schleife mit den Aminosäureresten 79–82 führt, die hydrophobe Kontakte kompensiert.^[71,73,74] Diese Schleife kann sich um 1–2 Å verschieben und somit die hydrophoben, unterschiedlich großen Inhibitorgruppen von P1 und P1' aufnehmen.^[75] Wie Abbildung 2 zeigt, lassen sich noch Strukturen von resistenten HIV-1-Proteasen mit 10–14 Mutationen

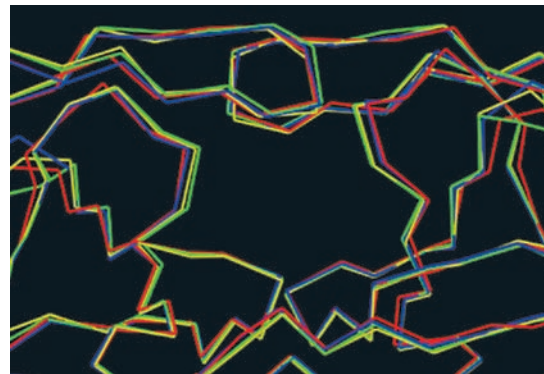


Abbildung 2. Überlagerung der HIV-1-Protease mit Mehrfachmutanten (PDB-Nummer 2FDD,^[76,77] grün; PDB-Nummer 1SGU,^[78] gelb) und der HIV-2-Protease (PDB-Nummer 1HSH, rot^[79]) mit der HIV-1-Protease (PDB-Nummer 2IEN,^[69] blau). Die Abweichungen im Rückgrat sind minimal.

übereinanderlegen, und sogar eine HIV-2-Protease passt hinein, die um die 40 Unterschiede enthält. Die Positionen der Rückgratátome um das aktive Zentrum herum weichen nur minimal voneinander ab.^[51,76–79] Auch Mutationen, die zu Resistenzen führen, ändern die Gesamtstruktur der Protease nicht wesentlich, denn ihre Funktion hängt unmittelbar mit der Struktur am aktiven Zentrum zusammen. Um ihre katalytische Aktivität und folgerichtig die Replikationsfitness des Virus nicht zu gefährden, weisen daher die aktiven, lebensfähigen Mutantenstämme nur minimale Strukturabweichungen im aktiven Zentrum ihrer Protease auf.^[50,52] Diese Beobachtung veranlasste uns zur Überlegung, dass Inhibitoren, die maximale Wasserstoffbrücken zu NH- oder C=O-Funktionen im Proteinrückgrat bilden, diese Wechselwirkungen auch bei mutierten Enzymen beibehalten müssten. Trotz viraler Mutation würden die Inhibitoren ihre Wirksamkeit nicht einbüßen und könnten daher eine nachhaltige Lösung für das Resistenzproblem bieten. Mit diesem Konzept entwarfen und synthetisierten wir eine Vielzahl von Inhibitoren, die multiple Bindungen zum Proteaserückgrat bildeten und bei einer ganzen Reihe von klinisch relevanten resistenten HIV-1-Stämmen nicht an Effizienz verloren.^[50,67,68,80]

3. Strukturbasiertes, auf das Proteinrückgrat ausgerichtetes Design

3.1. PIs mit hochaffinen cyclischen Ethern als Liganden

Im Bemühen, die Resistenzbildung zu bekämpfen, entwickelten und synthetisierten wir konzeptuell neuartige Proteaseinhibitoren, bei deren Design wir die Röntgenstruktur

einer HIV-1-Protease mit gebundenem Saquinavir zugrundeliegten (Abbildung 3). Im Wesentlichen war unser Konzept die Maximierung der Wechselwirkungen des Inhibitors mit

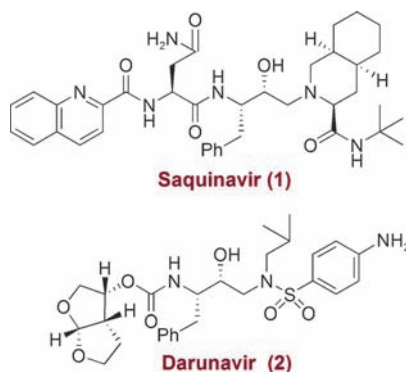


Abbildung 3. Struktur von Saquinavir und Darunavir.

dem aktiven Zentrum der Protease. Insbesondere planten wir die verstärkte Bildung von Wasserstoffbrücken zu den Rückgratatomen der Protease in den S2- und S2'-Subtaschen.^[50] Die Versuche führten letztlich zur Entdeckung eines breiten Spektrums von außerordentlich wirksamen PIs mit beeindruckenden Resistenzprofilen. Einer dieser PIs war Darunavir (**2**, TMC-114, UIC-94017), der von der FDA für die Behandlung von HIV/AIDS-Patienten mit resistentem HIV zugelassen wurde.^[81,82] Da eine Vielzahl von neueren Übersichten sich bereits detailliert mit der Entwicklung von Darunavir beschäftigt hat,^[67,83,84] wollen wir hier nur kurz die frühen strukturbasierten Versuche vorstellen und dann auf die einzigartigen Bindungseigenschaften von Darunavir zurückkommen. Dafür nehmen wir röntgenkristallographische Untersuchungen, und im Licht der so erhaltenen Strukturinformationen analysieren wir die Resistenzeigenschaften. Anschließend stellen wir einige Highlights unserer Arbeiten zum Design einer Vielfalt von PIs vor. Ziel war es, anhand der Strategie der Rückgratbindung eine neue Generation von PIs aufzubauen, die den mehrfach resistenten HIV-1-Varianten widerstehen kann.

Anfangs konzentrierte sich unser PI-Design darauf, die Peptidmerkmale zu reduzieren und die Medikamenteneigenschaften zu verbessern, wobei wir von Saquinavir ausgingen.^[67] Saquinavir (**1**) ist ein wirksamer, von der FDA zugelassener Inhibitor, dessen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gut untersucht sind und aus dessen Röntgenstrukturdaten wichtige molekulare Einblicke in die Wechselwirkungen bei der Ligandenbindung gewonnen wurden.^[85,86] Mit diesen Strukturinformationen interessierten wir uns nun besonders für die Verringerung des Molekulargewichts und die Eliminierung von peptidischen Bindungen. Inspiriert von der Natur, bauten wir zunächst cyclische Ethergruppen ein, die ein inhärentes Merkmal von biologisch aktiven Naturstoffen sind.^[68] Auf diese Weise entwarfen wir eine Reihe von Gerüsten mit sowohl konformationsgespannten cyclischen Ether als auch heterocyclischen Strukturen, die den Bindungsmodus einer Peptid-/Amidbindung an der S2-Subtasche im aktiven Zentrum der HIV-1-Protease imitieren sollen.

3.2. Entwicklung von 3S-THF- und Bis-THF-P2-Liganden

Saquinavir ist ein hochwirksamer PI, seine orale Bioverfügbarkeit ist aber sehr gering, was wahrscheinlich am Vorliegen zahlreicher peptidischer Amidbindungen liegt. Auf der Grundlage der Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem Saquinavir versuchten wir nun, zwei Amid-Carbonylgruppen (P2/P3) durch einen cyclischen Ether- beziehungsweise eine Sulfonsäuregruppe zu ersetzen. Wichtig war vor allem, die Ether- oder Sulfonsäuregruppe so zu positionieren, dass das Sauerstoffatom ähnlich wie das der peptidischen P2- und P3-Amid-Carbonylfunktionen von Saquinavir mit der Protease wechselwirken kann. Das Motiv des cyclischen Ethers wählten wir deshalb, weil viele biologisch aktive Naturstoffe solche Struktureinheiten enthalten und Naturstoffe wie Monensin und Ginkolid keine der für peptidische Arzneimittel typischen Absorptionsprobleme aufweisen.^[87,88] In Abbildung 4 ist dargestellt, wie 3R-Tetrahydrofuranlygly-

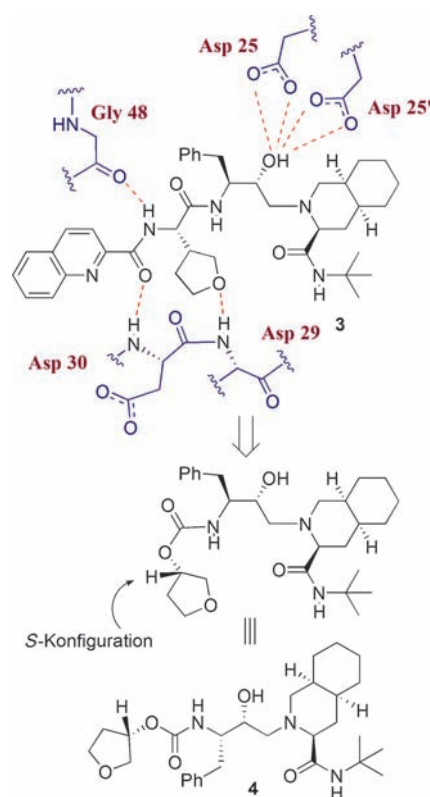


Abbildung 4. Inhibitoren mit einem Ethercyclus als P2-Ligand.

cin anstelle des P2-Asparagins in Saquinavir zum wirksamen PI **3** führt (IC_{50} des Enzyms = 0.05 nM; antivirale CIC_{95} = 8 nM). Entscheidend für die Wirksamkeit war die R-Konfiguration.^[89] Anschließend entfernten wir den Chinaldinliganden und stellten das entsprechende stereochemisch definierte Urethanderivat **4** her (IC_{50} = 160 nM; Konzentration für 95 % Inhibition in Zellkultur (CIC_{95}) = 800 nM).^[90] Diese Leitstruktur war wegen ihres reduzierten Molekulargewichts (515 Da von **4** gegenüber 670 Da von Saquinavir) wichtig.

Das 3S-THF-Urethan **4** war noch weit wirksamer (> 18-fach) als sein N-Boc-Derivat. Der Einbau der Urethan-

Funktionalität steigerte auch beim isosteren Hydroxyethylen-Inhibitor **5** sowohl die Enzymhemmung als auch die antivirale Aktivität merklich gegenüber dem *N*-Boc-Derivat.^[90] Das Cyclopentyllderivat **6** (Abbildung 5) war dagegen weit weni-

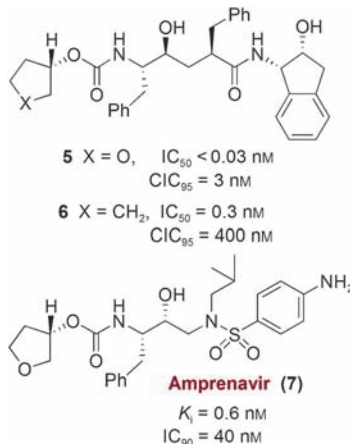


Abbildung 5. Wirksame PIs auf 3S-THF-Urethan-Basis.

ger aktiv, obwohl dieser PI die Substrat-Bindungsstelle wahrscheinlich nicht anders besetzte als der Inhibitor **5**. Das bedeutete, dass das Sauerstoffatom der cyclischen Etherfunktion sehr wichtig für die Bindung sein musste. Eine Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **4** deutete eine schwache Wasserstoffbrücke vom THF-Sauerstoffatoms zu den NH-Gruppen von Asp29 und Asp30 an.^[90] Vasquez et al.^[91] und Tung et al.^[92] bauten die 3S-THF-Urethangruppe in ein isosteres Hydroxyethylaminsulfonamid ein und erhielten den PI **7** (Abbildung 5, VX-478),^[93] der bald danach von der FDA unter dem Namen Amprenavir/Fosamprenavir zugelassen wurde. In der Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **7** ist klar zu erkennen, dass der Etherring die S2-Subtasche besetzt und das Ring-Sauerstoffatom eine schwache Wechselwirkung mit den Rückgrat-Amidgruppen von Asp29 und Asp30 eingeht (mit Abständen von 3.4 bzw. 3.5 Å).^[93]

Nachdem wir die 3S-THF-Urethangruppe als möglichen Substitutionskandidat für beide P2/P3-Liganden von Saquinavir identifiziert hatten, interessierte uns die weitere Verbesserung der Ligandenbindung in der S2-Subtasche. Schließlich entwarfen wir einen stereochemisch definierten bicyclischen (3*R*,3*aS*,6*aR*)-Tetrahydrofuranliganden (Bis-THF; Abbildung 6).^[94] Hier erwies sich **8** mit dem (3*R*,3*aS*,6*aR*)-Bis-THF-Liganden als ein weitaus wirksamerer Inhibitor als **9** mit dem (3*S*,3*aR*,6*aS*)-Bis-THF-Liganden. Der Inhibitor **8** war auch wirksamer als **4** mit 3S-THF als P2-Ligand. In unserer Röntgenkristallstrukturanalyse bildeten beide Sauerstoffatome von Bis-THF effektive Wasserstoffbrücken zu den Rückgrat-NH-Gruppen von Asp29 und Asp30.^[94] Außerdem füllte der THF-Bicyclus von **8** die hydrophobe S2-Subtasche effektiver aus als der Monocyclus von **4**. Interessanterweise waren bei **8** jedoch keine Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat der S2'-Subtasche zu erkennen.^[86,94] Wie schon gesagt, wollten wir mit unserer Strategie

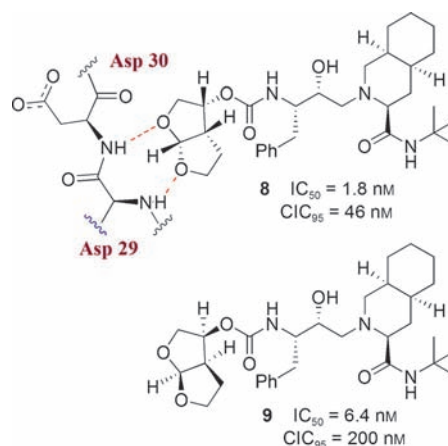


Abbildung 6. Design von PIs mit Bis-THF-Ligand.

der Rückgratbindung vor allem die Wechselwirkungen an den Positionen der Ligandenbindung maximieren, besonders in Form von Wasserstoffbrücken zu den Rückgratatomaten an den S2- bis S2'-Subtaschen der Protease.^[50]

3.3. Design von TMC-126 und dessen Bedeutung für das Konzept der Rückgratbindung

Nachdem wir den hochaffinen und nichtpeptidischen Bis-THF-Liganden erzeugt hatten, wollten wir als nächstes einen Inhibitor herstellen, der durchgängig von S2 bis zu S2' robuste Wasserstoffbrücken bilden kann.^[50] Dafür untersuchten wir den Effekt des P2-Bis-THF-Liganden zusammen mit einer Reihe von Isosteren, darunter (*R*)-(Hydroxyethyl)sulfonamid-Isosteren,^[91,92] wobei *p*-Methoxysulfonamid den P2'-Liganden bildete.^[50,81] Dass unsere erste Wahl auf *p*-Methoxysulfonamid fiel, beruhte auf der Annahme, dass das Sauerstoffatom der Methoxygruppe mit den Rückgrat-NH-Gruppen von Asp29' und Asp30' der S2'-Subtasche effektive Wasserstoffbrücken bilden würde. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass der Inhibitor **10** (UIC-PI oder UIC94003, später TMC-126) eine starke Enzymhemmung ($K_i = 14$ pM) hervorruft und eine starke antivirale Aktivität ($ID_{50} = 1.4$ nM) in

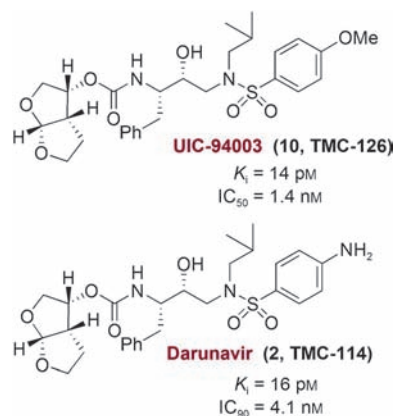


Abbildung 7. Wirksame Bis-THF-PIs, TMC-126 und Darunavir.

CEM-Zelllinien aufweist.^[82] Um die Ligandenwechselwirkung auf molekularer Ebene besser verstehen zu können, wurde eine hochaufgelöste Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **10** ermittelt.^[95] In Abbildung 8 ist zu

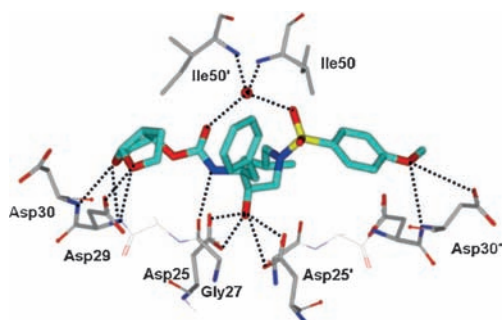


Abbildung 8. Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **10**.

erkennen, wie beide Sauerstoffatome des P2-Bis-THF-Liganden starke Wasserstoffbrücken mit den Rückgrat-NH-Gruppen von Asp29 und Asp30 der S2-Subtasche bilden. In der S2'-Subtasche bildet das *p*-Methoxy-Sauerstoffatom starke Wasserstoffbrücken zu der Rückgrat-NH-Gruppe von Asp30' und zur Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp30'.^[95] Die enzymatischen K_i -Werte von **10** wurden gegen

Tabelle 1: Enzymhemmung von **10** gegenüber Wildtyp-Protease und Proteasemutanten.

Enzym	K_i [pM]	$K_{i\text{mut}}/K_{i\text{wt}}$	Vitalität
Wildtyp	14	1	1
D30N	< 5	0.33	0.3
V32I	8	0.57	0.5
I84V	40	2.85	1
V32I/I84V	70	5	0.7
M46F/V82A	< 5	0.33	0.1
G48V/L90M	< 5	0.33	0.1
V82F/I84V	7	0.5	0.1
V82T/I84V	22	1.57	0.1
V32I/K45I/F53L/A71V/I84V/L89M	31	2.2	0.1
V32I/L33F/K45I/F53L/A71V/I84V	46	3.3	0.1
20R/36I/54V/71V/82T	31	2.2	0.1

eine Vielzahl von HIV-Proteasemutanten ermittelt. Tabelle 1 belegt die beeindruckende Wirkung des Inhibitors auf sämtliche Mutanten (K_i -Werte < 100 pM), wobei das Verhältnis $K_{i\text{mut}}/K_{i\text{wt}}$ nicht größer als fünf wird. Proteasen mit Mehrfachmutation, die gegen die zugelassenen PIs der ersten Generation noch stark resistent waren, blieben gegen **10** also auf einem sehr niedrigen Resistenzniveau.^[96]

Auch gegen ein breites Spektrum resistenter HIV-1-Varianten war **10** wirksam mit IC_{50} -Werten von 0.3 bis 0.5 nM.^[82] Eine detaillierte Evaluation der Medikamentenempfindlichkeit von HIV-Mutanten auf den PI **10** (Tabelle 2) demonstrierte, dass dieser Inhibitor bezüglich der Entstehung von Resistenzen erhebliche Vorteile gegenüber dem strukturell ähnlichen Amprenavir sowie anderen zugelassenen PIs bietet. Besonders interessant war der deutlich verzögerte Erwerb von Resistenzen gegen **10**. Darüber hinaus reagierten HIV-Stämme, die gegen **10** Resistenzen erworben haben, weiterhin auf sämtliche zugelassene PIs außer Amprenavir. Bemerkenswert war die beeindruckende Wirksamkeit von **10** gegen mehrfach resistente HIV-1-Stämme, die aus Patienten mit bereits resistentem HIV-1 isoliert worden waren (IC_{50} = 0.5 bis 5.5 nM). Andere PIs schnitten hier deutlich schlechter ab.^[82] Wir vermuteten, dass diese beeindruckende und konsistente Aktivität gegen ein breites Spektrum von arzneimittelresistenten HIV-Varianten von der robusten Bindung von **10** an das aktive Zentrum und insbesondere an die Rückgrat-NH-Gruppen der Aspartatreste zwischen den S2- und S2'-Subtaschen verursacht wurde.^[50] Somit bietet die Strategie der Rückgratbindung, das heißt die Bildung von multiplen Wasserstoffbrücken im gesamten aktiven Zentrum (S2- bis S2'-Bindungstasche), ein attraktives Konzept, um eine neue Generation von PIs zu entwickeln und so dem Problem der Resistenzbildung zu begegnen.

4. Im Kampf gegen die Arzneimittelresistenz: mit der Strategie der Rückgratbindung zur klinischen Einführung von Darunavir

4.1. Optimierung der Struktur von Darunavir

Aufbauend auf die Ergebnisse zu **10** (TMC-126) untersuchten wir Kombinationen von Bis-THF-Ligand und iso-

Tabelle 2: Wirksamkeit von **10** (TMC-126) gegenüber HIV-1-Varianten von Patienten mit bereits umfangreicher Behandlungsvorgeschichte mit PIs.

Virus ^[a]	IC_{50} [μM] (Faktor)					
	RTV	IDV	SQV	NFV	APV	10 (TMC-126)
Wildtyp	0.044 (1)	0.013 (1)	0.010 (1)	0.023 (1)	0.025 (1)	0.0007 (1)
1	> 1 (> 23)	> 1 (> 77)	0.27 (27)	> 1 (> 43)	0.27 (11)	0.004 (6)
2	> 1 (> 23)	0.49 (38)	0.037 (4)	0.33 (14)	0.28 (11)	0.0013 (2)
3	> 1 (> 23)	0.49 (38)	0.036 (4)	> 1 (> 43)	0.26 (10)	0.001 (1)
4	> 1 (> 23)	0.21 (16)	0.033 (3)	0.09 (4)	0.31 (12)	0.0016 (2)
5	> 1 (> 23)	> 1 (> 77)	0.31 (31)	0.41 (18)	0.67 (27)	0.0024 (3)
6	> 1 (> 23)	0.30 (23)	0.19 (19)	> 1 (> 43)	0.16 (6)	0.0005 (1)
7	> 1 (> 23)	> 1 (> 77)	0.12 (12)	> 1 (> 43)	0.49 (20)	0.0055 (8)
8	> 1 (> 23)	0.55 (42)	0.042 (4)	> 1 (> 43)	0.15 (6)	0.001 (1)

[a] Aminosäuresubstitution in den proteasekodierenden Regionen des Virus verglichen mit der Konsensussequenz aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [82] für Details.

steren (*R*)-(Hydroxyethyl)sulfonamid-Liganden, die mit verschiedenen P2'-Sulfonamid-Funktionalitäten ausgestattet waren. Diese Liganden sollten mit den Rückgrat-Atomen der S2'-Tasche wechselwirken. Aus den Versuchen resultierte eine Reihe von außergewöhnlich wirksamen PIs. Allerdings zeigte nur der Inhibitor **2** (Abbildung 7, der später TMC-114 und dann Darunavir genannt wurde) verbesserte pharmakologische Eigenschaften und ein starkes Resistenzprofil.^[81,97–99] Wir konnten das antivirale Profil von **10** (UIC-94003 oder TMC-126) und **2** (UIC-94017 oder TMC-114) im Wesentlichen auf deren einzigartiges Bindungsprofil zurückführen und etablierten so unser Konzept der Bindung an das Proteinerückgrat als vielversprechende Strategie gegen die Arzneimittelresistenz.^[50,100] Im nächsten Abschnitt wollen wir die Bindung von Darunavir und sein einzigartiges antivirales Profil genauer untersuchen.

4.2. Die Wechselwirkungen von Darunavir mit dem Proteaserückgrat

Die im Vergleich zu anderen PIs erhöhte Bindungsaffinität von Darunavir ($K_i = 16$ pM) liegt an seiner Fähigkeit, ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zum aktiven Zentrum der HIV-1-Protease zu bilden. In einer hochaufgelösten Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem Darunavir sind viele der maßgeblichen Wechselwirkungen zwischen Darunavir A und den Rückgrat-Atomen der Protease zu sehen.^[69] In Abbildung 9 ist dargestellt, wie der Bis-THF-

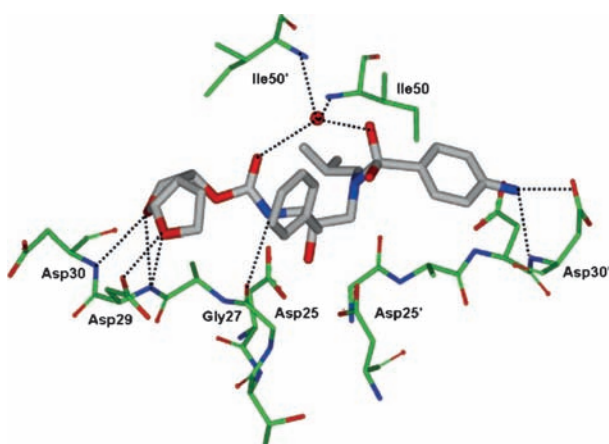


Abbildung 9. Darunavir bindet an die HIV-1-Protease wie eine „molekulare Krabbe“ (PDB-Nummer 2IEN).^[69]

Ligand am P2 mehrere Wasserstoffbrücken zu den Rückgrat-Amid-NH-Gruppen von Asp29 und Asp30 bildet und somit Darunavir in der S2-Subtasche verankert. Am anderen Inhibitorende sind die Wechselwirkungen zu erkennen, die die *p*-Aminosulfonamidgruppe mit der Amidgruppe von Asp30' und dem Seitenkettencarboxylat von Asp30' eingeht und die Darunavir im aktiven Zentrum stabilisieren. Die Hydroxyfunktion des Hydroxyethylsulfonamid-Isosters ahmt dagegen den Übergangszustand nach und stellt Wasserstoffbrücken zu den katalytisch aktiven Asp25- und Asp25'-Resten her. Dazu

kommen die Wechselwirkungen der NH-Gruppe des Urethans mit der Gly27-Carbonylgruppe und eine durch ein vierfach koordiniertes Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke zwischen den Deckelresten Ile50 und Ile50', der Urethan-Carbonylgruppe und dem Sulfonamid-Sauerstoffatom von Darunavir. Darüber hinaus verstärken die P1'-Isobutylgruppe und die P1-Benzylgruppe von Darunavir die Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen.^[69] Diese multiplen Wechselwirkungen machen Darunavir zu einer „molekularen Krabbe“, die sich fest an das Proteinerückgrat klammert.

Der Bindungsmodus von Darunavir an die HIV-1-Protease unterscheidet sich deutlich von dem der meisten PIs der ersten Generation. Während zum Beispiel die Bindung vieler PIs durch einen Entropiegewinn gesteuert wird, ist die von Darunavir, wahrscheinlich wegen der zahlreichen Wasserstoffbrücken, stark enthalpiebestimmt.^[101] Ein weiterer wichtiger Unterschied sind die kinetischen Eigenschaften der Bindung an die Protease. Die Bindung ist für Darunavir hoch assoziativ und wenig dissoziativ, weshalb die Dissoziation viel langsamer abläuft als bei anderen PIs.^[102] In Summe hat Darunavir ein hochaffines Bindungsprofil mit der außerordentlichen Fähigkeit, Mutationen der Protease auszugleichen.^[103]

Eine neuere Röntgenstruktur offenbarte dann eine letzte Besonderheit von Darunavir. Der Inhibitor kann die Protease nämlich noch an einer zweiten Position binden,^[69] die an der Proteaseoberfläche, an einer der flexiblen Deckelhälften liegt. Eine allosterische Bindung dort schränkt womöglich die Funktion der HIV-1-Protease zusätzlich ein und trägt somit zur außergewöhnlich hohen antiviralen Aktivität von Darunavir bei. Nach weiteren Studien zur Bindungskinetik von Darunavir wurde ein gemischter Inhibitionsmechanismus vorgeschlagen (kompetitiv-nichtkompetitiv). Die PIs der ersten Generation folgen dagegen ausschließlich einem kompetitiven Mechanismus.^[104] Diese Ergebnisse passen gut zum Modell einer zweiten Bindungsstelle und erklären das bessere antivirale Aktivitätsprofil von Darunavir.

4.3. Robustheit von Darunavir gegen mehrfach resistente HIV-1-Varianten

Quer über einen großen Bereich von HIV-1-Stämmen hat sich Darunavir als überaus wirksam erwiesen. In Tabelle 3 ist zu sehen, wie Darunavir gegenüber einer Reihe von HIV-1-Isolaten viele zugelassene PIs in der Hemmung der viralen Replikation und Infektiosität übertrifft ($IC_{50} = 3–6$ nM).^[105] Wegen seiner starken antiviralen Wirkung bei gleichzeitig relativ geringer Zytotoxizität erreicht Darunavir einen höheren Selektivitätsindex (> 20000 CC₅₀/EC₅₀).^[105] Hervorzuheben ist dabei seine starke antivirale Wirkung, die auch gegenüber Stämmen mit resistenzbildenden Mutationen nicht abnimmt. Insbesondere zeigte Darunavir eine beeindruckende Aktivität gegen klinische HIV-1-Varianten, die bereits in hohem Maße Mehrfachresistenzen gegen PIs aufgebaut haben und aus AIDS-Patienten isoliert wurden, die nicht mehr auf die vorhandenen antiviralen Therapien ansprachen (Tabelle 4). Während Darunavir (**2**) noch eine hervorragende

Tabelle 3: Wirksamkeit von **2** sowie von ausgewählten Anti-HIV-Reagentien gegen HIV-1_{BA-L}, HIV-2_{ROD} und HIV-2_{EHO}.

Virus	Zelltyp	Durchschnittliche IC ₅₀ [nM] ^[a]						
		SQV	RTV	IDV	NFV	APV	AZT	DRV (2)
HIV-1 _{BA-L}	PBMC	18	39	25	17	26	9	3
HIV-2 _{ROD}	MT-2	3	130	14	19	230	18	3
HIV-2 _{EHO}	MT-2	6	240	11	29	170	11	6

[a] Alle Assays wurden zwei oder drei Mal durchgeführt; die Daten repräsentieren den aus drei unabhängigen Experimenten bestimmten IC₅₀-Mittelwert. Die Messung der IC₅₀ wurde in PHA-PBMCs durchgeführt und die Inhibition der Produktion des p24-Gag-Proteins durch den PI als Endpunkt genommen. MT-2-Zellen wurden mit dem Virus versetzt und kultiviert und die IC₅₀-Werte durch MTT-Assay ermittelt. Siehe Lit. [82, 105] für Details.

Tabelle 4: Aktivität des Inhibitors **2** gegen klinische HIV-1-Isolate in PHA-PBMCs.

Virus ^[a]	IC ₅₀ [μM]					
	SQV	APV	IDV	NFV	RTV	DRV (2)
HIV-1 _{ERS104pre} (WT X4)	0.010	0.023	0.018	0.019	0.027	0.003
HIV-1 _{MOKW} (WT R5)	0.004	0.011	0.018	0.033	0.032	0.003
HIV-1 _{TM} (MDR X4)	0.23 (23)	0.39	> 1 (> 56)	0.54 (28)	> 1 (> 37)	0.004 (1)
HIV-1 _{MM} (MDR R5)	0.30 (30)	0.34	> 1 (> 56)	> 1 (> 53)	> 1 (> 37)	0.02 (7)
HIV-1 _{JSL} (MDR R5)	0.35 (35)	0.75 (33)	> 1 (> 56)	> 1 (> 53)	> 1 (> 37)	0.029 (10)
HIV-1 _A (MDR X4)	0.14 (14)	0.16 (7)	> 1 (> 56)	0.36 (19)	> 1 (> 37)	0.004 (1)
HIV-1 _B (MDR X4)	0.31 (31)	0.34 (15)	> 1 (> 56)	> 1 (> 53)	> 1 (> 37)	0.013 (4)
HIV-1 _C (MDR X4)	0.037 (4)	0.28 (12)	> 1 (> 56)	0.44 (23)	> 1 (> 37)	0.003 (1)
HIV-1 _G (MDR X4)	0.029 (3)	0.25 (11)	0.39 (22)	0.32 (17)	0.44 (16)	0.004 (1)

[a] Aminosäuresubstitution in den proteasekodierenden Regionen des Virus verglichen mit der Konsensussequenz aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [105] für Details.

antivirale Aktivität mit IC₅₀-Werten von 3 bis 30 nM aufwies, waren APV, IDV, NFV und RTV nahezu ineffektiv in der Blockierung der Replikation dieser mehrfach resistenten Stämme.^[105]

Auch gegenüber einer Reihe von HIV-1-Laborstämmen mit ausgewählten Resistenzen gegen andere PIs war die Aktivität weiter herausragend hoch (Tabelle 5), und nur bei einem APV-resistenten Virusstamm wurde eine Kreuzresistenz beobachtet. Der Inhibitor APV enthält ein ähnliches Sulfonamid-Isoster wie Darunavir.^[105] Umfassendere Studien mit über 1500 klinischen Isolaten bestätigten die bemerkenswerten Eigenschaften von Darunavir. Bei 75% der Varianten wurde für Darunavir eine EC₅₀ < 10 nM gemessen, und bei 90% der Stämme war der EC₅₀-Wert nicht mehr als 10-fach größer als der des Wildtyps.^[106] Dagegen zeigten APV, SQV, IDV, RTV, NFV und LPV bei weniger als 30% der Virusstämme eine ED₅₀ < 10 nM und ein wesentlich größeres Variabilitätsniveau in der EC₅₀ verglichen mit dem Wildtypwert.^[106]

Eine der großen Herausforderungen bei der Behandlung von HIV ist nach wie vor die rasche Entstehung von Resistenzen, die die Effektivität der antiviralen Therapie herabsetzen. Darunavir unterscheidet sich hier durch seine hohe genetische Barriere bei der Bildung von Resistenzen deutlich von anderen PIs. Erste Versuche, Darunavir-resistente HIV-Stämme in vitro zu selektieren, erwiesen sich als problematisch. Resistenzen entwickelten sich nur sehr langsam nach mehreren Passagen und nur bei Darunavir-Konzentrationen unter 200 nM (Abbildung 10).^[106] Später wurde gezeigt, dass HIV-1-Isolate von Patienten, die antiretrovirale Behandlungen ausgesetzt waren, durchaus resistenzähnliche Mutationen aufbauen können, auch wenn das Wildtyp-HIV eine Darunavir-Resistenz nicht leicht entwickelt.^[107] Während der klinischen POWER-Versuche wurden insgesamt 11 Aminosäuresubstitutionen mit einer Darunavir-Resistenz in Verbindung gebracht, darunter V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V und L89V. Die wichtigsten Mutationen waren wahrscheinlich I50V, I54M/L, L76V und

Tabelle 5: Aktivität von DRV gegen PI-resistente HIV-1-Laborstämme.

Virus	Aminosäuresubstitution	EC ₅₀ [μM] ^[a]					
		SQV	RTV	IDV	NFV	APV	DRV
HIV-1 _{NL4-3}	Wildtyp	0.009	0.018	0.011	0.020	0.027	0.003
HIV-1 _{SQV5μM}	L10I, G48V, I54V, L90M	> 1 (> 111)	> 1 (> 56)	> 1 (> 91)	0.30 (15)	0.17 (6)	0.005 (2)
HIV-1 _{RTV5μM}	M46I, V82F, I84V	0.013 (1)	> 1 (> 56)	0.31 (28)	0.24 (12)	0.61 (23)	0.025 (8)
HIV-1 _{IDV5μM}	L10F, L24I, M46I, L63P, A71V, G73S, V82T	0.015 (2)	> 1 (> 56)	> 1 (> 91)	0.74 (37)	0.33 (12)	0.029 (10)
HIV-1 _{NFV5μM}	L10F, D30N, K45I, A71V, T74S	0.031 (3)	0.09 (5)	0.28 (25)	> 1 (> 50)	0.093 (3)	0.003 (1)
HIV-1 _{APV5μM}	L10F, V32I, M46I, I54M, A71V, I84V	0.020 (2)	> 1 (> 56)	0.31 (28)	0.21 (11)	> 1 (> 37)	0.22 (73)

[a] MT-4-Zellen wurden mit dem jeweiligen HIV-1-Stamm versetzt (100×TCID₅₀s) und die Inhibition der Produktion des p24-Gag-Proteins als Endpunkt genommen. Die Zahlen in Klammern repräsentieren den Änderungsfaktor des IC₅₀ für jedes Isolat relativ zum HIV-1_{NL4-3}-Isolat. Siehe Lit. [105].

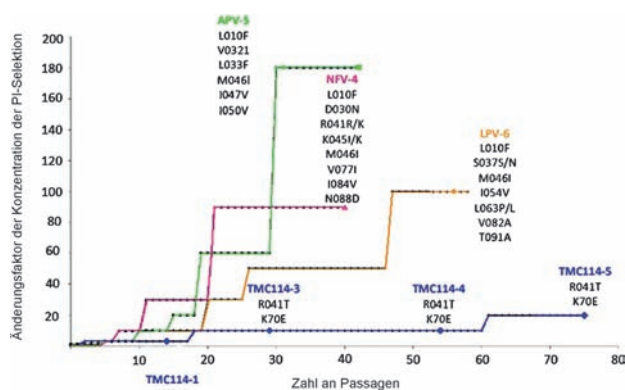


Abbildung 10. In-vitro-Selektion von resistenten HIV-Stämmen mit NFV, APV, LPV und TMC-114(DRV). Modifiziert nach Abbildung 4 in Lit. [106].

I84V.^[108,109] Später wurde noch A28S als diejenige Aminosäuresubstitution identifiziert, die ausschließlich zu Darunavir gehörte und nicht durch andere PIs ausgelöst wurde.^[110] Für sich genommen bewirkt A28S zunächst eine beträchtliche Abschwächung der Enzymfitness, die dann teilweise durch die Zweitmutation I50 V wieder ausgeglichen wird. Wahrscheinlich rührt die Darunavir-Resistenz durch A28S aus einer Positionsverschiebung des P2-Sulfonamids. Diese Verschiebung beeinträchtigt die Bildung von Wasserstoffbrücken und reduziert somit die Bindungsaffinität.

4.4. Darunavir inhibiert die Dimerisierung der HIV-1-Protease

Das beeindruckende antivirale Profil von Darunavir lässt sich teilweise auf seine geringe Größe und flexible Konformation zurückführen sowie auf seine Fähigkeit, multiple Wasserstoffbrücken zum Rückgrat der Protease zu bilden und somit eine hohe Bindungsaffinität zu entwickeln. Ein weiterer Faktor ist seine duale Inhibitorwirkung: Darunavir blockiert nicht nur die Spaltung des natürlichen Substratpeptids, sondern hemmt auch die Dimerisierung der HIV-1-Protease. Die aktive HIV-1-Protease besteht aus zwei Ketten von jeweils 99 Aminosäuren, die sich zu einer einzigen katalytisch aktiven Quartärstruktur vereinigen. Weil diese Dimerisierung der monomeren Untereinheiten eine Bedingung für die Aktivität der Protease ist, stellt deren Inhibition einen klaren Hemm-Mechanismus für die virale Replikation dar.^[111] Schon in geringen Konzentrationen von $0.01 \mu\text{M}$ ^[112] blockierte Darunavir die Dimerisierung. Dieses Thema wird aktuell weiter untersucht. Außer bei Darunavir wurde nur noch für TPV diese Eigenschaft nachgewiesen.^[112] Während Darunavir und TPV die Dimerisierung von Einzelmonomeren blockieren, vermag jedoch keiner der beiden eine einmal zusammengesetzte Protease wieder zu entfalten.

5. Design von hochwirksamen Bis-THF-PIs unter Beibehaltung der Rückgratbindung

5.1. Der Effekt von Benzodioxolansulfonamid an der S2-Bindungstasche

Wir forschten weiter an strukturellen Modifikationen, um zusätzliche Wasserstoffbrücken zu Rückgratresten der Protease aufzubauen und somit stärker affine Inhibitoren zu gewinnen. Als P2'-Ligand verwendeten wir ein Benzodioxolansulfonamid, das uns zum Inhibitor **11** führte (GRL-98065, Abbildung 11). Dieser Inhibitor war überaus wirksam und wies beträchtliche antivirale Aktivität auf ($K_i = 11 \text{ pM}$ und

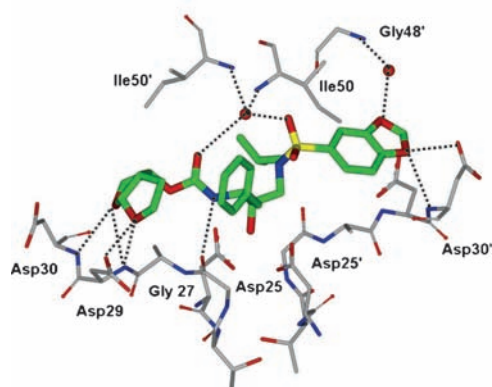
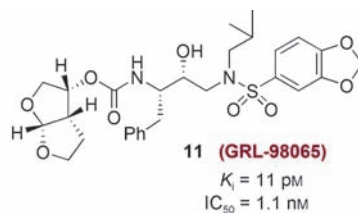


Abbildung 11. Struktur von **11** und Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **11**.

$\text{IC}_{50} = 1.1 \text{ nM}$).^[113] In Tabelle 6 ist die Evaluierung von **11** gegenüber einem breiten Spektrum von gegen mehrere Medikamente resistenten klinischen Isolaten zu sehen, wobei **11** andere zugelassene PIs einschließlich Darunavir übertraf und, ähnlich wie Darunavir, auf einem konstant hohen Niveau in der antiviralen Aktivität blieb (Abweichung 6–12-fach). Der anschließende Test von **11** gegen PI-resistente HIV-1-Varianten ergab ein einzigartiges antivirales Aktivitätsprofil (Tabelle 7), wobei eine Kreuzresistenz zu APV beobachtet wurde. Interessanterweise waren SQV und ATV weiterhin gegen Virusstämme, die gegen **11** selektiert waren und die A28S-Mutation trugen. Dies wurde mit der TMC-126-Resistenz in Verbindung gebracht und führte zu einer beträchtlichen Minderung der Fitness der Protease.^[113]

Wir ermittelten die Kristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenen **11** bei einer Auflösung von 1.6 \AA . Diese Struktur brachte sehr wichtige Einblicke in die molekulare Wirkung des Inhibitors und das Resistenzprofil.^[113] So wurde gezeigt, dass **11** an den S2- bis S2'-Subtaschen mehrere Wechselwirkungen mit den Rückgratatomen der Aminosäure-

Tabelle 6: Antivirale Aktivität von GRL-98065 (**11**) gegen mehrfach resistente klinische Isolate.

Virus ^[a]	EC ₅₀ [nM] ^[b]					
	SQV	RTV	NFV	APV	DRV	11 (GRL-98065)
HIV-1 _{ERS104pre} (WT X4)	8	25	15	29	3.8	0.5
HIV-1 _{MDR/TM} (X4)	180 (23)	> 1000 (> 40)	> 1000 (> 67)	300 (10)	4.3 (1)	3.2 (6)
HIV-1 _{MDR/MM} (R5)	140 (18)	> 1000 (> 40)	> 1000 (> 67)	480 (17)	16 (4)	3.8 (8)
HIV-1 _{MDR/JSL} (R5)	290 (36)	> 1000 (> 40)	> 1000 (> 67)	430 (15)	27 (7)	6 (12)
HIV-1 _{MDR/B} (X4)	270 (34)	> 1000 (> 40)	> 1000 (> 67)	360 (12)	40 (11)	3.9 (8)
HIV-1 _{MDR/C} (X4)	35 (4)	> 1000 (> 40)	420 (28)	250 (9)	9 (2)	2.7 (5)
HIV-1 _{MDR/G} (X4)	33 (4)	> 1000 (> 40)	370 (25)	320 (11)	7 (2)	3.4 (7)

[a] Aminosäuresubstitution in den proteasekodierenden Regionen des Virus verglichen mit der Konsensussequenz Typ B aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [113] für Details. [b] Mittlere effektive Konzentration.

Tabelle 7: Antivirale Aktivität von **11** gegen PI-resistente HIV-1-Laborvarianten.

Virus	EC ₅₀ [µm] des Medikaments ^[a]								
	SQV	RTV	IDV	NFV	APV	LPV	ATV	DRV	11 (GRL-98065)
HIV-1 _{NL4-3}	0.007	0.033	0.034	0.033	0.026	0.031	0.0042	0.0030	0.0003
HIV-1 _{SQV5µm}	> 1 (> 143)	> 1 (> 30)	> 1 (> 29)	0.48 (15)	0.33 (13)	0.27 (9)	0.326 (78)	0.0058 (2)	0.006 (20)
HIV-1 _{RTV5µm}	0.010 (1)	> 1 (> 30)	0.25 (7)	0.21 (6)	0.28 (11)	0.16 (5)	0.018 (4)	0.018 (6)	0.0025 (8)
HIV-1 _{IDV5µm}	0.059 (8)	> 1 (> 30)	> 1 (> 29)	0.47 (14)	0.17 (7)	0.26 (8)	0.06 (14)	0.015 (5)	0.0037 (12)
HIV-1 _{NFV5µm}	0.024 (3)	0.051 (2)	0.27 (8)	> 1 (> 30)	0.060 (2)	0.024 (1)	0.021 (5)	0.0033 (1)	0.0024 (8)
HIV-1 _{APV5µm}	0.031 (4)	0.29 (9)	0.200 (6)	0.27 (8)	> 1 (> 38)	0.23 (7)	0.003 (1)	0.33 (110)	0.032 (107)
HIV-1 _{LPV1µm}	0.032 (5)	> 1 (> 30)	> 1 (> 29)	0.49 (15)	0.31 (12)	0.31 (10)	0.040 (10)	n.b.	0.0075 (25)
HIV-1 _{ATV1µm}	0.037 (5)	0.12 (4)	0.388 (11)	0.22 (7)	0.20 (8)	0.033 (1)	0.33 (79)	0.0034 (1)	0.0015 (5)
HIV-1 _{GRL98065p40}	0.032 (5)	0.38 (12)	0.28 (8)	0.34 (10)	> 1 (> 38)	0.19 (6)	0.011 (3)	0.21 (70)	0.18 (600)

[a] MT-4-Zellen wurden mit 100 TCID₅₀s (Dosis für 50% Infektion in Zellkultur) jeder HIV-1-Variante versetzt und die Inhibition der Produktion des p24-Gag-Proteins als Endpunkt genommen. Die Zahlen in Klammern repräsentieren den Änderungsfaktor für jedes Isolat gegenüber der EC₅₀ für den HIV-1_{L4.3}-Wildtyp. Alle Assays wurden zwei oder drei Mal durchgeführt, und die gezeigten Daten wurden auf der Grundlage von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. n.b.: nicht bestimmt. Siehe Lit. [113] für Details.

ren des aktiven Zentrums der Protease eingeht (Asp29 und Asp30, Abbildung 11). Diese Wechselwirkungen sind wichtig für seine Wirksamkeit und die breitgestreute Aktivität gegenüber mehrfach PI-resistenten HIV-1-Varianten. Darüber hinaus sind diese Wechselwirkungen auch in der Kristallstruktur von resistenten Mutanten mit gebundenem **11** sichtbar.^[114] Ein Vergleich der Kristallstruktur mit gebundenem **11** mit einer Kristallstruktur mit gebundenem Darunavir (Abbildung 9) ergab ähnliche Wechselwirkungen in der S2-Bindungstasche, aber andere Wasserstoffbrücken in der S2'-Region. Auch wurde für Darunavir (**2**) keine Wechselwirkung über ein Wassermolekül von einem der Benzodioxolan-Sauerstoffatome zum Gly48' im Deckel beobachtet. Dieser Unterschied erklärt möglicherweise die besseren IC₅₀-Werte von **11** im Vergleich zu denen von Darunavir.^[113]

5.2. Design und klinische Entwicklung von Bis-THF-PIs mit neuartiger P1-Funktionalität

Auf der Grundlage des favorisierten Bis-THF-Liganden wurden zahlreiche wirksame PIs entworfen.^[67,84] Das von Glaxo Smith Kline entwickelte Brecanavir **12** (BCV/GW0385) enthält einen P2-Bis-THF-Liganden, einen P2'-Benzodioxolan-Liganden und einen substituierten P1-Liganden (Abbildung 12).^[115,116] Diese Verbindung wies eine Enzymhemmung im femtomolaren Bereich auf ($K_i = 15$ fm) und eine antivirale Aktivität im subnanomolaren Bereich mit

einer IC_{50} von 0.7 nM (Wildtyp). Gegen die beiden MDR, EP13 HIV-1 und D545701 HIV-1, zeigte BCV IC_{50} -Werte von

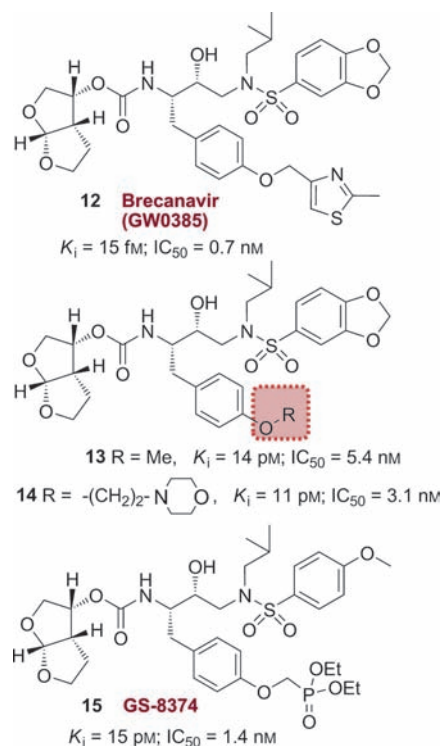


Abbildung 12. Strukturen der Pls 12–15.

1.1 nM bzw. 4.8 nM.^[115] Gegen eine Liste von 10 hoch resistenten und spezifisch PI-resistenten HIV-1-Isolaten zeigte BCV IC₅₀-Werte im sub- bis niedrignanomaren Bereich und geringer Kreuzresistenz.^[115] Darüber hinaus wurde BCV gegen 55 klinische Isolate von Patienten getestet, die PI-Therapien erfahren hatten. Bei allen Isolaten blieben die IC₅₀-Werte im niederen nanomolaren Bereich (0.1–14.9 nM). Bei 80 % der Isolate lag die IC₅₀ bei 0.8 nM oder darunter.^[117,118] Dieser Inhibitor durchlief die klinische Entwicklung bis Phase III. Die klinischen Versuche mussten dann jedoch wegen Formulierungsproblemen abgebrochen werden.^[119]

Wir untersuchten auch strukturelle Modifikationen an der P1-Seitenkette von **11**. Insbesondere versuchten wir, ein basisches Amin oder einen cyclischen Ether einzubauen, um die Wasserlöslichkeit und andere pharmakologische Eigenschaften zu verbessern. Beide so erzeugten PIs zeigten eine sehr hohe antivirale Aktivität.^[120]

Der Inhibitor **15** (GS-8374) enthielt einen P2-Bis-THF-, einen P2'-*p*-Methoxybenzosulfonamid- und einen P1-Phenyl-liganden mit Diethylphosphonylethoxyfunktion und wurde von Forschern bei Gilead Sciences entwickelt.^[121] Die Phosphonat-Funktionalität wurde ausgewählt, um ohne Änderung der Proteasebindung von **10** (TMC-126) die Retention in der Zelle zu verbessern. Der neue PI **15** wies ein ausgezeichnetes Resistenzprofil auf^[121,122] mit durchschnittlich 6.2-facher Vergrößerung der EC₅₀ (0.6–26 nM) gegenüber dem HIV-Wildtyp-Wert. Im Vergleich mit Darunavir und BCV zeigte **15** eine durchschnittlich 29.8-fache (1.0–157 nM) beziehungsweise 23.6-fache Vergrößerung der EC₅₀ (1.2–121 nM). Erklärbar war diese ausgeprägte Resistenzunterdrückung durch die Funktion der Phosphonateinheit als Ankerpunkt im umgebenden Medium. Dieser Anker begünstigt eine entropische Kompensation bei Proteasemutationen und verstärkt somit die Entartung des Bindungszustands des Inhibitors. Noch sechs Monate später war bei ausgewählten, gegen **15** exponierten HIV-1-Stämmen keine Anzeichen von RAM (Resistenz-assoziierten Mutationen) zu erkennen.^[123] Verglichen mit anderen PIs wies GS-8374 ein günstiges pharmakologisches und metabolisches Profil auf. Die Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **15** zeigte ein ähnliches Bindungsprofil für den P2-Bis-THF- und den P2'-Methoxysulfonamidliganden wie bei **10**. Ein Vergleich beider Strukturen zeigte, dass eine der Ethylphosphonat-Einheiten von **15** in einer hydrophoben Spalte an der Oberfläche der Protease gebunden war.^[121] Das Resistenzprofil von GS-8374 mit *p*-Diethylphosphonat am P1-Phenylrest war dem von BCV mit substituiertem Methylthiazol am P1 überlegen.^[123]

5.3. Effekt von C4-Methoxy-Bis-THF an der S2-Bindungstasche

Im Apoenzym sind die beiden Deckelhälften der HIV-1-Protease flexibel. Bindet jedoch ein Inhibitor, schließen sie sich und ändern ihre Rückgratkonformation nur noch minimal.^[53,124] In Abbildung 11 ist eine neuartige, durch ein Wassermolekül vermittelte Wechselwirkung von Gly48' mit dem Sauerstoffatom der Benzodioxolgruppe zu erkennen, die möglicherweise für das hervorragende antivirale und Resistenzprofil verantwortlich ist. Die Röntgenstruktur der HIV-

Protease mit gebundenem **10** wies die C4-Position des Bis-THF-Liganden als ideale Position aus, um nach Substitution mit einem Heteroatom mit der NH-Gruppe von Gly48 im Rückgrat eine Wechselwirkung einzugehen.^[95] Also synthetisierten wir eine Reihe von neuen PIs mit am C4 Alkoxy-substituierten Bis-THF-Liganden.^[125] Wie in Abbildung 13

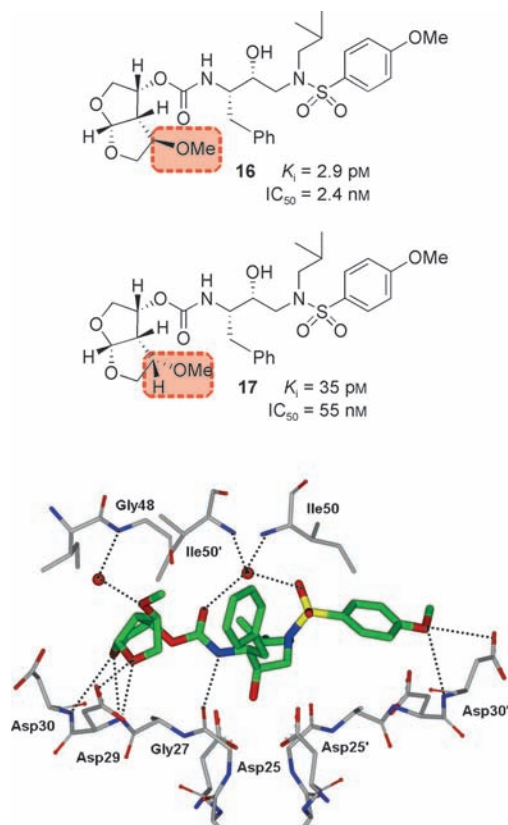


Abbildung 13. Strukturen der PIs **16** und **17** und Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **16**.

dargestellt, zeigte **16** mit 4*R*-Methoxygruppe eine bessere Enzymhemmung ($K_i = 2.9 \text{ pM}$) als **10** ($K_i = 14 \text{ pM}$). Das 4*R*-Isomer **16** war 12-fach wirksamer als das korrespondierende 4*S*-Isomer **17**. Bei größeren C4-Alkylgruppen wie dem Benzoyloxysubstituent ließ die Wirkung merklich nach. In der Röntgenstruktur (Abbildung 13) zeigte **16** ähnliche Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum der HIV-1-Protease wie **10**.^[125] Allerdings gab es zusätzlich eine über ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke vom Sauerstoffatom der 4*R*-Methoxygruppe zur NH-Gruppe von Gly48. Möglicherweise beruht die verbesserte Bindungsaffinität von **16** auf eben dieser wasservermittelten Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-NH-Gruppe von Gly48.^[125]

5.4. Design von makrocyclischen Inhibitoren mit Bis-THF an der S2-Bindungstasche

Wir wollten dann in die hydrophobe Tasche der S1'- bis S2-Bindungszentren einen flexiblen Makrocyclus einbauen

und untersuchten deshalb makrocyclische Bis-THF-Inhibitoren, deren P1'- bis P2'-Liganden ähnlich wie bei **10** und Darunavir alle wichtigen Wasserstoffbrücken mit dem Proteinrückgrat bilden können und gleichzeitig effektiv die hydrophobe S1'- und S2'-Subtasche belegen.^[95] Das mögliche Design des Makrocyclus erhielten wir aus unserer Beobachtung, dass bestimmte Mutationen die Van-der-Waals-Wechselwirkungen abschwächen und gleichzeitig die hydrophobe S1'-Subtasche vergrößern können. Einer Strukturuntersuchung von A-77003^[126] zufolge führt eine V82A-Mutation zur Abschwächung der Van-der-Waals-Wechselwirkung mit den Phenylringen in der S1- wie der S1'-Subtasche.^[127] Sowohl die Seitenkette des Inhibitors als auch die Atome in der S1-Subtasche der Protease werden dabei neu angeordnet. Daraus folgerten wir, dass gesättigte und ungesättigte 11- bis 15-gliedrige Makrocyclen geeignet sein müssten, die S1'-S2'-Subtaschen effektiv auszufüllen. Abbildung 14 zeigt, dass die

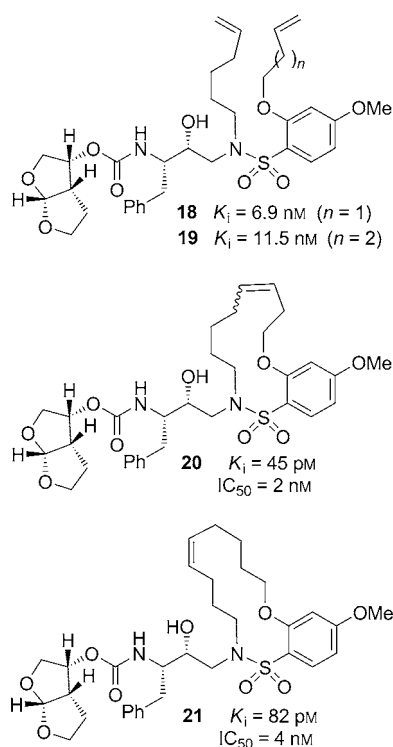


Abbildung 14. Struktur der acyclischen und makrocyclischen PIs **18–21**.

makrocyclischen Inhibitoren **20** und **21** ausgezeichnete inhibitorische und antivirale Aktivität aufwiesen, während ihre acyclischen Homologe deutlich weniger wirksam waren. Gesättigte Inhibitoren waren ebenfalls weniger aktiv als ihre ungesättigten Analoge.^[95]

Um sicherzustellen, dass die Struktureffekte auch tatsächlich zu verbesserten Resistenzeigenschaften führten, wurden die Inhibitoren **20** und **21** gegen eine Liste von klinischen Isolat vom Wildtyp X₄-HIV-1 (HIV-1_{ERS104pre}) getestet und in PBMC-Zellkulturen mit verschiedenen mehrfach resistenten klinischen X₄- und R₅-HIV-1-Isolaten verglichen.^[95,105] Tabelle 8 zeigt, dass die beiden Inhibitoren gegen HIV-1_{ERS104pre} in ihrer Wirksamkeit ($IC_{50} = 7$ bzw. 5 nM) den zugelassenen Inhibitoren IDV, APV und LPV überlegen waren, aber nur halb so wirksam waren wie Darunavir ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$).^[95] Der Inhibitor **20** war wirksamer als Amprenavir gegen HIV-1_{MDR/C}, HIV-1_{MDR/G}, HIV-1_{MDR/TM} und HIV-1_{MDR/JS} und noch mehr als 6-fach wirksamer gegen HIV-1_{MDR/MM}. Der Inhibitor **21** war Amprenavir gegen HIV-1_{MDR/C} und HIV-1_{MDR/G} überlegen (mehr als 12- bzw. 15-fach).^[95,128] Darüber hinaus verhinderten beide makrocyclischen PIs die Replikation von HIV-1_{NL4-3}-Varianten, die gegen maximal 5 μM Saquinavir, Lopinavir und Ininavir selektiert wurden ($IC_{50} = 20\text{--}46 \text{ nM}$). Die Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **20** ermittelten wir mit 1.17 Å Auflösung. In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass beide P2- und P2'-Liganden, ähnlich wie **10**, an multiplen Wasserstoffbrücken zu den Atomen des Proteinrückgrats der S2- und S2'-

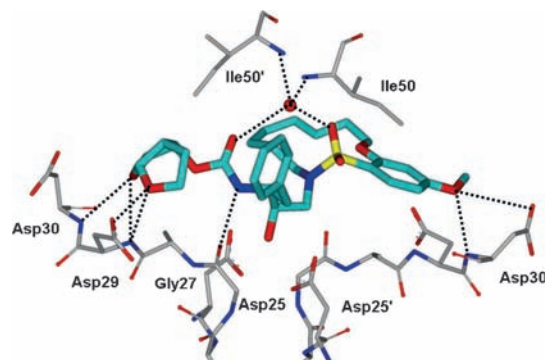


Abbildung 15. Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem makrocyclischen Inhibitor **20**. Alle starken Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linien dargestellt.

Tabelle 8: Antivirale Aktivität von makrocyclischen Inhibitoren gegen mehrfach resistente klinische Isolate in PHA-PBMCs.

Virus ^[a]	SQV	IDV	APV	IC ₅₀ [μM] LPV	DRV	21	20
HIV-1 _{ERS104pre} (WT X4)	0.008	0.043	0.030	0.034	0.003	0.007	0.005
HIV-1 _{MDR/B} (X4)	0.27 (34)	> 1 (> 23)	> 1 (> 33)	> 1 (> 29)	0.019 (6)	0.089 (13)	0.037 (7)
HIV-1 _{MDR/C} (X4)	0.032 (11)	> 1 (> 23)	0.37 (12)	> 1 (> 29)	0.008 (3)	0.029 (4)	0.044 (9)
HIV-1 _{MDR/G} (X4)	0.030 (4)	0.34 (5)	0.43 (14)	0.26 (8)	0.023 (5)	0.028 (4)	0.057 (11)
HIV-1 _{MDR/TM} (X4)	0.26 (33)	> 1 (> 23)	0.32 (11)	> 1 (> 29)	0.004 (1)	0.072 (10)	0.027 (6)
HIV-1 _{MDR/MM} (R5)	0.19 (24)	> 1 (> 23)	0.21 (7)	> 1 (> 29)	0.011 (4)	0.055 (8)	0.033 (7)
HIV-1 _{MDR/JS} (R5)	0.30 (37)	> 1 (> 23)	0.62 (21)	> 1 (> 29)	0.027 (9)	0.21 (30)	0.073 (15)

[a] Aminosäuresubstitution in der proteasekodierenden Region verglichen mit der Konsensussequenz Typ B aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [95] für Details.

Subtaschen beteiligt waren. Der kronenförmige P1'-P2'-Makrocyclus passte ausgesprochen gut in die S1'-Bindungstasche hinein. Interessanterweise verhielt sich der Makrocyclus ein wenig federartig und drückte gegen den P1-Phenylring, der sich infolgedessen um etwa 30° in die Richtung von Asp29' drehte. Eine solche Drehung war in der Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **10** nicht zu erkennen. Beide makrocyclischen PIs verloren gegen mehrfach resistente klinische Isolate nicht an Wirksamkeit, wahrscheinlich wegen der Vielzahl an Wasserstoffbrücken zum Proteaserückgrat und der hydrophoben Wechselwirkungen in den S1'-S2'-Subtaschen.^[95]

6. Das Konzept der Rückgratbindung als Strategie gegen die Arzneimittelresistenz im Test

6.1. Entwicklung von Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) als neuartigem P2-Liganden

Wir wollten nun die weiteren Möglichkeiten ausloten, die unsere auf das Proteinrückgrat ausgerichtete Strategie bietet, und entschieden uns aufgrund der Röntgenstrukturen von Proteinen mit gebundenem Liganden für das Design von strukturell variablen cyclischen Ethern als Liganden, die nicht dem Bis-THF-Liganden ähnelten. Dies führte uns schließlich zu einem stereochemisch definierten bicyclischen Hexahydrocyclopentanofuran (Cp-THF) als P2-Liganden. Diesen Liganden verknüpften wir mit isosteren Hydroxyethylaminosulfonamiden und erhielten somit eine Reihe von außergewöhnlich wirksamen PIs.^[51] Das Ether-Sauerstoffatom des Cp-THF-Rings positionierten wir so, dass es Wasserstoffbrücken zu den NH-Gruppen von Asp29 und Asp30 bilden konnte. In Abbildung 16 ist zu sehen, wie durch Austausch von Bis-THF in Darunavir durch den neuen Cp-THF-Liganden der Inhibitor **22** entsteht. Dessen Enzymhemmung lag im subnanomolaren Bereich und war somit fast 10-fach kleiner als die von Darunavir ($K_i = 16$ pM). Daraus folgerten wir, dass

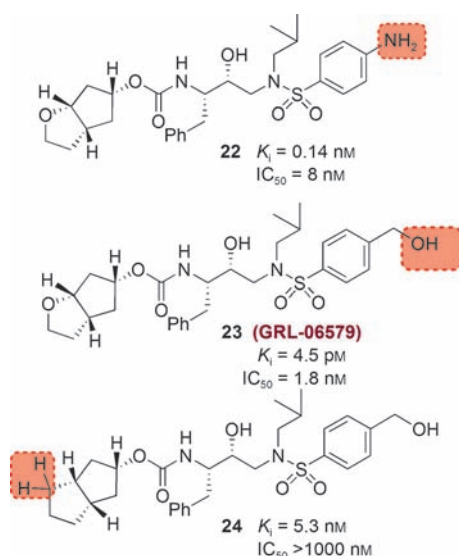


Abbildung 16. Strukturen von PIs mit Cp-THF-ähnlichen Liganden.

sich die Bindung des Cp-THF-Liganden in der S2-Subtasche von der des Bis-THF-Liganden unterscheidet. Möglicherweise war auch die Lage der restlichen Inhibitorstruktur im aktiven Zentrum etwas verschoben.^[51] Dies bedeutete, dass Modifikationen am P2'-Anilin die Wechselwirkung mit den NH-Gruppen von Asp29' und Asp30' in der S2'-Subtasche verbessern könnten. Daher bauten wir ein Hydroxymethylsulfonamid als P2'-Liganden ein. Der daraus hervorgehende Inhibitor **23** zeigte gegenüber **22** eine 30-fache Verbesserung in der Enzymhemmung ($K_i = 4.5$ pM). Zusätzlich zeigte er eine ähnlich beeindruckende antivirale Wirkung ($IC_{50} = 1.8$ nM) wie **10**. Welche Bedeutung das Sauerstoffatom im Cp-THF-Ring genau hat, testeten wir durch die Synthese von **24**, dessen Sauerstoffatom durch eine Methylengruppe ausgetauscht war. Tatsächlich verlor **24** verglichen mit **23** mehr als 1100-fach an Enzymhemmung. Auch die antivirale Aktivität von **24** war drastisch reduziert ($IC_{50} > 1000$ nM). Dies zeigt klar, dass das Sauerstoffatom des Cp-THF-Rings tatsächlich sehr wichtige Wechselwirkungen im aktiven Zentrum eingeht.

Wir bestimmten die Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **23** mit 1.35 Å Auflösung und erhielten aus dieser hochaufgelösten Struktur entscheidende Erkenntnisse, welche molekularen Wechselwirkungen in der Bindungstasche bei der Ligandenbindung vorliegen.^[51] In Abbildung 17 ist zu sehen, dass **23** ähnliche multiple Wechselwirkungen im aktiven Zentrum aufbaut wie Darunavir.

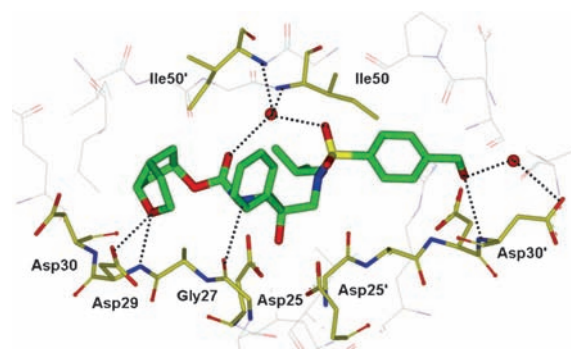


Abbildung 17. Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **23**.

Die P2'-Hydroxygruppe bildet starke Wasserstoffbrücken zu den Rückgrat-NH-Gruppen von Asp30' und hält über ein Wassermolekül Kontakt zum Sauerstoffatom der Asp30'-Seitenkette. Das Ring-Sauerstoffatom des Cp-THF-P2-Liganden bildet eine starke Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe von Asp29 im Rückgrat und eine schwache zu Asp30 aus. Diese Wechselwirkungen sind für den Inhibitor **24**, dem das Sauerstoffatom im Ring fehlt, nicht möglich, was wiederum die wesentlich schwächere Wirkung von **24** im Vergleich zu **23** erklärt. Diese Resultate veranschaulichen sehr gut, welche Bedeutung die Wasserstoffbrücken zum Proteaserückgrat der S2-Subtasche haben. Es reicht nicht aus, lediglich die Bindungstasche räumlich auszufüllen, denn dadurch wird weder eine enge Bindung induziert noch eine biologische Reaktion hervorgerufen.

Wir überlagerten die Röntgenstruktur der HIV-1-Protease (WT) mit gebundenem **23** mit den drei am stärksten mutierten resistenten Proteasen.^[51] Nur eine minimale mittlere quadratische Abweichung (0.5 bis 1.1 Å) der Alpha-Kohlenstoffatome des Rückgrats dieser Strukturen war zu erkennen. Dies bedeutet, dass der Inhibitor **23** nach wie vor gute bis ausgezeichnete Kontakte zum Rückgrat der Mutanten herstellt. Wie es sich dann herausstellte, war **23** sehr wirksam gegen HIV-1-Isolate (HIV-1_{LAI} und HIV-1_{Ba-L}) in MT-2-Zellen und PHA-PBMCs (Tabelle 10). Tabelle 9 zeigt, dass **23** gegen eine Liste von resistenten HIV-1-Stämmen stark antiviral aktiv blieb. Die höchste Aktivität (IC₅₀-Wert 3 nM) zeigte der Inhibitor **23** gegen den klinischen, von einem Medikamenten-indifferenten Patienten isolierten HIV-1-Stamm HIV-1_{ET}. Darüber hinaus war **23** aktiv gegen alle sechs klinischen arzneimittelresistenten Stämme, die jeweils 10–12 mit Inhibitorresistenzen assoziierte Aminosäuresubstitutionen (HIV-1_B, HIV-1_C, HIV-1_G, HIV-1_{TM}, HIV-1_{EV} und HIV-1_{ES}) in ihrer Protease enthielten. Die Stämme wurden von HIV-1-infizierten Patienten isoliert, denen in den vorhergehenden 24 bis 81 Monaten 7–11 unterschiedliche antivirale Reagentien verabreicht worden waren.^[82,105] Diese Stämme waren hoch resistent gegen sämtliche zugelassene PIs. Dennoch war der Inhibitor **23** höchst aktiv gegen alle sechs Varianten und zeigte IC₅₀-Werte von 4–52 nM. Auch gegen HIV-1_K war **23** mit einem IC₅₀-Wert von nur 3 nM hochwirksam. Diesen Daten zufolge ist **23** ein hoch aktiver Inhibitor gegen ein breites Spektrum arzneimittelresistenter Varianten.^[51]

6.2. Design von meso-Hexahydrocyclopenta-1,3-dioxolan als P2-Liganden

Wie wir bereits gesehen haben, ist das Sauerstoffatom im Cp-THF-Ring von **23** entscheidend für seine hervorragenden antiviralen und resistenzüberwindenden Eigenschaften. Anhand der Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **23** vermuteten wir nun, dass ein entsprechender meso-Hexahydrocyclopenta-1,3-dioxolan-Ligand ähnliche Wechselwirkungen wie der Cp-THF-Ligand eingehen müsste. Insbesondere wollten wir in den Cp-THF-Ring ein Sauerstoffatom einbauen und somit einen meso-Hexahydrocyclopenta-1,3-dioxolan-Liganden erhalten, der stereochemisch

Tabelle 10: Antivirale Aktivität (IC₅₀) von **23** in PBMCs und MT-2-Zellen.

Virus ^[a]	IC ₅₀ [nM]					
	SQV	RTV	INV	NFV	APV	23
HIV-1 _{LAI}	14	43	32	14	34	1.8
HIV-1 _{Ba-L}	18	36	24	7	29	2.0
HIV-1 _{LAI}	24	34	26	10	24	1.8
HIV-2 _{CHO}	1.9	290	13	20	440	21

[a] Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei Bestimmungen. Siehe Lit. [51] für Details.

erheblich weniger komplex und einfacher zu synthetisieren wäre. Zusätzlich zu diesem Vorteil bei der Herstellung dachten wir daran, dass das zusätzliche Ether-Sauerstoffatom weitere Wasserstoffbrücken zur Protease bilden und somit die Wirkungskraft des PIs noch weiter erhöhen würde. In Abbildung 18 sind die Struktur und Wirksamkeit einer Reihe von PIs mit meso-Liganden gezeigt.^[129]

Hierbei hatte das syn-Isomer **25** eine ähnliche Wirksamkeit und antivirale Aktivität wie der Cp-THF-PI **23**. Dagegen fiel die Wirksamkeit des anti-Isomers **27** um den Faktor 3 ab. Anders als beim Cp-THF-Liganden führte eine Hydroxymethylgruppe am P2' zu einem leichten Rückgang in der Wirksamkeit. Daraufhin untersuchten wir einen P2-1,4-Dioxanliganden und den daraus hervorgehenden Inhibitor **28**, der beträchtlich weniger antivirale Wirksamkeit zeigte. Auch ein größeres Trioxepansystem führte zu einem weniger aktiven PI. Wir evaluierten den Inhibitor **25** dann gegen eine Reihe von mehrfach resistenten HIV-1-Varianten, und die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zu sehen. Die antivirale Aktivität von **25** war ähnlich der der zugelassenen PIs SQV und APV, übertraf aber die von IDV. Dennoch war **25** nicht so aktiv gegen den Wildtyp oder resistente klinische HIV-1-Varianten wie Darunavir. Wir ermittelten die Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **28** bei 1.07 Å Auflösung (Abbildung 19). Der Inhibitor bindet über multiple Wechselwirkungen im aktiven Zentrum der Protease. Interessanterweise bildet eines der Dioxan-Sauerstoffatome eine Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-NH-Gruppe von Asp29. Das andere Dioxan-Sauerstoffatom war an einer Wasserstoffbrücke über ein Wassermolekül mit der Amid-NH-Gruppe von Gly48 beteiligt. Ähnliche Wechselwirkungen wie die mit Gly48

Tabelle 9: Antivirale Aktivität von **23** gegen HIV-1-Virusstämme.

Virus ^[a]	IC ₅₀ [nM]						
	SQV	RTV	IDV	NFV	APV	DRV	23
HIV-1 _{ET}	17	15	30	32	23	n.b.	3
HIV-1 _B	230	>1000	>1000	>1000	290	10.2	15
HIV-1 _C	100	>1000	500	310	300	3.5	5
HIV-1 _G	59	>1000	500	170	310	3.7	20
HIV-1 _{TM}	250	>1000	>1000	>1000	220	3.5	4
HIV-1 _{EV}	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	n.b.	52
HIV-1 _{ES}	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	n.b.	31
HIV-1 _K	20	58	260	>1000	68	3	3

[a] Aminosäuresubstitutionen in der proteasekodierenden Region von HIV-1_B (B), HIV-1_C (C), HIV-1_G (G), HIV-1_{TM} (TM), HIV-1_{EV} (EV), HIV-1_{ES} (ES), HIV-1_{ET} (ET), HIV-1_K (NFV_R) verglichen mit der Konsensussequenz B der Los-Alamos-Datenbank. Sämtliche Werte wurden drei Mal bestimmt. Die IC₅₀ wurde in PHA-PBMCs bestimmt und die Inhibition der Produktion des p35-Gag-Proteins als Endpunkt genommen. Siehe Lit. [51] für Details.

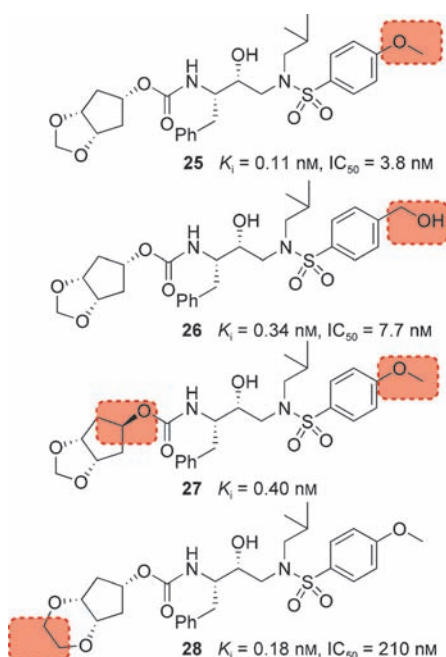


Abbildung 18. Enzymatischer K_i -Wert und antivirale Wirksamkeit der PIs **25–28**.

waren bereits für einige Substratpeptid-Analoga nachgewiesen worden,^[15,64] bislang aber noch nicht für das Liganden-design verwendet worden. Anhand der Röntgenstruktur entwarfen wir ein Modell des aktiven **25**. Hier bildete das kleinere 1,3-Dioxolan eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-NH-Gruppe von Asp30 aus.^[129] Diese zusätzliche Wechselwirkung mag die höhere antivirale Aktivität von **25** verglichen mit der von **28** erklären.

6.3. Design von Alkoxy/Hydroxy-Cp-THF für eine Rückgrat-Wechselwirkung mit Gly48 und der Effekt auf die Resistenzeigenschaften

Wie schon angeführt, zeigte der *meso*-Dioxolanligand eine sehr starke Enzymhemmung und antivirale Aktivität.^[129] In Abbildung 19 ist zu sehen, wie die beiden Sauerstoffatome des Dioxolanrings von **25**, so unsere Vermutung, sowohl eine Wasserstoffbrücke mit der Rückgrat-NH-Gruppe von Asp29 und Asp30 eingehen als auch eine durch ein Wassermolekül

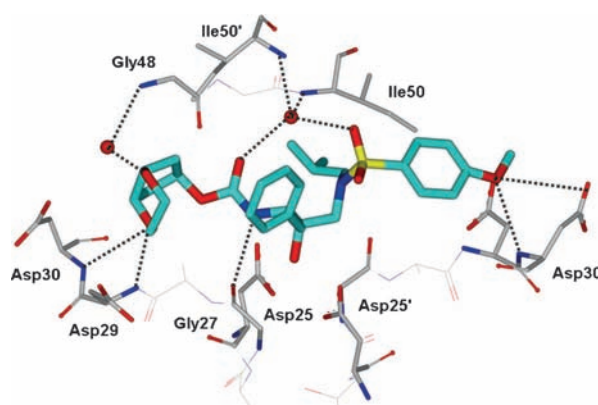


Abbildung 19. Röntgenstruktur des aktiven Zentrums der Wildtyp-HIV-1-Protease mit gebundenem Inhibitor **28**.

vermittelte Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-NH-Gruppe von Gly48 bilden. Auf dieser Möglichkeit aufbauend, entwarfen wir ein 3-Hydroxy-Cp-THF-Derivat für die Wechselwirkung mit der NH-Gruppe von Gly48 im Deckel.^[130] Ebenso synthetisierten wir ein stereochemisch definiertes Alkoxy-Cp-THF-Derivat und stellten die entsprechenden PIs her (Abbildung 20). Deutlich ist zu erkennen, dass der Inhibitor **30** mit 3*R*-Hydroxygruppe eine ähnlich hohe antivirale Aktivität wie Darunavir entfaltete. Der Inhibitor **29** mit 3*S*-Hydroxygruppe war ebenfalls recht wirksam. Wir stellten auch die entsprechenden 3-Methoxy-Cp-THF-Liganden her, deren Inhibitoren **31** und **32** ähnliche stereochemische Präferenzen und Wirksamkeiten zeigten wie die Hydroxyderivate.^[130]

Dann ermittelten wir die Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **30** bei 1.23 Å Auflösung. In Abbildung 21 ist zu sehen, dass der Cp-THF-Ring eine starke Wasserstoffbrücke mit der NH-Gruppe von Asp29 und eine eher schwache Wasserstoffbrücke zur Carboxylatgruppe von Asp29 bildet. Von der 3-Hydroxygruppe wurde tatsächlich eine Wasserstoffbrücke über ein Wassermolekül hin zur Rückgrat-NH-Gruppe von Gly48 gebildet.

Wir evaluierten die Wirksamkeit der PIs **29** und **30** gegen eine Liste von mehrfach resistenten HIV-1-Varianten im Vergleich mit den zugelassenen Inhibitoren Darunavir und APV. Tabelle 12 zeigt, dass **30** eine vergleichbare Aktivität gegen verschiedene mehrfach resistente HIV-1-Varianten aufweist wie Darunavir.^[130] Auch der Änderungsfaktor des IC_{50} ähnelt dem von Darunavir. Dagegen verlor PI **29**, der einen 3*S*-Hydroxyliganden trägt, beträchtlich an Wirksam-

Tabelle 11: Antivirale Aktivität des Inhibitors **25** gegen klinische HIV-1-Isolate in PBMCs.

Virus ^[a]	SQV	IDV	IC_{50} [nM] APV	DRV	25
HIV-1 _{ERS104pre} (WT X4)	12	26	33	3.5	29
HIV-1 _{MDR/MM} (R5)	190 (16)	> 1000 (> 38)	300 (9)	17 (5)	150 (5)
HIV-1 _{MDR/SL} (R5)	330 (28)	> 1000 (> 38)	430 (13)	26 (7)	550 (19)
HIV-1 _{MDR/C} (X4)	36 (3)	> 1000 (> 38)	230 (7)	7 (2)	300 (10)
HIV-1 _{MDR/G} (X4)	29 (2)	290 (11)	340 (10)	7 (2)	340 (12)
HIV-1 _{MDR/A} (X4)	81 (7)	> 1000 (> 38)	100 (3)	3 (1)	21 (1)

[a] Aminosäuresubstitutionen in der proteasekodierenden Region verglichen mit der Konsensussequenz Typ B aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [129] für Details.

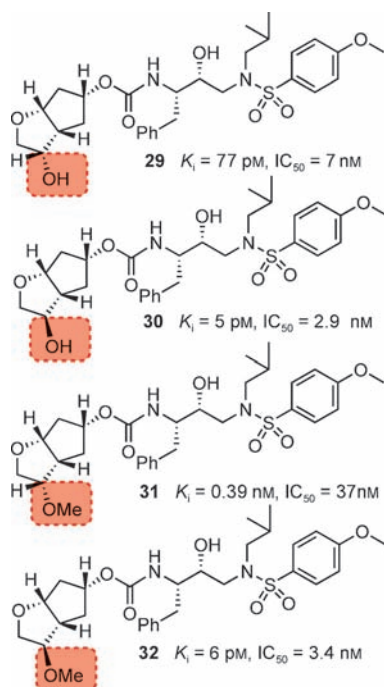


Abbildung 20. Strukturen der PIs 29–32 mit Alkoxy-/Hydroxy-Cp-THF-Liganden.

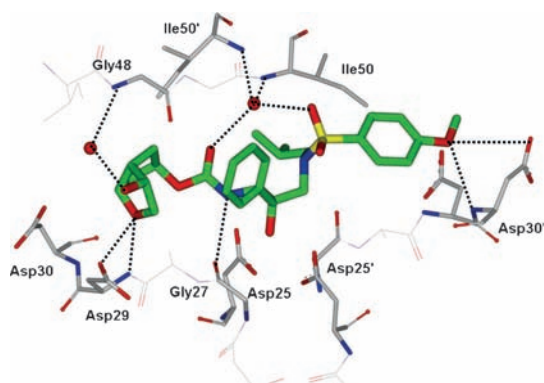


Abbildung 21. Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem 30.

Tabelle 12: Vergleich der antiviralen Aktivität von 29, 30 und anderen PIs gegen mehrfach resistente HIV-1-Varianten.

Virus ^[a]	APV	IC ₅₀ [μM] (Änderungsfaktor)		
		DRV	29	30
HIV-1 _{ERS104pre} (Wildtyp)	0.030	0.0037	0.020	0.0029
HIV-1 _{MDR/B}	0.93 (31)	0.036 (10)	> 1 (> 50)	0.029 (10)
HIV-1 _{MDR/C}	0.26 (9)	0.013 (4)	> 1 (> 50)	0.022 (7)
HIV-1 _{MDR/G}	0.38 (12)	0.0023 (1)	0.27 (13)	0.0045 (2)
HIV-1 _{MDR/TM}	0.19 (6)	0.0019 (1)	0.041 (2)	0.0031 (1)

[a] Aminosäuresubstitutionen in der proteasekodierenden Region verglichen mit der Konsensussequenz Typ B aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [130] für Details.

keit. Auch APV zeigte hohe IC₅₀-Werte und eine geringere Widerstandskraft gegen die hier untersuchten resistenten

HIV-1-Stämme. Die Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem 30 und das Widerstandsprofil von 30 bestätigen also wiederum die Strategie der Rückgratbindung als Mittel gegen die Resistenzen.

6.4. Verstärkung der Wechselwirkung mit dem Rückgrat an der S1'-Bindungstasche und Prüfung des Effekts auf die Arzneimittelresistenz von Cp-THF-PIs

Nachdem wir Liganden entworfen haben, die die Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat an der S2-Subtasche verstärkten, weiteten wir unser Konzept auch auf andere Regionen des aktiven Zentrums der Protease aus. Insbesondere wollten wir anstelle der Isobutylgruppe von 23 andere P1'-Liganden verwenden, die sowohl mit den Atomen des Rückgrats wechselwirken als auch die hydrophobe Tasche an der S1'-Bindungsstelle füllen können. Daher bauten wir stereochemisch definierte 2-Pyrrolidinon- und Oxazolidinon-Funktionalitäten ein, deren Pyrrolidinon-NH-Gruppe Wasserstoffbrücken zum Gly27' bilden kann und deren Carbonylgruppe mit dem Arg8' in der S1'-Subtasche wechselwirken sollte.^[131] Zunächst wollten wir dabei die Möglichkeiten des neuen P1'-Liganden in Kombination mit den Cp-THF- und Bis-THF-Liganden erkunden. Ebenso interessierte uns die Frage, ob PIs mit verstärkter Rückgratbindung zu einem verbessertes Resistenzprofil führen würden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 22 zusammengestellt. Der Inhibitor 33 mit (S)-Methyl-2-pyrrolidinon als P1'-Ligand zeigte eine gute Hemmwirkung gegen das Enzym, aber sein antiviraler IC₅₀-Wert war 230 nM. Das (R)-Methyl-2-pyrrolidinon-Derivat 34 zeigte demgegenüber eine Verbesserung im K_i und in der antiviralen Aktivität (IC₅₀ = 26 nM). Als Kombination von Bis-THF als P2-Ligand und (R)-Methyl-2-oxazolidinon als P1'-Ligand war jedoch die antivirale Aktivität

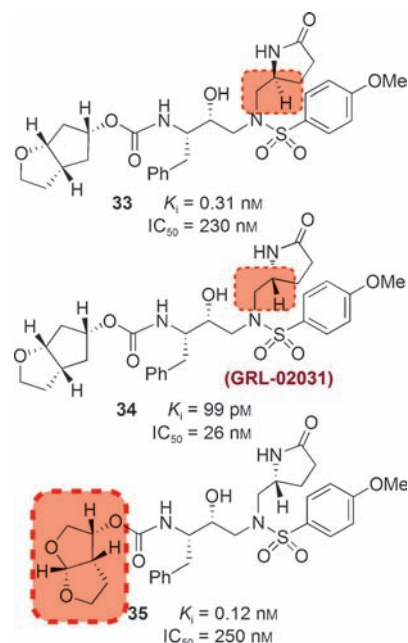


Abbildung 22. Struktur und Wirksamkeit der PIs 33–35.

im Vergleich zu **10** beträchtlich reduziert. Gegenüber **23** war **34** fast 10-fach weniger wirksam. Möglicherweise liegt dies an einer schlechteren Zellpermeabilität der polaren 2-Oxazolidinon-Funktionalität. Dennoch ist **34** ein hochwirksamer Inhibitor mit einer antiviralen Aktivität, die nicht hinter der von PIs mit FDA-Zulassung wie IDV, APV und LPV zurücksteht.^[131]

Um die multiplen Wechselwirkungen in der Bindungstasche auf molekularer Ebene besser zu verstehen, ermittelten wir eine hochaufgelöste Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **34** mit 1.29 Å Auflösung.^[131] In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass der Inhibitor über multiple Wechselwirkungen im aktiven Zentrum gebunden ist. Am

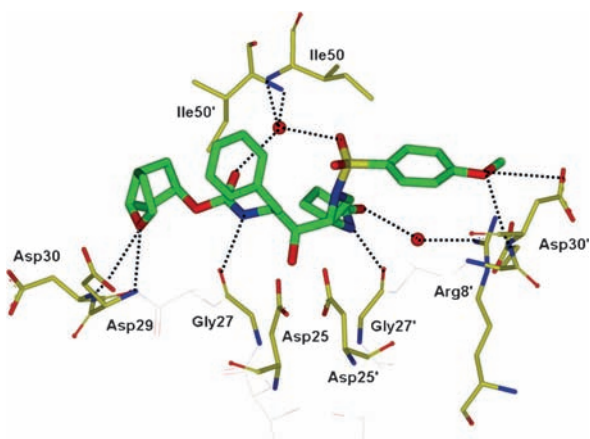


Abbildung 23. Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **34**.

meisten fällt auf, dass das P1'-Pyrrolidon zwei Konformationen einnimmt. In einer Konformation ist die NH-Gruppe des Pyrrolidons an einer Wasserstoffbrücke zur der Carbonylfunktion von Gly27' beteiligt, und die Carbonylfunktion des Pyrrolidons bildet eine über ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Arg8'. In der anderen Konformation besetzt der Pyrrolidonligand die hydrophobe Tasche, und die Carbonylgruppe bildet eine schwache Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-NH-Gruppe von Val82'. In der S2-Tasche ähneln die weiteren Wechselwirkungen des Cp-THF-Liganden denen von **23**, und das Methoxy-Sauerstoffatom in S2' bildet eine starke Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-NH-Gruppe von Asp30 und dem Seitenketten-Carboxylat aus.^[131]

Der Inhibitor **34** wurde gegen einen großen Bereich von Labor- und klinischen Wildtyp-Stämmen sowie mehrfach resistenten HIV-1-Stämmen evaluiert. Tabelle 13 listet seine Anti-HIV-Aktivitäten gegen ausgewählte klinische Isolate auf, die resistent gegen viele PIs sind.^[131,132] Die große Wirksamkeit von Inhibitor **34** gegen verschiedene klinische Isolate ist gut zu erkennen. Keiner der zugelassenen PIs außer Darunavir zeigten eine vergleichbare Aktivität. Ebenso wie Darunavir hemmte **34** alle sieben Primärstämme. Insbesondere behielt **34** außer beim R5-Phänotyp, bei dem er geringfügig weniger wirksam war (weniger als zweifach), seine nahezu volle Wirksamkeit bei. Insgesamt zeigte der Inhibitor **34** (GRL-02031) gegenüber **23** verstärkte Wechselwirkungen mit den Rückgrat-Atomen, insbesondere in der S1'-Subtasche. Wahrscheinlich trugen diese polaren Wechselwirkungen und die flexible Konformation des P1'-Oxazolidinons zu seiner robusten Aktivität gegen mehrfach resistente HIV-1-Varianten bei.^[132]

7. P2-Liganden mit flexibler Konformation, die multiple Wechselwirkungen mit dem Rückgrat eingehen

7.1. Design von flexiblen cyclischen Polyethern als P2-Liganden und der Effekt auf die Arzneimittelresistenz

Nach Studien zu unseren PIs mit *meso*-P2-Liganden versuchten wir weiter die stereochemische Komplexität des Bis-THF-Liganden zu reduzieren, wobei wir gleichzeitig die Wechselwirkungen mit dem Rückgrat und die Fähigkeit, virale Mutationen auszugleichen, die zu Aminosäurevariationen in den Seitenketten des aktiven Zentrums führen, beibehalten wollten. Dafür wandten wir uns P2-Ligandensystemen mit cyclischen Polyethern zu, deren flexible Ringe sich bei Mutationen neu anordnen können.^[133] Um einen solchen flexiblen Ring aufzubauen, entfernten wir die gemeinsame C-C-Bindung aus dem Bis-THF und stellten so den Inhibitor **36** mit flexiblem achtegliedrigem Ring her (Abbildung 24), der allerdings weit weniger wirksam war als Darunavir. Durch Verkleinerung des Rings zu einem siebengliedrigen Ring ließ sich die Inhibitionsaktivität wieder zurückgewinnen. Günstiger war hierbei das *R*-Stereoisomer, während das entsprechende PI mit epimerem P2-Liganden beträchtlich an Wirksamkeit einbüßte ($K_i = 0.16$ nM, $IC_{50} = 30$ nM). Eine weitere Ringverengung führte zum Inhibitor **38** mit einem sechsgliedrigen Ring, der ebenfalls hochwirksam

Tabelle 13: Anti-HIV-Aktivität von **34** gegen ausgewählte klinische Isolate, die resistent gegen mehrere PIs sind.

Virus ^[a]	Phänotyp	EC ₅₀ [μM]				
		IDV	APV	LPV	DRV	GRL-02031 (34)
HIV-1 _{ERS104pre} (Wildtyp)	X4	0.028	0.025	0.03	0.0036	0.028
HIV-1 _{TM} (MDR)	X4	> 1 (> 36)	0.25 (10)	0.73 (24)	0.0036 (1)	0.029 (1)
HIV-1 _{MM} (MDR)	R5	> 1 (> 36)	0.32 (13)	0.72 (24)	0.019 (5)	0.042 (2)
HIV-1 _C (MDR)	X4	> 1 (> 36)	0.35 (14)	0.32 (11)	0.015 (4)	0.023 (1)
HIV-1 _G (MDR)	X4	0.29 (10)	0.33 (13)	0.14 (5)	0.014 (4)	0.027 (1)

[a] Aminosäuresubstitutionen in der proteasekodierenden Region von HIV-1_{ERS104pre}, HIV-1_{TM}, HIV-1_{MM}, HIV-1_C und HIV-1_G verglichen mit der Konsensussequenz Typ B aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [131, 132].

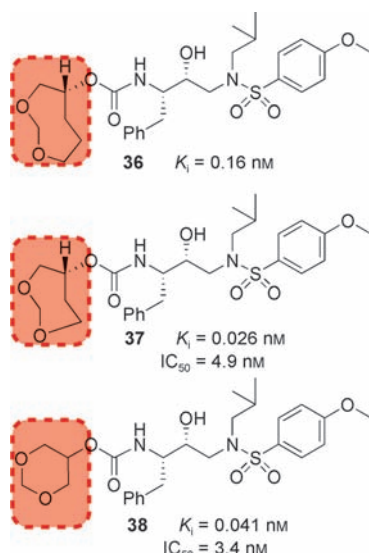


Abbildung 24. Struktur und Wirksamkeit von PIs mit cyclischen Polyethern.

war. Die Ringerweiterung zu größeren polycyclischen Ethern (zehngliedrig und größer) führte hingegen generell zu drastischen Wirkungsverlusten. Unverzichtbar für eine weiterhin hohe Enzymhemmung waren außerdem die Ether-Sauer-

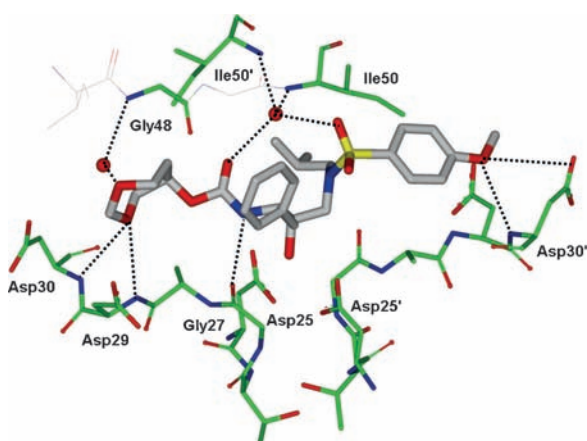


Abbildung 25. Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem 37.

stoffatome in den Ringsystemen. Jedes aus 37 entfernte Sauerstoffatom führte zu beträchtlichen Aktivitätsverlusten.

Wir ermittelten eine Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem 37 mit 1.00 Å Auflösung. Die meisten der bindenden Wechselwirkungen im aktiven Zentrum waren die gleichen wie die vom Inhibitor 10 (TMC-126). Eine Ausnahme bildeten die Wechselwirkungen in der S2-Bindungstasche. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass ein Sauerstoffatom des 1,3-Dioxepan-Liganden Wasserstoffbrücken zu den NH-Gruppen von Asp29 und Asp30 bildet. Das andere Sauerstoffatom war in eine einzigartige, über ein Wassermolekül vermittelte Wechselwirkung mit der NH-Gruppe von Gly48 einbezogen.^[133]

Die beiden PIs 37 und 38 wurden dann auf ihre antivirale Aktivität gegen eine Reihe klinisch relevanter HIV-1-Isolate hin untersucht. Zwar waren sie weniger wirksam als Darunavir, aber beide Verbindungen übertrafen die zugelassenen PIs RTV und IDV und zeigten eine vergleichbare antivirale Aktivität wie APV (Tabelle 14). Dies deutete darauf hin, dass die Verbesserung des Resistenzprofils von 37 gegenüber den anderen untersuchten PIs an der Fähigkeit des P2-Liganden von 37 liegen muss, dauerhafte Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat zu bilden. Somit führte unser Designkonzept, PIs mit maximaler Rückgratbindung herzustellen, zu PIs mit hoher Wirksamkeit gegen den Wildtyp und mehrfach resistente HIV-1-Stämme.^[50]

7.2. Weitere Optimierungsschritte für Bis-THF-Liganden und das Design eines Tp-THF-P2-Liganden

Anschließend evaluierten wir die Möglichkeiten, den Bis-THF-Liganden von Darunavir weiter zu optimieren. Nach der Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem Darunavir (Abbildung 9) waren die Sauerstoffatome des Bis-THF-Ethers an Wasserstoffbrücken zu den NH-Amid-Gruppen von Asp29 und Asp30 beteiligt, und zwar mit Abständen von 2.9 bzw. 3.1 Å. Daraus folgerten wir, dass ein größeres Ringsystem zu effektiveren Wasserstoffbrücken zu den Rückgratresten führen müsste. Dies sollte die Anordnung zwischen dem Sauerstoffatom des Ethercyclus und der N-H-Amidbindung von Asp30 begünstigen. Außerdem kann sich ein größeres Ringsystem günstig auf hydrophobe Wechselwirkungen in der S2-Subtasche auswirken und durch seine

Tabelle 14: Anti-HIV-Aktivität von 37 und 38 gegen ausgewählte klinische Isolate, die hoch resistent gegen mehrere Proteaseinhibitoren sind.

Virus ^[a]	IC ₅₀ [nM]					
	IDV	RTV	APV	DRV	37	38
ERS104pre (Wildtyp)	26	34	33	3.5	20	6
MDR/TM	> 1000 (> 38)	> 1000 (> 29)	290 (9)	4 (1)	220 (11)	64 (10)
MDR/MM	> 1000 (> 38)	> 1000 (> 29)	300 (9)	17 (5)	250 (13)	110 (5)
MDR/JSL	> 1000 (> 38)	> 1000 (> 29)	430 (13)	26 (7)	500 (25)	330 (55)
MDR/B	> 1000 (> 38)	> 1000 (> 29)	320 (10)	26 (7)	340 (17)	230 (38)
MDR/C	> 1000 (> 38)	> 1000 (> 29)	230 (7)	7 (2)	210 (11)	160 (27)
MDR/G	290 (11)	> 1000 (> 29)	340 (10)	7 (2)	360 (18)	300 (50)
MDR/A	> 1000 (> 38)	> 1000 (> 29)	100 (3)	3 (1)	20 (1)	13 (2)

[a] Aminosäuresubstitutionen in der proteasekodierenden Region verglichen mit der Konsensussequenz Typ B aus der Los-Alamos-Datenbank. Siehe Lit. [133].

zusätzliche Flexibilität sterische Änderungen besser ausgleichen, die durch Proteasemutationen hineingebracht werden. Wir synthetisierten und evaluierten dann eine Reihe von PIs, die einen Tetrahydropyranyl-THF(Tp-THF)-P2-Liganden enthielten.^[134] In Abbildung 26 ist zu sehen, dass der 4-S-Ligand von **39** (GRL-0476) ebenso wie Bis-THF stereochemisch günstiger ist als der epimere Ligand. Ebenso wie beim Bis-THF-Liganden waren beide Sauerstoffatome des Etherings entscheidend für die Bindung. Wurden sie durch eine Methylengruppe ausgetauscht, ging die Wirksamkeit beträchtlich zurück. Wir stellten auch die PIs **40** und **41** her, die als P1-Liganden jeweils eine *p*-Methoxybenzyl-Seitenkette und als P2'-Liganden eine *p*-Methoxysulfonamid- beziehungsweise *p*-Aminophenylsulfonamid-Gruppe trugen. Nach detaillierten Studien zur Arzneimittelresistenz beider PIs waren **40** und **41** sehr wirksam gegen HIV-1-Varianten, die resistent gegen zahlreiche PIs waren.^[135]

Um das System auf molekularer Ebene besser verstehen zu können, modellierten wir ausgehend von der Röntgenkristallstruktur von **10** (TMC-126) ein aktives **39** und optimierten die Konformation von **39** mit dem MMFF94-Kraftfeld.^[136] Demnach lagen in der S2-Subtasche die Sauerstoff-

atome der Etherringe von Tp-THF deutlich innerhalb der Distanz für Wasserstoffbrücken zu den Rückgrat-NH-Gruppen von Asp29 und Asp30. Andere Wechselwirkungen im aktiven Zentrum waren ähnlich wie für **10**.^[95] In Tabelle 15 ist zu erkennen, dass der Inhibitor **39** gegen eine Reihe von mehrfach resistenten klinischen Isolaten zwei PIs mit FDA-Zulassung (APV und LPV) überlegen war und bei sämtlichen Stämmen eine hohe antivirale Aktivität aufwies (EC₅₀ von 2.6 bis 27.5 nM). Diese Ergebnisse waren vergleichbar denen von **10** (TMC-126). In absoluten Zahlen war **39** sogar noch wirksamer als **10**, aber im Faktor, der die Effizienzänderung zwischen den Virusstämmen anzeigt, bestanden keine signifikanten Unterschiede.

8. Weitere Verbesserung der Resistenzeigenschaften durch Maßnahmen zur Rückgratbindung und zu den Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand

Unsere auf das Proteinrückgrat gerichtete Designstrategie hat uns zu einer Vielzahl von hochinteressanten Ligandengerüsten geführt, mit denen wir außergewöhnlich wirksame Inhibitoren mit hervorragendem Resistenzprofil erzeugen konnten. Als nächstes wollten wir die Ligandenstruktur so optimieren, dass sowohl die entscheidenden Wechselwirkungen mit dem Rückgrat beibehalten werden als auch gleichzeitig die hydrophobe Tasche am aktiven Zentrum effektiv ausgefüllt wird. Dies sollte die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand maximieren. Also fügten wir an den Bis-THF-Liganden Funktionalitäten an, um die Resistenzeigenschaften der PIs weiter zu verbessern. Abbildung 27 zeigt eine Überlagerung der Röntgenstrukturen des aktiven Zentrums der HIV-1-Protease mit gebundenem Darunavir^[69] und SQV.^[86] Davon ausgehend planten wir, die hier durch die Chinaldineinheit von SQV besetzte hydrophobe Tasche zu befüllen. Insbesondere nahmen wir an, dass wir durch einen weiteren an den Bis-THF-Liganden kondensierten Tetrahydrofuranring noch zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindungstasche gewinnen würden. Dieser Oxatricycclus enthält zahlreiche Stereozentren, darunter eine *syn-syn-syn*-Form (SSS) und ein *syn-anti-syn*-Isomer (SAS). Aus unserem Überlagerungsmodell in Abbildung 27 folgerten wir allerdings, dass ein SAS-Ligand am ehesten die Wechselwirkungen des Inhibitors an der S2-Bindungstasche verstärken

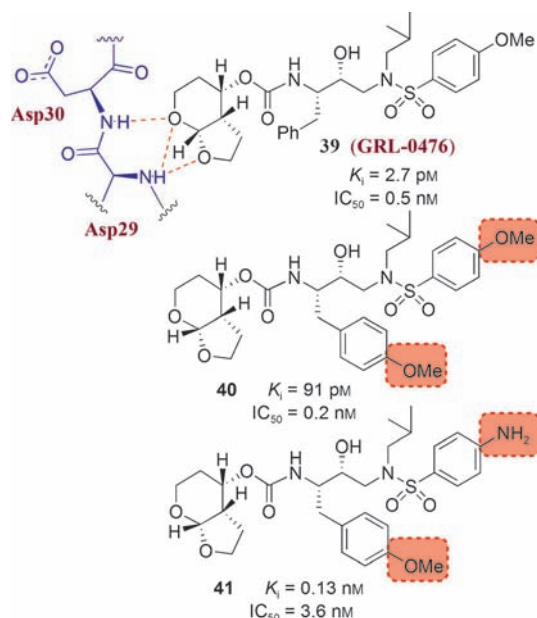


Abbildung 26. Struktur und Wirksamkeit von PIs mit Tp-THF-Liganden.

Tabelle 15: Vergleich der antiviralen Aktivität von **39** mit der von anderen PIs gegen mehrfach resistente klinische Isolate.

Virus ^[a]	Phänotyp	EC ₅₀ [μM]			
		ATV	LPV	DRV	39 (GRL-0476)
HIV-1 _{ERS104pre} (Wildtyp)	X4	0.0027	0.031	0.004	0.0019
HIV-1 _{MDR/B}	X4	0.470 (174)	> 1 (> 32)	0.034 (9)	0.0145 (8)
HIV-1 _{MDR/C}	X4	0.039 (14)	0.437 (14)	0.009 (2)	0.0037 (2)
HIV-1 _{MDR/G}	X4	0.019 (7)	0.181 (6)	0.026 (7)	0.0026 (1)
HIV-1 _{MDR/TM}	X4	0.075 (28)	0.423 (14)	0.022 (6)	0.0275 (14)
HIV-1 _{MDR/MM}	R5	0.205 (76)	0.762 (25)	0.017 (4)	0.0050 (3)
HIV-1 _{MDR/JSL}	R5	0.293 (109)	> 1 (> 32)	0.023 (6)	0.0275 (14)

[a] Siehe Lit. [134] und [135] für Details zu den Aminosäuresubstitutionen in der proteasekodierenden Region von HIV-1_{ERS104pre}, HIV-1_B, HIV-1_C, HIV-1_G, HIV-1_{TM}, HIV-1_{MM}, HIV-1_{JSL} und zum Assayprotokoll.

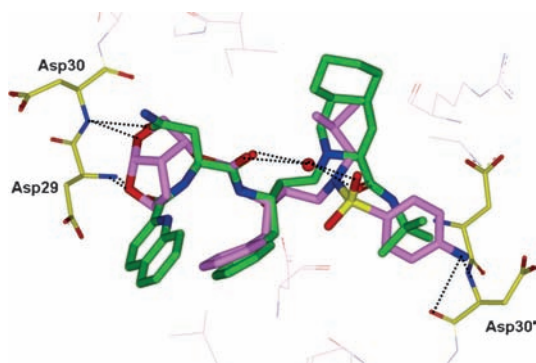


Abbildung 27. Überlagerung der Röntgenstrukturen von Darunavir und SQV im aktiven Zentrum der HIV-1-Protease.

würde. Wir synthetisierten dann stereoselektiv beide Formen (SAS und SSS) des oxatricyclischen Liganden und erhielten so die PIs **42** und **43** (Abbildung 28).^[137]

Der Inhibitor **42** (GRL-0519A, mit *syn-anti-syn*-Konfiguration im Tris-THF-Ring) zeigte eine gegenüber dem *syn-syn-syn*-Derivat **43** 10-fach bessere Enzymhemmung. Auch bezüglich der antiviralen Aktivität übertraf **42** das Derivat **43**. Die Röntgenstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **42** ermittelten wir mit 1.27 Å Auflösung (Abbildung 29).^[137]

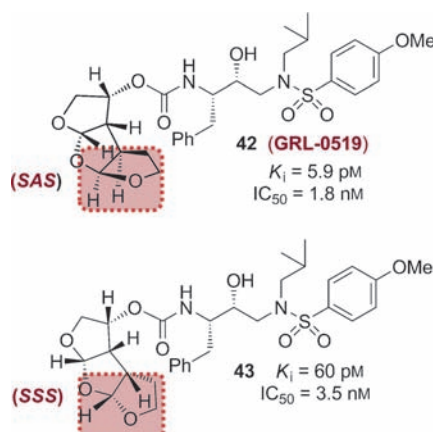


Abbildung 28. Struktur und Wirksamkeit der PIs **42** und **43**.

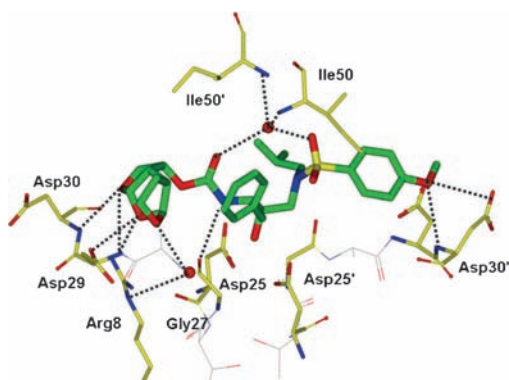


Abbildung 29. Röntgenkristallstruktur der HIV-1-Protease mit gebundenem **42** (PDB-Nummer 30K9).^[137]

Anders als für die Bis-THF-Liganden von Darunavir oder TMC-126 waren für diese Struktur eine Reihe von zusätzlichen Wechselwirkungen mit der S2-Subtasche zu erkennen. Die Sauerstoffatome der beiden oberen THF-Ringe waren an Wasserstoffbrücken mit den Rückgrat-NH-Gruppen von Asp29 und Asp30 beteiligt. Das Sauerstoffatom im zweiten Ring bildete offensichtlich auch eine Wasserstoffbrücke zur Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp29. Und erwartungsgemäß füllte der dritte THF-Ring die S2-Subtasche ausgesprochen gut aus. Er baute zudem ein halbkreisförmiges Netzwerk von drei konservierten Wassermolekülen auf, die um die Seitenkette von Arg8 herum angeordnet waren.

Der Inhibitor **42** erwies sich als extrem wirksam gegen verschiedene mehrfach resistente HIV-1-Varianten, und seine IC_{50} -Werte von 0.6–4.3 nM stellten eine fast 10-fache Verbesserung gegenüber Darunavir dar (Tabelle 16). In vitro war die Bildung eines GRL-0519A-resistenten HIV-1-Stamms im

Tabelle 16: Antivirale Aktivität von **42**, Amprenavir (APV) und Darunavir (DRV) gegen mehrfach resistente klinische Isolate in PHA-PBMCs.^[a]

Virus ^[a]	APV	EC ₅₀ [μM] DRV	42 (GRL-0519)
HIV-1 _{ERS104pre} (Wildtyp)	0.032	0.005	0.0006
HIV-1 _{MDR/B}	0.521 (16)	0.028 (6)	0.0043 (7)
HIV-1 _{MDR/C}	0.357 (11)	0.011 (2)	0.0009 (2)
HIV-1 _{MDR/G}	0.485 (15)	0.031 (6)	0.0027 (5)
HIV-1 _{MDR/TM}	0.488 (15)	0.031 (6)	0.0022 (4)
HIV-1 _{MDR/MM}	0.291 (9)	0.016 (3)	0.0027 (5)
HIV-1 _{MDR/JSL}	0.419 (13)	0.024 (5)	0.0028 (5)

[a] Siehe Lit. [137] für Details.

Vergleich mit einer Auswahl an zugelassenen PIs beträchtlich verzögert.^[137] Sehr interessant waren auch Messungen zur HIV-1-Expression mithilfe des Förster-Energietransfers (FRET), bei denen die Proteasemonomere mit Cyan fluoreszierendem Protein und Gelb fluoreszierendem Protein markiert waren.^[112] Nach den Messungen blockierte GRL-0519A die Dimerisierung der Protease mindestens 10-fach effektiver als Darunavir. Die Daten zeigen, dass die Entwicklung der PI-Klasse GRL-01519 als mögliche Therapeutika für Primärinfektionen und Infektionen mit mehrfach resistenten HIV-1-Stämmen unbedingt weiter verfolgt werden sollte.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Unser spezifisches Interesse an der Chemie und Biologie von Naturstoffen ermöglichte uns eine einzigartige Perspektive auf das Design und die Synthese von HIV-1-Protease-Inhibitoren zur Behandlung von HIV-Infektionen und AIDS. Ursprünglich verfolgten wir die akademische Fragestellung, ob man auf der Grundlage von Naturstoffen Liganden oder Template entwerfen könnte, die die biologische Wirkungsweise der Peptidbindungen nachahmen und die inhärenten Probleme von Arzneimitteln auf Peptidbasis kompensieren können. Die Natur selbst optimiert seit Millionen von Jahren

cyclische und polycyclische Ethertemplate in verschiedenen biologischen Mikroumgebungen und verwendet dafür die Enzyme der Biosynthese. Inspiriert davon, formulierten wir auf der Grundlage von Röntgenstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen den Gedanken, dass wir cyclische Ether oder Polyether als stereochemisch definierte molekulare Einheiten verwenden könnten, die die Peptidbindung ersetzen und die hydrophoben Taschen im aktiven Zentrum der HIV-1-Protease effektiv auszufüllen würden. Das Sauerstoffatom des Etherrings würde dabei die biologische Funktion der Peptid-Carbonylgruppe imitieren, und die cyclische Einheit sollte für die Van-der-Waals-Wechselwirkungen in der hydrophoben Tasche aufkommen. Unsere Bemühungen führten uns zu einer Vielzahl von konzeptuell neuartigen Molekültemplaten, die vollständig nichtpeptidisch sind und dennoch eine überaus hohe Affinität zur HIV-1-Protease aufweisen. Durch eine große Zahl von röntgenkristallographischen Analysen der HIV-1-Protease mit gebundenem Inhibitor demonstrierten wir, dass ein solches Sauerstoffatom des Ether-/Polyetherrings tatsächlich die Carbonylgruppe einer Peptid-/Amidfunktionalität ersetzen und imitieren kann, und dass ebenso die cyclischen Einheiten ausgesprochen gut in die hydrophoben Taschen des aktiven Zentrums des Enzyms hineinpassen.

Während wir die verschiedenen hochaffinen nichtpeptidischen Liganden entwickelten, wandten wir uns deren Eigenschaften der Arzneimittelresistenz zu. Uns interessierte die Optimierung der Inhibitorstruktur gegen die Wildtyp-HIV-1-Protease und bekannte Proteasemutanten. Wir ermittelten die Röntgenstrukturen der Wildtyp-HIV-1-Protease mit gebundenen Inhibitoren und weitere Strukturen einer Vielzahl von inhibitorgebundenen Mutanten. Durch Überlagerung der Strukturen von Wildtyp und Mutante erkannten wir, dass die Konfiguration des Rückgrats nur minimal verändert wurde. Nun war unser strategisches Ziel gegen die Arzneimittelresistenz, das Rückgrat des Proteins als Angriffspunkt zu nehmen. Durch Maximierung der Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrat erschufen wir eine „molekulare Krabbe“, die sich an das aktive Zentrum des Proteins fest und dauerhaft anklammert. Die Praktikabilität und Nützlichkeit der Rückgratbindung als Designstrategie gegen die Arzneimittelresistenz dokumentierten wir mit einer Kombination aus detaillierten antiviralen Studien, Untersuchungen zur Arzneimittelresistenz und Röntgenkristallanalysen. Auf unsere von Polyether-Naturstoffen inspirierten Arbeiten zum Ligandendesign folgte also das auf die Rückgratbindung gerichtete Inhibitor-Design, und die Kombination daraus führte letztlich zur Entwicklung von Darunavir, dem ersten FDA-zugelassenen Medikament für die Behandlung von Patienten mit mehrfach resistenten HIV-1-Varianten. Die Indikationen zur Behandlung mit Darunavir wurden später auf sämtliche Patienten mit HIV-Infektion und AIDS verallgemeinert. Darüber hinaus entdeckten wir den dualen Wirkmechanismus von Darunavir und identifizierten dieses Molekül als wirkungsvollen Inhibitor der Dimerisierung der HIV-1-Protease.

Darunavir markierte einen wichtigen Wendepunkt im Entwicklungskonzept von PIs gegen HIV. Unsere Arbeiten führten uns zum Konzept der Rückgratbindung als einem

effektiven Mittel zur Unterdrückung der Adaptationsfähigkeit des Virus. In einer Weiterführung der Designstrategie entwarfen und synthetisierten wir eine Vielzahl von überaus wirksamen HIV-1-Protease-Inhibitoren mit ungewöhnlichen Strukturmerkmalen. Besonders interessant ist die fast vollständig erhaltene Wirksamkeit von GRL-02031 gegen eine Reihe von mehrfach resistenten HIV-1-Varianten. Ebenfalls ist bei GRL-0519 die antivirale Aktivität gegenüber Darunavir 10-fach verbessert, wobei die Wirksamkeit für einen großen Bereich von klinisch relevanten, mehrfach resistenten Stämmen nicht abfällt. Das Konzept der Rückgratbindung könnte sich auch als Anleitung dafür anbieten, in anderen Bereichen antiretrovirale Reagentien zu entwickeln. Wir werden dieses Designkonzept weiterentwickeln, um uns auf diese Weise den Herausforderungen der modernen Medizin dauerhaft zu stellen.

Diese Arbeit wurde durch die National Institutes of Health (GM53386) unterstützt. Wir danken Dr. K. V. Rao (Purdue University) für hilfreiche Diskussionen.

Eingegangen am 20. April 2011

Online veröffentlicht am 31. Januar 2012

Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer, Otterberg

- [1] E. Domingo, C. K. Biebricher, M. Eigen, J. J. Holland in *Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences*, Eurekah, Georgetown, **2001** (Vorwort).
- [2] M. Burnet, D. O. White in *Natural History of Infectious Disease*, Cambridge University Press, London, **1972**.
- [3] J. Needham, L. Gwei-djen in *Science and Civilization in China*, Vol. 6 (Hrsg.: N. Sivin), Cambridge University Press, Cambridge, **1999**, S. 134.
- [4] A. Waterson, L. Wilkinson in *An Introduction to the History of Virology*, Cambridge University Press, Cambridge, **1978**, S. 23–34.
- [5] F. Fenner, F. M. Burnett in *Portraits of Viruses: A History of Virology* (Hrsg.: F. Fenner, A. Gibbs), S. Karger AG, Basel, **1988**, S. 1–37.
- [6] J. B. Brooksby in *Portraits of Viruses: A History of Virology* (Hrsg.: F. Fenner, A. Gibbs), S. Karger AG, Basel, **1988**, S. 124–146.
- [7] WHO, Summary of SARS Cases, http://www.who.int/csr/sars/country/country2003_08_15.pdf, **2003**.
- [8] WHO, Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO, http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_02_02/en/index.htm, **2011**.
- [9] UNAIDS Report on the global HIV/AIDS epidemic, http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2010/20101123_globalreport_en.pdf, **2010**.
- [10] F. Barre-Sinoussi, J. Chermann, F. Rey, M. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, et al., *Science* **1983**, 220, 868–871.
- [11] R. C. Gallo, P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, M. Popovic, *Science* **1983**, 220, 865–867.
- [12] T. Lyle in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Vol. 7 (Hrsg.: J. Taylor, D. Triggle), Elsevier Science Maryland Heights, **2007**, S. 329–371.
- [13] Y. Mehellou, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 521–538.
- [14] L. Menéndez-Arias, *Antiviral Res.* **2010**, 85, 210–231.

- [15] C. Flexner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 959–966.
- [16] H. Mitsuya, S. Broder, *Nature* **1987**, 325, 773–778.
- [17] N. E. Kohl, E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. F. Dixon, E. M. Scolnick, I. S. Sigal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4686–4690.
- [18] S. Virgil in *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Vol. 45 (Hrsg.: A. K. Ghosh), Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, S. 139–168.
- [19] H. Mitsuya, J. Erickson in *Textbook of AIDS Medicine* (Hrsg.: T. Merigan, J. Bartlett, D. Bolgnesi), Williams & Wilkins, Baltimore, **1999**, S. 751–780.
- [20] M. Glesby in *Protease Inhibitors in AIDS Therapy*, (Hrsg.: R. Ogden, C. Flexner), Marcel Dekker, New York, **2001**, S. 237–256.
- [21] A. Wensing, N. M. van Maarseveen, M. Nijhuis, *Antiviral Res.* **2010**, 85, 59–74.
- [22] S. Grabar, C. Pradier, E. Le Corfec, R. Lancar, C. Allavena, M. Bentata, P. Berlureau, C. Dupont, P. Fabbro-Peray, I. Poizot-Martin, D. Costagliola, *AIDS* **2000**, 14, 141–149.
- [23] M. Wainberg, G. Friedland, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1998**, 279, 1977–1983.
- [24] L. Mansky, H. Temin, *J. Virol.* **1995**, 69, 5087–5094.
- [25] J. Drake, J. Holland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 13910–13913.
- [26] A. Perelson, A. Neumann, M. Markowitz, J. Leonard, D. Ho, *Science* **1996**, 271, 1582–1586.
- [27] D. Robertson, B. Hahn, P. Sharp, *J. Mol. Evol.* **1995**, 40, 249–259.
- [28] A. Leigh Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 1862–1865.
- [29] R. Steigbigel, D. Cooper, P. Kumar, et al., *N. Engl. J. Med.* **2008**, 359, 339–354.
- [30] J. Stephenson, *J. Am. Med. Assoc.* **2007**, 297, 1535–1536.
- [31] P. Cane, J. Antimicro, *Chemother* **2009**, Suppl. 1, i37–i40.
- [32] B. Dau, M. Holodniy, *Drugs* **2009**, 69, 31–50.
- [33] C. Stoddart, P. Joshi, B. Sloan, J. Bare, P. Smith, G. Allaway, C. Wild, D. Martin, *PLoS ONE* **2007**, 2, e1251.
- [34] J. Tazi, N. Bakkour, V. Marchand, L. Ayadi, A. Aboufirassi, C. Branlant, *FEBS J.* **2010**, 277, 867–876.
- [35] H. Mitsuya, A. Ghosh in *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets* (Hrsg.: A. Ghosh), Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, S. 245–262.
- [36] E. Domingo, R. Webster, J. Holland in *Origins and Evolution of Viruses*, Academic Press, London, **1999**, S. 197–224.
- [37] A. Ali, R. Bandaranayake, Y. Cai, N. King, M. Kolli, S. Mittal, J. Murzycki, M. Nalam, E. Nalivaika, A. Ozen, M. Prabu-Jeyabalan, K. Thayer, C. Schiffer, *Viruses* **2010**, 2, 2509–2535.
- [38] L. Menéndez-Arias, *Antiviral Res.* **2010**, 85, 210–231.
- [39] A. Wensing, N. Maarseveen, M. Nijhuis, *Antiviral Res.* **2010**, 59–74.
- [40] S. V. Gulnik, L. I. Suvorov, B. Liu, B. Yu, B. Anderson, H. Mitsuya, J. W. Erickson, *Biochemistry* **1995**, 34, 9282–9287.
- [41] R. Kantor, W. J. Fessel, A. R. Zolopa, D. Israelski, N. Shulman, J. G. Montoya, M. Harbour, J. M. Schapiro, R. W. Shafer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 1086–1092.
- [42] K. Yusa, W. Song, M. Bartelmann, S. Harada, *J. Virol.* **2002**, 76, 3031–3037.
- [43] G. Croteau, L. Doyon, D. Thibeault, G. McKercher, L. Pilote, D. Lamarre, *J. Virol.* **1997**, 71, 1089–1096.
- [44] J. Martinez-Picado, A. V. Savara, L. Sutton, R. T. D'Aquila, *J. Virol.* **1999**, 73, 3744–3752.
- [45] J. Condra, W. Schleif, O. Blahy, L. Gabryelski, D. J. Graham, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shiva-prakash, D. Titus, T. Yang, H. Teplert, K. E. Squires, P. J. Deutsch, E. A. Emini, *Nature* **1995**, 374, 569–571.
- [46] S. Tamiya, S. Mardy, M. Kavlick, K. Yoshimura, H. Mitsuya, *J. Virol.* **2004**, 78, 12030–12040.
- [47] F. Mammano, C. Petit, F. Clavel, *J. Virol.* **1998**, 72, 7632–7637.
- [48] L. Hong, X. Zhang, J. A. Hartsuck, J. Tang, *Protein Sci.* **2000**, 9, 1898–1904.
- [49] G. S. Laco, C. Schalk-Hihi, J. Lubkowski, G. Morris, A. Zdanov, A. Olson, J. H. Elder, A. Wlodawer, A. Gustchina, *Biochemistry* **1997**, 36, 10696–10708.
- [50] A. K. Ghosh, B. Chapsal, I. Weber, H. Mitsuya, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 78–86.
- [51] A. K. Ghosh, P. R. Sridhar, S. Leshchenko, A. K. Hussain, J. Li, A. Y. Kovalevsky, D. E. Walters, J. Wedekind, V. Grum-Tokars, D. Das, Y. Koh, K. Maeda, H. Gatanaga, I. T. Weber, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5252–5261.
- [52] J. Agniswamy, I. T. Weber, *Viruses* **2009**, 1, 1110–1136.
- [53] A. Wlodawer, J. Vondrasek, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 249–284.
- [54] C. Chothia, A. Lesk, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1987**, 52, 399–405.
- [55] C. Worth, S. Gong, T. Blundell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, 10, 709–720.
- [56] A. Todd, C. Orengo, J. Thornton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 548–556.
- [57] J. Liang, H. Edelsbrunner, C. Woodward, *Protein Sci.* **1998**, 7, 1884–1897.
- [58] R. Wolfenden, M. J. Snider, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 938–945.
- [59] S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer, *Science* **2003**, 301, 1196–1202.
- [60] M. Garcia-Viloca, J. Gao, M. Karplus, D. G. Truhlar, *Science* **2004**, 303, 186–195.
- [61] A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskolski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, S. B. Kent, *Science* **1989**, 245, 616–621.
- [62] A. Gustchina, I. T. Weber, *FEBS Lett.* **1990**, 269, 269–272.
- [63] A. Gustchina, C. Sansom, M. Prevost, J. Richelle, S. Y. Wodak, A. Wlodawer, I. T. Weber, *Protein Eng.* **1994**, 7, 309–317.
- [64] Y. Tie, P. I. Boross, Y. F. Wang, L. Gaddis, F. Liu, X. Chen, J. Tozser, R. W. Harrison, I. T. Weber, *FEBS J.* **2005**, 272, 5265–5277.
- [65] A. Wlodawer, A. Gustchina, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, 1477, 16–34.
- [66] W. Wang, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14937–14942.
- [67] A. K. Ghosh, P. R. Sridhar, N. Kumaragurubaran, Y. Koh, I. T. Weber, H. Mitsuya, *ChemMedChem* **2006**, 1, 939–950.
- [68] A. K. Ghosh, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2163–2176.
- [69] A. Y. Kovalevsky, F. Liu, S. Leshchenko, A. K. Ghosh, J. M. Louis, R. W. Harrison, I. T. Weber, *J. Mol. Biol.* **2006**, 363, 161–173.
- [70] F. Liu, P. I. Boross, Y. F. Wang, J. Tozser, J. M. Louis, R. W. Harrison, I. T. Weber, *J. Mol. Biol.* **2005**, 354, 789–800.
- [71] A. Y. Kovalevsky, Y. Tie, F. Liu, P. I. Boross, Y. F. Wang, S. Leshchenko, A. K. Ghosh, R. W. Harrison, I. T. Weber, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 1379–1387.
- [72] F. Liu, A. Y. Kovalevsky, J. M. Louis, P. I. Boross, Y. F. Wang, R. W. Harrison, I. T. Weber, *J. Mol. Biol.* **2006**, 358, 1191–1199.
- [73] B. Mahalingam, Y. F. Wang, P. I. Boross, J. Tozser, J. M. Louis, R. W. Harrison, I. T. Weber, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 1516–1524.
- [74] Y. Tie, A. Y. Kovalevsky, P. Boross, Y. F. Wang, A. K. Ghosh, J. Tozser, R. W. Harrison, I. T. Weber, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2007**, 67, 232–242.
- [75] P. Martin, J. F. Vickrey, G. Proteasa, Y. L. Jimenez, Z. Wawrzak, M. A. Winters, T. C. Merigan, L. C. Kovari, *Structure* **2005**, 13, 1887–1895.
- [76] C. H. Shen, Y. F. Wang, A. Y. Kovalevsky, R. W. Harrison, I. T. Weber, *FEBS J.* **2010**, 277, 3699–3714.

- [77] J. F. Miller, C. W. Andrews, M. Brieger, E. S. Furfine, M. R. Hale, M. H. Hanlon, R. J. Hazen, I. Kaldor, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1788–1794.
- [78] J. C. Clemente, R. E. Moore, R. Hemrajani, L. R. Whitford, L. Govindasamy, R. Reutzel, R. McKenna, M. Agbandje-McKenna, M. M. Goodenow, B. M. Dunn, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12141–12151.
- [79] Z. Chen, Y. Li, E. Chen, D. L. Hall, P. L. Darke, C. Culberson, J. A. Shafer, L. C. Kuo, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26344–26348.
- [80] A. K. Ghosh, S. Gemma, E. Simoni, A. Baldrige, D. E. Waters, K. Ide, Y. Tojo, Y. Koh, H. Mitsuya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1241–1246.
- [81] A. K. Ghosh, J. F. Kincaid, W. Cho, D. E. Walters, K. Krishnan, K. A. Hussain, Y. Koo, H. Cho, C. Rudall, L. Holland, J. Buthod, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 687–690.
- [82] K. Yoshimura, R. Kato, M. F. Kavlick, A. Nguyen, V. Maroun, K. Maeda, K. A. Hussain, A. K. Ghosh, S. V. Gulnik, J. W. Erickson, H. Mitsuya, *J. Virol.* **2002**, *76*, 1349–1358.
- [83] A. K. Ghosh, Z. L. Dawson, H. Mitsuya, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7576–7580.
- [84] A. K. Ghosh, B. D. Chapsal, H. Mitsuya in *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets* (Hrsg.: A. K. Ghosh), Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, *S.* 205–235.
- [85] N. A. Roberts, J. A. Martin, D. Kitchington, A. V. Broadhurst, J. C. Craig, I. B. Duncan, S. A. Galpin, B. K. Handa, J. Kay, A. Krohn, R. W. Lambert, J. H. Merrett, J. S. Mills, K. E. B. Parkes, S. Redshaw, A. J. Ritchie, D. L. Taylor, G. J. Thomas, P. J. Machin, *Science* **1990**, *248*, 358–361.
- [86] A. Krohn, S. Redshaw, J. C. Ritchie, B. J. Graves, M. H. Hatada, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3340–3342.
- [87] K. Nakanishi, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4987–5000.
- [88] A. L. Donoho, *J. Anim. Sci.* **1984**, *58*, 1528–1539.
- [89] A. K. Ghosh, W. J. Thompson, M. K. Holloway, S. P. McKee, T. T. Duong, H. Y. Lee, P. M. Munson, A. M. Smith, J. M. Wai, P. L. Darke, et al., *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2300–2310.
- [90] A. K. Ghosh, W. J. Thompson, S. P. McKee, T. T. Duong, T. A. Lyle, J. C. Chen, P. L. Darke, J. A. Zugay, E. A. Emini, W. A. Schleif, et al., *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 292–294.
- [91] M. L. Vazquez, M. L. Bryant, M. Clare, G. A. DeCrescenzo, E. M. Doherty, J. N. Freskos, D. P. Getman, K. A. Houseman, J. A. Julien, G. P. Kocan, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 581–584.
- [92] R. D. Tung, D. J. Livingston, B. G. Rao, E. E. Kim, C. T. Baker, J. S. Boger, S. P. Chambers, D. D. Deininger, M. Dwyer, L. Elsayed, J. Fulghum, B. Li, M. A. Murcko, M. A. Navia, P. Novak, S. Pazhanisamy, C. Stuver, J. A. Thomson in *Protease Inhibitors in AIDS Therapy* (Hrsg.: R. C. Ogden, C. W. Flexner), Marcel Dekker, New York, **2001**, *S.* 101–137.
- [93] E. E. Kim, C. T. Baker, M. D. Dwyer, M. A. Murcko, B. G. Rao, R. D. Tung, M. A. Navia, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1181–1182.
- [94] A. K. Ghosh, J. F. Kincaid, D. E. Walters, Y. Chen, N. C. Chaudhuri, W. J. Thompson, C. Culberson, P. M. Fitzgerald, H. Y. Lee, S. P. McKee, P. M. Munson, T. T. Duong, P. L. Darke, J. A. Zugay, W. A. Schleif, M. G. Axel, J. Lin, J. R. Huff, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3278–3290.
- [95] A. K. Ghosh, S. Kulkarni, D. D. Anderson, L. Hong, A. Baldrige, Y.-F. Wang, A. A. Chumanevich, A. Y. Kovalevsky, Y. Tojo, M. Amano, Y. Koh, J. Tang, I. T. Weber, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7689–7705.
- [96] J. W. Erickson, S. V. Gulnik, H. Mitsuya, A. K. Ghosh (Fitness Assay and Associated Methods), US Patent 7470506B1, **2008**.
- [97] S. De Meyer, M. Peters, Abstracts 533 and 620, *11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)*, 8.–11. Februar **2004**, San Francisco, CA (USA).
- [98] R. Hoetelmans, I. van der Sandt, M. De Pauw, K. Struble, M. Peeters, R. van der Geest, Abstract 549, *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)*, Februar **2003**, Boston, MA (USA).
- [99] D. L. Surleraux, A. Tahri, W. G. Verschuere, G. M. Pille, H. A. De Kock, T. H. Jonckers, A. Peeters, S. De Meyer, H. Azijn, R. Pauwels, M. P. de Bethune, N. M. King, M. Prabu-Jeyabalan, C. A. Schiffer, P. B. Wigerinck, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1813–1822.
- [100] Y. Tie, P. Boross, Y. Wang, L. Gaddis, A. Hussain, S. Leshchenko, A. Ghosh, J. Louis, R. Harrison, I. Weber, *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 341–352.
- [101] N. King, M. Prabu-Jeyabalan, E. Nalivaika, P. Wigerinck, M. de Bethune, C. Schiffer, *J. Virol.* **2004**, *78*, 12012–12021.
- [102] I. Dierynck, I. Keuleers, M. De Wit, A. Tahri, D. Surleraux, D. A. Peeters, K. Hertogs, *Antiviral Res.* **2005**, *10*, S71.
- [103] E. Lefebvre, C. Schiffer, *AIDS Rev.* **2008**, *10*, 131–142.
- [104] A. Kovalevsky, A. K. Ghosh, I. T. Weber, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6599–6603.
- [105] Y. Koh, H. Nakata, K. Maeda, H. Ogata, H. G. Bilcer, T. Devasamudram, J. F. Kincaid, P. Boross, Y. F. Wang, Y. Tie, P. Volarath, L. Gaddis, R. W. Harrison, I. T. Weber, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3123–3129.
- [106] S. De Meyer, H. Azijn, D. Surleraux, D. Jochmans, A. Tahri, R. Pauwels, P. Wigerinck, M. de Bethune, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2314–2321.
- [107] Y. Koh, M. Amano, T. Towata, M. Danish, S. Leshchenko-Yashchuk, D. Das, M. Nakayama, Y. Tojo, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *J. Virol.* **2010**, *84*, 11961–11969.
- [108] S. De Meyer, A. Hill, I. De Baere, I. Rimsky, H. Azijn, B. Van Baelen, E. De Paepe, T. Vangeneugden, et al., *Antiviral Ther.* **2006**, *11*, S73.
- [109] C. Wolfe, C. Hicks, *HIV/AIDS* **2009**, *1*, 13–21.
- [110] K. Saskova, M. Kozisek, P. Rezacova, J. Brynda, T. Yashina, R. Kagan, J. Konvalinka, *J. Virol.* **2009**, *83*, 8810–8818.
- [111] A. Wlodwaer, M. Miller, M. Jaskolski, B. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. Weber, L. Selk, L. Clawson, *Science* **1989**, *245*, 616–621.
- [112] Y. Koh, S. Matsumi, D. Das, M. Amano, D. Davis, J. Li, S. Leschenko, A. Baldrige, et al., *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28709–28720.
- [113] M. Amano, Y. Koh, D. Das, J. Li, S. Leschenko, Y. F. Wang, P. I. Boross, I. T. Weber, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2143–2155.
- [114] J. F. Miller, E. S. Furfine, M. H. Hanlon, R. J. Hazen, J. A. Ray, L. Robinson, V. Samano, A. Spaltenstein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 959–963.
- [115] J. F. Miller, C. W. Andrews, M. Brieger, E. S. Furfine, M. R. Hale, M. H. Hanlon, R. J. Hazen, I. Kaldor, E. W. McLean, D. Reynolds, D. M. Sammond, A. Spaltenstein, R. Tung, E. M. Turner, R. X. Xu, R. G. Sherrill, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1788–1794.
- [116] R. Hazen, R. Harvey, R. Ferris, C. Craig, P. Yates, P. Griffin, J. Miller, I. Kaldor, J. Ray, V. Samano, E. Furfine, A. Spaltenstein, M. Hale, R. Tung, M. St. Clair, M. Hanlon, L. Boone, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3147–3154.
- [117] S. L. Ford, Y. S. Reddy, M. T. Anderson, S. C. Murray, P. Fernandez, D. S. Stein, M. A. Johnson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2201–2206.
- [118] J. R. Lalezari, D. J. Ward, S. A. Tomkin, H. R. Garges, *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 170–174.
- [119] Dazu die entsprechende Online-Presseerklärung: „Glaxo-SmithKline Discontinues Clinical Development of Investigational Protease Inhibitor Brecanavir (640385)“. http://www.gsk.com/media/pressreleases/2006/2006_12_18_GSK945.htm.
- [120] A. K. Ghosh, J. Li, H. Mitsuya, unveröffentlichte Ergebnisse, Purdue University und National Cancer Institute.

- [121] T. Cihlar, G. X. He, X. Liu, J. M. Chen, M. Hatada, S. Swaminathan, M. J. McDermott, Z. Y. Yang, et al., *J. Mol. Biol.* **2006**, 363, 635–647.
- [122] C. Callebaut, K. Stray, L. Tsai, L. H. Xu, G. X. He, A. Mulato, T. Priskich, N. Parkin, et al., *20th International Conference on Antiviral Research*, Palm Spring, CA, 29. April bis 3. Mai **2007**, S. 2.
- [123] C. Callebaut, K. Stray, L. Tsai, M. Williams, Z. Yang, C. Cannizzaro, S. A. Leavitt, X. Liu, K. Wang, B. P. Murray, A. Mulato, M. Hatada, T. Priskich, N. Parkin, S. Swaminathan, W. Lee, G. He, L. Xu, T. Cihlar, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 1366–1376.
- [124] A. Gustchina, I. T. Weber, *FEBS Lett.* **1990**, 269, 269–272.
- [125] A. K. Ghosh, C. D. Martyr, M. Steffey, Y.-F. Wang, J. Agniswamy, M. Amano, I. T. Weber, H. Mitsuya, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 298–302.
- [126] D. J. Kempf, K. C. Marsh, D. A. Paul, M. F. Knige, D. W. Norbeck, W. E. Kohlbrenner, L. Codacovi, S. Vasavanonda, P. Bryant, X. C. Wang, N. E. Wideburg, J. J. Clement, J. J. Plattner, J. Erickson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35, 2209–2214.
- [127] E. T. Baldwin, T. N. Bhat, B. Liu, N. Pattabriaman, J. W. Erickson, *Struct. Biol.* **1995**, 2, 244–249.
- [128] Y. Tojo, Y. Koh, M. Amano, M. Aoki, D. Das, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 3460–3470.
- [129] A. K. Ghosh, S. Gemma, J. Takayama, A. Baldrige, S. Leshchenko-Yashchuk, H. B. Miller, Y.-F. Wang, A. Y. Kovalevsky, Y. Koh, I. T. Weber, H. Mitsuya, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3703–3713.
- [130] A. K. Ghosh, B. Chapsal, H. Mitsuya, G. L. Parham, M. P. Steffey, J. Agniswamy, Y.-F. Wang, M. Amano, I. T. Weber, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5890–5901.
- [131] A. K. Ghosh, S. Leshchenko-Yashchuk, D. D. Anderson, A. Baldrige, M. Noetzel, H. B. Miller, Y. Tie, Y.-F. Wang, Y. Koh, I. T. Weber, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3902–3914.
- [132] Y. Koh, D. Das, S. Leshchenko, H. Nakata, H. Ogata-Aoki, M. Amano, M. Nakayama, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 997–1006.
- [133] A. K. Ghosh, S. Gemma, A. Baldrige, Y. F. Wang, A. Y. Kovalevsky, Y. Koh, I. T. Weber, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6021–6033.
- [134] A. K. Ghosh, B. Chapsal, A. Baldrige, M. P. Steffey, D. E. Walters, Y. Koh, M. Amano, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 622–634.
- [135] K. Ide, M. Aoki, M. Amano, Y. Koh, R. S. Yedidi, D. Das, S. Leshchenko, B. Chapsal, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 1717–1727.
- [136] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 730–748.
- [137] A. K. Ghosh, C. X. Xu, K. V. Rao, A. Baldrige, J. Agniswamy, Y. F. Wang, I. T. Weber, M. Aoki, S. G. P. Miguel, M. Amano, H. Mitsuya, *ChemMedChem* **2010**, 5, 1850–1854.