



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03820744.3

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1678757A

[22] 申请日 2003.7.1 [21] 申请号 03820744.3

[30] 优先权

[32] 2002.7.1 [33] US [31] 60/393,306

[86] 国际申请 PCT/US2003/021024 2003.7.1

[87] 国际公布 WO2004/003513 英 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.1

[71] 申请人 瓦罗洛吉克公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 H·黄 M·T·维林

A·加马尼克 J·贝奥蔡内

J·M·怀特科布

C·J·佩特罗波洛斯

N·T·帕金

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 13 页

[54] 发明名称 测定致病病毒复制能力的组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及检测非核苷反转录酶抑制物抗性病毒的复制能力的组合物和方法。该组合物和方法对于鉴定治疗病毒性感染的有效药剂，以及鉴定和检测潜在治疗性化合物的生物学有效性是有用的。

1. 一种检测人免疫缺陷病毒（“HIV”）具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法，包括：检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示与受损的复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变在所述
5 反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位点 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高，条件是所述突变不是 P236L。
2. 一种检测 HIV 具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法，包括：检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示突变的存在或缺失，
10 所述突变选自所述反转录酶的氨基酸序列的 A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S 和 G190V，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。
- 15 3. 一种检测受试者是否具有受损的复制能力的可能性提高的 HIV 的方法，其包括：检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示与受损的复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变在所述反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位点 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力
20 的可能性提高，条件是所述突变不是 P236L。
4. 一种检测受试者是否具有受损的复制能力的可能性提高的 HIV 的方法，其包括：检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示突变的存在或缺失，所述突变选自所述反转录酶的氨基酸序列的 A98G、L100I、
25 K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S 和 G190V，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。
5. 权利要求 1，2，3 或 4 的方法，其中所述突变赋予对非核苷反转录酶抑制物的抗性。
- 30 6. 权利要求 1，2，3 或 4 的方法，其中所述人免疫缺陷病毒为人免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）。
7. 权利要求 5 的方法，其中所述非核苷反转录酶抑制物为奈韦那

平、地拉韦啉或依非韦伦。

8. 权利要求 1, 2, 3 或 4 的方法, 其中通过以一种序列特异性寡核苷酸探针与编码所述突变的所述人免疫缺陷病毒进行杂交来检测在所述反转录酶中所述突变的所述存在或缺失, 其中杂交的发生提示所述突变的所述存在或缺失。

9. 权利要求 1, 2, 3 或 4 的方法, 其中通过测定编码所述突变的核酸序列检测在所述反转录酶中所述突变的所述存在或缺失。

10. 权利要求 3 或 4 的方法, 其中受试者正在进行或之前曾经进行过非核苷反转录酶抑制物的治疗。

11. 权利要求 1, 2, 3 或 4 的方法, 其中该方法包括在至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个氨基酸位置上检测与受损复制能力相关联的突变的存在或缺失。

12. 权利要求 11 的方法, 其中该方法包括检测与受损复制能力相关的突变在氨基酸位置 106 和 181; 103 和 190; 103 和 236; 181 和 236; 103 和 188; 103 和 181; 100 和 103; 或 98 和 181 上的存在或缺失。

13. 权利要求 11 的方法, 其中该方法包括检测与受损复制能力相关的突变的存在或缺失, 所述突变选自 V106A 和 Y181C; K103N 和 G109S; P236L 和 K103N; P236L 和 Y181C; K103N 和 G190A; K103N 和 Y181C; K103N 和 Y188L; L100I 和 K103N; 和 Y181C 和 A98G。

14. 权利要求 11 的方法, 其中该方法包括检测与受损复制能力相关的突变的存在或缺失, 所述突变在氨基酸位置 103、181 和 236; 100、103 和 190; 或 103、181 和 225。

15. 权利要求 11 的方法, 其中该方法包括检测与受损复制能力相关的突变的存在或缺失, 所述突变选自 P236L、K103N 和 Y181C; L100I、K103N 和 G190S; 以及 K103N、Y181C 和 P225H。

16. 一种长度在大约 10 和大约 40 个核苷酸之间的编码 HIV 中的 HIV 反转录酶的一部分的分离的寡核苷酸, 其包含在所述 HIV 中所述反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位点 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上的突变, 其中所述突变与对蛋白酶抑制物的减弱的敏感性相关, 条件是所述突变不是 P236L。

测定致病病毒复制能力的组合物和方法

1. 发明领域

5 本发明涉及测定病毒复制能力的组合物和方法。该组合物和方法对于鉴定治疗病毒性感染的有效药剂，以及鉴定和检测潜在治疗性化

合物的生物学有效性是有用的。

2. 发明背景

10 自从 1980 年代早期以来，超过 60,000,000 的人口已经感染过人免疫缺陷病毒（“HIV”），它是获得性免疫缺陷综合症（“AIDS”）的致病因子。参见 Lucas, 2002, Lepr Rev.73 (1):64-71。HIV/AIDS 现在是非洲撒哈拉以南地区死亡的主要原因，并且是全世界第四大致命原因。2001 年末，全球估计有 40,000,000 人携带 HIV。参见 Norris,

15 2002, Radiol Technol.73 (4):339-363。

现代的抗 HIV 药物靶向 HIV 生活周期的不同阶段以及 HIV 的复制和/或存活所必需的多种酶。在这些药物中到目前为止已证明对于 AIDS 治疗有作用的为核苷反转录酶抑制物（“NRTT”）如 AZT、ddI、ddC、d4T、3TC、阿巴卡韦，核苷反转录酶抑制物如 Tenofovir，非核

20 苷反转录酶抑制物（“NNRTT”）如奈韦那平、依非韦伦、地拉韦啉和蛋白酶抑制物如沙奎那韦、利托那韦、茚地那韦、奈非那韦、安普那韦及 lopinavir。

抗病毒性药物作用的一个后果是它能够对病毒复制施加足够的选择性压力以选择耐药的突变体（Hermann 等，1977, Ann NY Acad Sci

25 284:632-637）。随着药物暴露的增加，在复制病毒种群上的选择性压力升高以促进耐药突变体更快的出现。已知许多蛋白酶抑制物抗性突变和一些 NRTI 抗性突变在不同程度上损害 HIV-1 的复制能力。一般地，赋予对于抗病毒药物的抗性的突变减弱突变病毒的复制能力。参见，例如，Nijhuis 等，2001, Curr Op Infect Diseases 14:23-28，在此

30 并入其全部内容作为参考。由于它们能够影响病人对于抗病毒治疗的反应，所以病毒的复制能力的变化具有主要的临床重要性。参见同前。但是，NNRTI 抗性突变的效果大部分还未进行鉴定并且经常假定

NNRTI 抗性与受损的病毒复制不相关联。因而，在该领域对于检测 NNRTI 抗性病毒的复制能力的方法和组合物有所需要。

3. 发明概述

5 本发明提供检测病毒，例如 HIV 复制能力（也称为复制适合度）的方法和组合物，例如一种非核苷反转录酶抑制物（NNRTI）抗性 HIV。该方法和组合物是基于对一组重组病毒载体的分析之上的，利用包含一个或多个反转录酶（RT）氨基酸取代的定点突变来产生所述载体。本发明的方法和组合物通过提供对于设计更有效的抗病毒治疗剂
10 有用的信息而显著地提高病人生活的质量。另外，通过避免给药无效的药物，节约了可观的时间和金钱。

测量复制适合度的方法能够适用于其它病毒，包括但不限于肝 DNA 病毒（例如，人乙型肝炎病毒）、黄病毒（例如人丙型肝炎病毒）和疱疹病毒（例如，人巨细胞病毒）。

15 本发明进一步涉及测量 HIV-1 复制适合度的方法，所述 HIV-1 显示对于反转录酶抑制物和蛋白酶抑制物的减弱的药物敏感性。测量复制适合度的方法能够适用于其它类别的 HIV-1 复制抑制物，所述复制包括但不限于整合、病毒装配，以及病毒附着和进入。

本发明进一步涉及一种鉴定蛋白酶或反转录酶的突变的方法，所述
20 突变改变复制适合度。

本文描述的鉴定改变复制适合度的突变的方法能够适用于 HIV-1 复制的其它组成，包括但不限于整合、病毒装配，以及病毒附着和进入。

25 本发明进一步涉及量化蛋白酶或反转录酶的特异性突变对于复制适合度的影响的方法。这种量化特异性的蛋白酶和反转录酶突变对于复制适合度的影响的方法能够适用于在其它病毒基因中的突变，所述基因涉及 HIV-1 复制，包括但不限于 gag、pol 和包膜基因。

30 本发明进一步涉及具有减弱的复制适合度的病人样品的高发生率以及在减弱的药物敏感性和减弱的复制适合度之间的一般联系。更具体地，本发明进一步涉及在接受蛋白酶抑制物和/或反转录酶抑制物治疗的病人中具有减弱的适合度的病毒的发生。

本发明进一步涉及具有减弱的复制适合度的病人样品的发生率，

其中适合度的减弱归因于 gag 多聚蛋白质 (p55) 的改变了的蛋白酶加工。

本发明进一步涉及在显示低的、中度的或正常的 (野生型) 复制适合度的病人样本中蛋白酶突变的发生率。

5 本发明进一步涉及蛋白酶突变, 所述蛋白酶突变在显示减弱的复制能力的病毒中不论是单独或是组合都经常被观察到。

本发明也涉及具有减弱的复制适合度的病人样本的发生率, 其中适合度的减弱归因于改变的反转录酶活性。

10 本发明涉及在抗反转录病毒药物治疗失败的病人中具有减弱的复制适合度的病毒的发生。

本发明进一步涉及利用复制适合度测量以指导 HIV-1 的治疗方法, 例如, 涉及利用复制适合度的测量以指导抗反转录病毒药物治疗失败的病人的治疗或利用复制适合度的测量以指导新近感染了 HIV-1 的病人的治疗。利用复制适合度的测量以指导 HIV-1 的治疗方法能够适用于其它病毒, 包括但不限于肝 DNA 病毒 (例如, 人乙型肝炎病毒)、黄病毒 (例如人丙型肝炎病毒) 和疱疹病毒 (例如, 人巨细胞病毒)。

20 在一方面, 本发明提供了一种检测一种 HIV, 例如 HIV-1 具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法, 包括: 检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示与受损的复制能力相关联的突变的存在或缺失, 所述突变在所述反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位点 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上, 其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高, 条件是所述突变不是 P236L。

25 在另一方面, 本发明提供了一种检测一种 HIV, 例如 HIV-1 具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法, 包括检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示突变的存在或缺失, 所述突变选自所述反转录酶的氨基酸序列的 A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、30 G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S 和 G190V, 其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。

在另一方面, 本发明提供了一种检测受试者是否具有有一种 HIV,

例如 HIV-1 的方法，所述 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高，包括检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示与受损的复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变在所述反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位点 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高，条件是所述突变不是 P236L。

在另一个实施方案中，所述方法包括在至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个氨基酸位点上检测与受损的复制能力相关联的突变的存在或缺失。通常，该方法能够包括检测本文所列出的与受损复制能力相关联的突变的任何组合的存在或缺失。例如，该方法能够包括在至少两个氨基酸位点，如 106 和 181、103 和 190、103 和 236、181 和 236、103 和 188、103 和 181、100 和 103，或 98 和 181 上检测突变的存在或缺失。在某些实施方案中，这种方法能够包括检测 V106A 和 Y181C；K103N 和 G109S；P236L 和 K103N；P236L 和 Y181C；K103N 和 G190A；K103N 和 Y181C；K103N 和 Y188L；L100I 和 K103N；或 Y181C 和 A98G 的存在或缺失。

另外，该方法能够包括在至少三个氨基酸位点，如氨基酸位点 103、181 和 236；100、103 和 190；或 103、181 和 225 上检测突变的存在或缺失。在某些实施方案中，这种方法能够包括检测 P236L、K103N 和 Y181C；L100I、K103N 和 G190S；或 K103N、Y181C 和 P225H 的存在或缺失。

在另一方面，本发明提供了一种检测受试者是否具有有一种 HIV，例如 HIV-1 的方法，所述 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高，包括检测由所述 HIV 编码的反转录酶是否显示突变的存在或缺失，所述突变选自所述反转录酶的氨基酸序列的 A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S 和 G190V，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。

在一个实施方案中，所述突变赋予对于非核苷反转录酶抑制物（“NNRTI”）的抗性。在另一个实施方案中，所述人免疫缺陷病毒为人免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）。在另一个实施方案中，所述 NNRTI 为奈韦那平（“NVP”）、地拉韦啉（“DLV”）或依非韦伦（“EFV”）。

在另一个实施方案中，通过以一种序列特异性寡核苷酸探针对编码所述突变的所述人免疫缺陷病毒进行杂交来检测在所述反转录酶（“RT”）中所述突变的所述存在或缺失，其中杂交的发生提示所述突变的所述存在或缺失。在另一个实施方案中，通过测定编码所述突变的核酸序列检测在所述 RT 中的所述突变的所述存在或缺失。在另一个实施方案中，通过由例如 PCR 扩增核酸检测在所述 RT 中的所述突变的所述存在或缺失。在另一个实施方案中，所述受试者正在进行或曾经进行过抗病毒性药物的在先治疗。在一个实施方案中，抗病毒性药物为 NNRTI。

10 在另一个方面，本发明提供了一种长度在大约 10 和大约 40 个核苷酸之间的编码 HIV 中的 HIV 反转录酶的一部分的分离的寡核苷酸，其包含在所述 HIV 中所述反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位点 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上的突变，其中所述突变与对蛋白酶抑制物的减弱的敏感性相关，条件是所述突变不是 P236L。

4. 附图简述

图 1 给出一种复制能力测定的图示说明。

图 2 给出概括在突变的存在和突变对以及复制能力之间的联系的图表。

20 图 3 给出概括重组病毒的复制能力的图表，所述重组病毒在反转录酶内的相同位置包含不同的氨基酸取代。

图 4 给出表明利用复制能力分析进行的复制能力测量与利用复制竞争分析进行的测量相一致的图表。

25 图 5 给出表明 L74V 部分地恢复了含有 G190 突变的重组病毒的受损的复制能力的图表。

图 6 给出了表明含有有害的 G190 突变的源自病人的病毒的复制能力的图表。

图 7 给出显示 K103N 和其它 NNRTI 突变的效果为大致累积性的图表。

30 图 8 给出阐明了药物浓度与在反转录酶相同氨基酸位点上不同取代突变的复制能力之间的关系。图 8A 阐明了地拉韦啉与对于在反转录酶相同氨基酸位点上不同取代突变的复制能力之间的关系。图

8B 阐明了依非韦伦与对于在反转录酶相同氨基酸位点上不同取代突变的复制能力之间的关系。图 8C 阐明了奈韦那平与对于在反转录酶相同氨基酸位点上不同取代突变的复制能力之间的关系。

5 图 9 给出阐明在 K101P 缺失(白色框)和存在(灰色框)时 NNRTI 敏感性的分布的图表。

图 10 给出阐明在 K103R+V179D 缺失(白色框)和存在(灰色框)时 NNRTI 敏感性的分布的图表。

5. 发明详述

10 本发明提供开发和应用检测非核苷反转录酶抑制物 (NNRTI) 抗性病毒的复制能力的方法和组合物的方法和组合物。该方法和组合物是基于对一组重组病毒载体的分析之上的, 利用包含一个或多个反转录酶 (RT) 氨基酸取代的定点突变来产生所述载体。本发明的方法和组合物通过提供对于设计更有效的抗病毒治疗剂有用的信息而显著地
15 提高病人生活的质量。另外, 通过避免给药无效的药物, 节约了可观的时间和金钱。

5.1 缩写

“NRTI” 是对核苷反转录酶抑制物的缩写。

“NNRTI” 是对非核苷反转录酶抑制物的缩写。

20 “RT” 是对反转录酶的缩写。

“PCR” 是对“多聚酶链式反应”的缩写。

本文中所用的对于 20 种遗传编码的 L-氨基酸的氨基酸符号是常规的并且如下:

氨基酸	单符号缩写	三符号缩写
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
蛋氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val

除非另外注明，当多肽序列以一系列单字母和/或三字母缩写给出时，根据通常的惯例序列是以 N→C 方向给出的。

- 5 本文中 AN 表示序列中的个别的氨基酸，其中 A 为序列中氨基酸的标准单符号标志，而 N 为序列中的位置。在此突变表示为 A_1NA_2 ，其中 A_1 为参照蛋白质序列中氨基酸的标准单符号标志， A_2 为突变的蛋白质序列中氨基酸的标准单符号标志，而 N 为氨基酸序列中的位置。例如，一个 G25M 突变代表在氨基酸位点 25 由甘氨酸到蛋氨酸的
- 10 变化。在此突变也可以表示为 NA_2 ，其中 N 为氨基酸序列中的位置而 A_2 为突变的蛋白质序列中氨基酸的标准单符号标志（例如，25M，为在

氨基酸位点 25 由野生型氨基酸到蛋氨酸的变化)。此外,在此突变也可以表示为 A_1N , 其中 A_1 为参照蛋白质序列中氨基酸的标准单符号标志, 而 N 为氨基酸序列中的位置(例如, G_{25} 代表在氨基酸位点 25 由甘氨酸到任何氨基酸的变化)。一般在突变的蛋白质序列中的氨基酸是未知的, 或者假如在突变蛋白质序列中的氨基酸能够是除了参照蛋白质序列中发现的氨基酸之外的任何氨基酸时使用这种符号。基于蛋白质的全长序列对氨基酸位点进行计数, 包含突变的区域源自该蛋白质。在 DNA 序列中的核苷酸和点突变的表示方法是相似的。

在整个说明书中所用的指代包含特异性碱基序列的核酸的缩写为传统的单符号缩写。因而, 当包括在核酸中时, 自然发生的编码碱基缩写如下: 腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。除非另外指定, 表示为一系列单符号缩写的单链核酸序列, 以及双链序列的上链以 $5' \rightarrow 3'$ 给出。

5.2 定义

如本文所用的, 下列术语具有以下含义:

除非另外指定, “主要突变”指影响酶活性位点的突变, 即那些涉及酶-底物复合物的, 或当病毒经受抗病毒剂的选择压力时可重复性地出现在复制早期循环的, 或对抗病毒剂的表型敏感性具有重大影响的氨基酸位置。

“次要突变”指不是主要突变并对减弱敏感性有所作用或代偿由主要突变所引起的严重缺陷的突变。

“表型分析”是测量病毒(如 HIV)对于特异的抗病毒剂的敏感性的试验。

“基因型分析”是检测生物、生物的一部分、基因或基因的一部分的基因序列的试验。这样的分析经常在 HIV 中进行以确定某些突变是否与呈现的抗药性相关联。

如本文所用的, “基因型数据”是有关例如病毒的基因型的数据。基因型数据的例子包括但不限于病毒、病毒的一部分、病毒基因、病毒基因的一部分的核苷酸或氨基酸序列, 或一种或多种在病毒核酸或蛋白质中的核苷酸或氨基酸残基的鉴定。

“敏感性”指病毒对于一种特定药物的反应。对于一种药物具有降低的或减弱的敏感性的病毒具有对该药物增强的抗性或降低的敏感

性。对于一种药物具有增强的或更大的敏感性的病毒具有对该药物增强的敏感性或降低的抗性。

病毒对于给定药物的表型敏感性是一个连续统。但是，确定一个或几个阈值以简化特定倍数变化的结果的解释在实践上是有用的。对于已经收集了足够临床结果数据的药物，有可能确定一个如下的“临床截止值”。

“临床截止值”指一个特定的点，在此点抗性开始而敏感性终止。它由药物敏感性水平所限定，在此水平上病人用特定药物的治疗失败的可能性提高。如在临床研究中所检测的，对于不同的抗病毒剂截止值有所不同。在临床试验中通过评估抗性和结果数据对临床截止值进行确定。在治疗起始对药物敏感性（表型的）进行测量。在治疗过程中于预定的时间点对治疗反应，如病毒负荷的变化进行监测。药物敏感性与治疗反应相关而临床截止值由抗性水平进行测定，所述抗性水平与治疗失败（全部试验结果的统计分析）相关联。

“ IC_n ”指抑制性浓度。它是抑制致病微生物（如 HIV）繁殖 $n\%$ 所需的病人血液中或在体外的药物浓度。因而，“ IC_{50} ”指抗病毒剂的浓度，在这种浓度下，不存在药物时观察到的病毒复制被抑制了 50%。

“病人 IC_{50} ”指抑制病人的病毒复制的 50% 所需的药物浓度而“参照 IC_{50} ”指抑制参照或野生型病毒复制的 50% 所需的药物浓度。类似地，“ IC_{90} ”指抑制病毒复制 90% 的抗病毒剂的浓度。

“倍数变化”是病人病毒与药物敏感性参照病毒的药物敏感性的数量比较。它是病人 IC_{50} 对药物敏感性参照 IC_{50} 的比率，即病人 IC_{50} / 参照 IC_{50} = 倍数变化（“FC”）。1.0 的倍数变化表示病人病毒显示与药物敏感性参照病毒相同程度的药物敏感性。小于 1 的倍数变化表示病人病毒比药物敏感性参照病毒更敏感。大于 1 的倍数变化表示病人病毒比药物敏感性参照病毒更不敏感。等于或大于临床截止值的倍数变化意味着病人病毒具有对于该药物反应的较低的可能性。小于临床截止值的倍数变化意味着病人病毒对该药物是敏感性的。

如果病毒具有一种特性，例如，一种与受损复制能力相关的突变，该病毒就有“具有受损的复制能力的可能性提高”。如果具有该特性的病毒种群平均起来相对于缺少该特性的其它方面类似的病毒种群具有受损的复制能力，那么病毒的这种特性就与受损的复制能力相关

联。因而，在该特性的存在与受损的复制能力之间的联系不需要是绝对的，也没有该特性对于受损的复制能力是必要的（即，该特性在受损的复制能力中起着原由性的作用）或充分的（即，该特性自身的存在是充分的）要求。

5 本文中术语“%序列同源性”与术语“%同源性”、“%序列同一性”和“%同一性”可以互换使用，指当利用一种序列比对程序进行比对时在两种或更多种肽序列之间的氨基酸序列同一性水平。例如，如本文所用的，80%同源性意指与通过一种固定算法所测定的80%的序列同一性相同的事物，并且相应地一个给定序列的同源物具有对于
10 给定序列长度上的大于80%的序列同一性。示例性的序列同一性水平包括，但不限于对一个给定序列的60、70、80、85、90、95、98%的或者更大的序列同一性。

能够用于测定两个序列间的同一性的示例性的计算机程序包括，但不限于一组BLAST程序，例如BLASTN、BLASTX和TBLASTX、
15 BLASTP以及TBLASTN，这些程序在因特网上于<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>上是公众可获得的。也参见Altschul等，1990，J.Mol.Biol.215:403-10（特别参考公开的默认设置，即参数w=4，t=17）以及Altschul等，1997，Nucleic Acids Res.，25:3389-3402。当相对于GenBank蛋白质序列以及其它公共数据库中的氨基酸序列评估一个给定的氨基酸序列时，一般利用BLASTP程序
20 进行序列检索。BLASTX程序优选用于相对于GenBank蛋白质序列以及其它公共数据库中的氨基酸序列检索已在全部阅读框进行了翻译的核酸序列。BLASTP和BLASTX二者都利用默认参数OPEN GAP PNALTY11.0和extended gap penalty1.0，并利用BLOSUM-62矩阵来
25 运行。参见Altschul等，1997。

优选使用例如在MacVector版本6.5中的CLUSTAL-W程序来进行一种优选的选择序列的比对，以测定在两个或更多序列之间的“%同一性”，所述程序以默认程序运行，包括OPEN GAP PNALTY11.0和extended gap penalty 1.0，以及BLOSUM 30相似性矩阵。

30 “极性氨基酸”指一种具有在生理pH下不带电荷的侧链的亲水氨基酸，但它具有至少一个键，其中由两个原子所共享的电子对被其中一个原子控制得更近。通常编码的极性氨基酸包括Aln(N)、Gln(Q)、

Ser (S) 和 Thr (T)。

“非极性氨基酸”指一种具有在生理 pH 下不带电荷的侧链的疏水氨基酸，它具有一些键，其中由两个原子所共享的电子对通常由两个原子中的每个同等地控制（即，侧链不是极性的）。通常编码的非极性氨基酸包括 Ala (A)、Gly (G)、Ile (I)、Leu (L)、Met (M) 和 Val (V)。

“亲水性氨基酸”指一种显示疏水性小于 0 的的氨基酸，根据 Eisenberg 等 (Eisenberg 等, 1984, J.Mol.Biol.179:125-142) 的标准化的一致疏水性标准。遗传编码的亲水性氨基酸包括 Arg (R)、Asn (N)、Asp (D)、Glu (E)、Gln (Q)、His (H)、Lys (K)、Ser (S) 和 Thr (T)。

“疏水性氨基酸”指一种显示疏水性大于 0 的氨基酸，根据 Eisenberg 等 (Eisenberg 等, 1984, J.Mol.Biol.179:125-142) 的标准化的一致疏水性标准。遗传编码的疏水性氨基酸包括 Ala (A)、Gly (G)、Ile (I)、Leu (L)、Met (M)、Phe (F)、Pro (P)、Trp (W)、Tyr (Y) 和 Val (V)。

“酸性氨基酸”指具有小于 7 的侧链 pK 值的亲水性氨基酸。由于丢失了氢离子，酸性氨基酸在生理 pH 下一般具有带负电的侧链。遗传编码的酸性氨基酸包括 Asp (D) 和 Glu (E)。

“碱性氨基酸”指具有大于 7 的侧链 pK 值的亲水性氨基酸。由于与水合氢离子的结合，碱性氨基酸在生理 pH 下一般具有带正电的侧链。遗传编码的碱性氨基酸包括 Arg (R)、His (H) 和 Lys (K)。

“突变”是相对于参照核酸或多肽在氨基酸序列或在相应的核酸序列中的改变。对于含有 HIV 蛋白酶或反转录酶的实施方 案，编码蛋白酶或反转录酶的参照核酸分别是存在于 NL4-3HIV 中的蛋白酶或反转录酶的编码序列 (GenBank 登录号 AF324493)。同样，参照蛋白酶或反转录酶多肽是由 NL4-3HIV 序列所编码的。尽管肽的氨基酸序列可以直接通过例如 Edman 降解或质谱分析来测定，但更一般地，肽的氨基酸序列由编码该肽的核酸的核苷酸序列所推理。能够使用本领域已知的任何测定核酸序列的方法，例如 Maxam-Gilbert 测序 (Maxam 等, 1980, Methods in Enzymology 65:499)、双脱氧法测序 (Sanger 等, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463) 或基于杂交的方法 (参

见例如, Sambrook 等, 2001, 分子克隆:实验指南, 冷泉港实验室, 第三版, 纽约; 以及 Ausubel 等, 1989, 分子生物学现代方法, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 纽约)。

病毒中的“抗性相关突变”(“RAM”)是与对抗病毒剂的减弱的敏感性相关联的突变。RAM能够在几种病毒,包括但不限于人免疫缺陷病毒(“HIV”)中发现。这样的突变能够在一种或多种病毒蛋白中发现,例如,在HIV的蛋白酶、整合酶、包膜或反转录酶中。相对于参照株定义RAM。对于含有HIV蛋白酶的发明实施方案,参照蛋白酶是存在于NL4-3HIV中的蛋白酶(GenBank登录号AF324493)。

“突变体”是具有相对于参照病毒、基因或蛋白质的一种或多种变化的序列的病毒、基因或蛋白质。

术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在全文可以相互交换使用。

术语“参照”和“野生型”在全文可以相互交换使用。

术语“多聚核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”在全文可以相互交换使用。

5.3 与受损复制能力相关联的突变

本发明提供在HIV反转录酶中包含与NNRTI的抗性和受损复制能力相关联的突变的核酸和多肽。优选地,HIV为人免疫缺陷病毒1型(“HIV-1”)。NNRTI的例子包括但不限于奈韦那平(“NVP”)、地拉韦啉(“DLV”)或依非韦伦(“EFV”)。

在一方面,本发明提供在HIV反转录酶中包含与NNRTI的抗性和受损复制能力相关联的突变的肽、多肽或蛋白质。本发明的多肽包括由这些多肽改进的或源自这些多肽的肽、多肽和蛋白质。在一个实施方案中,多肽包含翻译后的修饰。

在一个实施方案中,本发明提供源自HIV反转录酶并包含在选自98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225和236的氨基酸位置上的突变的多肽。在一个更加特别限定的实施方案中,突变选自A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S和G190V。

在另一个实施方案中,本发明提供一种源自HIV反转录酶并包含在两个或多个氨基酸位置上突变的组合的多肽。这种组合的例子包括

但不限于 P236L、K103N 和 Y181C；V106A 和 Y181C；K103N 和 G109S；P236L 和 K103N；L100I、K103N 和 G190S；P236L 和 Y181C；K103N 和 G190A；K103N 和 Y188L；K103N 和 Y181C；L100I 和 K103N；K103N、Y181C 和 P225H；Y181C 和 A98G。

5 在另一方面，本发明提供编码本发明的多肽或其生物学活性部分或与之有关的多聚核苷酸、寡核苷酸或核酸，包括例如足以用作杂交探针、PCR 引物或测序引物的核酸分子，以鉴定、分析、诱变或扩增本发明的核酸。

核酸能够是任何长度的。核酸能够是，例如至少 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 10 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 或 500 个核苷酸长。核酸能够是，例如，小于 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, 15 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 或 20 10000 个核苷酸长。在一个优选的实施方案中，核酸具有适于检测本文所述的突变的长度和序列，例如作为一种探针或引物。

在另一个实施方案中，本发明提供了适于用作引物或杂交探针以检测本发明的核酸序列的核酸分子。本发明的核酸分子能够仅包含编码本发明的全长多肽的核酸序列的一部分，例如一种能够用作探针或 25 引物的片段或一种编码本发明的多肽的生物学活性部分的片段。探针能够包含附于其上的标记基团，例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。在多个实施方案中，本发明的核酸分子能够在碱基部分、糖部分或磷酸骨架上进行修饰。

5.4 发现与受损复制能力相关联的突变

30 在另一个方面，本发明提供发现与病毒或病毒衍生物中的受损复制能力相关联的突变的方法。

5.4.1 病毒和病毒样品

根据本发明的与受损复制能力相关联的突变能够存在于任何类型的病毒中，例如在动物中发现的任何病毒。在本发明的一个实施方案中，病毒包括已知感染哺乳动物，包括狗、猫、马、羊、牛等的病毒。在一个优选的实施方案中，已知病毒感染灵长类。在一个更加优选的实施方案中已知病毒感染人类。人类病毒的例子包括但不限于人免疫缺陷病毒（“HIV”），单纯疱疹病毒，巨细胞病毒，水痘带状疱疹，其他人疱疹病毒，流感 A 病毒，呼吸道合胞体病毒，甲肝、乙肝和丙肝病毒，鼻病毒和人乳头状瘤病毒。在本发明的一个优选的实施方案中，病毒为 HIV。优选地，病毒为人免疫缺陷病毒 1 型（“HIV-1”）。前述为某些目前已有抗病毒化疗法的病毒的代表，并代表病毒家族逆转录病毒类、疱疹病毒类、正粘病毒类、paramyxovirus、小核糖核酸病毒、黄病毒、肺病毒和嗜肝 DNA 病毒类。本发明能够用于归因于这些家族内的其它病毒的病毒性感染以及目前尚无疗法的起于其它病毒家族中的病毒的病毒性感染。

根据本发明的与受损复制能力相关联的突变能够在通过任何本领域公知的获得病毒样品的方法所获得的病毒样品中发现。这样的方法包括，但不限于从感染了病毒的人或动物中获得病毒或从病毒培养物中获得病毒。在一个实施方案中，从感染了病毒的人类个体中获得病毒样品。病毒样品能够从感染个体的身体的任何部分或任何有望含有病毒的分泌物中获得。这些部分的例子包括但不限于血液、血清、血浆、痰、淋巴液、精液、阴道粘液以及其它体液样品。在一个优选的实施方案中，样品为血液、血清或血浆样品。

在另一个实施方案中，根据本发明的与受损复制能力相关联的突变存在于能够从培养物中获得的病毒中。在一些实施方案中，培养物能够从实验室获得。在另一些实施方案中，培养物能够从保藏中心获得，例如美国典型培养物保藏中心。

在某些实施方案中，根据本发明的与受损复制能力相关联的突变存在于病毒的衍生物中。在一个实施方案中，病毒衍生物自身并不是致病性的。在另一个实施方案中，病毒衍生物是基于质粒的系统，其中质粒或以该质粒转染的细胞的复制受选择压力存在与否的影响，从而选择对选择压力抗性增强的突变。在一些实施方案中，病毒衍生物包括目标核酸或蛋白质，例如为一种抗病毒治疗所靶向的核酸或蛋白

质。在一个实施方案中，目标基因能够整合于一种载体中。参见，例如美国专利号 5,837,464 和 6,242,187 以及 PCT 公开文本 WO99/67427，在此并入每一篇作为参考。在一个优选的实施方案中，基因可以是编码蛋白酶或反转录酶的那些。

5 在另一个实施方案中，不需要使用完整的病毒。相反，能够使用整合入载体的病毒的一部分。优选使用受抗病毒药物所靶向的病毒的那部分。

在另一个实施方案中，根据本发明的与受损复制能力相关联的突变存在于经过遗传修饰的病毒中。病毒能够利用任何本领域公知的遗传修饰病毒的方法进行遗传修饰。例如，该病毒能够在实验室培养物中生长所期望的代数。在一个实施方案中，没有应用选择压力（即，病毒没有进行有利于具有某些特性的病毒的复制的处理），新的突变通过随机遗传漂移积累。在另一个实施方案中，当病毒生长在培养物中时应用选择压力（即，病毒生长在有利于具有一种或多种特性的病毒

15 的复制的条件下）。在一个实施方案中，选择压力为抗病毒处理。能够使用任何已知的抗病毒处理作为选择压力。在一个实施方案中，病毒为 HIV 而选择压力为 NNRTI。在另一个实施方案中，病毒为 HIV-1 而选择压力为 NNRTI。能够使用任何 NNRTI 以施加选择压力。NNRTI 的例子包括但不限于 NVP、DLV 和 EFV。通过以一种 NNRTI 处理体外培养的 HIV，能够选择具有对 NNRTI 增强的抗性的 HIV 突变株。

20 能够控制选择压力的严格性以提高或降低不具有待选择特性的病毒的存活。

在另一方面，根据本发明的与受损复制能力相关联的突变通过诱变病毒、病毒基因组或病毒基因组的一部分来产生。本领域公知的任何诱变方法都能够用作这一目的。在一个实施方案中，诱变基本上是

25 随机的。在另一个实施方案中，基本上随机的诱变通过将病毒、病毒基因组或病毒基因组的一部分暴露于诱变处理中进行。在另一个实施方案中，将编码病毒蛋白质的基因进行诱变，所述蛋白质为一种抗病毒疗法的靶。基本上随机的诱变处理的例子包括，例如暴露于诱变物质（例如，溴化乙锭、甲磺酸乙酯、乙基亚硝基脲（ENU）等）、

30 射线（例如，紫外光）、可换位元件的插入和/或去除（例如，Tn5，Tn10），或在具有提高的突变率的细胞、细胞提取物或体外复制系统

中的复制。参见，例如 Russell 等，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. 本领域技术人员会理解尽管这些诱变方法的每一种在分子水平上都是基本上随机的，每一种却有它自己优选的靶向。

在另一个方面，通过定点突变生产与受损的复制能力相关联的突变。能够使用本领域公知的任何定点突变方法（参见例如，Sambrook 等，2001，分子克隆：实验指南，冷泉港实验室，第三版，纽约；以及 Ausubel 等，1989，分子生物学现代方法，Greene Publishing Associates and Wiley Interscience，纽约）。定点突变能够定向于，例如特定的基因或基因组区域、基因或基因组区域的特定部分，或基因或基因组区域内的一个或几个特定的核苷酸。在一个实施方案中，定点突变定向于病毒基因组区域、基因、基因片段，或基于一个或多个标准的核苷酸。在一个实施方案中，将基因或基因的一部分进行定点突变，因为它编码已知或怀疑是一种抗病毒疗法的靶的蛋白质，例如编码 HIV 反转录酶的基因。在另一个实施方案中，选择基因的一部分，或在基因中的一个或几个核苷酸进行定点突变。在一个实施方案中，进行突变的核苷酸编码已知或怀疑与抗病毒化合物相互作用的氨基酸残基。在另一个实施方案中，进行突变的核苷酸编码已知或怀疑在具有受损复制能力的病毒株中进行了突变的氨基酸残基。在另一个实施方案中，突变的核苷酸编码毗连或邻近蛋白质残基一级序列的氨基酸残基，所述一级序列已知或怀疑与一种抗病毒化合物相互作用或已知或怀疑在具有受损复制能力的病毒株中进行了突变。在另一个实施方案中，突变的核苷酸编码毗连或邻近蛋白质残基的二级、三级或四级结构的氨基酸残基，所述二级、三级或四级结构已知或怀疑与一种抗病毒化合物相互作用或已知或怀疑在具有受损复制能力的病毒株中进行了突变。在另一个实施方案中，突变的核苷酸编码在蛋白质活性位点中或其附近的氨基酸残基，所述活性位点已知或怀疑与一种抗病毒化合物相结合。参见，例如 Sarkar 和 Sommer, 1990, Biotechniques, 8:404-407。

5.4.2 检测在病毒中的突变的存在或缺失

在病毒中根据本发明的与受损复制能力相关联的突变的存在或缺

失能够通过本领域公知的检测突变的方法来进行检测。能够在编码一种特定蛋白质的病毒基因中，或在蛋白质自身中，即在蛋白质的氨基酸序列中检测突变。

5 在一个实施方案中，突变在病毒基因组中。这样的突变能够在，例如编码一种病毒蛋白质的基因中，在编码病毒蛋白质的基因的顺式或反式作用调控序列，基因间序列或内含子序列中。突变能够影响病毒的结构、功能、复制或环境的任何方面，所述病毒改变其对于抗病毒处理的敏感性。在一个实施方案中，突变在编码一种抗病毒处理的靶的病毒蛋白质的基因中。

10 能够利用多种技术检测病毒基因中的突变。病毒 DNA 或 RNA 能够用作这种分析技术的起始点，并可以根据本领域技术人员所公知的标准方法来进行分离。

在具体核酸序列，如在病毒基因的特定区域中的突变的检测，能够通过各种方法来完成，包括但不限于基于等位基因特异性的限制性内切酶剪切的限制性片段长度多态检测 (Kan 和 Dozy, 1978, *Lancet* ii:910-912)，错配修复检测 (Faham 和 Cox, 1995, *Genome Res* 5:474-482)，MutS 蛋白质的结合 (Wagner 等, 1995, *Nucl Acids Res* 23:3944-3948)，变性梯度凝胶电泳 (Fisher 等, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:1579-83)，单链构像多态检测 (Orita 等, 1983, *Genomics* 5:874-879)，在错配碱基对上的 RNA 酶剪切 (Myers 等, 1985, *Science* 230:1242)，化学的 (Cotton 等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:4397-4401) 或酶学的 (Youil 等, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:87-91) 异源双链体 DNA 的剪切，基于寡核苷酸特异性引物延伸的方法 (Syvanen 等, 1990, *Genomics* 8:684-692)，遗传小片段分析 (Nikiforov 等, 1994, *Nucl Acids Res* 22:4167-4175)，寡核苷酸连接分析 (Landegren 等, 1988, *Science* 241:1077)，寡核苷酸特异性连接链式反应 ("LCR") (Barrany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:189-193)，gap-LCR (Abravaya 等, 1995, *Nucl Acids Res* 23:675-682)，利用本领域公知的标准方法的放射活性或荧光 DNA 测
20 序，以及肽核酸 (PNA) 分析 (Orum 等, 1993, *Nucl. Acids Res.* 21:5332-5356; Thiede 等, 1996, *Nucl. Acids Res.* 24:983-984)。

此外，病毒 DNA 或 RNA 可以用在杂交或扩增分析中以检测涉及

基因结构的异常，包括点突变、插入、缺失和基因组重排。这些分析可以包括但不限于 Southern 分析 (Southern, 1975, J Mol. Biol. 98:503-517)、单链构象多态分析 (SSCP) (Orita 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766-2770) 和 PCR 分析 (美国专利号 4,683,202; 4,683,195; 4,800,159; 和 4,965,188; PCR 策略, 1995 Innis 等 (编辑), Academic Press, Inc.)。

这样的检测基因特异性突变的诊断性方法能够包括例如，在有利于这些试剂与它们的互补序列的特异性退火的条件下，将病毒核酸与一种或多种标记过的核酸试剂一起接触并进行温育，所述核酸试剂包括重组 DNA 分子、克隆的基因或其降解变异体。优选地，这些核酸试剂的长度至少为 15 到 30 个核苷酸。温育后，将所有未退火的核酸从核酸分子杂交体中去除。随后检测已杂交核酸的存在，如果任何这样的分子存在的话。利用这样的检测方案，来自病毒的核酸能够固定到例如一种固体支持物上如膜，或塑料表面如在微量滴定板或聚苯乙烯珠上的表面。在这种情况下，温育后上面描述的那类非退火的、标记过的核酸试剂得以轻易地去除。利用本领域技术人员公知的标准技术完成剩余的、退火的、标记过的核酸试剂的检测。能够将核酸试剂退火上的基因序列与正常基因所预期的退火模式相比较以测定是否存在基因突变。

对于检测基因特异性核酸分子的选择性诊断方法可以包括它们的扩增，例如通过 PCR (美国专利号 4,683,202; 4,683,195; 4,800,159; 和 4,965,188; PCR 策略, 1995 Innis 等 (编辑), Academic Press, Inc.)，随后利用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。如果扩增的核酸仅包含各自基因的正常拷贝，得到的扩增序列能够与那些预期的序列相比较以确定基因突变是否存在。

此外，能够通过本领域公知的任何测序方法对核酸进行测序。例如，病毒 DNA 能够通过 Sanger 等 (Sanger 等, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463) 的双脱氧法，如 Messing 等 (Messing 等, 1981, Nuc. Acids Res. 9:309) 进一步描述的，或通过 Maxam 等 (Maxam 等, 1980, Methods in Enzymology 65:499) 的方法进行测序。还参见在 Sambrook 等, 2001, 分子克隆:实验指南, 冷泉港实验室, 第三版, 纽约; 以及 Ausubel 等, 1989, 分子生物学现代方法, Greene Publishing

Associates and Wiley Interscience, 纽约中所描述的技术。

针对病毒基因产物, 即病毒蛋白质或病毒肽片段的抗体也能够用于检测在病毒蛋白质中的突变。或者, 目标病毒蛋白质或肽片段能够通过本领域公知的测序方法进行测序从而获得目标蛋白质的氨基酸序列。这种方法的一个例子是 Edman 降解法, 它能够用于对小蛋白质或多肽进行测序。大的蛋白质能够首先通过本领域公知的化学的或酶的试剂, 例如溴化氰、羟胺、胰蛋白酶或糜蛋白酶进行剪切, 随后通过 Edman 降解法进行测序。

5.5 测量突变体病毒的表型敏感性

能够利用本领域的任何已知方法测定突变体病毒或病毒种群对于抗病毒疗法的表型敏感性。参见例如, 美国专利号 5,837,464 和 6,242,187, 在此将它们的全部内容并入作为参考。在一些实施方案中进行表型分析, 即相对于没有突变的参照病毒的敏感性分析病毒对于给定的抗病毒剂的敏感性。这是一种直接的定量的药物敏感性测量并能够通过任何本领域公知的测定病毒对抗病毒剂的敏感性的方法来进行。这种方法的例子包括但不限于测定相对于参照病毒的 IC_{50} 的倍数变化。表型试验测量一种特定的病毒株在体外药物抑制物存在时生长的能力。相对于抑制参照病毒所需要的药物量, 当需要较多的药物抑制病毒活性时, 该病毒对这种特定的药物较不敏感。

在一个实施方案中, 进行表型分析并用来计算药物对病毒株的 IC_{50} 或 IC_{90} 。分析的结果也能够表示为与药物敏感性对照株或来自同一个病人的以前的病毒株相比每个病毒株在 IC_{50} 或 IC_{90} 中的倍数变化。由于病毒直接暴露于每种已有的抗病毒药物, 能够将结果直接与治疗反应联系起来。例如, 如果病人的病毒显示对于一种特定药物的抗性, 就会避免这种药物或将其从病人的治疗方法中去除, 使得医生能够设计一种在较长时期内可能更有效的治疗计划。

在另一个实施方案中, 利用重组病毒分析 (“RVAs”) 进行表型分析。RVAs 利用由在病毒载体和病毒基因序列之间的同源重组产生的病毒系, 该病毒载体为 HIV 载体而病毒基因序列为蛋白酶和/或反转录酶序列。

在一个优选的实施方案中, 利用 PHENOSENSE™ (ViroLogic Inc., South San Francisco, CA) 进行表型分析。参见 Petropoulos 等,

2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:920-928; 美国专利号 5,837,464 和 6,242,187。PHENOSENSE™ 是一种表型分析法，它具有表型试验的优点并克服了以前分析法的缺点。由于该分析法已经自动化，PHENOSENSE™ 在控制的条件下提供更高的通量。结果是一种分析法，它精确地确定病人 HIV 分离物对于所有当前存在的抗反转录病毒药物的敏感性曲线，并在样品收到的大约 10 至 15 天将结果直接传递给医生。PHENOSENSE™ 是精确的并能够仅以一个病毒复制周期获得结果，因而避免了病毒亚种群的筛选。结果是定量的，测量药物敏感性的变化度，并且是灵敏的—该试验能够在病毒负载为大约 500 拷贝/mL 的血液样本上进行并且能够在总病毒种群的 10% 或更少的浓度上检测一些抗药病毒的少数种群。另外，结果是可重复的并且依赖于药物在大约 95% 进行的分析中具有小于大约 1.4-2.5 倍变化。

PHENOSENSE™ 能够用来自扩增的病毒基因序列的核酸进行。如在 5.4.1 部分所讨论的，含有病毒的样品可以是来自感染了病毒的人或动物的样品或是来自病毒细胞的培养物的样品。在一个实施方案中，病毒样品包含经过遗传修饰的实验室株。

随后通过使用任何本领域公知的将基因序列整合入载体中的方法将扩增的病毒基因序列整合入复制缺陷的病毒载体中。在一个实施方案中，使用限制性酶和传统的克隆方法。参见 Sambrook 等，2001，分子克隆：实验指南，冷泉港实验室，第三版，纽约；以及 Ausubel 等，1989，分子生物学现代方法，Greene Publishing Associates and Wiley Interscience，纽约。在一个优选的实施方案中，使用 *ApaI* 和 *PinAI* 限制性酶。优选地，复制缺陷的病毒载体为指示剂基因病毒载体 ("IGVV")。在一个优选的实施方案中，病毒载体包含检测 RTV 复制的工具。优选地，病毒载体包含虫荧光素酶表达盒。

该分析能够通过首先以 RTV DNA 和一种质粒共转染宿主细胞进行，所述细胞表达另一种反转录病毒，例如双嗜性鼠白血病病毒 (MLV) 的包膜蛋白。转染后，能够收获病毒颗粒并用于感染新鲜的靶细胞。通过检测包含在载体中的复制的方法能够检测病毒复制单个周期的完成。在一个优选的实施方案中，病毒复制单个周期的完成导致虫荧光素酶的生产。在转染步骤或感染步骤都加入系列浓度的抗病毒剂。

通过比较在抗病毒剂存在或不存在时载体的复制能够测量对于抗病毒剂的敏感性。例如，对于抗病毒剂的敏感性能够通过比较在抗病毒剂存在或不存在时虫荧光素酶的活性进行测量。敏感性的病毒在抗病毒剂存在时会产生低水平的虫荧光素酶活性，而具有减弱的敏感性的病毒会产生较高水平的虫荧光素酶活性。

在优选的实施方案中，在评价 HIV-1 对于抗病毒药物的表型敏感性中使用 PHENOSENSE™。优选地，抗病毒药物为 NNRTI。在优选的实施方案中，参照病毒株为 HIV NL4-3 株或 HXB-2 株。

在一个实施方案中，病毒核酸，例如 HIV-1 RNA 由血浆样品中提取，病毒基因的片段或完整的病毒基因能够通过如，但不限于 PCR 的方法进行扩增。参见例如，Hertogs 等，1998, *Antimicrob Agents Chemother* 42 (2):269-76。在一个实施例中，通过巢式反转录-PCR 扩增了包含完整的 HIV-1 PR 和 RT 编码序列的 2.2kb 片段。扩增的核酸，例如 PR-RT-编码序列的合并物随后与 pGEMT3deltaPRT 质粒共转染入一种宿主细胞如 CD4+T 淋巴细胞 (MT4) 中，从所述质粒中删除了大多数的 PR (密码子 10-99) 和 RT (密码子 1 到 482) 序列。同源重组导致包含病毒编码序列，如源自血浆中 HIV-1 RNA 的 PR 和 RT 编码序列的嵌合病毒的产生。嵌合病毒对于所有当前现有的靶向转染基因产物 (例如，proRT 和/或 PR 抑制物) 的抗病毒剂的敏感性，能够通过任何本领域公知的细胞活力分析法进行测定。例如，在一种允许高样品通量的自动系统中能够使用一种基于 MT4 细胞-3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-溴化二苯基四唑 (镱) 的细胞活力分析法。对于所有抗病毒剂，如 RT 和 PR 抑制物的抗性曲线能够在单一的 PR-RT-Antivirogram 中得以图解式地呈现。

能够使用其它的本领域技术人员公知的评价一种病毒对于抗病毒药物的表型敏感性的分析法。参见，例如 Shi 和 Mellors, 1997, *Antimicrob Agents Chemother*. 41 (12):2781-85; Gervais 等, 1997, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94 (9):4653-8; Race 等, 1999, *AIDS* 13:2061-2068, 在此并入它们的全部内容作为参考。

在另一个实施方案中，通过分析在抗病毒治疗存在时抗病毒处理的靶的活性来测定一种病毒对于抗病毒治疗的治疗的敏感性。在一个实施方案中，病毒为 HIV，抗病毒处理为蛋白酶抑制物，而抗病毒处

理的靶为 HIV 蛋白酶。参见，例如美国专利号 5,436,131、6,103,462，在此并入它们的全部内容作为参考。

5.6 将突变与受损的复制能力相联系

任何本领域公知的方法都能够用于测定一种突变是否与受损的复制能力相联系。在一个实施方案中，利用 P 值测定这种联系的统计学显著性，P 值越小，测量也就越显著。优选地 P 值会小于 0.05。更优选地，P 值会小于 0.01。P 值能够通过任何本领域技术人员所公知的方法进行计算。在一个实施方案中，利用 Fisher's 精确试验计算 P 值。参见，例如，David Freedman, Robert Pisani 和 Roger Purves, 1980, STATISTICS, W. W. Norton, 纽约。

5.7 检测受损的复制能力

在另一个方面，本发明提供在病毒中检测受损的复制能力的方法。与受损的复制能力相关联的突变能够如上所述，用任何合适的方法进行鉴定。在病毒中与受损的复制能力相关联的突变的存在能够通过任何本领域公知的方法，例如，如上面所讨论的进行检测。在病毒中与受损的复制能力相关联的突变的存在提示该病毒具有受损复制能力的可能性提高。在一个实施方案中，病毒为人免疫缺陷病毒 (HIV)。在另一个实施方案中，病毒为人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1)。在另一个实施方案中，抗病毒处理为 NNRTI。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种检测 HIV 具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法，包括检测在所述 HIV 的 RT 中与受损复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变在所述 RT 的氨基酸序列的氨基酸位置 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。在另一个实施方案中，突变不是 P236L。

在另一个实施方案，本发明提供了一种检测 HIV 具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法，包括检测在所述 HIV 的 RT 中与受损复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变选自 A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S 和 G190V，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种检测来自受试者的 HIV 具有受损的复制能力的可能性是否提高，包括检测在所述 HIV 的 RT 中与受损复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变在所述 RT 的氨基酸序列的氨基酸位置 98、100、101、103、106、108、179、181、188、190、225 或 236 上，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。在另一个实施方案中，突变不是 P236L。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种检测来自受试者的 HIV 具有受损的复制能力的可能性是否提高，包括检测在所述 HIV 的 RT 中与受损复制能力相关联的突变的存在或缺失，所述突变选自 A98G、L100I、K101E、K103N、V106A、V106I、V106M、Y181C、Y188A、Y188C、Y188H、Y188L、G190A、G190C、G190E、G190T、G190V、G190Q、G190S 和 G190V，其中所述突变的存在提示 HIV 具有受损的复制能力的可能性提高。

6. 实施例

6.1 实施例 1: 利用抗性测试载体测量复制适合度

本实施例提供精确地可重复性地测量 HIV-1 的复制适合度的方法和组合物。测量复制适合度的方法能够适用于其它病毒，包括但不限于肝 DNA 病毒（例如，人乙型肝炎病毒）、黄病毒（例如人丙型肝炎病毒）和疱疹病毒（例如，人巨细胞病毒）。本实施例进一步涉及测量 HIV-1 复制适合度的方法，所述 HIV-1 显示对于反转录酶和蛋白酶抑制物的减弱的药物敏感性。测量复制适合度的方法能够适用于其它类型的 HIV-1 复制抑制物，所述复制包括但不限于整合、病毒装配，以及病毒附着和进入。

利用表型药物敏感性和在美国专利号 5,837,464（国际公开号 WO 97/27319）中所描述的方法进行复制适合度测试，在此引入其全部内容作为参考。

源于病人的相应于 HIV 蛋白酶和反转录酶编码区的片段为利用分离自存在于 HIV 感染个体的血清中的病毒颗粒的病毒 RNA 通过反转录多聚酶链式反应法（RT-PCR）扩增的源于病人的片段，或是通过抗性测试载体 DNA 的亲本克隆的定点突变生产的野生型 HIV-1 的突变体。当用于评价复制适合度时，抗性测试载体也称为“适合度测试载

体”。利用标准方法（例如，RNAGENTSTM 全 RNA 分离系统，Promega, Madison WI or RNazol, Tel-Test, Friendswood, TX）进行病毒 RNA 的分离。RT-PCR 法分为两步。使用一种反转录病毒的反转录酶（例如 Moloney MuLV 反转录酶（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ），或鸟髓母细胞过多症病毒（AMV）反转录酶（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN））将病毒 RNA 拷贝为 cDNA。随后使用一种热稳定的 DNA 聚合酶（例如 Taq（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ），Tth（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ），PRIMEZYMETM（isolated from Thermos brockianus, Biometra, Gottingen, Germany））扩增 cDNA 或利用所描述的热稳定聚合酶的组合以进行“长 PCR”（Barnes, W.M., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 91,2216-20）例如 Expand High Fidelity PCR System（Taq+Pwo），（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）或 GENEAMP XLTM PCR kit（Tth+Vent），（Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ））。

设计 PCR 引物以将 Apa I 和 Age I 识别位点分别引入 PCR 产物的两端。

如在美国专利号 5,837, 464（参见图 1）中所描述的，使用利用病毒 RNA 作为模板和寡核苷酸 PCR6（#1）、PDSApa（#2）和 PDSAge（#3）作为引物通过 RT-PCR 制备的 1.5kB 的扩增 DNA 产物，构建整合了源自“测试”病人的片段的适合度载体，随后以 Apa I 和 Age I 或同切点酶 *pinA1* 进行消化。为了确保相应于得到的适合度测试载体的质粒 DNA 包含存在于给定病人血浆中的 HIV 病毒准种的代表性样品，合并许多（>100）在构建给定的适合度测试载体中获得的独立的大肠杆菌（*E. coli*）转化体并用于质粒 DNA 的制备。

一种编码双嗜性 MuLV 4070A env 基因产物的包装表达载体使得在适合度测试载体宿主细胞中适合度测试载体病毒颗粒的生产成为可能，所述颗粒能够有效地感染人靶细胞。利用编码除了 env 之外的所有 HIV 基因的适合度测试载体转染包装宿主细胞（一旦被转染，宿主细胞就称为适合度测试载体宿主细胞）。将编码双嗜性 MuLV 4070A env 基因产物的包装表达载体与抗性测试载体一起使用，使得在适合度测试载体宿主细胞中感染性假型适合度测试载体病毒颗粒的生产成为

可能。

利用包装宿主和由人胚肾细胞系 293 组成的靶宿主细胞实施以适合度测试载体进行的适合度测试。

5 利用两种宿主细胞型以适合度测试载体实施适合度测试。通过第一宿主细胞（适合度测试载体宿主细胞）生产适合度测试载体病毒颗粒，所述第一宿主细胞通过以适合度测试载体和包装表达载体转染包装宿主细胞进行制备。随后用适合度测试载体病毒颗粒感染第二宿主细胞（靶宿主细胞），在第二宿主细胞中测量指示基因的表达（参见图 1）。

10 构建包含功能性虫荧光素酶基因盒的适合度测试载体并且以适合度测试载体 DNA 转染宿主细胞。适合度测试载体包含源自病人的反转录酶和蛋白酶 DNA 序列，所述序列编码对于抗反转录病毒剂敏感的或抗性的蛋白质，如核苷反转录酶抑制物、非核苷酸转录酶抑制物和蛋白酶抑制物。

15 将在受感染细胞中检测的虫荧光素酶活性量用作“感染性”、“复制能力”或“复制适合度”的直接量度，即病毒完成复制的单个周期的能力。通过比较由源自病人的病毒产生的虫荧光素酶活性量与充分表征的参照病毒（野生型）产生的虫荧光素酶活性量来分析相对适合度，所述参照病毒源自 HIV-1 的分子克隆，例如 NL4-3 或 HXB2。适合度测量表示为参照的百分比，例如参照的 25%、50%、75%、100%
20 或 125%（图 2, 3, 5, 6 和 7）。

将宿主细胞接种在 10cm 直径平皿中并且在以适合度测试载体质粒 DNA 和包膜表达载体铺平板 1 天之后进行转染。利用磷酸钙共沉淀法进行转染。在转染后的 1 到 24 小时，将含有 DNA 沉淀的细胞培养基以新鲜培养基进行替换。在转染后的 1 到 4 天收获含有适合度测试
25 载体病毒颗粒的细胞培养基，并在保存于 -80℃ 之前通过 0.45mm 滤器。如生产商（SIAC; Frederick, MD）所描述的通过一种 ELA 法测定在所收获的细胞培养基中的衣壳蛋白（p24）水平。感染前，将靶细胞（293 和 293/T）在细胞培养基上涂布。使用来自无转染（无 DNA）或含有
30 适合度测试载体质粒 DNA 而无包膜表达质粒的转染的细胞培养基进行对照感染。在感染后的 1 到 3 天或更久，将培养基移除并向每个孔加入细胞裂解缓冲液（Promega）。对细胞裂解物测试虫荧光素酶活性。

或者，通过直接向每个孔加入 Steady-Glo (Promega) 试剂来裂解细胞并测量虫荧光素酶活性，而不用将培养基从孔中抽吸出来。

6.2 实施例 2: 测量 RT 活性缺陷病毒的复制适合度

本实施例提供鉴定在反转录酶中改变复制适合度的突变的方法和组合物。鉴定改变复制适合度的突变的方法能够适用于 HIV-1 复制的其它组成，包括但不限于整合、病毒装配，以及病毒附着和进入。本实施例还提供一种量化特异性突变对于复制适合度的影响的方法。量化特异性的蛋白酶和反转录酶突变对于复制适合度的影响的手段和方法能够适用于在其它病毒基因中的突变，所述基因涉及 HIV-1 复制，包括但不限于 gag、pol 和包膜基因。

如在实施例 1 中所描述的构建适合度测试载体。将源自病人样品的适合度测试载体或源自适合度测试载体合并物的克隆，或通过定点突变设计以含有特异性突变的适合度测试载体在适合度分析中进行测试，以精确定量地测定与充分表征的对照标准相比的相对适合度。进一步检测病人样品中与观察到的相对适合度相关的提高或降低的反转录酶活性。

病人 HIV 样品的反转录酶活性：反转录酶活性能够通过任何一种广泛使用的分析方法进行测量，包括但不限于使用例如 oligo dT:poly rC 的同聚延伸或基于分子指示剂或 5'核酸外切酶活性 (Lie and Petropoulos, 1998, Curr Opin Biotechnol. 9 (1):43-48) 的实时 PCR。在本发明的一个实施方案中，将病人病毒的适合度与参照病毒相比以确定与“野生型”病毒相比的相对适合度，所述“野生型”病毒未暴露于反转录酶抑制物药物。在另一个实施方案中，将病人病毒的适合度与在不同时间点收集自同一病人的病毒相比，例如在开始治疗之前、药物治疗中的变化之前或之后，或在疾病进程的病毒学 (RNA 拷贝数)、免疫学 (CD4 T 细胞) 或临床 (机会性感染) 标志的变化之前或之后。

病人 HIV 样品的基因型分析：适合度测试载体 DNA，不论是合并物或克隆，都能够通过任何基因型方法，例如，如上所述的方法进行分析。在本发明的一个实施方案中，使用病毒 RNA 纯化、RT/PCR 和 ABI 链式终止子自动测序对病人 HIV 样品序列进行测定。测定的序列与数据库中存在的参照序列相比较或与治疗起始前来自病人的样品相

比较, 如果存在的话。检查基因型有别于参照或治疗前序列或与所观察到的适合度相关的序列。

5 定点突变体的适合度分析: 通过构建包含在限定的野生型(药物敏感的)遗传背景下的含有特异性突变的适合度载体, 对据观察与适合度改变相关的基因型改变进行评估。突变单独地或与据认为调节病毒适合度的其它突变相结合进行整合。通过任何公知的定点突变方法将突变导入适合度测试载体。在本发明的一个实施方案中, 使用进行
10 定点突变的 mega-引物 PCR 法。随后用在实施例 1 中所描述的适合度测试检测含有特异性突变或突变组的适合度测试载体, 并将适合度与没有特异性突变的遗传上确定的野生型(药物敏感的)适合度测试载体的适合度相比较。在适合度中观察到的变化能够归因于导入抗性测试载体中的特异性突变。

在本发明的几个相关的实施方案中, 构建在反转录酶中含有定点突变的适合度测试载体并测试其活性, 所述突变在位置 98 (A98G),
15 100 (L100I), 101 (K101E), 103 (K103N), 106 (V106A, V106I, V106M), 181 (Y181C, Y188A, Y188C, Y188H, Y188L), 或 190 (G190A, G190S, G190C, G190E, G190V, G190T, G190Q) 导致氨基酸取代并显示反转录酶活性的不同量(图 2, 3, 4, 5, 6, 7 和 8A-8C)。适合度的结果建立了在特异性的反转录酶氨基酸取代和适合度之间的联系。数据表明在同一位置不同的突变能够对于复制能力具有显著不同的效果。图 3 显示 V106I 和 V106M 与 V106A 相比具有相对高的复制能力。在位置 190 的不同突变之间观察到的区别特别惊人, 从仅仅可以检测到大于野生型的 80%。如图 8A-8C 所示, 当突变体病毒株在 NNRTI 存在下复制时在复制能力上的差别也是明了的。
20

25 图 4 表明如上所述进行的复制能力测量产生了与使用复制竞争测试结果进行的测量相一致的结果。

如图 2 中所示还构建并测试了包含多个突变的病毒。图 7 比较了单突变体株和包含单个突变的组合的双突变体株的复制能力, 并且显示具有突变组合的病毒株有较单独具有其中一个突变的病毒株更小的复制能力。
30

包含在位置 190 上的突变和突变 L74V 的突变体株也如图 5 中所示进行构建。尽管 L74V 突变不影响在位置 190 上为野生型的病毒株的复

制能力，但它确实提高了大多数其它位置 190 突变的复制能力。

6.3 实施例 3: 病人样品的分析以鉴定抗性相关的突变

本实施例表明了一种分析病人样品从而鉴定与 NNRTI 抗性相关联的突变的方法。它也表明 K101P, K103R 和 V179D 以及 K103R 和 179D 的组合是新的 NNRTI 抗性突变。

为了测定在一种 HIV-1 株的反转录酶 (RT) 序列和其对于 NNRTI 的敏感性之间的关系，对 18,034 个样品的数据进行基因型以及表型分析。通过一元和组合相关性分析鉴定那些在充分表征的 NNRTI 突变不存在时具有 NNRTI 抗性的样品。8,673 个样品在位置 100,181, 188, 190 或 227 上没有突变，在反转录酶中也没有任何下列突变：A98G, K101E, K103N/S, V106A/M, P225H, M230L, 或 P236L，但对于一种或多种 NNRTI 的敏感性仍然有高水平的减弱。在 8,673 个样品中，146 个样品在对至少一种 NNRTI 的敏感性中显示出大于 5 倍的减弱。

鉴定了在纯粹形式的（即，没有突变和野生型的混合）至少两个样品中突变的所有 RT 的氨基酸位点。鉴定的氨基酸位置和残基为：

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 和 E297。

随后测定存在于每一种以上位置上的氨基酸并且单独分析任何存在于一个以上样品中的氨基酸。利用 Statview 软件 (SAS Institute, Cary, NC, 美国) 进行相关分析以确定与每一种 NNRTI 持续倍数变化 (FC)，或与一种两分倍数变化 (FC>10) 相关的氨基酸突变。

从 146 个样品中分析的对 NNRTI 最具抗性的样品数据 (RT 突变, 奈韦那平 (“NVP”)、地拉韦啉 (“DLV”) 和依非韦伦 (“EFV”) 的倍数变化) 示于表 1。表 1 提供了 RT 基因型和 NNRTI 敏感性的 FC,

它是在关于至少一种 NNRTI 显示大于 10 的 FC 的样品中观察到的。对于 NVP、DLV 和 EFV 观察到的最大的 FC 值分别 >400, >250 和 >144 倍。如在图 9 和 10 以及表 1 中所示, 具有最高 FC 的样品在位置 101 上含有脯氨酸取代 (n=10, 中值 NVP, DLV 和 EFV 的倍数变化分别为 355, 26 和 26 倍) 或 103R 和 179D 的组合 (n=13, 中值 NVP, DLV 和 EFV 的倍数变化分别为 12, 24 和 17 倍)。在 RT 基因型中 K101P, K103R 和 V179D 的存在在表 1 的栏 1 中以粗体显示。

所有的 101P 样品, 以及除了 2 个以外的 103R/179D 样品, 也具有与核苷 RT 抑制物 (NRTI) 抗性相关联的突变。在没有 101P 或 103R/179D 的样品中, NVP、DLV 和 EFV 的最大的 FC 值分别 41, 67 和 15 倍。与所有三种 NNRTI 相关联的突变不依赖于 101P, 103R/179D, 或者与 NRTI 相关的突变, 包括 101Q, 106I, 135T, 166R, 179D, 189I, 245T, 272S 和 297T。在一些样品中, 在位置 245 和 138 也见到与降低的抗性或提高的敏感性, 以及对于 NNRTI 的可能的高敏感性的惊人相关性。

通过分析无 NNRTI 抗性的样品验证了 K101P、K103R/V179D 和其它鉴定为 NNRTI 抗性突变的突变与对于 NNRTI 降低的敏感性之间的相关性。一共分析了 526 个无 NNRTI 抗性的样品。这些样品的 NNRTI 倍数变化都在 1 和 2 之间, 提示没有 NNRTI 抗性。526 个样品的基因型分析显示没有鉴定为 NNRTI 抗性的突变存在于任何样品中, 确认了 NNRTI 抗性突变确实与对 NNRTI 降低的敏感性相关联。

本实施例阐释了一种检测人免疫缺陷病毒 (HIV), 例如人免疫缺陷病毒 1 型具有受损的复制能力的可能性是否提高的方法, 包括: 检测由所述 HIV-1 编码的反转录酶 (RT) 是否显示与对于所述 NNRTI 处理的抗性相关联的突变的存在或缺失, 所述突变在所述反转录酶的氨基酸序列的氨基酸位置 101, 103 或 179, 例如 K101P, K103R 或 V179D, 其中所述突变的存在提示该 HIV-1 具有对 NNRTI 处理的抗性的可能性提高。通常, 该方法能够包括检测任何本文所列的突变的组合的存在或缺失, 所述突变与 NNRTI 抗性相关联。例如, 该方法能够包括检测与 NNRTI 抗性相关联的 2 个或所有的 3 个氨基酸位置上的突变的存在或缺失。在某些实施方案中, 这种方法能够包括检测 K103R 和 V179D 的存在或缺失。NNRTI 的例子包括但不限于地拉韦定、奈韦

那平和依非韦伦。

将本文引用的所有参考文献的全部并入作为参考。

本文所提供的事实上的和预言性的实施例，都仅仅是本发明的实施方案并不以任何方式限制本发明。

5

表1

在具有至少一种大于10的NNRTI倍数变化的样品的
敏感性数据中的RT基因型和NNRTI倍数变化

在样品中的RT突变	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, T200L, 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/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

在样品中的RT突变		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, V166I, 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, K227K/E, D237E, A272P, R277K, E297T		16.5	11.5	14.2
V35V/I, 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
I31L, 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

在样品中的RT突变	NVP FC*	DLV FC*	EFV FC
K20R, K49R, D67N, T69N, K70K/R, K101H, Q102K, D123E, I135T, C162S, D177E, M184V, V189V/L, I195V/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/L, 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, T200T/A, E203D, L210L/W, R211R/K, T215Y, L228L/R, A272P, V293I, E297K	33.0	7.1	4.3
E6D, V35V/L, A98A/S, Q102K, I135T, C162S, K173E, T200T/A, Q207E, R211R/K, K238T, V245M, S251S/T, A272P, K275R, R277K, T286A, E297K	14.7	7.6	4.8
V35V/L, K49R, A98S, Q102K, K122K/E, A158S, C162S, E169D, Q174Q/K/R, I178L/M, T200A, Q207E, M230M/V, I257L, V261I, 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/L, D67N, K70R, V90I, Q102K, V106V/L, 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

* 对于NVP的最大可检测倍数变化为400而对于DLV为250。

** 通过列出观察到的氨基酸显示在任何样品中所列位置上的氨基酸的混合物的存在, 通过一个杠号 (“/”) 隔开。

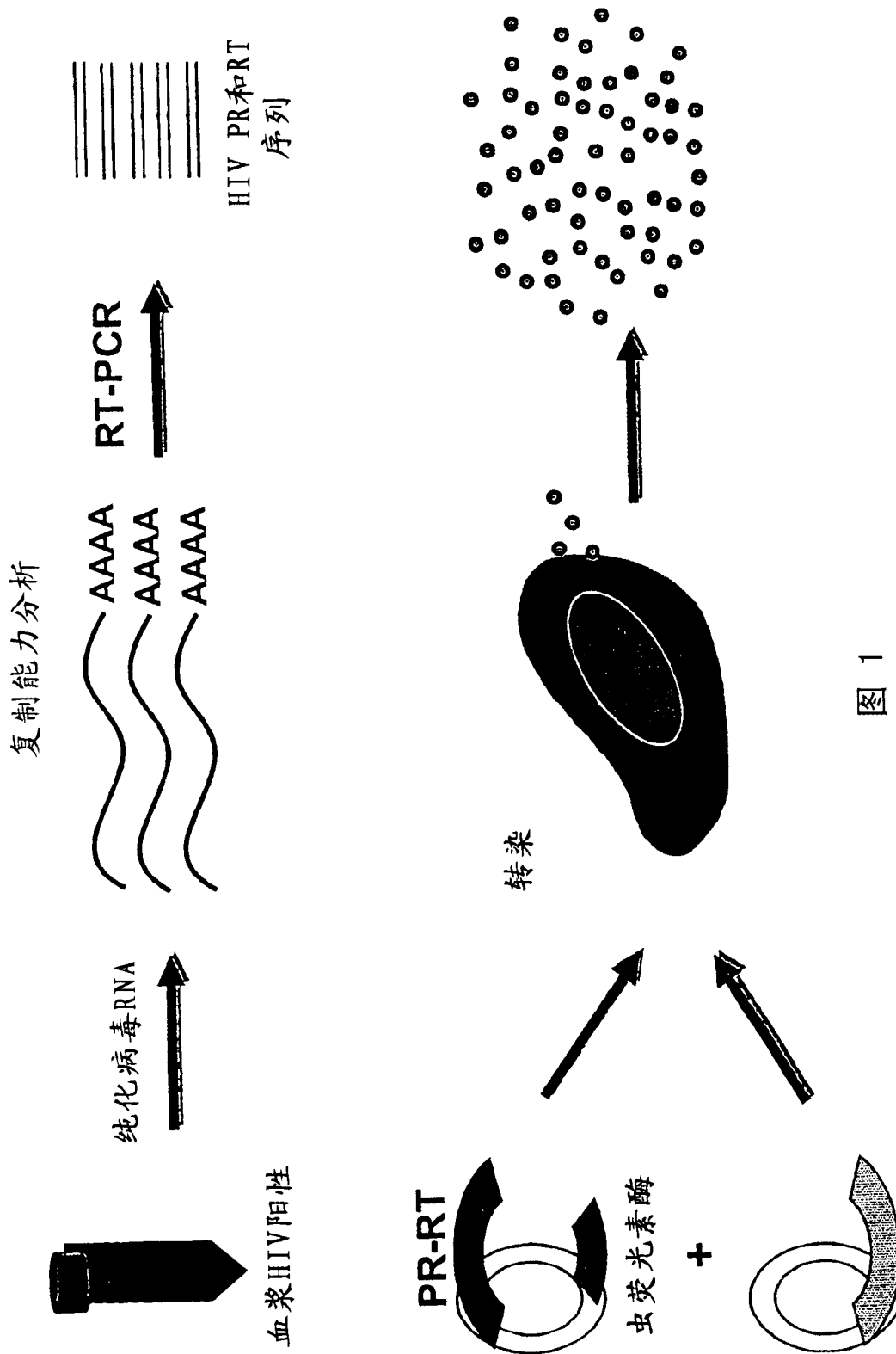


图1

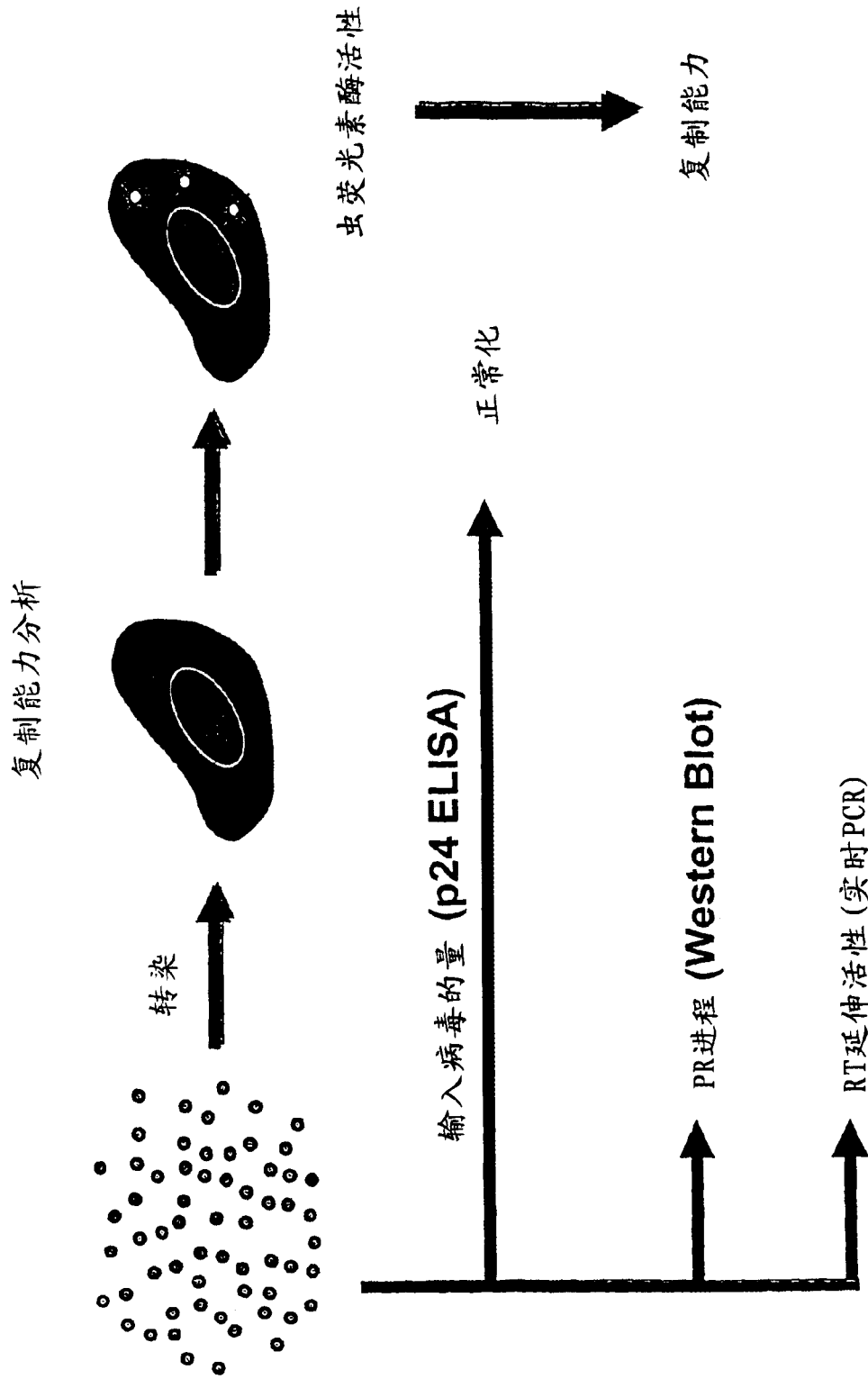
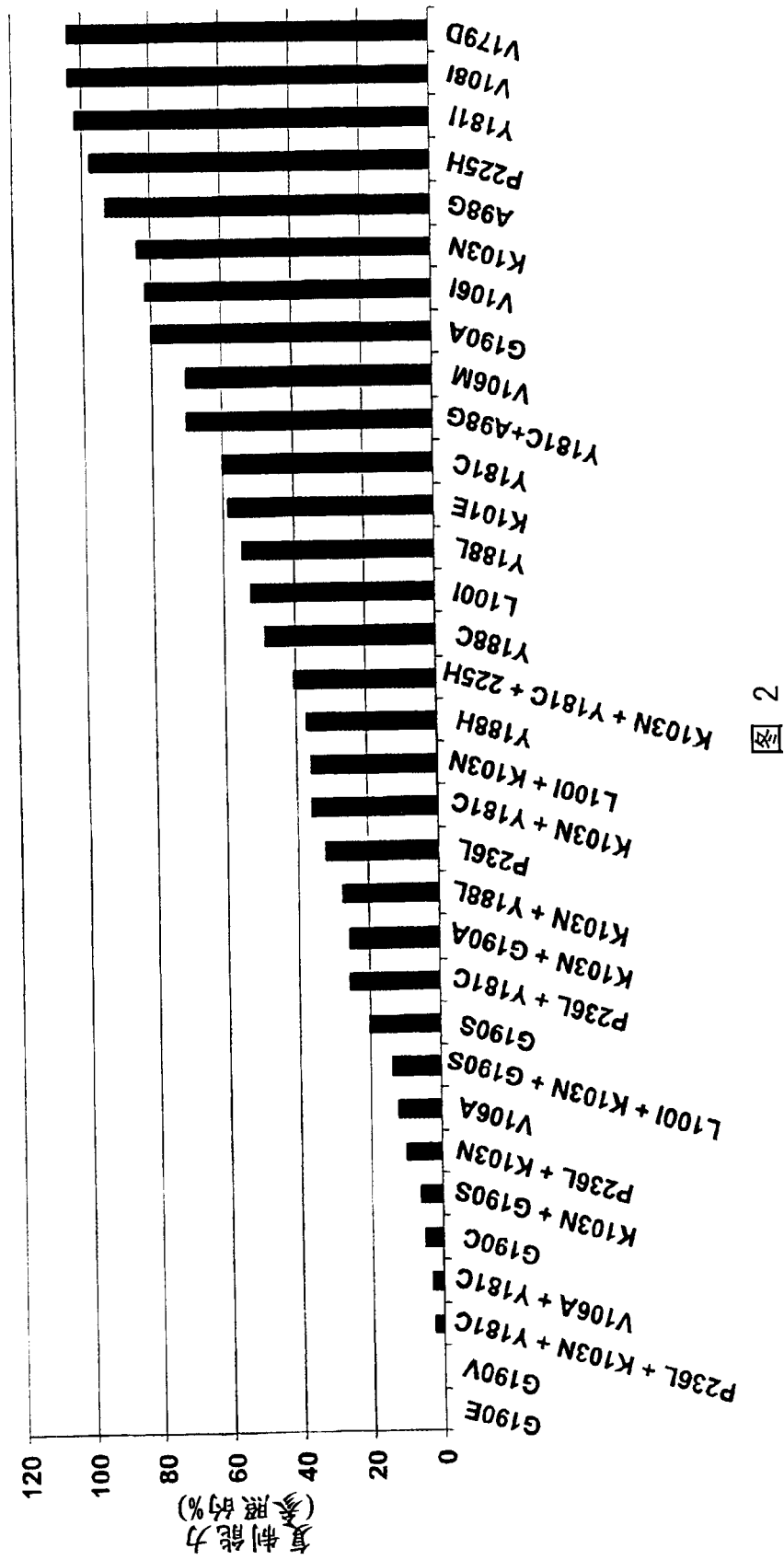


图 1 (续)

含有NNRTI抗性突变的重组病毒的复制能力



2

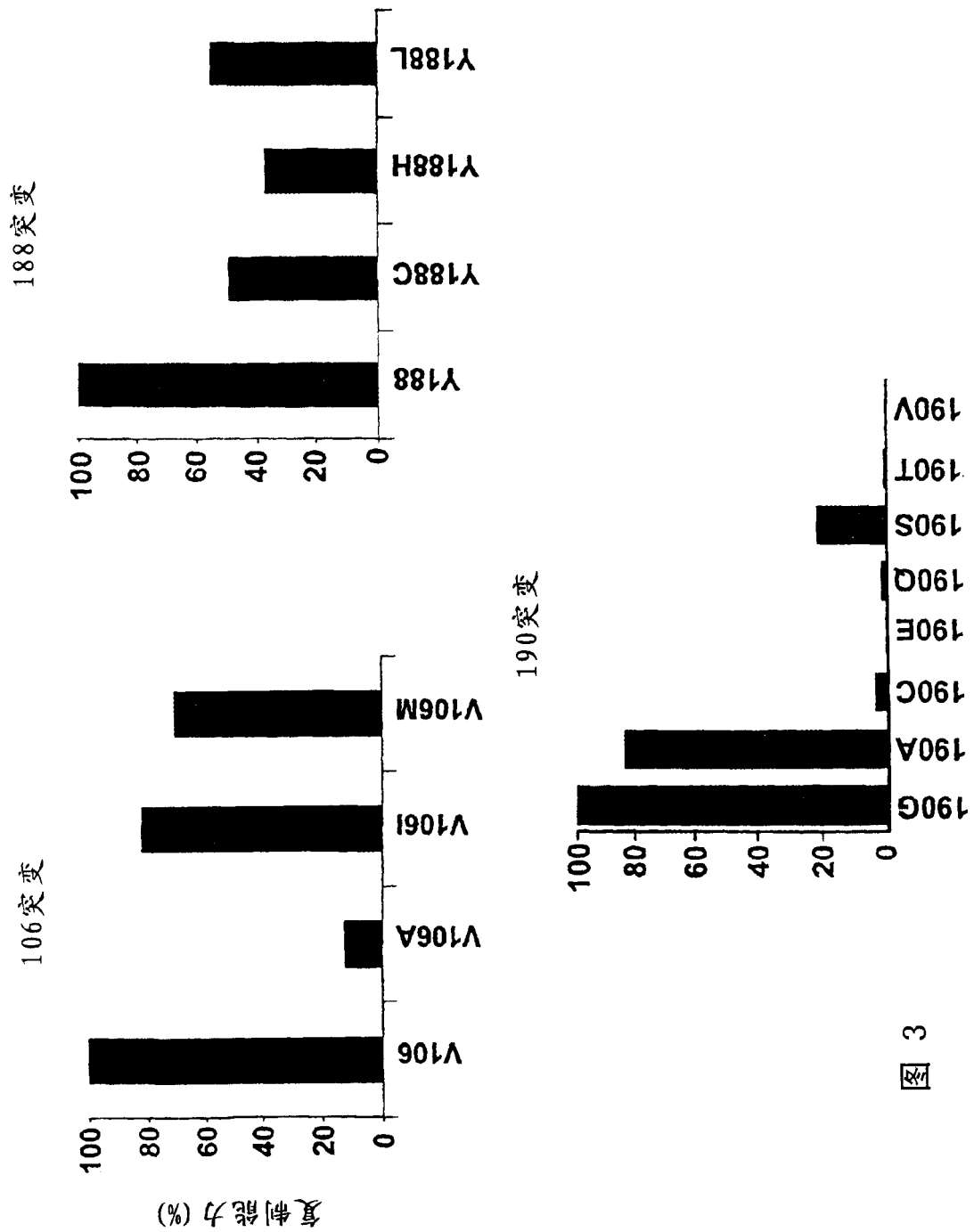


图 3

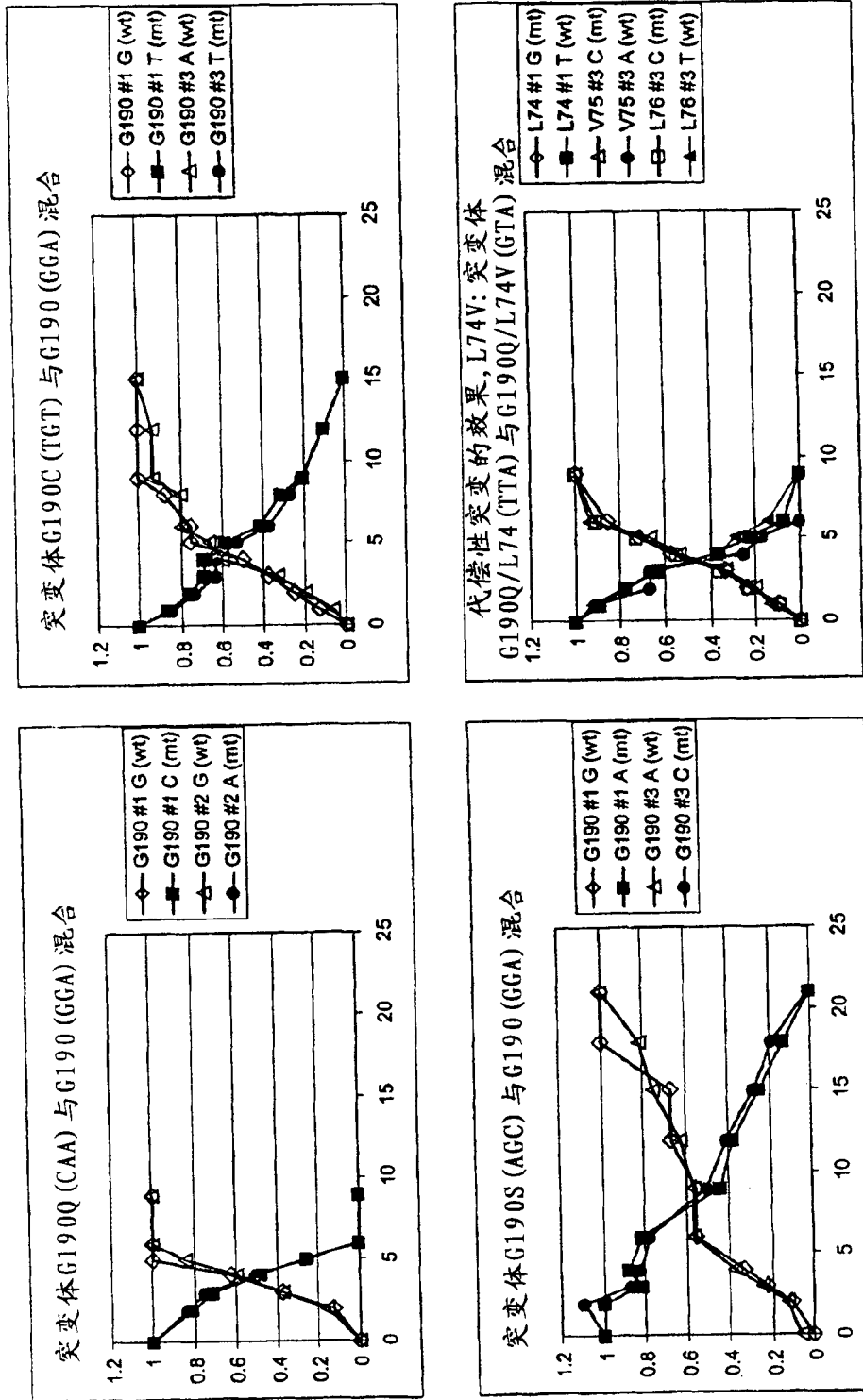


图 4

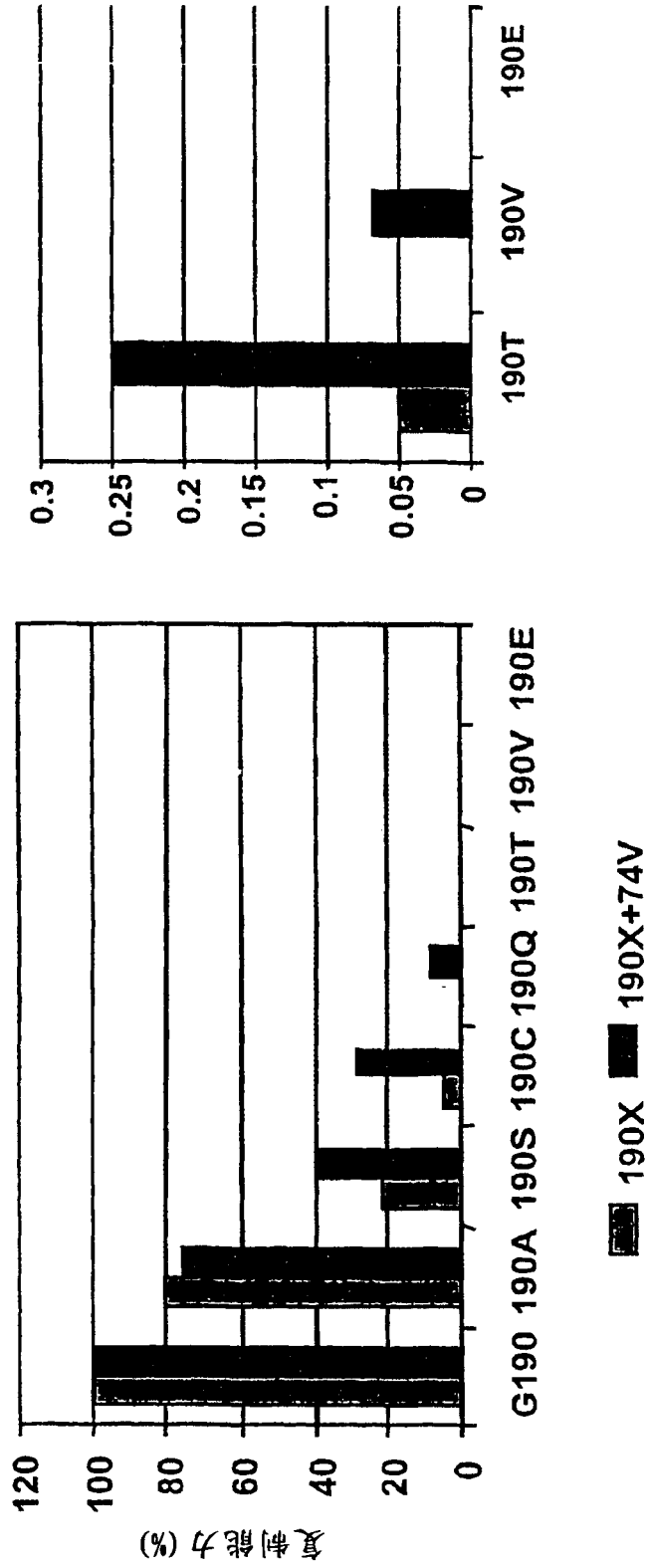
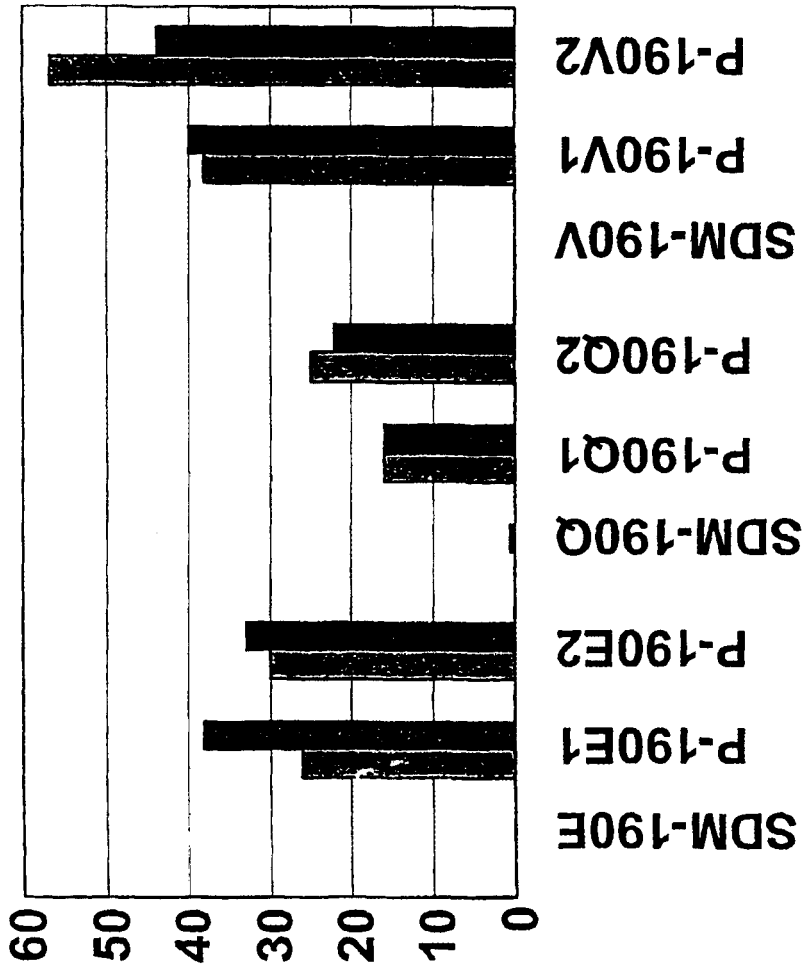
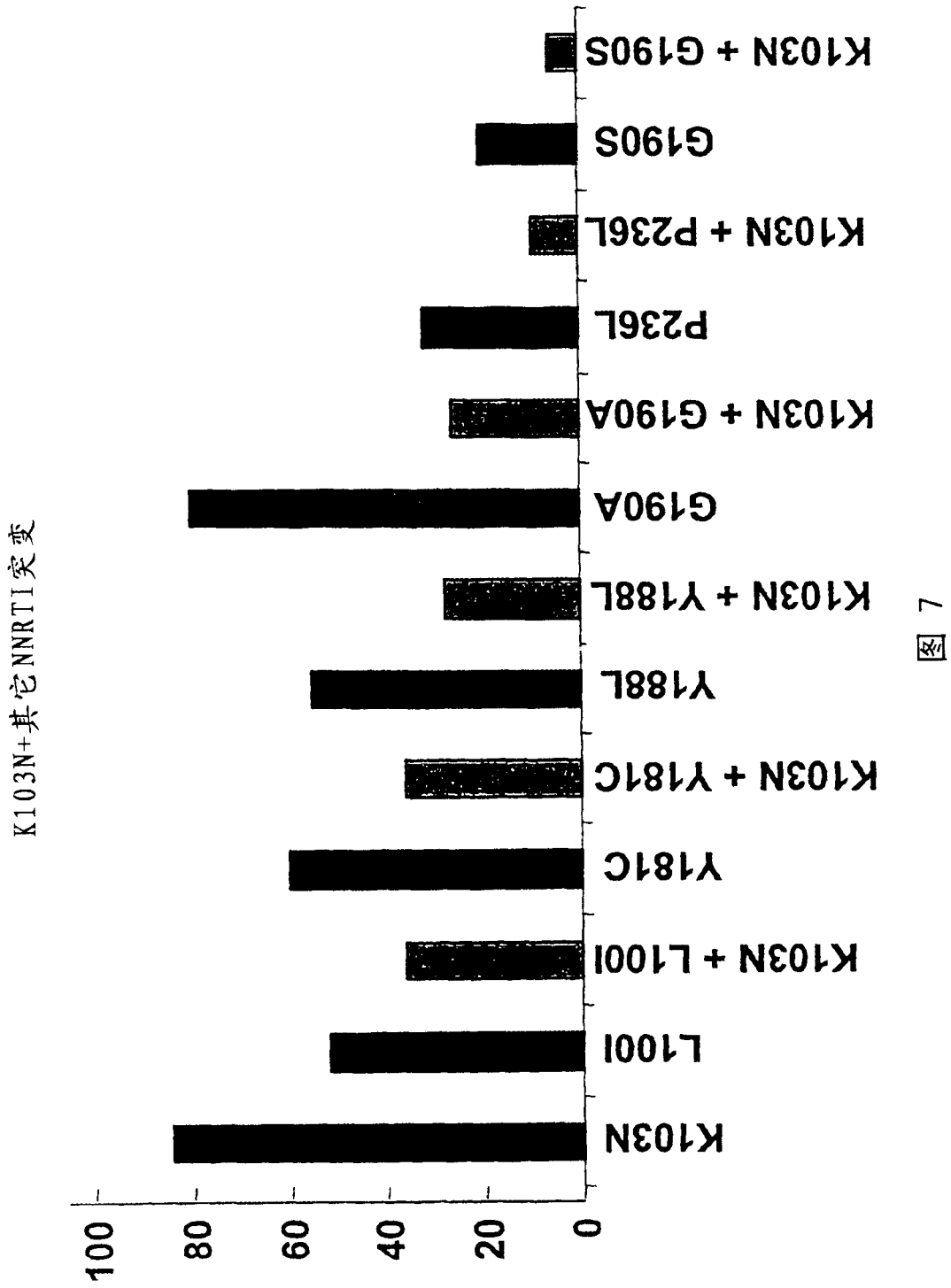


图 5



% RT活性
%复制能力

6



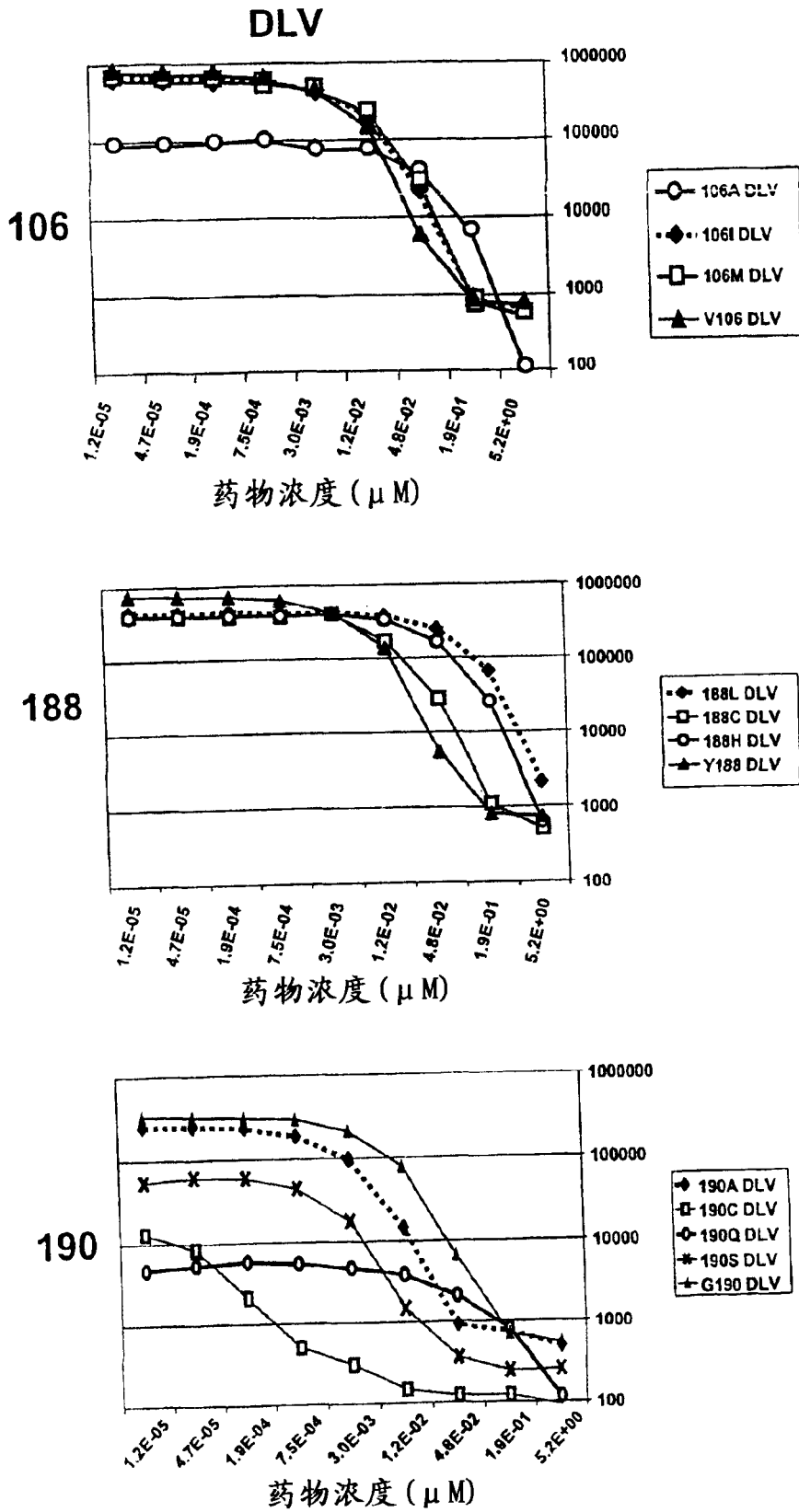


图 8A

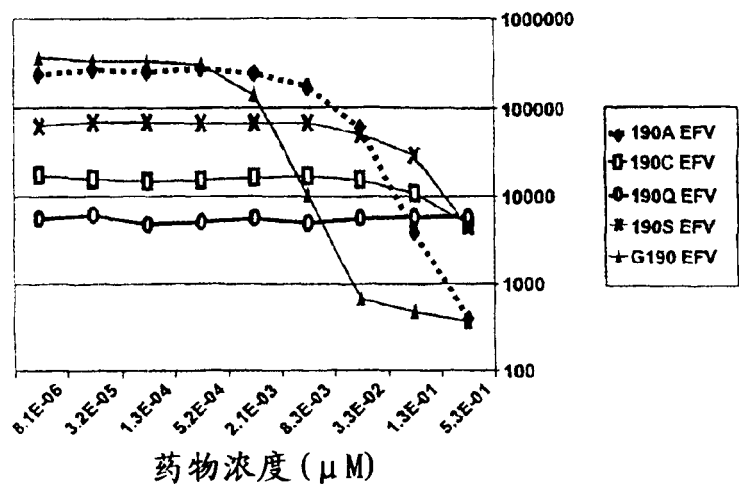
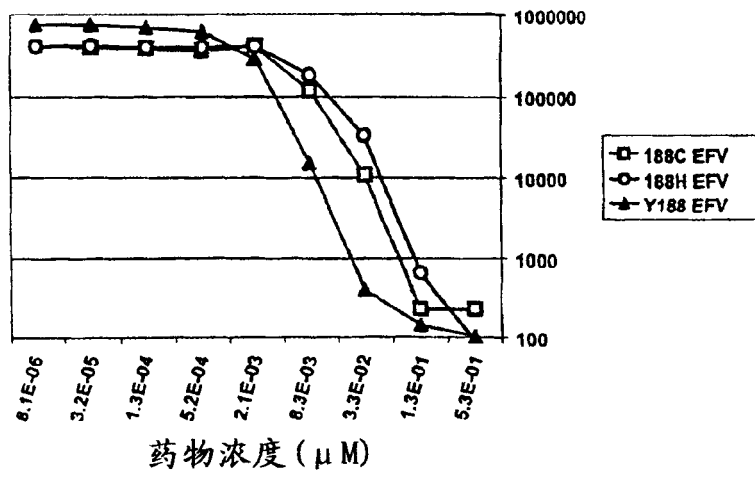
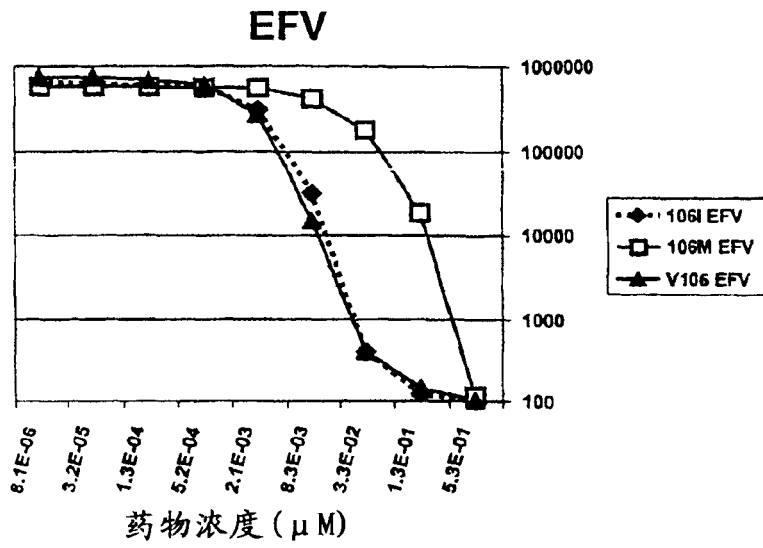


图 8B

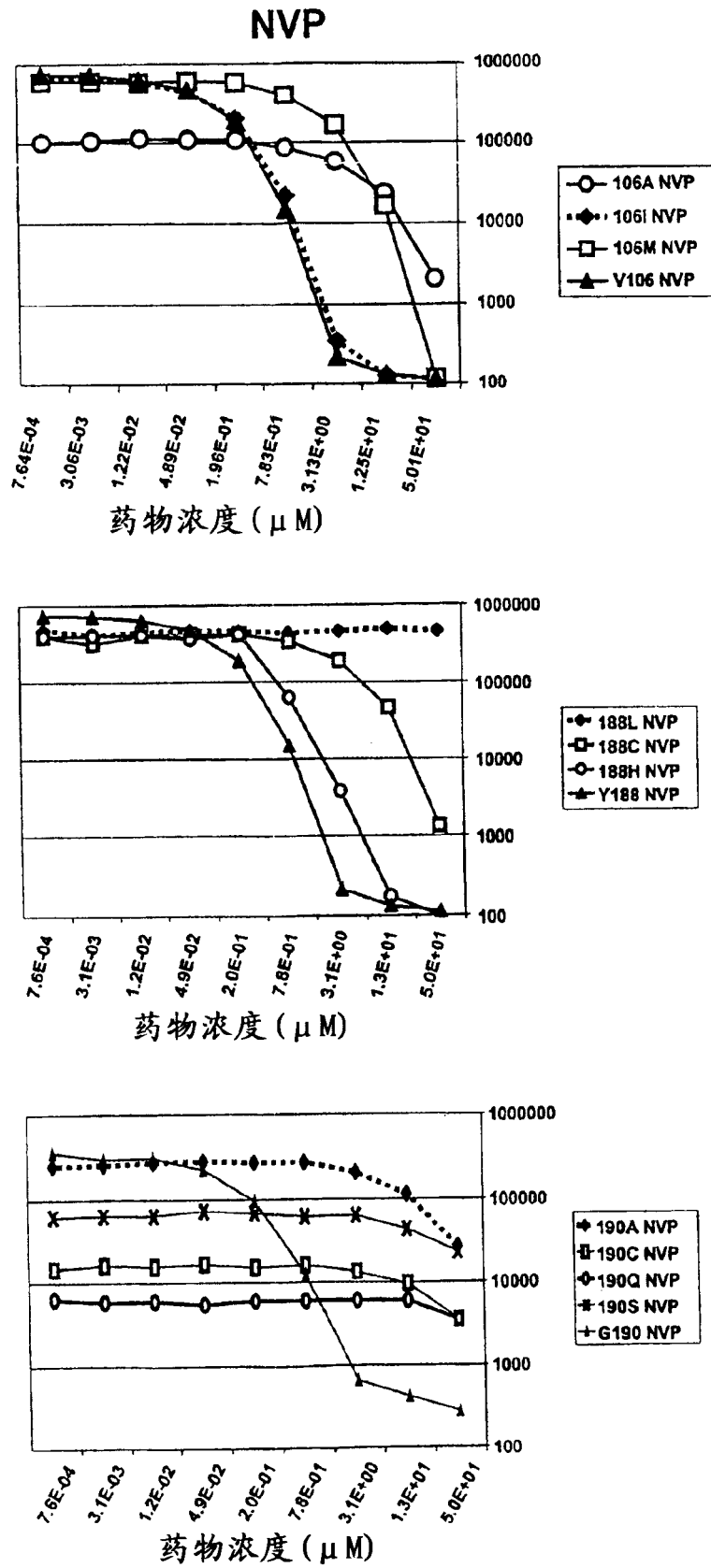


图 8C

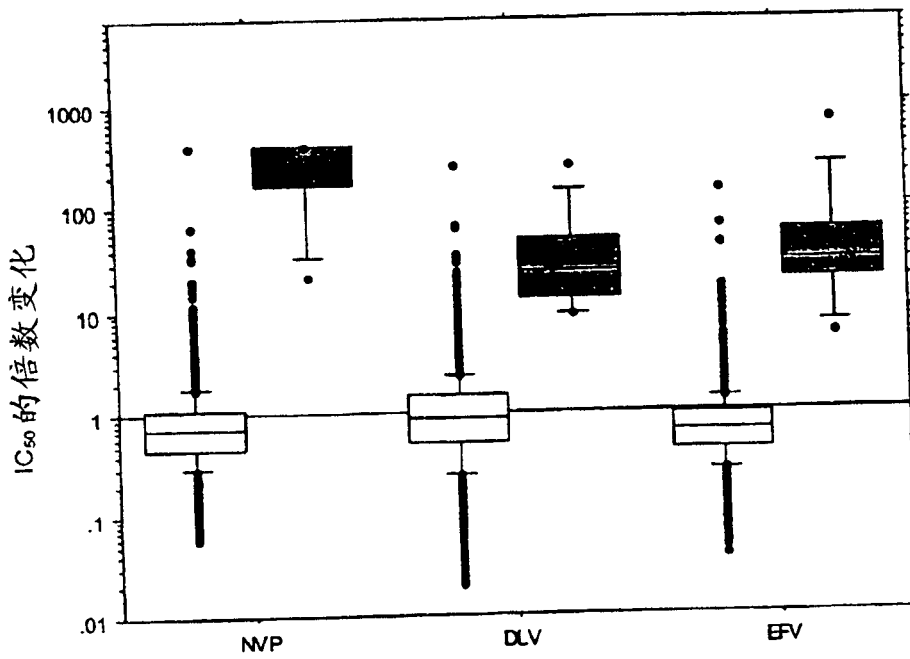


图 9

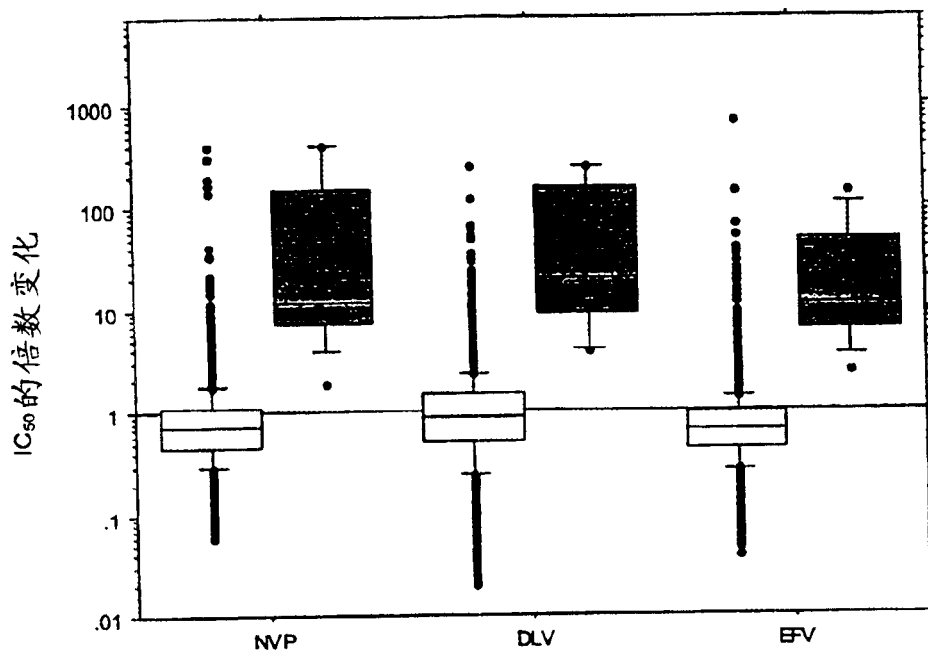


图 10

专利名称(译)	测定致病病毒复制能力的组合物和方法		
公开(公告)号	CN1678757A	公开(公告)日	2005-10-05
申请号	CN03820744.3	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)	瓦罗洛吉克公司		
当前申请(专利权)人(译)	瓦罗洛吉克公司		
[标]发明人	H黄 MT维林 A加马尼克 J贝奥蔡内 JM怀特科布 CJ佩特罗波洛斯 NT帕金		
发明人	H·黄 M·T·维林 A·加马尼克 J·贝奥蔡内 J·M·怀特科布 C·J·佩特罗波洛斯 N·T·帕金		
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		
代理人(译)	刘玥		
优先权	60/393306 2002-07-01 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测非核苷反转录酶抑制剂抗性病毒的复制能力的组合物和方法。该组合物和方法对于鉴定治疗病毒性感染的有效药剂，以及鉴定和检测潜在治疗性化合物的生物学有效性是有用的。

