

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532054

(P2005-532054A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 5 B 0 5 7
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/569	G O 1 N 33/569	H

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-518237 (P2004-518237)	(71) 出願人	504308431 バイロロジック, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 94080-4811 カリフォルニア州, サウス サン フラン シスコ, オイスター ポイント ブルバード 345
(86) (22) 出願日	平成15年7月1日(2003.7.1)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月2日(2005.3.2)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/021024	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02004/003513		
(87) 国際公開日	平成16年1月8日(2004.1.8)		
(31) 優先権主張番号	60/393, 306		
(32) 優先日	平成14年7月1日(2002.7.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原性ウイルスの複製能を決定するための組成物及び方法

(57) 【要約】

この発明は非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤に耐性なウイルスの複製能を決定する組成物及び方法に関する。この組成物及び方法はウイルス感染の治療のための有効な薬剤療法を確定するために、また潜在的治療化合物の生物学的有効性を同定及び決定するために有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト免疫不全ウイルス（「HIV」）が減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、該逆転写酵素のアミノ酸配列のアミノ酸位置98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225または236に呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、該HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆されるが、但し、該突然変異はP236Lではないものとする、上記方法。

【請求項 2】

HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、該逆転写酵素のアミノ酸配列のA98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる群から選択される突然変異の存在または不存在を呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法。

【請求項 3】

被験者が減損した複製能を示す可能性が高くなっているHIVを保有するか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素配列が、減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、該逆転写酵素のアミノ酸配列のアミノ酸位置98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225または236に呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、該HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆されるが、但し、該突然変異はP236Lでないものとする、上記方法。

【請求項 4】

被験者が減損した複製能を示す可能性が高くなっているHIVを保有するか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、該逆転写酵素のアミノ酸配列のA98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる群から選択される突然変異の存在または不存在を呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法。

【請求項 5】

前記突然変異が非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤に対する耐性を付与する、請求項1, 2, 3または4に記載の方法。

【請求項 6】

前記ヒト免疫不全ウイルスがヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）である、請求項1, 2, 3または4に記載の方法。

【請求項 7】

前記非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤がネビラピン(nevirapine)、デラビルジン(delavirdine)またはエファビレンツ(efavirenz)である、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

前記逆転写酵素中の前記突然変異の前記存在または不存在を、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブと該突然変異をコードする前記ヒト免疫不全ウイルスの核酸配列とのハイブリダイゼーションにより検出し、ハイブリダイゼーションの形成により、該突然変異の該存在または不存在が示唆される、請求項1, 2, 3または4に記載の方法。

【請求項 9】

前記逆転写酵素における前記突然変異の前記存在または不存在を、該突然変異をコードする核酸配列の決定によって検出する、請求項1, 2, 3または4に記載の方法。

【請求項 10】

前記被験者が非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤による先行治療を受けているまたは受け

10

20

30

40

50

たことがある、請求項3または4に記載の方法。

【請求項11】

減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11または12ヶ所のアミノ酸位置で検出することを含み、請求項1, 2, 3または4に記載の方法。

【請求項12】

減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、アミノ酸位置106と181; 103と190; 103と236; 181と236; 103と188; 103と181; 100と103; または98と181で検出することを含み、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

減損した複製能に関連する、V106AとY181C; K103NとG109S; P236LとK103N; P236LとY181C; K103NとG190A; K103NとY181C; K103NとY188L; L100IとK103N; 及びY181CとA98Gよりなる群から選択される突然変異の存在または不存在を検出することを含み、請求項11に記載の方法。

10

【請求項14】

減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、アミノ酸位置103, 181及び236; 100, 103及び190; または103, 181及び225で検出することを含み、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

減損した複製能に関連する、P236L, K103N及びY181C; L100I, K103N及びG190S; 並びにK103N, Y181C及びP225Hよりなる群から選択される突然変異の存在または不存在を検出することを含み、請求項11に記載の方法。

20

【請求項16】

HIV中のHIV逆転写酵素の一部をコードする約10~約40塩基長の単離されたオリゴヌクレオチドであって、該HIV中の該逆転写酵素のアミノ酸配列のアミノ酸位置98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225または236で突然変異を含み、該突然変異がプロテアーゼ阻害剤に対する感受性低下に関連するが、但し、該突然変異はP236Lでないものとする、上記オリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、ウイルスの複製能を決定するための組成物および方法に関する。組成物および方法は、ウイルス感染症の治療に有効な薬剤療法の確認ならびに治療化合物候補の生物学的有効性の確認および決定に有用である。

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

1980年代初期以来、6000万人を超える人々が、後天性免疫不全症候群(「AIDS」)の原因因子であるヒト免疫不全ウイルス(「HIV」)に感染している。Lucas, 2002, Lepr Rev. 73(1):64-71を参照されたい。HIV/AIDSは、現在、サハラ以南のアフリカで第1位の死亡原因であり、世界で第4位の死亡原因である。2001年末には、全世界で推定4000万人の人々がHIVに感染して生存していた。Norris, 2002, Radiol Technol. 73(4):339-363を参照されたい。

40

【0003】

現代の抗HIV剤は、HIV生活環のさまざまな時期ならびにHIVの複製および/または生存に不可欠なさまざまな酵素を標的にする。AIDS治療用としてこれまでに承認を受けた薬剤の中には、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(「NRTT」)、たとえば、AZT、ddI、ddC、d4T、3TC、アバカビル、ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤、たとえば、テノフォビル、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(「NNRTT」)、たとえば、ネビラピン、エファビレンツ、デラ

50

ビルジン、ならびにプロテアーゼ阻害剤、たとえば、サキナビル、リトナビル、インジナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、およびロピナビルがある。

【0004】

抗ウイルス剤の作用の結果の1つは、薬剤耐性突然変異体を選択するために十分な選択圧をウイルス複製に加えるということである(Herrmann et al., 1977, Ann NY Acad Sci 284:632-637)。薬剤への暴露が増大するにつれて、複製ウイルス集団に加わる選択圧が増大し、薬剤耐性突然変異体のより急速な出現が促進される。多くのプロテアーゼ阻害剤耐性突然変異及び数種のNRTI耐性突然変異がHIV-1の複製能を様々な程度で減損させることが知られている。典型的には、抗ウイルス薬剤に対する耐性を付与する突然変異は突然変異ウイルスの複製能を低下する。例えば、その全体を参照として本明細書中に組み入れる、Nijhuisら、2001、Curr Op Infect Diseases 14:23-28を参照のこと。ウイルスの複製能の変化は、それらが抗ウイルス療法に対する患者の反応に影響する可能性があるため臨床的に非常に重要である。(上記を参照のこと。)しかしNNRTI耐性突然変異の作用は十分に特徴付けられておらず、そしてNNRTI耐性はウイルス複製の減損と関連しないと度々考えられている。したがって、NNRTI耐性ウイルスの複製能を決定する方法及び組成物に対するニーズが当業界にある。

10

【発明の開示】

【0005】

3. 発明の概要

本発明は、HIV、例えば非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NNRTI)耐性HIVなどのウイルスの複製能(複製適応度(replication fitness)とも呼ばれる)を決定する方法及び組成物を提供する。その方法及び組成物は、部位特異的突然変異誘発法を用いることによって作製され、かつ1以上の逆転写酵素(RT)アミノ酸置換を含む組換えウイルスベクターパネルの分析に基づく。この発明の方法及び組成物は、より効果的な抗ウイルス治療剤療法のデザインに有用な情報を臨床医に提供することによって、患者の生活の質を著しく改善する。また、効果のない薬の投与を回避することにより、時間と費用がかなり節約される。

20

【0006】

複製適応度の測定方法は、別のウイルスに適用させることもでき、ヘパドナウイルス(例えばヒトB型肝炎ウイルス)、フラビウイルス(例えばヒトC型肝炎ウイルス)、及びヘルペスウイルス(例えばヒトサイトメガロウイルス)が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0007】

本発明はさらに、逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤感受性の低下を示すHIV-1の複製適応度を測定する方法に関する。複製適応度の測定方法は、以下のものに限定されないが、組み込み、ウイルス形成、並びにウイルス付着及び侵入を含むHIV-1複製における別の種類のHIV-1複製阻害剤に適用することができる。

【0008】

本発明はさらに、複製適応度を変化させるプロテアーゼ及び逆転写酵素中の突然変異を同定する方法に関する。

40

【0009】

本明細書に記載される複製適応度を変化させる突然変異を同定する方法は、以下のものに限定されないが、組み込み、ウイルス形成、並びにウイルス付着及び侵入を含むHIV-1複製における他の成分に適用することができる。

【0010】

本発明はさらに、プロテアーゼまたは逆転写酵素中の特定の突然変異が複製適応度に与える影響を定量する方法に関する。特異的なプロテアーゼ及び逆転写酵素の突然変異が複製適応度に与える影響を定量する方法は、以下のものに限定されないが、gap、pol、及びエンベロープ遺伝子を含むHIV-1複製に関与する他のウイルス遺伝子中の突然変異に適用させることができる。

50

【0011】

本発明はさらに、複製適応度の低下を有する患者サンプルの高発生率、及び薬剤感受性の低下と複製適応度の低下との間の一般的な相関に関する。より詳細には、本発明はさらに、プロテアーゼ阻害剤及び/または逆転写酵素阻害剤治療を受けている患者における適応度の低下を有するウイルスの発生率に関する。

【0012】

本発明はさらに、適応度の減少がgagポリタンパク質(p55)の改変したプロテアーゼプロセシングに起因する複製適応度の低下を有する患者サンプルの発生率に関する。

【0013】

本発明はさらに、低い、中度の、または標準(野生型)の複製適応度を示す患者サンプル中のプロテアーゼ突然変異の発生率に関する。

10

【0014】

本発明はさらに、複製能の低下を示すウイルス中で、単独であるいは組み合わせのいずれかで頻繁に観察されるプロテアーゼ突然変異に関する。

【0015】

本発明はまた、適応度の低下が改変した逆転写酵素活性に起因する複製適応度の低下を有する患者サンプルの発生率に関する。

【0016】

本発明は、抗レトロウイルス剤治療に失敗した患者における、複製適応度の低下を有するウイルスの発生に関する。

20

【0017】

本発明はさらに、HIV-1の治療を導くために複製適応度の測定を用いる方法、例えば、抗レトロウイルス剤治療に失敗した患者の治療を導くために複製適応度の測定を用いる、またはHIV-1に新たに感染した患者の治療を導くために複製適応度の測定を用いる、方法に関する。HIV-1の治療を導くために複製適応度の測定を用いる方法は、別のウイルスにも適用させることができ、そのようなウイルスには、ヘパドナウイルス(例えばヒトB型肝炎ウイルス)、フラビウイルス(例えばヒトC型肝炎ウイルス)、及びヘルペスウイルス(例えばヒトサイトメガロウイルス)が含まれるがこれらに限定されない。

【0018】

一態様において本発明は、HIV、例えばHIV-1が減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、該逆転写酵素のアミノ酸配列のアミノ酸位置98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225、または236で呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、該HIVが減損した複製能を示す可能性が高いことが示唆されるが、但し、該突然変異はP236Lでないものとする、上記方法を提供する。

30

【0019】

他の態様において本発明は、HIV、例えばHIV-1が減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、該逆転写酵素のアミノ酸配列についてA98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G198T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる群から選択される突然変異の存在または不存在を示すか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、HIVが減損した複製能を示す可能性が高いことが示唆される、上記方法を提供する。

40

【0020】

他の態様において本発明は、被験者が減損した複製能を示す可能性が高くなっているHIV、例えばHIV-1、を保有しているか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、該逆転写酵素のアミノ酸配列のアミノ酸位置98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225、または236に呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、該H

50

IVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆されるが、但し、該突然変異はP236Lでないものとする、上記方法を提供する。

【0021】

他の実施形態において、前記方法は、減損した複製能と関連する突然変異の存在または不存在を、少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11、または12ヶ所のアミノ酸位置で検出することを含む。一般的に、この方法は、減損した複製能に関連する本明細書中に列挙された突然変異のいかなる組み合わせの存在または不存在を検出することを含むことができる。例えば、この方法は、アミノ酸位置106と181、103と190、103と236、181と236、103と188、103と181、100と103、100と103、または98と181など、少なくとも2ヶ所のアミノ酸位置で突然変異の存在または不存在を検出することを含むことができる。特定の実施形態において、そのような方法は、V106AとY181C；K103NとG109S；P236LとK103N；P236LとY181C；K103NとG190A；K103NとY181C；K103NとY188L；L100IとK103N；またはY181CとA98Gの存在または不存在を検出することを含むことができる。

10

【0022】

さらに、この方法は、アミノ酸位置103、181及び236；100、103及び190；あるいは103、181、及び225など、少なくとも3ヶ所のアミノ酸位置で突然変異の存在または不存在を検出することを含むことができる。特定の実施形態において、そのような方法は、P236L、K103N及びY181C；L100I、K103N及びG190S；あるいはK103N、Y181C及びP225Hの存在または不存在を検出することを含むことができる。

【0023】

他の態様において、本発明は被験者が減損した複製能を示す可能性が高くなっているHIV、例えばHIV-1、を保有しているか否かを決定する方法であって、該HIVによってコードされる逆転写酵素が、該逆転写酵素のアミノ酸配列のA98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる群から選択される突然変異の存在または不存在を呈するか否かを検出することを含み、該突然変異の存在により、HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法を提供する。

20

【0024】

一実施形態では、前記突然変異は非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（「NNRTI」）に対する耐性を付与する。他の実施形態では、前記ヒト免疫不全ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）である。他の実施形態では、前記NNRTIはネビラピン（「NVP」）、デラビルジン（「DLV」）またはエファビレンツ（「EFV」）である。他の実施形態では、前記逆転写酵素中の前記突然変異の前記存在または不存在を、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブと該突然変異をコードする前記ヒト免疫不全ウイルスの核酸配列とのハイブリダイゼーションにより検出し、ハイブリダイゼーションの形成により、該突然変異の該存在または不存在が示唆される。他の実施形態では、前記RT中の前記突然変異の前記存在または不存在は、該突然変異をコードする核酸配列を決定することによって検出される。他の実施形態では、前記RT中の前記突然変異の前記存在または不存在は、（例えばPCRにより）核酸を増幅することにより検出される。他の実施形態では、前記被験者は抗ウイルス剤を用いた先行治療を受けているまたは受けたことがあるものである。一実施形態において、抗ウイルス剤はNNRTIである。

30

40

【0025】

HIV中のHIV逆転写酵素の一部をコードする約10～約40塩基長の単離されたオリゴヌクレオチドであって、該HIV中の該逆転写酵素のアミノ酸配列のアミノ酸位置98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225または236で突然変異を含み、該突然変異がプロテアーゼ阻害剤に対する感受性低下に関連するが、但し、該突然変異はP236Lでないものとする、上記オリゴヌクレオチドを提供する。

【0026】

4. 図面の簡単な説明

（後述の「図面の簡単な説明」を参照のこと。）

50

5. 発明の詳細な説明

本発明は、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 耐性ウイルスの複製能を決定する方法及び組成物を開発及び使用するための方法及び組成物を提供する。この方法及び組成物は、部位特異的突然変異誘発法を用いることによって作製される1以上の逆転写酵素 (RT) アミノ酸置換を含む組換えウイルスベクターパネルの分析に基づく。本発明の方法及び組成物は、より効果的な抗ウイルス治療剤療法の構築に有用な情報を臨床医に提供することによって、患者の生活の質を著しく改善する。また、効果のない薬の投与を回避することにより、時間と費用がかなり節約される。

【0027】

5.1 略号

「NRTI」はヌクレオシド系転写酵素阻害剤の略語である。

【0028】

「NNRTI」は非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤の略語である。

【0029】

「RT」は逆転写酵素の略語である。

【0030】

「PCR」は、「ポリメラーゼ連鎖反応」の略語である。

【0031】

遺伝子によりコードされる20種のL-アミノ酸に対して本明細書中で使用されるアミノ酸表記は、従来方式であり、次のとおりである：

アミノ酸	一文字略号	三文字略号
アラニン	A	Ala
アルギニン	R	Arg
アスパラギン	N	Asn
アスパラギン酸	D	Asp
システイン	C	Cys
グルタミン	Q	Gln
グルタミン酸	E	Glu
グリシン	G	Gly
ヒスチジン	H	His
イソロイシン	I	Ile
ロイシン	L	Leu
リシン	K	Lys
メチオニン	M	Met
フェニルアラニン	F	Phe
プロリン	P	Pro
セリン	S	Ser
トレオニン	T	Thr
トリプトファン	W	Trp
チロシン	Y	Tyr
バリン	V	Val

別段の記載がないかぎり、ポリペプチド配列が一連の一文字略号および/または三文字略号として提示される場合、配列は、慣例に従ってN→C方向に提示される。

【0032】

配列中の個々のアミノ酸は、本明細書中では、ANとして表される。ここで、Aは、配列中のアミノ酸に対する標準的な一文字記号であり、Nは、配列中の位置である。突然変異は、本明細書中では、 A_1NA_2 として表される。ここで、 A_1 は、参照タンパク質配列中のアミノ酸に対する標準的な一文字記号であり、 A_2 は、突然変異タンパク質配列中のアミノ酸に対する標準的な一文字記号であり、そしてNは、アミノ酸配列中の位置である。たとえば、G25M突然変異は、アミノ酸位置25におけるグリシンからメチオニンへの変化を表す。

10

20

30

40

50

突然変異はまた、本明細書中では、NA₂として表される場合もある。ここで、Nは、アミノ酸配列中の位置であり、A₂は、突然変異タンパク質配列中のアミノ酸に対する標準的な一文字記号である(たとえば、25Mは、アミノ酸位置25における野生型アミノ酸からメチオニンへの変化を表す)。このほか、突然変異はまた、本明細書中ではA₁Nとして表される場合もある。ここで、A₁は、参照タンパク質配列中のアミノ酸に対する標準的な一文字記号であり、Nは、アミノ酸配列中の位置である(たとえば、G25は、アミノ酸位置25におけるグリシンから任意のアミノ酸への変化を表す)。突然変異タンパク質配列中のアミノ酸が既知でない場合、または突然変異タンパク質配列中のアミノ酸が参照タンパク質配列中に見いだされる以外の任意のアミノ酸であってよい場合、典型的には、この表記が使用される。アミノ酸位置は、突然変異を包含する領域を取り出す元になるタンパク質の全長配列に基づいて番号づけされる。DNA配列中のヌクレオチドおよび点突然変異の表現は、類似している。

【0033】

特異的核酸塩基配列を含む核酸を参照するために本明細書全体を通して使用される略号は、従来の一文字略号である。したがって、核酸を組み入れる場合、天然に存在するコード核酸塩基は、次のように略記される：アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、およびウラシル(U)。別段の記載がないかぎり、一連の一文字略号として表される一本鎖核酸配列および二本鎖配列のトップ鎖は、5' 3'方向に提示される。

【0034】

5.2 定義

本明細書中で使用する場合、以下の用語は以下の意味を有するものとする：

別段の記載がないかぎり、「一次突然変異」とは、酵素活性部位に影響を及ぼす突然変異、すなわち、酵素-基質複合体に関与するアミノ酸位置の突然変異、またはウイルスが抗ウイルス剤の選択圧を受けたときに複製の初期ラウンドで再現性よく現れる突然変異、または抗ウイルス剤に対する表現型感受性に大きな影響を及ぼす突然変異を意味する。

【0035】

「二次突然変異」とは、一次突然変異ではなく、感受性低下に寄与するかまたは一次突然変異により付加される大きな欠損を補償する突然変異を意味する。

【0036】

「表現型アッセイ」とは、特定の抗ウイルス剤に対するウイルス(たとえば、HIV)の感受性を測定する試験である。

【0037】

「遺伝子型アッセイ」とは、生物、生物の一部分、遺伝子、または遺伝子の一部分の遺伝子配列を決定する試験である。そのようなアッセイは、薬剤耐性に関連する特定の突然変異が存在するか否かを確定するために、HIVで頻繁に行われる。

【0038】

本明細書中で使用する場合、「遺伝子型データ」とは、たとえばウイルスの遺伝子型に関するデータである。遺伝子型データの例としては、ウイルス、ウイルスの一部分、ウイルス遺伝子、ウイルス遺伝子の一部分の塩基配列もしくはアミノ酸配列、またはウイルスの核酸中またはタンパク質中の1つ以上のヌクレオチド残基もしくはアミノ酸残基の同一性が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0039】

「感受性」とは、特定の薬剤に対するウイルスの反応を意味する。薬剤に対する感受性が軽減または低下しているウイルスは、薬剤に対する耐性が増加しているかまたは感受性が低下している。薬剤に対する感受性が増加または増強または増大されているウイルスは、薬剤に対する感受性が増加しているかまたは耐性が低下している。

【0040】

所与の薬剤に対するウイルスの表現型感受性は、連続的なものである。それにもかかわらず、特定の倍数変化の結果の解釈を単純化すべく1つまたは複数の閾値を定義することが実用上有用である。十分な臨床転帰データが収集されている薬剤では、「臨床カットオ

10

20

30

40

50

「FC」を以下のように定義することが可能である。

【0041】

「臨床カットオフ値」とは、耐性が現れて感受性が失われる特定のポイントを意味する。それは、患者が特定の薬剤による治療を受けて失敗する確率が有意に増大する薬剤感受性レベルにより定義される。カットオフ値は、臨床試験で決定した場合、抗ウイルス剤ごとに異なる。臨床カットオフ値は、耐性および転帰のデータを評価することにより臨床試験で決定される。薬剤感受性(表現型)は、治療開始時に測定される。治療の全過程にわたりあらかじめ決められた時間点で、ウイルス量の変化のような治療反応をモニターする。薬剤感受性を治療反応と関連づけ、治療失敗に関連する耐性レベルにより臨床カットオフ値を決定する(全試験結果の統計解析)。

10

【0042】

「IC_n」とは、阻害濃度を意味する。それは、疾患誘発微生物(たとえば、HIV)の複製をn%抑制するのに必要とされる患者の血液中またはin vitroの薬剤の濃度である。したがって、「IC₅₀」とは、薬剤の不存在下で観測されるレベルの50%までウイルス複製を阻害する抗ウイルス剤の濃度を意味する。「患者IC₅₀」とは、患者由来のウイルスの複製を50%阻害するのに必要な薬剤濃度を意味し、「参照IC₅₀」とは、参照ウイルスまたは野生型ウイルスの複製を50%阻害するのに必要な薬剤濃度を意味する。同様に、「IC₉₀」とは、ウイルス複製の90%を阻害する抗ウイルス剤の濃度を意味する。

【0043】

「倍数変化(fold change)」とは、患者ウイルスと薬剤感受性参照ウイルスとの薬剤感受性の数値比較である。それは、患者IC₅₀と薬剤感受性参照IC₅₀との比、すなわち、患者IC₅₀/参照IC₅₀=倍数変化(fold change) (「FC」)である。1.0の倍数変化は、患者ウイルスが薬剤感受性参照ウイルスと同程度の薬剤感受性を呈することを示唆する。1未満の倍数変化は、患者ウイルスが薬剤感受性参照ウイルスよりも感受性であることを示唆する。1よりも大きい倍数変化は、患者ウイルスが薬剤感受性参照ウイルスほど感受性でないことを示唆する。臨床カットオフ値に等しいかまたはそれよりも大きい倍数変化は、患者ウイルスがその薬剤に反応する確率がより低いことを意味する。臨床カットオフ値未満の倍数変化は、患者ウイルスがその薬剤に対して感受性であることを意味する。

20

【0044】

ウイルスが、減損した複製能に関連する性質(たとえば、突然変異)を有する場合、ウイルスは、「減損した複製能を示す可能性が高くなっている」。この性質を有するウイルスの集団が、平均して、この性質が欠如していること以外は類似しているウイルスの集団と比べて複製能が減損している場合、ウイルスの性質は減損した複製能に関連する。したがって、性質の存在と減損した複製能との相関は、絶対的なものである必要はなく、性質が減損した複製能を引き起こすための必要条件(すなわち、性質が、複製能の減損の原因となる役割を担う条件)も、十分条件(すなわち、性質の存在だけで十分であるという条件)も、存在しない。

30

【0045】

「配列相同性%」という用語は、本明細書中では、「相同性%」という用語と同義的に使用される。「配列同一性%」および「同一性%」とは、配列アライメントプログラムを用いてアライメントしたときの2つ以上のペプチド配列間のアミノ酸配列同一性のレベルを意味する。たとえば、本明細書中で使用する場合、80%の相同性は、既定のアルゴリズムにより決定された80%の配列同一性と同じことを意味する。したがって、所与の配列の相同体は、所与の配列の長さ全体にわたり80%超の配列同一性を有する。配列同一性の例示的レベルとしては、所与の配列に対して60、70、80、85、90、95、98%、またはそれ以上の配列同一性が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0046】

2つの配列間の同一性を決定するのに使用可能な例示的なコンピュータープログラムとしては、BLASTプログラム一式、たとえば、BLASTN、BLASTX、およびTBLASTX、BLASTP、およびTBLASTN(インターネット上で<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>から公的に入手可

50

能)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。このほかに、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10(とくに、発表されたデフォルト設定、すなわち、パラメーター $w=4$ 、 $t=17$ を参照されたい)、およびAltschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402を参照されたい。GenBank Protein Sequences、および他の公共のデータベース中のアミノ酸配列と対比して所与のアミノ酸配列を評価する場合、典型的には、BLASTPプログラムを用いて配列検索が行われる。BLASTXプログラムは、すべてのリーディングフレーム中の翻訳された核酸配列を、GenBank Protein Sequencesおよび他の公共のデータベース中のアミノ酸配列と対比して検索するのに好適である。BLASTPおよびBLASTXは、両方とも、オープンギャップペナルティ-11.0および伸長ギャップペナルティ-1.0のデフォルトパラメーターを用いて実行され、BLOSUM-62マトリックスを利用する。Altschul, et al., 1997を参照されたい。

10

【0047】

2つ以上の配列間の「同一性%」を決定するための選択された配列の好ましいアライメントは、たとえば、MacVector version 6.5中のCLUSTAL-Wプログラム用いて行われる。このプログラムは、オープンギャップペナルティ-10.0、伸長ギャップペナルティ-0.1、およびBLOSUM 30類似度行列を含むデフォルトパラメーターを用いて実行される。

【0048】

「極性アミノ酸」とは、生理学的pHで非荷電である側鎖を有する親水性アミノ酸を意味するが、但し、この側鎖は、2個の原子により共有された電子対が一方の原子の方により近接して保持される少なくとも1つの結合を有する。遺伝子によりコードされる極性アミノ酸としては、Asn(N)、Gln(Q)、Ser(S)、およびThr(T)が挙げられる。

20

【0049】

「非極性アミノ酸」とは、生理学的pHで非荷電である側鎖を有する疎水性アミノ酸を意味する。但し、この側鎖は、2個の原子により共有された電子対が一般的には2個の各原子によって等しく保持される結合を有する(すなわち、側鎖は極性ではない)。遺伝子によりコードされる無極性アミノ酸としては、Ala(A)、Gly(G)、Ile(I)、Leu(L)、Met(M)、およびVal(V)が挙げられる。

【0050】

「親水性アミノ酸」とは、Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142の規格化コンセンサス疎水性スケールに基づいてゼロ未満の疎水性を呈するアミノ酸を意味する。遺伝子によりコードされる親水性アミノ酸としては、Arg(R)、Asn(N)、Asp(D)、Glu(E)、Gln(Q)、His(H)、Lys(K)、Ser(S)、およびThr(T)が挙げられる。

30

【0051】

「疎水性アミノ酸」とは、Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142の規格化コンセンサス疎水性スケールに基づいてゼロよりも大きい疎水性を呈するアミノ酸を意味する。遺伝子によりコードされる疎水性アミノ酸としては、Ala(a)、Gly(G)、Ile(I)、Leu(L)、Met(M)、Phe(F)、Pro(P)、Trp(W)、Tyr(Y)、およびVal(V)が挙げられる。

【0052】

「酸性アミノ酸」とは、7未満の側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を意味する。酸性アミノ酸は、典型的には、水素イオンの消失により生理学的pHで負に荷電した側鎖を有する。遺伝子によりコードされる酸性アミノ酸としては、Asp(D)およびGlu(E)が挙げられる。

40

【0053】

「塩基性アミノ酸」とは、7よりも大きい側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を意味する。塩基性アミノ酸は、典型的には、ヒドロニウムイオンとの会合により生理学的pHで正に荷電された側鎖を有する。遺伝子によりコードされる塩基性アミノ酸としては、Arg(R)、His(H)およびLys(K)が挙げられる。

【0054】

「突然変異」とは、参照の核酸またはポリペプチドに対するアミノ酸配列の変化または対応する核酸配列の変化である。HIVプロテアーゼまたは逆転写酵素を含む本発明の実施形態では、プロテアーゼまたは逆転写酵素をコードする参照核酸は、それぞれ、NL4-3 HI

50

V(GenBank 受託番号 . AF324493)中に存在するプロテアーゼまたは逆転写酵素のコード配列である。同様に、参照プロテアーゼまたは逆転写酵素ポリペプチドは、NL4-3 HIV配列によりコードされるものである。ペプチドのアミノ酸配列は、たとえば、エドマン分解または質量分析により、直接決定することができるが、より典型的には、ペプチドのアミノ配列は、ペプチドをコードする核酸の塩基配列から推測される。当技術分野で公知の任意の核酸配列決定法を用いることができる。たとえば、Maxam-Gilbert配列決定法(Maxam et al., 1980, Methods in Enzymology 65:499)、ジデオキシ配列決定法(Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463)、またはハイブリダイゼーションに基づく方法(たとえば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 3rd ed., NY;およびAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYを参照されたい)。

【0055】

ウイルス中の「耐性関連突然変異」(「RAM」)とは、抗ウイルス剤に対するウイルスの感受性低下に関連する突然変異である。RAMは、いくつかのウイルス(たとえば、限定されるものではないが、ヒト免疫不全ウイルス(「HIV」))中に見いだすことができる。そのような突然変異は、1種以上のウイルスタンパク質(たとえば、HIVのプロテアーゼ、インテグラーゼ、エンベロープ、または逆転写酵素)中に見いだすことができる。RAMは、参照株に対比して定義される。HIVプロテアーゼを含む本発明の実施形態では、参照プロテアーゼは、NL4-3 HIV(GenBank 受託番号 . AF324493)によりコードされるプロテアーゼである。

【0056】

「突然変異体」とは、参照のウイルス、遺伝子、またはタンパク質に対して1つ以上の変化を有する配列を有するウイルス、遺伝子、またはタンパク質である。

【0057】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、全体を通して同義的に用いられる。

【0058】

「参照」および「野生型」という用語は、全体を通して同義的に用いられる。

【0059】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、全体を通して同義的に用いられる。

【0060】

5.3 減損した複製能に関連する突然変異

本発明は、NNRTIに対する耐性及び減損した複製能に関連する突然変異をHIV逆転写酵素中に含む核酸及びポリペプチドを提供する。好ましくは、HIVはヒト免疫不全ウイルス1型(「HIV-1」)である。NNRTIの例には、ネビラピン(「NVP」)、デラビルジン(「DLV」)及びエファビレンツ(「EFV」)が含まれるがこれらに限定されない。

【0061】

一態様において、本発明は、NNRTIに対する耐性及び減損した複製能に関連する突然変異をHIV逆転写酵素中に含むペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を提供する。本発明のポリペプチドは、それらのポリペプチドから改変されたあるいは誘導されたペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を含む。一実施形態において、ポリペプチドは翻訳後修飾が含まれる。

【0062】

一実施形態において、本発明は、HIVの逆転写酵素に由来し、かつ98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225及び236よりなる群から選択されるアミノ酸位置で突然変異を含むポリペプチドを提供する。より詳細に規定される実施形態において、突然変異は、A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる突然変

異群から選択される。

【0063】

他の実施形態において、本発明はHIV逆転写酵素に由来し、かつ2以上のアミノ酸位置における突然変異の組み合わせを含むポリペプチドを提供する。そのような組み合わせの例には、P236L、K103N及びY181C；V106A及びY181C；K103N及びG190S；P236L及びK103N；L1001、K103N及びG190S；P236L及びY181C；K103N及びG190A；K103N及びY188L；K103N及びY181C；L1001及びK103N；K103N、Y181C及び225H；Y181C及びA98G、が含まれるがこれらに限定されない。

【0064】

他の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードするかまたはそれらに関連するポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、または核酸、たとえば、本発明の核酸の同定、分析、突然変異、または増幅を行うためのハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマー、または配列決定用プライマーとして使用するのに十分な核酸分子、を提供する。 10

【0065】

核酸は、任意の長さであってよい。核酸は、たとえば、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、120、125、150、175、200、250、300、350、375、400、425、450、475、または500塩基長でありうる。核酸は、たとえば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、120、125、150、175、200、250、300、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、または10000塩基未満の長さでありうる。好ましい実施形態では、核酸は、たとえばプローブまたはプライマーとして、本明細書に記載の突然変異を検出するのに好適な長さおよび配列を有する。 20

【0066】

他の実施形態では、本発明は、本発明の核酸配列を検出するためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに好適な核酸分子を提供する。本発明の核酸分子は、本発明の全長ポリペプチドをコードする核酸配列の一部だけ、たとえば、プローブもしくはプライマーとして使用することができる断片、または本発明のポリペプチドの生物学的に活性な部分をコードする断片を含みうる。プローブは、それに結合された標識化基、たとえば、放射性同位体、蛍光性化合物、酵素、または酵素補因子を含みうる。種々の実施形態では、本発明の核酸分子は、塩基部分、糖質部分、またはリン酸バックボーンが修飾されていてもよい。 30

【0067】

5.4 減損した複製能に関連する突然変異の検出

他の態様において、本発明は、ウイルスまたは該ウイルス派生物において減損した複製能に関連する突然変異を見いだす方法を提供する。 40

【0068】

5.4.1 ウイルスおよびウイルスサンプル

本発明に係る減損した複製能に関連する突然変異は、任意のタイプのウイルス(たとえば、動物に見いだされる任意のウイルス)中に存在しうる。本発明の一実施形態では、ウイルスは、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシなどの哺乳動物に感染することが知られているウイルスを包含する。好ましい実施形態では、ウイルスは、霊長類に感染することが知られている。さらにより好ましい実施形態では、ウイルスは、ヒトに感染することが知られている。ヒトウイルスの例としては、ヒト免疫不全ウイルス(「HIV」)、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、他のヒトヘルペスウイルス、 50

A型インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、A型、B型、およびC型肝炎ウイルス、ライノウイルス、ならびにヒトパピローマウイルスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の好ましい実施形態では、ウイルスはHIVである。好ましくは、ウイルスはヒト免疫不全ウイルス1型(「HIV-1」)である。以上は、現在利用可能な抗ウイルス化学療法が存在する特定のウイルスの代表であり、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス(paramyxovirus)、ピコルナウイルス、フラビウイルス、ニューモウイルス、およびヘパドナウイルスのウイルス科を代表するものである。本発明は、これらの科に属する他のウイルスに起因する他のウイルス感染症、および現在利用可能な療法が存在するかまたは存在しない他のウイルス科のウイルスが原因で生じるウイルス感染症、に使用することができる。

10

【0069】

本発明に係る減損した複製能に関連する突然変異は、ウイルスサンプルを取得するための当技術分野で公知の任意の手段により取得されるウイルスサンプル中に見いだすことができる。そのような方法としては、ウイルスに感染したヒトもしくは動物からウイルスサンプルを取得する方法またはウイルス培養物からウイルスサンプルを取得する方法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。一実施形態では、ウイルスサンプルは、ウイルスに感染したヒト個体から取得される。ウイルスサンプルは、感染個体の生体の任意の部分またはウイルスを含有することが予想される任意の分泌物から取得しうる。そのような部分の例としては、血液、血清、血漿、喀痰、リンパ液、精液、腺粘液、および他の体液のサンプルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましい実施形態では、サンプルは、血液、血清、または血漿のサンプルである。

20

【0070】

他の実施形態では、本発明に係る減損した複製能に関連する突然変異は、培養物から取得しうるウイルス中に存在する。いくつかの実施形態では、培養物は、実験室から取得可能である。他の実施形態では、培養物は、コレクション(たとえば、American Type Culture Collection)から取得可能である。

【0071】

特定の実施形態では、本発明に係る減損した複製能に関連する突然変異は、ウイルスの派生物中に存在する。一実施形態では、ウイルスの派生物は、それ自体は病原性ではない。他の実施形態では、ウイルスの派生物は、プラスミドまたはプラスミドをトランスフェクトした細胞の複製が、選択圧に対する耐性を増大させる突然変異が選択されるように選択圧の存在または不存在により影響を受ける、プラスミド系である。いくつかの実施形態では、ウイルスの派生物は、対象の核酸またはタンパク質、たとえば、抗ウイルス治療の標的とされる核酸またはタンパク質を含む。一実施形態では、対象の遺伝子をベクター中に組み込むことができる。たとえば、米国特許第5,837,464号および同第6,242,187号ならびにPCT公開WO 99/67427(いずれも、参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい。好ましい実施形態では、遺伝子は、プロテアーゼまたは逆転写酵素をコードする遺伝子でありうる。

30

【0072】

他の実施形態では、無傷のウイルスを使用する必要はない。その代わりに、ベクター中に組み込まれたウイルスの一部を使用することができる。好ましくは、抗ウイルス剤の標的となるウイルスの一部を使用する。

40

【0073】

他の実施形態では、本発明に係る減損した複製能に関連する突然変異は、遺伝子改変ウイルス中に存在する。ウイルスを遺伝子改変するための当技術分野で公知の任意の方法を用いて、ウイルスを遺伝子改変することができる。たとえば、実験室培養により所望の世代数でウイルスを増殖させることができる。一実施形態では、選択圧を加えない(すなわち、ウイルスは、特定の特性を有するウイルスの複製に有利な処理に付されない)、そして新しい突然変異は、遺伝的浮動を介して蓄積される。他の実施形態では、培養で増殖させるときに選択圧をウイルスに加える(すなわち、1つ以上の特性を有するウイルスの複製

50

に有利な条件下でウイルスを増殖させる)。一実施形態では、選択圧は抗ウイルス治療である。任意の公知の抗ウイルス治療を選択圧として使用することができる。一実施形態では、ウイルスはHIVであり、選択圧はNNRTIである。他の実施形態では、ウイルスはHIV-1であり、選択圧はNNRTIである。任意のNNRTIを用いて、選択圧を加えることができる。NNRTIの例としてはNVP、DLV及びEFVが含まれるがこれらに限定されるものではない。in vitroで培養されたHIVをNNRTIで処理することにより、NNRTIに対する耐性が増大されたHIVの突然変異株を選択することができる。選択圧のストリンジェンシーを操作することにより、選択特性を有していないウイルスの生存率を増大させたり低下させたりすることができる。

【0074】

他の態様において、本発明に係る減損された複製能に関連する突然変異は、ウイルス、ウイルスゲノム、またはウイルスゲノムの一部分を突然変異させることにより生成される。当技術分野で公知の任意の突然変異誘発方法をこの目的のために使用することができる。一実施形態では、突然変異誘発は、本質的にランダムである。他の実施形態では、ウイルス、ウイルスゲノム、またはウイルスゲノムの一部分を突然変異誘発処理に付することにより、本質的にランダムな突然変異誘発を行う。他の実施形態では、抗ウイルス療法の標的であるウイルスタンパク質をコードする遺伝子を突然変異させる。本質的にランダムな突然変異誘発処理の例としては、たとえば、突然変異誘発物質(たとえば、臭化エチジウム、エチルメタンスルホン酸、エチルニトロソウレア(ENU)など)、放射線(たとえば、紫外光)への暴露、転移因子(たとえば、Tn5、Tn10)の挿入および/もしくは除去、または増大された突然変異誘発率を有する細胞、細胞抽出物、もしくはin vitro複製系における複製が挙げられる。たとえば、Russell et al., 1979, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:5918-5922; Russell, W., 1982, Environmental Mutagens and Carcinogens: Proceedings of the Third International Conference on Environmental Mutagensを参照されたい。これらの突然変異誘発方法はいずれも、本質的にランダムであるが、分子レベルで、それぞれ、それ自体の好ましい標的を有することは、当業者であればわかるであろう。

【0075】

他の態様において、減損した複製能に関連する突然変異は、部位特異的突然変異誘発法を用いて行われる。当技術分野で公知の任意の部位特異的突然変異誘発法を使用することができる(たとえば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed., NY;およびAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYを参照されたい)。部位特異的突然変異誘発は、たとえば、特定の遺伝子もしくはゲノム領域、遺伝子もしくはゲノム領域の特定部分、または遺伝子もしくはゲノム領域内の1つもしくはいくつかの特定のヌクレオチドを対象に行うことができる。一実施形態では、部位特異的突然変異誘発は、1つ以上の基準に基づいて、ウイルスのゲノム領域、遺伝子、遺伝子断片、またはヌクレオチドを対象に行われる。一実施形態では、遺伝子または遺伝子の一部分が、部位特異的突然変異誘発に付される。なぜなら、それは、抗ウイルス療法の標的であることが知られているかまたは推測されるタンパク質をコードするからである(たとえば、HIV逆転写酵素をコードする遺伝子)。他の実施形態では、遺伝子の一部分または遺伝子内の1つもしくはいくつかのヌクレオチドが、部位特異的突然変異誘発に付すべく選択される。一実施形態では、突然変異の対象となるヌクレオチドは、抗ウイルス化合物と相互作用することが知られているかまたは推測されるアミノ酸残基をコードする。他の実施形態では、突然変異の対象となるヌクレオチドは、複製能が減損しているウイルス株中で突然変異を起こすことが知られているかまたは推測されるアミノ酸残基をコードする。他の実施形態では、突然変異ヌクレオチドは、抗ウイルス化合物と相互作用することが知られている

10

20

30

40

50

かもしくは推測されるタンパク質残基または複製能が減損しているウイルス株中で突然変異を起こすことが知られているかもしくは推測されるタンパク質残基の二次、三次、または四次構造中の隣接するまたは近接するアミノ酸残基をコードする。他の実施形態では、突然変異ヌクレオチドは、抗ウイルス化合物に結合することが知られているかまたは推測されるタンパク質の活性部位またはその近傍のアミノ酸残基をコードする。たとえば、Sarkar and Sommer, 1990, Biotechniques, 8:404-407を参照されたい。

【0076】

5.4.2 ウイルス中の突然変異の存在または不存在の検出

ウイルス中の本発明に係る減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在は、突然変異を検出するための当技術分野で公知の任意の手段により検出することができる。突然変異は、特定のタンパク質をコードするウイルス遺伝子中で、またはタンパク質自体の中で、すなわち、タンパク質のアミノ酸配列中で、検出することができる。

10

【0077】

一実施形態では、突然変異は、ウイルスゲノム中に存在する。そのような突然変異は、たとえば、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子中に、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子のシスまたはトランス作用性調節配列、遺伝子間配列、またはイントロン配列の中に存在しうる。突然変異は、抗ウイルス治療に対する感受性を変化させるウイルスの構造、機能、複製、または環境のいずれかの側面に影響を及ぼしうる。一実施形態では、突然変異は、抗ウイルス治療の標的であるウイルスタンパク質をコードする遺伝子中に存在する。

20

【0078】

ウイルス遺伝子内の突然変異は、いくつかの方法を利用することにより検出することができる。そのようなアッセイ方法の出発点としてウイルスのDNAまたはRNAを使用することができ、当業者に周知の標準的手順に従って単離することが可能である。

【0079】

特定の核酸配列中(たとえば、ウイルス遺伝子の特定の領域中)の突然変異の検出は、さまざまな方法により、たとえば、限定されるものではないが、対立遺伝子特異的制限酵素切断に基づく制限断片長多型検出(Kan and Dozy, 1978, Lancet ii: 910-912)、ミスマッチ修復検出(Faham and Cox, 1995, Genome Res 5:474-482)、MutSタンパク質の結合(Wagner et al., 1995, Nucl Acids Res 23:3944-3948)、変性勾配ゲル電気泳動(Fisher et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1579-83)、一本鎖コンフォメーション多型検出(Orita et al., 1983, Genomics 5:874-879)、ミスマッチ塩基対におけるRNAase切断(Myers et al., 1985, Science 230:1242)、ヘテロ二本鎖DNAの化学的(Cotton et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4397-4401)または酵素的(Youil et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:87-91)切断、オリゴヌクレオチド特異的プライマー伸長に基づく方法(Syvaenen et al., 1990, Genomics 8:684-692)、遺伝子ビット解析(Nikiforov et al., 1994, Nucl Acids Res 22:4167-4175)、オリゴヌクレオチド連結アッセイ(Landegren et al., 1988, Science 241:1077)、オリゴヌクレオチド特異的連結連鎖反応(「LCR」)(Barrany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:189-193)、ギャップLCR(Abravaya et al., 1995, Nucl Acids Res 23:675-682)、当技術分野で周知の標準的手順を用いる放射性または蛍光性DNA配列決定、およびペプチド核酸(PNA)アッセイ(Orum et al., 1993, Nucl. Acids Res. 21:5332-5356; Thiede et al., 1996, Nucl. Acids Res. 24:983-984)により行うことができる。

30

40

【0080】

さらに、ウイルスのDNAまたはRNAは、遺伝子構造が関与する異常、たとえば、点突然変異、挿入、欠失、およびゲノム再配列を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイまたは増幅アッセイで使用可能である。そのようなアッセイとしては、限定されるものではないが、サザン分析(Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517)、一本鎖コンフォメーション多型分析(SSCP)(Orita et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766-27

50

70)、およびPCR分析(米国特許第4,683,202号;同第4,683,195号;同第4,800,159号;および同第4,965,188号;PCR Strategies, 1995 Innis et al. (eds.), Academic Press, Inc.)を挙げることができる。

【0081】

遺伝子特異的突然変異を検出するためのそのような診断方法は、たとえば、ウイルス核酸を、組換えDNA分子、クローン化遺伝子、またはそれらの縮重変異体を含む1種以上の標識化核酸試薬に、これらの試薬がそれらの相補的配列に特異的にアニーリングするのに有利な条件下で、接触させてインキュベートすることを含みうる。好ましくは、これらの核酸試薬の長さは、少なくとも15~30塩基である。インキュベーション後、アニーリングされていないすべての核酸を核酸分子ハイブリッドから除去する。次に、ハイブリダイズした核酸の存在を、そのような分子が存在するのであれば、検出する。そのような検出スキームを用いて、ウイルス由来の核酸を、たとえば、固体担体(たとえば、膜またはプラスチック表面、具体的には、マイクロタイタープレートまたはポリスチレンビーズの表面)に固定することができる。この場合、インキュベーション後、アニーリングされていない先に記載したタイプの標識化核酸試薬は、容易に除去される。残留するアニーリングされた標識化核酸試薬の検出は、当業者に周知の標準的方法を用いて行われる。核酸試薬がアニーリングした遺伝子配列を正常な遺伝子配列から予想されるアニーリングパターンと比較することにより、遺伝子突然変異が存在するかを決定することができる。

10

【0082】

遺伝子特異的核酸分子を検出するための代替的な診断方法は、それらの増幅を行ってから、たとえば、PCR(米国特許第4,683,202号;同第4,683,195号;同第4,800,159号;および同第4,965,188号;PCR Strategies, 1995 Innis et al. (eds.), Academic Press, Inc.)により増幅を行ってから、当業者に周知の方法を用いて、増幅された分子を検出することを含みうる。得られた増幅配列を、増幅核酸がそれぞれの遺伝子の正常コピーだけを含む場合に予想される配列と比較することにより、遺伝子突然変異が存在するかを決定することができる。

20

【0083】

このほか、当技術分野で公知の任意の配列決定法により、核酸の配列決定を行うことができる。たとえば、Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463のジデオキシ法(これについては、Messing et al., 1981, Nuc. Acids Res. 9:309にさらなる解説がある)により、またはMaxam et al., 1980, Methods in Enzymology 65:499の方法により、ウイルスDNAの配列決定を行うことができる。また、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed., NY; およびAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYに記載されている方法をも参照されたい。

30

【0084】

ウイルス遺伝子産物(すなわち、ウイルスタンパク質)またはウイルスペプチド断片に対する抗体も、ウイルスタンパク質中の突然変異を検出するために使用することができる。他の選択肢として、当技術分野で公知の任意の配列決定法を用いて対象のウイルスタンパク質またはペプチド断片の配列決定を行うことにより、対象のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。そのような方法の一例は、小型のタンパク質またはポリペプチドの配列決定に使用可能なエドマン分解法である。より大型のタンパク質の場合には、最初に、当技術分野で公知の化学試薬または酵素試薬(たとえば、プロモシアン、ヒドロキシルアミン、トリプシン、またはキモトリプシン)により切断し、次に、エドマン分解法により配列決定を行うことができる。

40

【0085】

5.5 突然変異ウイルスの表現型感受性の測定

当技術分野で公知の任意の方法を用いて、抗ウイルス療法に対する突然変異ウイルスまたはウイルス集団の表現型感受性を決定することができる。たとえば、米国特許第5,837,464号および同第6,242,187号(その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとす

50

る)を参照されたい。いくつかの実施形態では、表現型分析を行う。すなわち、突然変異のない参照ウイルスの感受性と対比して、所与の抗ウイルス剤に対するウイルスの感受性をアッセイする。これは薬剤感受性の直接的定量的測定であり、抗ウイルス剤に対するウイルスの感受性を決定すべく当技術分野で公知の任意の方法により行うことができる。そのような方法の一例としては、参照ウイルスに対する IC_{50} 値の倍数変化を決定することが挙げられるが、これに限定されるものではない。表現型試験では、特定のウイルス株が薬剤阻害剤の存在下で*in vitro*増殖する能力を測定する。参照ウイルスを阻害するのに必要な薬剤の量に対して、ウイルス活性を阻害するのにより多くの薬剤が必要とされる場合、ウイルスは、特定の薬剤に対する感受性がより低い。

【0086】

10

一実施形態では、表現型分析を行い、これを用いてウイルス株に対する薬剤の IC_{50} または IC_{90} を計算する。分析結果はまた、薬剤感受性対照株または同一の患者に由来する先行ウイルス株と比較して、ウイルス株ごとに IC_{50} または IC_{90} の倍数変化として提示することができる。ウイルスが各利用可能な抗ウイルス薬物療法に直接付されるので、結果を治療反応に直接結びつけることができる。たとえば、患者ウイルスが特定の薬剤に対して耐性を示す場合、その薬剤を回避するかまたは患者の治療法から除外することにより、医師は、より長期間にわたり効果を示す可能性が高くなっている治療計画をデザインすることができる。

【0087】

他の実施形態では、組換えウイルスアッセイ(「RVAS」)を用いて表現型分析を行う。RV 20
Aでは、ウイルスベクターと、患者ウイルスから増幅させたウイルス遺伝子配列と、の間で相同的組換えを行うことにより生成させたウイルスストックを使用する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターはHIVベクターであり、ウイルス遺伝子配列はプロテアーゼ配列および/または逆転写酵素配列である。

【0088】

好ましい実施形態では、PHENOSENSETM(ViroLogic INC., South San Francisco, CA)を用いて表現型分析を行う。Petropoulos et al., 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44:920-928; 米国特許第5,837,464号および同第6,242,187号を参照されたい。PHENOSENSETMは、表現型試験の利点を活かし以前のアッセイの欠点を克服した表現型アッセイである。アッセイが自動化されているので、PHENOSENSETMでは、制御条件でより高いスループット 30
が得られる。その結果、このアッセイでは、すべての現在利用可能な抗レトロウイルス剤に対する患者のHIV単離物の感受性プロファイルが正確に規定され、サンプルを受け取ってから約10~約15日以内に結果が医師に直接送付される。PHENOSENSETMは、正確であり、わずか1ラウンドのウイルス複製で結果が得られるので、ウイルスのサブ集団の選択が回避される。結果は定量的であり、さまざまな度合の薬剤感受性の尺度となり、かつ感度が高いので、試験は、約500コピー/mLのウイルス量の血液検体で行うことができ、全ウイルス集団の10%以下の濃度のいくつかの薬剤耐性ウイルスの小集団を検出することができる。さらに、結果は再現性があり、薬剤にもよるが、実施されるアッセイの約95%において、約1.4~2.5倍未満の変動が達成される。

【0089】

40

PHENOSENSETMは、増幅されたウイルス遺伝子配列に由来する核酸と併用することができる。第5.4.1節に論述されているように、ウイルスを含有するサンプルは、ウイルスに感染したヒトまたは動物に由来するサンプルであってもよいし、ウイルス細胞の培養物に由来するサンプルであってもよい。一実施形態では、ウイルスサンプルは、遺伝子改変実験株を含む。

【0090】

次に、遺伝子配列をベクター中に組み込む当技術分野で公知の任意の方法を用いて、増幅されたウイルス遺伝子配列を複製欠損ウイルスベクター中に組み込むことにより、耐性試験ベクター(「RTV」)を構築することができる。一実施形態では、制限酵素および従来のクローニング法を使用する。Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laborato 50

ry Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed., NY; および Ausubel ET al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NYを参照されたい。好ましい実施形態では、ApaIおよびPmlI制限酵素を使用する。好ましくは、複製欠損ウイルスベクターは、インジケータ遺伝子ウイルスベクター(「IGVV」)である。好ましい実施形態では、ウイルスベクターは、RTVの複製を検出する手段を含有する。好ましくは、ウイルスベクターは、ルシフェラーゼ発現カセットを含有する。

【0091】

アッセイは、次のように行うことができる。最初に、RTV DNAと、他のレトロウイルス(たとえば、アンホトロピックマウス白血病ウイルス(MLV))のエンベロープタンパク質を発現するプラスミドとを宿主細胞にコトランスフェクトする。トランスフェクション後、ウイルス粒子を採取し、これを用いて新たな標的細胞に感染させることができる。1ラウンドのウイルス複製の完了は、ベクター中に含まれる複製検出手段により検出することができる。好ましい実施形態では、1ラウンドのウイルス複製の完了により、ルシフェラーゼが産生される。トランスフェクションステップまたは感染ステップのいずれかで、一連の濃度の抗ウイルス剤を添加することができる。

10

【0092】

抗ウイルス剤に対する感受性は、抗ウイルス剤の存在下および不存在下でベクターの複製を比較することにより測定することができる。たとえば、抗ウイルス剤に対する感受性は、抗ウイルス剤の存在下および不存在下でルシフェラーゼ活性を比較することにより測定することができる。感受性ウイルスは、抗ウイルス剤の存在下で低レベルのルシフェラーゼ活性を生じ、一方、感受性の低下したウイルスは、より高レベルのルシフェラーゼ活性を生じるであろう。

20

【0093】

好ましい実施形態では、PHENOSENSE™を用いて、抗ウイルス剤に対するHIV-1の表現型感受性を評価する。好ましくは、抗ウイルス剤はNNRTIである。好ましい実施形態では、参照ウイルス株は、HIV株NL4-3またはHXB-2である。

【0094】

一実施形態では、ウイルス核酸(たとえば、HIV-1 RNA)を血漿サンプルから抽出し、限定されるものではないが、PCRなどの方法により全ウイルス遺伝子およびその断片を増幅することが可能である。たとえば、Hertogs et al, 1998, Antimicrob Agents Chemother 42 (2):269-76を参照されたい。一例を挙げると、全HIV-1 PRおよびRTコード配列を含有する2.2kbの断片をネステッド逆転写PCRにより増幅する。次に、増幅された核酸(たとえば、PR-RTコード配列)のプールを、ほとんどのPR(コドン10~99)およびRT(コドン1~482)配列が欠失したpGEMT3deltaPRTプラスミドと共に、CD4+Tリンパ球(MT4)のような宿主細胞中にコトランスフェクトする。相同的組換えにより、ウイルスコード配列(たとえば、血漿中のHIV-1 RNAに由来するPRおよびRTコード配列)を含有するキメラウイルスを産生させる。トランスフェクトされた遺伝子の産物を標的にするすべての現在利用可能な抗ウイルス剤(たとえば、proRTおよび/またはPR阻害剤)に対するキメラウイルスの感受性は、当技術分野で公知の任意の細胞生存能力アッセイにより決定することができる。たとえば、MT4細胞-3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド系の細胞生存能力アッセイを、高いサンプルスループットを可能にする自動化システムで、使用することができる。RTおよびPR阻害剤のようなすべての抗ウイルス剤に対する耐性のプロファイルを、単一のPR-RT-Antivirogramでグラフ表示することができる。

30

40

【0095】

当業者に公知の抗ウイルス剤に対するウイルスの表現型感受性を評価するための他のアッセイを使用することができる。たとえば、Shi and Mellors, 1997, Antimicrob Agents Chemother. 41 (12):2781-85; Gervaix et al., 1997, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 94 (9):4653-8; Race et al., 1999, AIDS 13:2061-2068(その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい。

50

【0096】

他の実施形態では、抗ウイルス治療剤による治療に対するウイルスの感受性は、抗ウイルス治療剤の存在下で抗ウイルス治療剤の標的の活性をアッセイすることにより決定される。一実施形態では、ウイルスはHIVであり、抗ウイルス治療剤はプロテアーゼ阻害剤であり、そして抗ウイルス治療剤の標的はHIVプロテアーゼである。たとえば、米国特許第5,436,131号、同第6,103,462号(その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい。

【0097】

5.6 減損した複製能と突然変異との相関

当技術分野で公知の任意の方法を用いて、突然変異が減損した複製能と相関するかを決定することができる。一実施形態では、P値を用いて相関の統計的有意性を決定する。その際、P値が小さいほど、測定が有意であるものとする。好ましくは、P値は0.05未満であろう。より好ましくは、P値は0.01未満であろう。P値は、当業者に公知の任意の手段により算出することができる。一実施形態では、P値は、フィッシャーの直接確率検定を用いて算出される。たとえば、David Freedman, Robert Pisani & Roger Purves, 1980, STATISTICS, W. W. Norton, New Yorkを参照されたい。

【0098】

5.7 減損した複製能の検出

他の態様において、本発明は、ウイルスにおける減損した複製能を検出する方法を提供する。上述のように、減損した複製能に関連する突然変異はあらゆる適切な方法を用いることにより同定することができる。ウイルスにおける減損した複製能に関連する突然変異の存在は、当業界で公知のいかなる手段、例えば上で論じた手段により検出することができる。ウイルスにおける減損した複製能と関連する突然変異の存在は、ウイルスの複製能が減損している可能性が高くなっていることを示唆する。一実施形態では、ウイルスはヒト免疫不全ウイルス(HIV)である。他の実施形態では、ウイルスはヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)である。他の実施形態において、抗ウイルス治療剤はNNRTIである。

【0099】

他の実施形態において、本発明は、HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVのRTにおいて、減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、該RTのアミノ酸配列のアミノ酸位置98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225または236で検出することを含み、該突然変異の存在により、該HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法を提供する。他の実施形態では、該突然変異はP236Lではないものとする。

【0100】

他の実施形態において、本発明は、HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVのRT中で、A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる群から選択される減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を検出することを含み、該突然変異の存在により、該HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法を提供する。

【0101】

他の実施形態において、本発明は、被験者に由来するHIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVのRT中で、減損した複製能に関連する突然変異の存在または不存在を、該RTのアミノ酸配列のアミノ酸位置98, 100, 101, 103, 106, 108, 179, 181, 188, 190, 225または236で検出することを含み、該突然変異の存在により、該HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法を提供する。他の実施形態では、該突然変異はP236Lではないものとする。

【0102】

他の実施形態において、本発明は、被験者に由来するHIVが減損した複製能を示す可能

10

20

30

40

50

性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIVのRT中で、A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S及びG190Vよりなる群から選択される減損した複製能と関連する突然変異の存在または不存在を検出することを含み、該突然変異の存在により、HIVが減損した複製能を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法を提供する。

【実施例】

【0103】

6.1 実施例1：耐性試験ベクターを用いた複製適応度の測定

この実施例は、HIV-1の複製適応度を正確かつ再現的に測定するための方法及び組成物を提供する。複製適応度を測定する方法は、別のウイルスに適用させることもでき、これにはヘパドナウイルス（例えばヒトB型肝炎ウイルス）、フラビウイルス（例えばヒトC型肝炎ウイルス）、及びヘルペスウイルス（例えばヒトサイトメガロウイルス）が含まれるがこれらに限定されない。この実施例はさらに、逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤感受性の低下を示すHIV-1の複製適応度を測定する方法を提供する。複製能を測定する方法は、これらに限定されないが、組み込み、ウイルス形成、並びにウイルス付着及び侵入を含むHIV-1複製における別の種類のHIV-1複製阻害剤に適用することができる。

10

【0104】

複製適応度試験は、その全体を参照として本明細書中に組み入れる米国特許第5,837,464（国際公開番号W097/27319）に記載される表現型薬剤感受性及び耐性の試験のための方法を用いて実施される。

20

【0105】

HIVプロテアーゼ及び逆転写酵素をコードする領域に相当する患者由来の断片は、HIVに感染した個体の血清中に存在するウイルス粒子から単離されるウイルスRNAを用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）によって増幅される患者由来の断片、または耐性試験ベクター-DNAの親クローンの部位特異的突然変異誘発法により作製される野生型HIV-1の突然変異体のいずれかである。耐性試験ベクターは複製適応度を評価するのに用いられる際には、「適応度試験ベクター」とも称される。ウイルスRNAの単離は標準方法（例えばRNAGENTSTM Total RNA Isolation System, Promega, Madison WIまたはRNAzol, Tel-Test, Friendswood, TX）を用いることにより実施した。RT-PCRプロトコールを2つの手順に分けた。レトロウイルスの逆転写酵素（例えばMoloney MuLV逆転写酵素（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ）またはトリ骨髄芽球症ウイルス（AMV）の逆転写酵素（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN））はウイルスRNAをcDNAに複製するのに用いた。cDNAはその後、耐熱性DNAポリメラーゼ（例えば、Taq（Roche Molecular Systems, inc., Branchburg, NJ）、Tth（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ）、PRIMEZYMETM（Thermus brockianus（Biometra, Gottingen, Germany）から単離）、または「ロングPCR」の実施について記載する耐熱性ポリメラーゼの組み合わせ（Barnes, W.M., 1994, Proc.Natl. Acad.Sci, USA 91, 2216-20）（例えばExpand High Fidelity PCR System（Taq+Pwo）、（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）またはGENEAMP XLTM PCR キット（Tth+Vent）、（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ））を用いて増幅した。

30

40

【0106】

PCRプライマーは、PCR産物の両末端にそれぞれApaI及びAgeI認識部位を導入するよう設計した。

【0107】

患者由来の「試験」断片を組み込んだ適応度試験ベクターは、鋳型としてウイルスRNAを用い、プライマーとしてPCR6(#1)、PDSApa(#2)、及びPDSAge(#3)を用いたRT-PCRによって調製し、その後ApaI及びAgeIまたはアイソシゾマーPinA1を用いて消化した1.5k Bの増幅DNA産物を用いて米国特許番号5,837,464（図1参照）に記載される通りに構築した。合成された適応度試験ベクターに対応するプラスミドDNAが、特定の患者の血漿中に存在す

50

るHIVウイルス類似種の代表サンプルを含むことを確実にするため、所定の適応度試験ベクターの構築において得られた多くの (>100) 独立したE.coli形質転換体をプールし、プラスミドDNAの調製に用いた。

【0108】

両種指向性MuLV 4070A env遺伝子産物をコードするパッケージング発現ベクターは、適応度試験ベクターウイルス粒子の適応度試験ベクター宿主細胞中で生産を可能にし、該粒子はヒト標的細胞に効率的に感染することができる。envを除く全てのHIV遺伝子をコードする適応度試験ベクターを、パッケージング宿主細胞をトランスフェクトするのに用いた (一旦トランスフェクトされた宿主細胞は適応度試験ベクター宿主細胞と呼ぶ)。両種指向性MuLV 4070A env遺伝子産物をコードするパッケージング発現ベクターは、耐性試験ベクターとともに用いられ、感染性擬似型適応度試験ベクターウイルス粒子の適応度試験ベクター宿主細胞中で生産を可能にする。

10

【0109】

適応度試験ベクターを用いて実行される適応度試験は、パッケージング宿主とヒト胚性腎臓細胞系293からなる標的宿主細胞とを用いて実施した。

【0110】

適応度試験は、2種の宿主細胞型を、適応度試験ベクターとともに用いて実施した。適応度試験ベクターウイルス粒子は、パッケージング宿主細胞を適応度試験ベクター及びパッケージング発現ベクターでトランスフェクトすることにより調製された第1宿主細胞 (適応度試験ベクター宿主細胞) によって産生した。適応度試験ベクターウイルス粒子はその後、第2宿主細胞 (標的宿主細胞) を感染するのに用い、第2宿主細胞内で指標遺伝子の発現を測定する (図1参照)。

20

【0111】

機能的なルシフェラーゼ遺伝子カセットを含む適応度試験ベクターが構築され、宿主細胞を適応度試験ベクターDNAでトランスフェクトした。適応度試験ベクターは、タンパク質をコードする患者由来の逆転写酵素及びプロテアーゼDNA配列を含み、該タンパク質は、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤などの抗レトロウイルス剤に対して感受性または耐性のいずれかであった。

【0112】

感染細胞中で検出されるルシフェラーゼ活性量は、「感染性」、「複製能」、または「複製適応」、すなわち複製を1ラウンド行うウイルスの能力、の直接的な測定に用いた。相対的な適応度は、患者由来のウイルスにより生産されたルシフェラーゼ活性量と、HIV-1、例えばNL4-3またはHXB2の分子クローンに由来する十分に特徴付けられた参照ウイルス (野生型) により産生されたルシフェラーゼ活性量とを比較することにより評価した。適応度測定値は参照のパーセント、例えば参照の25%、50%、75%、100%、125% (図2, 3, 5, 6及び7) として表される。

30

【0113】

宿主細胞を直径10cmのシャーレに蒔き、適応度試験ベクタープラスミドDNA及びエンベロップ発現ベクターとともに平板培養した後、1日間トランスフェクトした。トランスフェクションはカルシウム-リン酸共沈降法を用いて行われた。トランスフェクション後1~24時間で、DNA沈殿物を含む細胞培養培地を新しい培地と取り替えた。適応度試験ベクターウイルス粒子を含む細胞培養培地をトランスフェクション後1~4時間で回収し、0.45 µmフィルターに通し、-80 °Cで保存した。回収された細胞培養培地中のHIVキャプシドタンパク (p24) レベルは、製造者 (SIAC; Frederick, MD) によって記載されるEIA法によって測定した。インフェクション前に、標的細胞 (293及び293/T) を細胞培養培地で平板培養した。コントロールのインフェクションは、擬似トランスフェクション (DNAなし) またはエンベロップ発現プラスミドのない適応度試験ベクターDNAを含むトランスフェクションからの細胞培養培地を用いて実施した。インフェクション後1~3日以上で、培地を除き、細胞溶解バッファー (Promega) をそれぞれのウェルに加えた。細胞溶解物はルシフェラーゼ活性についてアッセイした。あるいは、細胞を溶解し、ウェルから培養培地を吸

40

50

引することなくSteady-Glo(Promega)試薬を直接それぞれのウェルに添加することによってルシフェラーゼを測定した。

【0114】

6.2 実施例2: RT活性が欠損したウイルスの複製適応度の測定

この実施例は複製適応度を改変する逆転写酵素中の突然変異を同定する方法及び組成物を提供する。複製適応度を改変する突然変異を同定する方法は、以下のもの限定されないが、組み込み、ウイルス形成、並びにウイルス付着及び侵入を含むHIV-1複製における他の成分に適用させることができる。この実施例は、逆転写酵素が有する特定の突然変異が複製適応度に及ぼす影響を定量する方法も提供する。特定のプロテアーゼ及び逆転写酵素の突然変異が有する複製適応度に及ぼす影響を定量する手段及び方法は、以下のものに限定されないが、gal, pol及びエンベロープ遺伝子を含むHIV-1複製に關与する他のウイルス遺伝子中の突然変異に適用させることができる。

10

【0115】

適応度試験ベクターは実施例1に記載されるように構築した。患者サンプルに由来する適応度試験ベクターまたは適応度試験ベクターのプールに由来するクローン、または特定の突然変異を含むように部位特異的突然変異誘発により操作された適応度試験ベクターは、適応度アッセイで試験し、十分に特徴付けられた参照標準と比較した相対的な適応度を精確かつ定量的に測定された。患者サンプルをさらに、観察される相対適応度と相関する増加したまたは減少した逆転写酵素活性について調べた。

【0116】

患者HIVサンプルの逆転写酵素活性：逆転写酵素活性は広く使用される多くのアッセイ手順によって測定することができ、これにはホモポリマー伸長(homopolymeric extension)の使用(例えばオリゴdT:ポリrC)または分子ビーコンまたは5'エキソヌクレアーゼ活性に基づくリアルタイムPCRが含まれるがこれに限定されない(Lie及びPetropoulos, 1998, Curr Opin Biotechnol.9(1):43-48)。本発明の一実施形態において、患者ウイルスの適応度と参照ウイルスを比較し、逆転写酵素阻害薬剤にさらされていない「野生型」のウイルスと比較した相対的な適応度を決定した。他の実施形態において、患者ウイルスの適応度を、異なる時点、例えば治療開始前、薬剤治療の変更前後、あるいは病気進行のウイルス学的(RNAコピー数)、免疫学的(CD4 T細胞)、臨床的(日和見感染)マーカーの変化の前後、で同一患者から採集されたウイルスと比較した。

20

30

【0117】

患者HIVサンプルの遺伝子型分析：プールまたはクローンいずれかの適応度試験ベクターDNAは、例えば上述のあらゆる遺伝子型タイピング法(genotyping method)により分析することができる。本発明の一実施形態において、患者HIVサンプルの配列を、ウイルスRNA精製、RT/PCR及びABI自動化連鎖終止配列決定法を用いることによって決定した。決定された配列は、利用可能な場合には、データベース中に存在する参照配列と比較し、または治療開始前の患者からのサンプルと比較する。遺伝子型は参照または治療前の配列と異なる配列について調べ、観察される適応度と相関付けた。

【0118】

部位特異的突然変異体の適応度分析：適応度の変化との相関が観察される遺伝子型の変化は、規定の野生型(薬剤感受性)の遺伝的背景上に特定の突然変異を含む適応度ベクターの構築によって評価した。突然変異は、単独で、および/またはウイルスの適応度を調節すると考えられた他の突然変異と組み合わせ、取り込まれた。突然変異を部位特異的突然変異誘発のために広く知られるいくつかの方法を介して適応度試験ベクターに導入した。本発明の一実施形態において、部位特異的突然変異誘発のためにメガプライマーPCR法を用いた。特定の突然変異または突然変異群を含む適応度試験ベクターをその後、実施例1に記載される適応度アッセイを用いて試験し、適応度を特定の突然変異を欠く遺伝子的に明確な野生型(薬剤感受性)適応度試験ベクターの適応度と比較した。適応度の観察される変化は、耐性試験ベクターに導入された特定の突然変異に起因すると考えることができる。

40

50

【0119】

本発明の関連するいくつかの実施形態では、逆転写酵素中にアミノ酸置換を98 (A98G)、100 (L100I)、101 (K101E)、103 (K103N)、106 (V106A、V106I、V106M)、181 (Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L)、または190 (G190A、G190S、G190C、G190E、G190V、G190T、G190Q) の位置で生じている部位特異的突然変異を含み、かつ異なる逆転写酵素活性量を示す適応度試験ベクターを構築し、適応度を試験した (図2, 3, 4, 5, 6, 7及び8A~8C)。適応度の結果により、特定の逆転写酵素アミノ酸置換と適応度との間の相関関係が確立された。データは同一位置における異なる突然変異が、複製能に対して激しく異なる影響を有し得ることを実証した。図3はV106I及びV106MがV106Aと比べて、比較的高い複製能を有することを示す。190位での異なる突然変異間で観察される違いは特に目覚しく、かろうじて検出できるものから野生型の80%以上の範囲までわたる。図8A~8Cに示されるように、変異体ウイルス株が異なるNNRTIの存在下で複製されるとき、複製能のこれらの違いも明らかにされた。

10

【0120】

図4は、上述の通りに行われた複製能測定は、複製競合アッセイ結果を用いて測定された測定値と一致する結果を与えたことを実証する。

【0121】

複数の突然変異を含むウイルスも構築し、そして図2に示されるように試験した。図7は、単一の突然変異株の複製能と単一の突然変異の組み合わせを含む二重突然変異株の複製能とを比較し、突然変異の組み合わせを有する株が、いずれかの突然変異を単独で有する株に比べて低い複製能を有することを示す。

20

【0122】

190位の突然変異及びL74V突然変異の両方を含む突然変異株も図5に示されるように構築した。L74V突然変異は190位が野生型である株の複製能に影響しないが、ほとんど他の190位突然変異株の複製能を増加した。

【0123】

6.3 実施例3：耐性関連突然変異を同定するための患者サンプルの分析

この実施例はNNRTI耐性に関連する突然変異を同定するための患者サンプルの分析方法を示す。またK101P、K103R及びV179D並びにK103R及びV179Dの組み合わせは、新しいNNRTI耐性突然変異であることも実証する。

30

【0124】

HIV-1株の逆転写酵素 (RT) 配列とそのNNRTIに対する感受性との間の関係を決定するため、18,034サンプルのデータセットを遺伝子型及び表現型について分析した。十分に特徴付けられたNNRTI突然変異の不在下で、NNRTI耐性をもつこれらのサンプルを単変量及び組合せによる相関分析によって同定した。8,637サンプルは100、181、188、190または227位に突然変異を含まず、RT中に以下の、A98G、K101E、K103N/S、V106A/M、P225H、M230L、またはP236 Lのいずれの突然変異も含まないが、依然として1以上のNNRTIに対する感受性において高レベルの低下を有した。8,673サンプル中146サンプルは少なくとも1種のNNRTIに対する感受性において5倍以上の低下を示した。

【0125】

純粋な形態 (すなわち突然変異の混合を含まない及び野生型) で突然変異を有する少なくとも2つのサンプルのRTの全アミノ酸位置を同定した。同定したアミノ酸位置及び残基は：

40

P4、E6、K20、T27、V35、T39、M41、K43、E44、S48、K49、I50、V60、A62、K64、D67、S68、T69、K70、L74、V75、F77、R83、D86、V90、I94、A98、K101、Q102、K103、K104、V106、V108、Y115、F116、V118、D121、K122、D123、I135、E138、T139、I142、Q151、A158、C162、T165、K166、I167、E169、K173、Q174、P176、D177、I178、V179、M184、V189、E194、G196、Q197、T200、I202、E203、Q207、H208、L210、R211、F214、T215、D218、K219、H221、L228、D237、K238、P243、V245、E248、D250、I257、A272、K275、V276、R277、Q278、K281、L283、R284、T286、A288、E291、V292、V293、P294及びE297である。

50

【0126】

上述の各位置に存在するアミノ酸をその後決定し、1以上のサンプル中に存在する全てのアミノ酸を別々に分析した。相関分析はStatviewソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行われ、各NNRTIの連続的倍数変化 (FC)、または二分法による倍数変化 (FC>10)、と相関するアミノ酸突然変異を決定した。

【0127】

分析された146サンプル間でNNRTIに対して最も耐性であるサンプルのデータ (RT突然変異、ネビラピン (NVP)、デラビルジン (DLV) 及びエファビレンツ (EFV) のFC) を表1に示す。表1は、少なくとも1種のNNRTIにより10以上のFCを示したサンプルで観察された感受性にあるRT遺伝子型及びNNRTI FCを示している。NVP、DLV及びEFVについて観察された最大FC値はそれぞれ > 400倍、> 250倍、> 144倍である。図9及び10並びに表1で例証されるように、最も高いFCを有するサンプルは101位でプロリン置換 (n=10、NVP、DLV及びEFV 倍数変化の中間値はそれぞれ355倍、26倍及び26倍であった。) または103Rと179Dの組み合わせ (n=13、NVP、DLV及びEFV 倍数変化の中間値はそれぞれ12倍、24倍及び17倍であった。) を含んでいた。RT遺伝子型におけるK101P、K103R及びV179Dの存在は、表1の欄1内に太字で示している。

10

【0128】

全ての101Pサンプル及び2つを除く全ての103R/179Dサンプルも、ヌクレオシドRT阻害剤 (NRTI) 耐性に関連する突然変異を有していた。101Pまたは103R/179Dを含まないサンプルにおいて、NVP、DLV及びEFVにおける最大FCはそれぞれ、41倍、67倍及び15倍であった。3種全てのNNRTIに対する低感受性に関連し、101P、103R/179D、またはNRTIに関連する突然変異と無関係な突然変異は、101Q、106I、135T、166R、179D、189I、245T、272S及び297Tを含んでいた。いくつかのサンプルにおいて、NNRTIに対する減少した耐性または増加した感受性、及びおそらくは高感受性との驚くべき相関も245及び138位で認められた。

20

【0129】

K101P、K103R/V179D及びNNRTI耐性突然変異として同定された他の突然変異と、NNRTIに対する減少した感受性との相関を、NNRTI耐性のないサンプルを分析することにより証明した。NNRTI耐性のない全526サンプルを分析した。これらのサンプルのNNRTI 倍数変化は全て1~2の間であり、NNRTI耐性を全く示していない。526サンプルの遺伝子型分析は、NNRTI耐性突然変異として同定される突然変異はいずれのサンプルにも存在しないことを示し、NNRTI耐性突然変異は確かにNNRTIに対する減少した感受性に関係していることを証明している。

30

【0130】

この実施例はヒト免疫不全ウイルス (HIV)、例えばヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) が、NNRTIによる治療に対する耐性を示す可能性が高くなっているか否かを決定する方法であって、該HIV-1によってコードされる逆転写酵素 (RT) が、該NNRTIによる治療に対する耐性に関連する突然変異の存在または不存在を、該RTのアミノ酸配列のアミノ酸位置101、103、または179に呈するか否かを検出すること (例えばK101P、K103RまたはV179D) を含み、該突然変異の存在により、HIV-1がNNRTIによる治療に対して耐性を示す可能性が高くなっていることが示唆される、上記方法を説明する。一般的に、本方法はNNRTI耐性に関連する本明細書中に列挙された突然変異のあらゆる組み合わせの存在または不存在を検出することを含むことができる。例えば、本方法はNNRTI耐性に関連する2または3ヶ所全てのアミノ酸位置で突然変異の存在または不存在を検出することを含むことができる。特定の実施形態において、そのような方法は、K103R及びV179Dの存在または不存在を検出することを含むことができる。NNRTIの例にはデラビルジン、ネビラピン及びエファビレンツを含むがこれに限定されない。

40

【0131】

本明細書中で引用されたすべての文献は、その全体を参照として組み入れるものとする。

【0132】

50

本明細書に提供されている実施例は、実際のものであっても予測的なものであっても、単に本発明の実施形態にすぎず、なんら本発明を限定しようとするものではない。

【表1】

表1
少なくとも1種のNNRTI FCが10以上である
サンプルの感受性データにおけるRT遺伝子型及びNNRTI倍率変化

サンプル中のRT 突然変異	NVP FC*	DLV FC*	EFV FC
A62A/V, K101P, Q102K, D123E, I135T, T139V, C162S, I178M, M184V, G196E, R211G, F214L, H221H/Y, L228L/R, A272P, R277K, K281R, T286P, E297K	400.0	121.1	70.3
K20R, M41L, K43E, E44D, D67N, L74I, A98S, K101P, Q102K, V118I, D123E, C162S, D177E, I178I/L, M184V, G196G/E, E203E/K, Q207E, H208Y, R211K, T215Y, D218E, K219Q, L228H, V245E, R277K, T286A, E297K	400.0	23.4	20.6
M41L, K43K/N, L74L/V, V75V/L, K101P, Q102K, V108I, V118V/I, I135T, C162S, V179L, M184V, L210W, R211K, T215Y, L228R, V245E, R277K, T286T/A, E297R, L301I	400.0	19.6	700.0
K64K/N, D67N, T69T/N, K70R, K101P, C162S, I178M, R211K, K219Q, H221Y, K238T, V245E, R277K	400.0	250.0	144.6
M41L, K101P, Q102K, C162S, M184V, T215Y, H221Y, V245T, V293I, E297K	311.5	48.5	40.1
V35R, T39A, T69D, K82R, R83K, K101P, Q102K, K122E, I135T, I142I/T, Q151M, C162Y, K173E, V179V/I, T215Y, I244I/V, A272P, R277K, E297K	196.8	29.6	29.3
K13K/N, M41L, K43Q, E44D, D67N, L74V, I94L, K101P, Q102K, V118I, K122E, D123E, I135T, N137N/S, C162S, M184V, T200A, E203K, Q207E, L210W, T215Y, D218E, K219N, K223Q, L228H, Q242H, R277K, T286T/A	172.9	35.4	22.0
V35I, E44E/D, K49E, I50I/T, A62V, Q102K/R, K103R, Y115F, V118I, I135I/T, E138A, I142R, C162S, I178L, V179D, M184V, F214L, T215Y, D218D/E, H221H/Y, A272P, V276I, R277K, L283I	400.0	250.0	67.3
V35V/E, K64H, D67N, Q102K, K103R, V118I, I135T, T139R, C162S, T165L, V179D, M184V, F214L, T215F, K219Q, V245M, R277K, A288S	400.0	250.0	142.5
L34I, M41L, K64K/R, Q102K, K103R, D121Y, K122E, D123E, I178M, V179D, M184V, G196E, T200I, R211G, T215Y, V245M, A272P, R277K, V293I, P294Q	65.7	64.4	42.5
K64K/R, Q102K, K103K/R, V118I, K122A, D123E, C162S, E169D, V179D, T200A, F214L, V254V/I, A272P, R277K, T286A, A288A/S, V293I	19.1	33.2	18.0
T69T/N, R83K, V90I, Q102K, K103K/R, K122E, C162S, V179D, G196E, T200T/A/I/L/S/V, T215T/S, V245V/M, A272P, R277K	14.6	26.4	19.4
E6E/K, A62A/V, K64R, K70R, Q102K, K103R, K122E, C162S, I178M, V179D, M184V, T215T/F/I/S, S251S/I, T286T/A	11.6	22.6	10.9

サンプル中の RT 突然変異		NVP FC*	DLV FC*	EFV FC
Q102K, K103K/R, V108I, D123E, C162S, K173K/E, D177D/E, V179V/D, Q207E, R211K, E248V, A272P, R277R/K, V292I		11.3	15.6	11.6
Q102K, K103K/R, V106I, D123D/E, I135I/V, C162S, E169D, K173R, Q174K, V179D, M184V, Q207K, R211A, K219R, A272P, R277K, V293I		10.9	57.7	21.0
V35M, A62A/V, D86E, Q102K, K103R, D123E, C162S, D177K, V179D, M184V, I202V, Q207A, R211K, V241I, R277K, A288G		10.0	17.5	11.4
A98S, Q102K, V106I, T107A, K122E, I135T, C162S, K166R, K173S, Q207E, A272S, R277K, T286A, V292I, V293I		34.0	34.8	15.3
P4S, L74V, Q102K, Y115F, K122K/E, C162S, Q174K, I178M, M184V, K201K/R, I202I/V, Q207E, R211R/A/G/T, T240T/S, A272P, R277K, T286A, V293I		19.2	67.3	13.1
Q102K, I135T, C162S, K173E, I178L, V179D, G196E, R211S, F214L, K220K/E, D237E, A272P, R277K, E297T		16.5	11.5	14.2
V35V/L, T39A, M41L, K43K/D/E/N, E44D, V60V/I, D67N, K101P, Q102K, V106I, V118I, D121D/H, K122K/E, D123D/E/K/N, C162S, K166K/R, V179I, G196E, T200A, E203D, H208F, L210W, R211K, T215Y, D218E, K219N, D250E, A272P, I274I/V, R277R/K, A288S, E297K		400.0	9.1	24.2
K20R, M41L, K43E, E44A, D67S, T69SCT, L74V, R83K, A98S, K101P, Q102K, V118I, K122E, D123E, I135T, C162D/G, K166R, D177D/N, I178M, V179V/I, G196E, T200A, L210W, R211K, T215Y, V245E, A272P, R277K, K281K/R, V293I, E297K		142.3	9.3	18.2
V35I, A62V, D67G, T69G, K70K/R, V75I, F77L, R83K, K101P, Q102K, K104K/R, F116Y, K122E, D123N, Q151M, M184V, I202V, Q207N, K219E, A272P, R277K, T286A, V293I, E297A		35.4	22.4	7.8
K20R, K49R, N81N/S, A98S, Q102K, K122E, A158S, C162S, T165L, E169D, I178M, M184M/V, G196E, T200T/I, V245E, V276I, R277K, T296S		40.6	29.1	5.5
T31L, R83R/K, V90V/I, K101K/Q, Q102K, V118V/I, K122E, D123N, C162S, V179V/I, M184V, L210L/S, R211K, H221H/Y, L228L/R, R277K, V293I		20.3	21.2	7.0
V60I, Q102K, I135T, I142V, C162S, T165L, M184V, T200A, Q207E, R211K, A272S, L283I, T286A, E297K		17.8	17.2	6.8
E28A, K70R, K101N, Q102K, C162S, Q207E, R277K, V293I		10.3	21.9	8.1
D67N, T69D, K70R, Q102K, K103R, K122E, D123E, I135T, C162S, V179E, F214L, K219Q, V245E, A272P, R277K, K281R, A288T, V293V/I, E297K		5.9	22.9	11.8
K20R, K32K/R, M41L, K43K/E, D67D/G, S68S/G, L74I, V75V/A, Q102K, K103R, V118V/I, I135M, C162S, K166K/T, I178I/M, V179D, M184V, V189I, T200A, H208H/Y, L210W, R211K, T215Y, R277K, R284K, T286A, V293I		19.9	No Data	16.7
V21I, Q102K, T139R, C162S, M184V, T200A, Q207E, R211K, K238N, A272P, R277K, V293I, P294T, E297K		34.1	18.7	4.0
Q102K, I135T, C162S, K166R, K173Q, Q207E, R211K, V245T, A272P, V293I, E297R		20.3	14.7	4.4

サンプル中の RT 突然変異	NVP FC*	DLV FC*	EFV FC
K20R, K49R, D67N, T69N, K70K/R, K101H, Q102K, D123E, I135T, C162S, D177E, M184V, V189V/I, I195I/V, G196E, E203K, K219Q, R277K, K281R, L283I, V293I, E297K, L303L/R	20.1	64.1	4.6
K49R, V90I, Q102K, C162D, K166R, D177E, I178M, V245M, A272P, R277K, V293I	11.6	14.6	2.4
S3S/C, V35K, T39A, M41L, K43E, D67H, S68N, T69N, K101H, Q102K, K122E, D123E, I135T, I142V, A158A/S, C162C/Y, Q174E/K, N175N/Y, G196G/E, Q207S, T215Y, K219N, A272P, R277K, A288A/T, V293I, E297T	10.6	23.3	1.7
K20R, V35V/I, Q102K, K103R, K122E, I135V, C162S, E169D, Q174K, V179D, M184V, G196E, T200A, F214L, V245E, R277K, T286A, A288S	6.9	14.3	6.8
K101K/Q, Q102K, K122K/E, I135L/V, C162S, K173K/T, I178L, M184V, R211K, A272P, L283I	9.1	10.1	5.2
E6D, R83K, K101Q, Q102K, I135L/S/T, E138E/A, C162S, K173R, L210F, R211K, K275K/Q, V276T	8.8	23.0	6.9
R83K, Q102K, C162S, E169D, I178L, V179E, I202I/V, R211K, A272P, R277K, V293I	6.9	16.4	9.4
E6D, M41L, K49R, V60I, Q102K, I135I/T, E138E/D, C162S, K166I, I178M, V179I, T200I/A, E203D, L210L/W, R211R/K, T215Y, L228L/R, A272P, V293I, E297K	33.0	7.1	4.3
E6D, V35V/I, A98A/S, Q102K, I135T, C162S, K173E, T200T/A, Q207E, R211R/K, K238T, V245M, S251S/I, A272P, K275R, R277K, T286A, E297K	14.7	7.6	4.8
V35V/L, K49R, A98S, Q102K, K122K/E, A158S, C162S, E169D, Q174Q/K/R, I178I/L/M, T200A, Q207E, M230M/V, I257L, V261L, R277K	9.6	11.3	3.2
Q102K, D121Y, K122E, I135I/T, I142I/T, C162S, I178I/L, V189I, R211K, V245T, R277K, E297T	8.7	12.0	4.3
V60V/I, D67N, K70R, V90I, Q102K, V106V/I, T139K, I142V, C162C/Y, E169D, R211K, K219Q, V245E, A272P, A288S, P294Q	8.0	32.2	2.2
K49R, Q102K, I135T, C162S, Q207E, V245M, R277K, T286A, V293I	6.6	10.7	2.5
A98S, Q102K, D121Y, K122E, I135L, E138A, C162S, V179I, M184M/V, Q207E, R211K, P243S, V245E, R277K, E297A	6.0	20.2	2.6
Q102K, C162S, I178M, V179E, T200A, Q207R, R277K, A288T	4.5	12.5	6.7
K20R, Q102K, I135L, V179D, T200A, Q207N, R211K, T286A, V293I, P294T	2.9	10.6	5.2
K64H, D67N, T69N, K70R, V90I, Q102K, C162S, P176Q, G196E, T200A, K219Q, L228H, K238T, V245E, A272P, R277K, Q278H, T286P, E297R	4.1	10.2	2.0
P4P/S, V35T, T39K/R, S48T, Q102K, K122E, E138A, K173T, D177E, V179D, T200A, I202I/V, Q207E, F214L, V245Q, E248D/N, A272P, K275Q, R277R/K, L283L/I, T286T/A, E291D, V292I, P294P/Q	3.0	10.4	2.1

* 検出可能な最大 FC は NVP については 400、DLV については 250 である。
 ** 全てのサンプルにおける列挙した位置でのアミノ酸混合の存在は、観察されたアミノ酸をスラッシュ(/) で分けて記載することにより示した。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 3 3 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、複製能アッセイの概略図を示す。

【 図 1 B 】 図 1 B は、複製能アッセイの概略図を示す。

【 図 2 】 図 2 は、突然変異及び突然変異対の存在と複製能との間の相関を要約した図を示

す。

【図3】図3は、逆転写酵素内の同一位置で異なるアミノ酸置換を含む組換えウイルスの複製能を要約した図を示す。

【図4】図4は、複製能アッセイを用いて測定された複製能測定値が、複製競合アッセイを用いて測定された測定値と一致することを実証する図を示す。

【図5】図5は、L74Vが、G190突然変異を含む組換えウイルスの減損した複製能を部分的に回復することを実証する図を示す。

【図6】図6は、有害なG190突然変異を含む患者由来のウイルスの複製能を実証する図を示す。

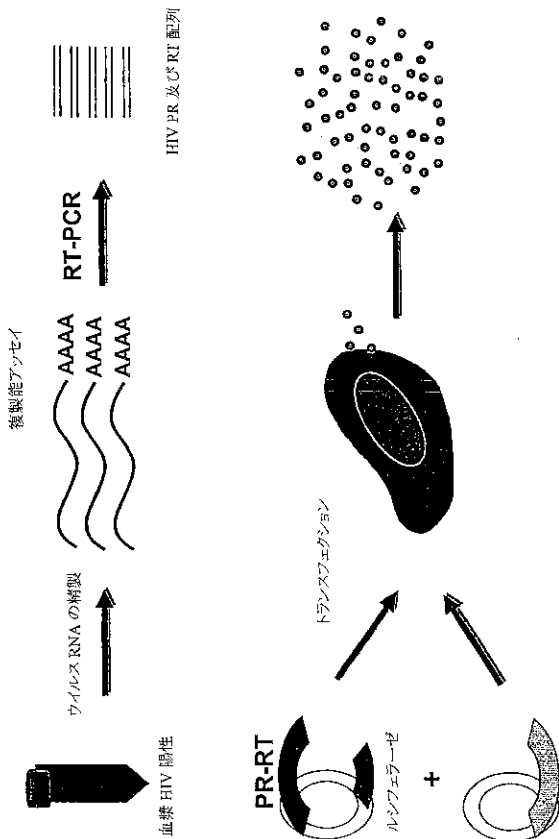
【図7】図7は、K103Nと他のNNRTIの突然変異の作用がほぼ付加的であることを示す図である。

【図8】図8は、逆転写酵素中の同一アミノ酸位置における種々の置換突然変異について、薬剤濃度と複製能との関係を例示する図を示す。図8Aは、逆転写酵素中の同一アミノ酸位置における種々の置換突然変異について、デラビルジンと複製能との関係を説明する。図8Bは、逆転写酵素中の同一アミノ酸位置における種々の置換突然変異について、エファビレンツと複製能との関係を説明する。図8Cは、逆転写酵素中の同一アミノ酸位置における種々の置換突然変異について、ネビラピンと複製能との関係を説明する。

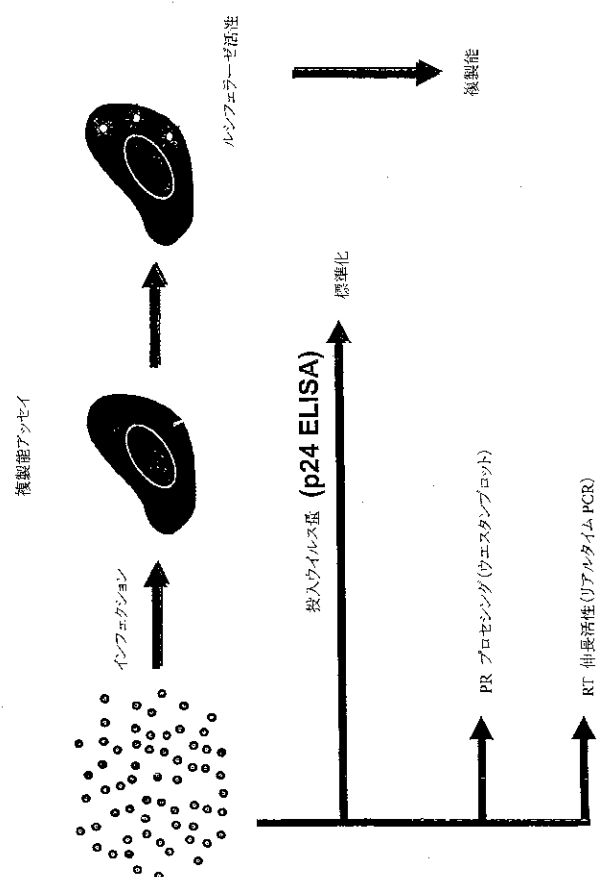
【図9】図9は、K101Pの不存在（白ボックス）及び存在（灰色ボックス）下におけるNNRTI感受性分布を例示する図を示す。

【図10】図10は、K103R + V179Dの不存在（白ボックス）または存在（灰色ボックス）下におけるNNRTI感受性分布を例示する図を示す。

【図1A】



【図1B】

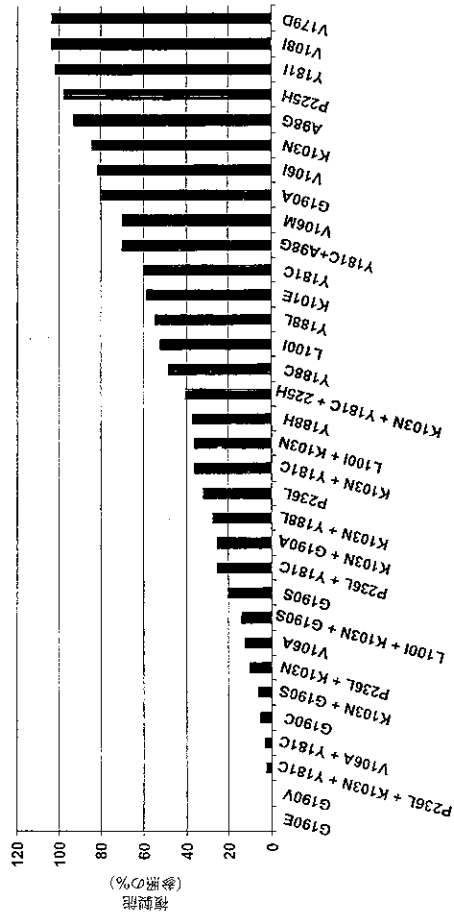


10

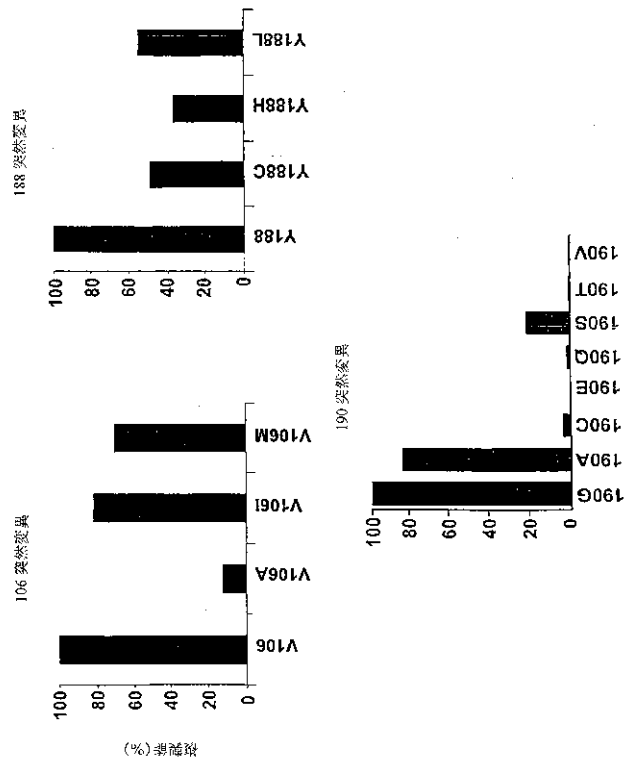
20

【 2 】

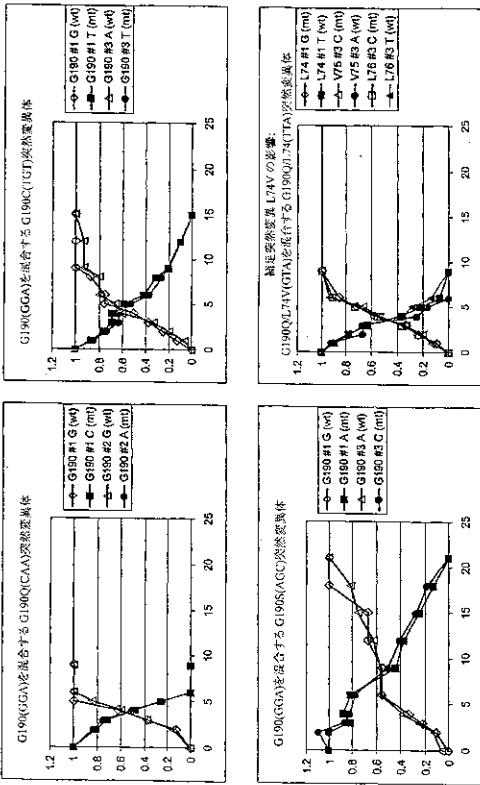
NNIKT 耐性突然変異を含む組換えウイルスの複製能



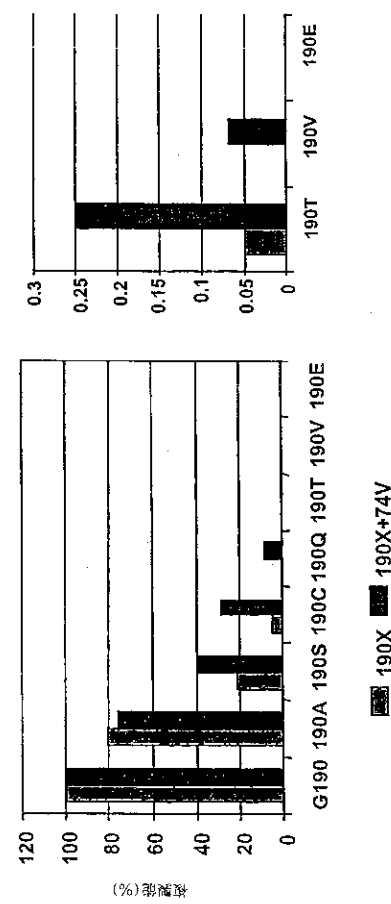
【 3 】



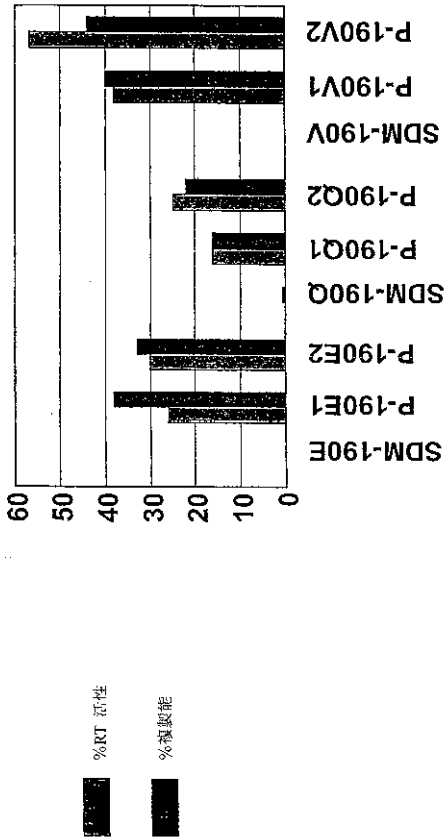
【 4 】



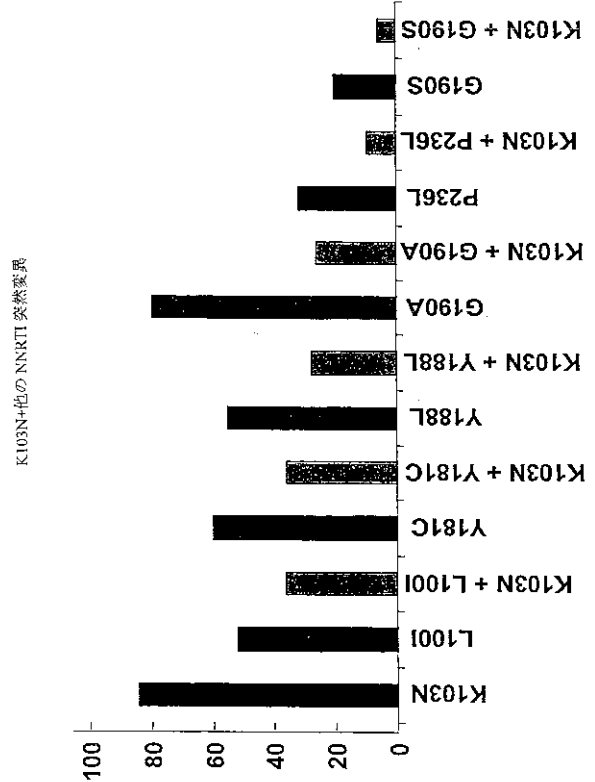
【 5 】



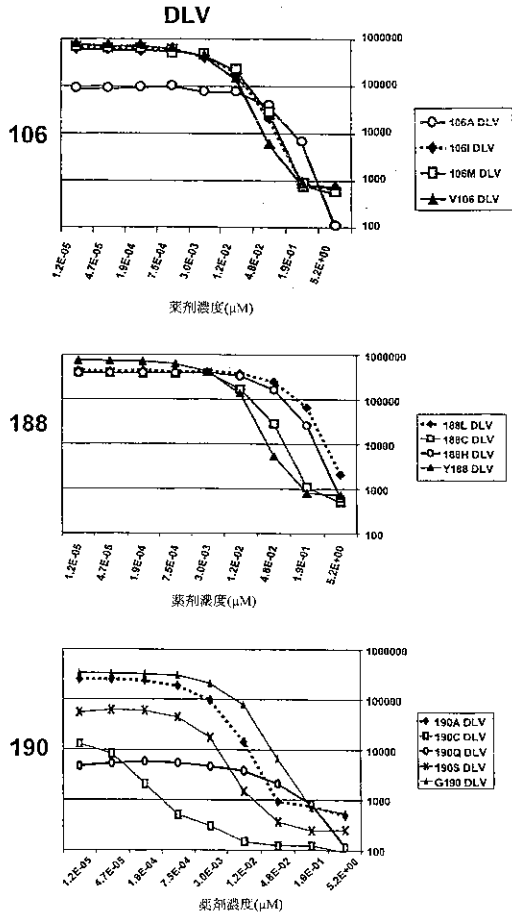
【 図 6 】



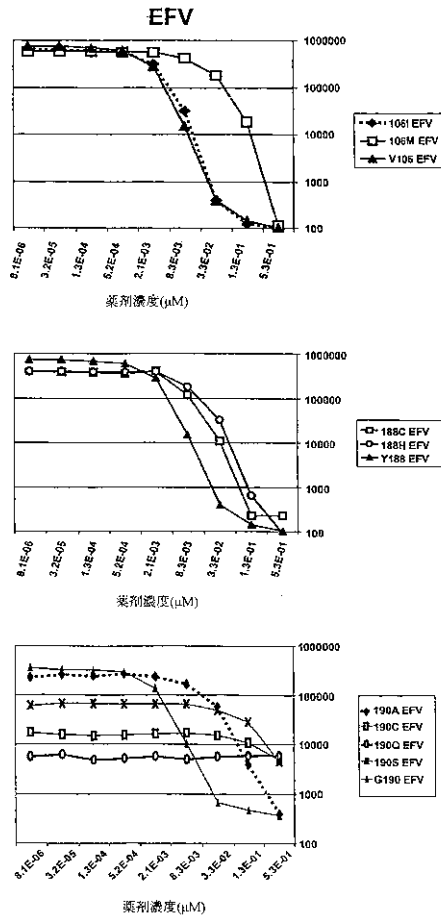
【 図 7 】



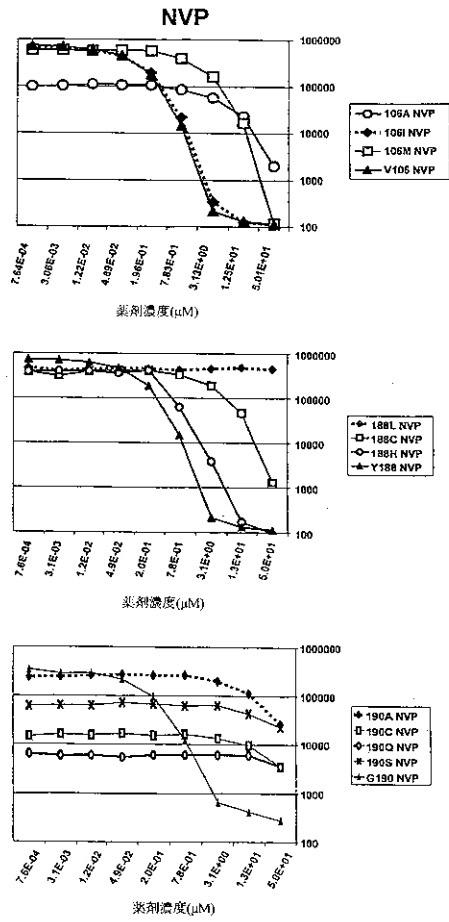
【 図 8 A 】



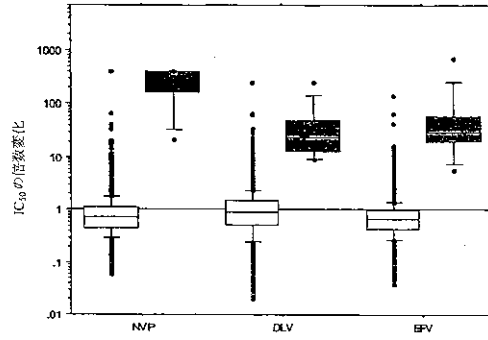
【 図 8 B 】



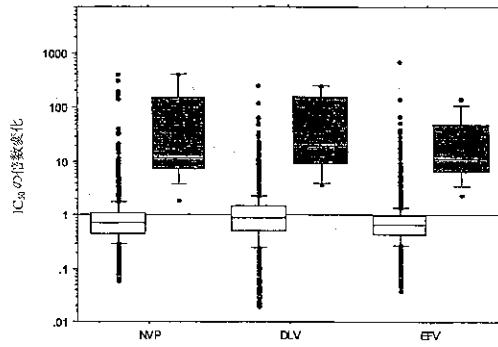
【 8 C 】



【 9 】



【 10 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/21024		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C12Q 1/70. US CL : 435/5; 424/208.1; 536/23.1				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5; 424/208.1; 536/23.1				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 99/61658 A1 (VIROLOGIC, INC.) 02 December 1999 (02.12.1999), abstract and claims 1-72.	1-16		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 12 March 2004 (12.03.2004)	Date of mailing of the international search report 18 MAY 2004			
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Stacy B. Chen <i>Janice Ford</i> Telephone No. 703-308-0196 <i>for</i>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/024

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

APS, CAS ONLINE, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, SCISEARCH, DRUGU

search terms: huang, wrin, garmamik, beauchaine, whitcomb, petropoulos, parkin, hiv, nucleoside, non-nucleoside, drug, anti-viral, retrovirus, mutation, reverse transcriptase, amino acid mutation

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
G 0 6 T 1/00 G 0 6 T 1/00 2 9 5

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ヒュアン, ダブリュ.
アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州, フォスター シティ, コメット ドライブ
7 7 7
- (72)発明者 リン, メアリー, ティー.
アメリカ合衆国 9 4 5 5 5 カリフォルニア州, フレモント, ウォルセイ プレース 3 0 4 0
- (72)発明者 ガマルニク, アンドレア
アメリカ合衆国 8 5 2 2 5 - 2 9 9 9 アリゾナ州, チャンドラー, ノース サンセット ドラ
イブ 2 0 3 7
- (72)発明者 ビューチェイン, ジェイ.
アメリカ合衆国 9 4 0 1 5 カリフォルニア州, デリー シティ, ベルヘヴン アベニュー
1 6 0
- (72)発明者 ホイトコム, ジェイ., エム.
アメリカ合衆国 9 4 4 0 2 カリフォルニア州, サン マテオ, コッベヒル プレース 2 2 6
0
- (72)発明者 ベトロボウロス, クリストス, ジェイ.
アメリカ合衆国 9 4 1 0 9 カリフォルニア州, ハーフ ムーン ベイ, ガルシア ドライブ
4 1 5
- (72)発明者 パーキン, ニール, ティー.
アメリカ合衆国 9 4 0 0 2 カリフォルニア州, ベルモント, ベイヴュー アベニュー 1 9 3
8

F ターム(参考) 4B024 AA14 CA01 CA09 DA03 EA04 GA11 HA11 HA12
4B063 QA06 QA13 QA17 QQ10 QQ12 QQ27 QQ42 QR07 QR32 QR39
QR55 QR79 QR80 QS05 QS34 QS38 QX02
5B057 AA10 BA02 CA08 CA12 CA16 DA12 DB02 DB09 DC09 DC34

专利名称(译)	用于确定病原性病毒的复制能力的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005532054A	公开(公告)日	2005-10-27
申请号	JP2004518237	申请日	2003-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	瓦罗洛吉克公司		
申请(专利权)人(译)	Bairorojikku公司		
[标]发明人	ヒュアンダブリュ リンメアリーティー ガマルニクアンドレア ビューチェインジェイ ホイトコムジェイエム ペトロポウロスクリストスジェイ パーキンニールティー		
发明人	ヒュアン,ダブリュ. リン,メアリー,ティー. ガマルニク,アンドレア ビューチェイン,ジェイ. ホイトコム,ジェイ.,エム. ペトロポウロス,クリストス,ジェイ. パーキン,ニール,ティー.		
IPC分类号	G01N33/53 C12N1/20 C12N15/09 C12Q1/48 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N G01N33/569 G06T1/00		
CPC分类号	C12Q1/703		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/48 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/569.H G06T1/00.295		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA12 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QQ10 4B063/QQ12 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QR07 4B063/QR32 4B063/QR39 4B063/QR55 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS34 4B063/QS38 4B063/QX02 5B057/AA10 5B057/BA02 5B057/CA08 5B057/CA12 5B057/CA16 5B057/DA12 5B057/DB02 5B057/DB09 5B057/DC09 5B057/DC34		
优先权	60/393306 2002-07-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于测定对非核苷逆转录酶抑制剂具有抗性的病毒的复制能力的组合物和方法。该组合物和方法可用于确定用于治疗病毒感染和鉴定和确定潜在治疗化合物的生物有效性的有效药物疗法。

(P2005-5320)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10)

Int. Cl. 7	FI	テマコード (参考)
C12N 15/09	C12N 15/00	A 4B024
C12Q 1/48	C12Q 1/48	4B063
C12Q 1/68	C12Q 1/68	A 5B057
G01N 33/53	G01N 33/53	M
G01N 33/569	G01N 33/569	H

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に

出願番号	特願2004-518237 (P2004-518237)	(71) 出願人	504308431
(22) 出願日	平成15年7月1日(2003.7.1)		
翻訳文提出日	平成17年3月2日(2005.3.2)		
国際出願番号	PCT/US2003/021024		
国際公開番号	W02004/003513		
国際公開日	平成16年1月8日(2004.1.8)		
優先権主張番号	60/393,306	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
優先日	平成14年7月1日(2002.7.1)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 郎