

(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2004-533255

(P2004-533255A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(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	Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	Z	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 55 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-505360 (P2003-505360)	(71) 出願人	501494539 カビディ、テック、アクチボラダ C A V I D I T E C H A B スエーデン国ウプサラ、ウプサラ、サイエ ンス、パーク
(86) (22) 出願日	平成14年6月14日 (2002. 6. 14)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月15日 (2003. 12. 15)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/001155	(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(87) 国際公開番号	W02002/103039	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002. 12. 27)		
(31) 優先権主張番号	60/297, 773		
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001. 6. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA重合の測定方法およびその方法の応用

(57) 【要約】

生物学的試料のDNA依存的DNA重合を測定する方法が記載される。この方法は、内部で塩基対とすることができない、固相に結合した一本鎖の短い特異配列を有するプライマーを供給し、プライマー構築物を、プライマーに相補的な配列の一部を有する一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型と、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸であってその一つを修飾して標識抗体によって特異的に認識されるようにしたものを含む反応混合物と接触させ、レトロウイルス逆転写酵素(RT)のようなDNAポリメラーゼを含んでなる生物学的試料を混合物に加え、ポリメラーゼ反応を進行させ、固定化反応生成物を標識抗体と共にインキュベーションし、結合した標識抗体の量を検出し、DNA重合の尺度としての組込まれた修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸の量を結合した抗体の標識によって測定する段階を含んでなり、薬剤感受性試験に用いることができる。商業用包装も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的試料のDNA依存的DNA重合を測定する方法であって、

- a) 内部で塩基対とすることができない、固相に結合した一本鎖の短い特定配列を有するプライマーを供給し、
- b) プライマー構築物を、プライマーに相補的な配列の一部を有する一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型と、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸であってその一つを修飾して標識抗体によって特異的に認識されるようにしたものを含む反応混合物と接触させ、
- c) DNAポリメラーゼを含んでなる生物学的試料をb)の混合物に加え、
- d) ポリメラーゼ反応を進行させ、
- e) d)から生成する固定化反応生成物を標識抗体と共にインキュベーションし、
- f) 結合した標識抗体の量を、用いた標識によって検出し、
- g) DNA重合の尺度としての組込まれた修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸の量を結合した抗体の標識によって測定する段階を含んでなる、方法。

10

【請求項2】

DNAポリメラーゼがレトロウイルス逆転写酵素(RT)である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

レトロウイルスRTがヒト免疫不全ウイルス(HIV) RTである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸が5 - プロモデオキシウリジン 5 - 三リン酸(BrdUTP)であり、標識抗体がアルカリホスファターゼ(Ap)に結合した抗BrUモノクローナル抗体である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項5】

測定したDNA重合を薬剤感受性試験に用いる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

- a) 内部で塩基対とすることができない、固相に結合した一本鎖の短い特定配列を有するプライマー、
- b) a)のプライマーに相補的な配列の一部を有する一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型、
- c) 4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸であって、その一つを修飾して標識抗体によって特異的に認識されるようにしたもの、および
- d) c)の修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸を認識する標識抗体を含んでなる、請求項1～4のいずれか一項に記載のDNA依存的DNA重合を測定するための記載されたまたはデータキャリアー使用説明書を含む、商業用包装。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNA重合の測定方法およびこの方法の応用に関する。更に正確には、本発明は、DNA依存的DNA重合の測定方法に関する。

【0002】

背景

この数十年間に、逆転写、すなわちRNA依存的DNA重合の新たな測定方法が急速に発達してきた。DNA依存的DNA重合の定量方法に関する一層複雑な問題については、これまでは余り注目されることはなかった。

40

【0003】

古典的DNAポリメラーゼ活性分析法は、DNアーゼで処理したDNA(「活性化DNA」)のプライマー/鋳型としての使用、および放射能標識したヌクレオチドのDNAへの組込みを含んでいる(Aposhian and Komberg 1962)。酸でプレシプタブルの放射能を測定することによって、組込まれたヌクレオチドの量および存在する酵素単位の数を計算することができる。しかしながら、放射能の使用は一般に制限されておりまた多くの実験室で止められるように

50

なっており、このため、放射能に基づく手法から離れる一般的傾向がある。

【0004】

DNAポリメラーゼについては、新たに作製されたDNAに組込まれたジゴキシゲニン標識したヌクレオチドのELISAに基づく商業的分析法が用いられている (Roche Molecular Biochemicals Cat. no 1468120, 米国特許第5,635,350号明細書)。この分析法は、嵩高な基を有する2種類の異なるヌクレオチド基質類似体、標識としてのジゴキシゲニン、および生成物の固定化のためのビオチンの使用によって妨げられる。その結果、重合反応速度とその後の検出感度は減少する。著しく偏向した反応速度特性を有する基質類似体を用いると、この系は異なるポリメラーゼの薬剤感受性の研究に余り関連性がなくなる。

【0005】

もう一つの一層有望な代替法は、色素PicoGreenと二本鎖DNAとの特異的反応に基づくDNAポリメラーゼホロ酵素の蛍光に基づく分析法である (Seville et al 1996)。後者の方法は、一層広範囲の様々なDNA重合酵素に適するように最近改質されている (Tveit and Kristensen 2001)。この分析法は技術的に簡単であり、天然ヌクレオチドの利用に基づいている。しかしながら、検出感度は未だ古典的な放射性DNAポリメラーゼ分析法と同じ範囲であり、報告されている応用では0.5~0.5 U DNAポリメラーゼ/試料の検出範囲を示している。

【0006】

HIV治療は、現在は多剤療法に基づいている。この投薬計画は、利用可能な3種類総ての薬剤であるヌクレオシド類似体、非ヌクレオシド類似体およびプロテアーゼ阻害薬の組合せに基づいている。この方法は、突然変異体ウイルスが生き残る確率を最小限にすることである。

【0007】

RT阻害薬は、ヌクレオシド類似体または非ヌクレオシド類似体である。非ヌクレオシド阻害薬は、活性部位に接近しているが接触はしていないRT酵素の疎水性ポケットに結合している。HIV-1複製は、ポリメラーゼ結合部位に関して触媒的なアスパルテート残基を置換することによってアロステリックに阻害される。

【0008】

現在用いられているヌクレオシド阻害薬は、それらが3'-ヒドロキシル基を欠いているので、DNA鎖の伸長を終結させる。ヌクレオシド阻害薬を用いる長期間の治療により、通常は耐性ウイルスを発生させる。この過程は、ウイルスpol遺伝子に突然変異が漸進的に出現し、それぞれが画定されたアミノ酸を置換することと関連している [総説については、Vandamme et al 1998を参照されたい]。酵素レベルでのこれらの置換の影響は複雑であり、原始的なDNAエディティング機能の増加が挙げられる。この反応はヌクレオチド依存的であり、ジヌクレオシドポリホスフェートと伸長性DNAの3'末端を生成する [Arion et al 1998, Meyer et al 1999]。

【0009】

HIV-1RT並びに他の逆転写酵素は、3種類の異なる酵素反応、すなわちRNA依存的DNA重合、DNA依存的DNA重合、およびDNA-RNAハイブリッド (RNアーゼH)におけるRNAの分解を行う。pol遺伝子によってコードされたHIVRTは、p66とp51サブユニットからなるヘテロ二量体である。RNA依存的DNA重合とDNA依存的DNA重合はいずれも、p66サブユニットに局在する同一活性部位によって行われる (総説については、Goff 1990を参照されたい)。これらの薬剤の反応機構は、主としてRNA依存的DNA重合反応についてのそれらの作用によって定義されている。DNA依存的DNA重合反応に対する影響については、比較的余り研究されていない。

【0010】

反応機構および活性の代謝薬剤が知られており且つ利用可能である場合には、表現型ウイルスの薬剤感受性を酵素レベルで決定することができる。使用される酵素分析法とウイルス単離技術によっては、薬剤感受性試験は、理論的には一次ウイルス単離であるウイルス培養増殖物からの上清について、または患者から直接回収したウイルス製剤について行う

10

20

30

40

50

ことができる。通常のRT活性分析法は、人工的鑄型プライマー構築物および標識したデオキシヌクレオシド三リン酸をヌクレオチド基質として用いることによって行われる。鑄型/プライマー対のポリ(rA)/オリゴ(dT)は、HIVの測定並びに他のレトロウイルスRTについて最も効率的且つ最も多く用いられる組合せである。薬剤感受性試験に関するときのこの種類の分析法の欠点は、非ヌクレオシド類似体またはrAと塩基対を組むことができる類似体しか試験できないことである。他のヌクレオチド塩基の類似体は、可変ポリマー鑄型に基づく分析法が必要である。ピリミジン塩基を含むRNAポリマーはRNアーゼに感受性であり且つ実際には生物学的試料と適合性でないことが知られている。従って、薬剤感受性試験を目的とするポリメラーゼ分析系が逆転写の阻害および古典的表現型薬剤耐性試験の結果と相関する結果を生じる場合には、この分析法を可変DNA鑄型に基づくようにするのが有利である。

10

【0011】

現在用いられているHIV療法は、DNAポリメラーゼ阻害薬の有効性の一例に過ぎない。細菌や他の微生物における最近の状況が関係する耐性の発生により、新たな種類の抗微生物薬の探求に弾みがついている。DNAポリメラーゼは、この活動の際の主要な目的の一つである。それ自体、技術的に簡単なポリメラーゼ分析法であって、潜在的な環境上の危険性を引き起こさず且つ広範囲の微生物DNAポリメラーゼアイソザイムに対する薬剤スクリーニングに応用することができる分析法が強く求められている。見出された薬剤の毒性は、相当する哺乳類のDNAポリメラーゼに対して更に評価しなければならない。

【0012】

20

ポリメラーゼ - および - のような増殖に関連したポリメラーゼの定量を用いて、細胞増殖を観察することができる。これに関連して、現在、もう一つの細胞増殖に関連した酵素であるチミジンキナーゼの血清濃度を用いて、悪性疾患の予知および分類することが述べられている(米国特許第4,637,977号明細書)。チミジンのリン酸化は、DNA合成の目的でチミジン三リン酸を提供する2種類の細胞内合成経路の一方である。DNAポリメラーゼ自身の測定は、チミジンキナーゼ活性またはチミジン組込みと比較して一層正確に全DNA合成を評価する可能性を有する。

【0013】

発明の説明

本発明は、比色または蛍光により生成物を検出することができるマイクロタイタープレートフォーマットにおける非放射性DNAポリメラーゼ分析法を提供する。

30

【0014】

好ましい態様では、本発明は、ヌクレオシド三リン酸基質として5-ブロモデオキシウリジン5'-三リン酸(BrdUTP)を用いる。BrdUTPの5'位の臭素とチミジン三リン酸の5'位のメチル基の間のVan der Waals半径の差は極微(2.0と比較して1.95)であり、これら2種類のヌクレオシドの酵素反応速度特性は、極めて類似している。この方法は芳香族化し、3nUポリメラーゼ活性/試料までの検出範囲を有することができる。

【0015】

本発明の応用の一つは、薬剤感受性試験である。これまでに認可されている総ての抗レトロウイルス薬は、ウイルスプロテアーゼまたはRTの酵素反応を妨げる。更に、伝達系路にはレトロウイルスインテグラーゼの機能に影響を与える候補薬剤もある。

40

【0016】

特に本発明は、広汎な種類のDNA依存的DNAポリメラーゼを測定する手続きを提供する。これは、比較的短い鑄型が用いられているが、高度に発展的なDNAポリメラーゼ系の研究にも適していることが明らかになっている。細菌性ポリメラーゼIおよびIIIの活性、哺乳類DNAポリメラーゼ、および、ヒト血清中の増殖関連ポリメラーゼ活性、およびHIVRTによるDNA依存的DNA重合の測定に対する有用性が明らかにされるが、この方法は実質的に総てのウイルスおよび細胞性DNAポリメラーゼの研究に用いることができる。本発明のDNAポリメラーゼ分析法を従来技術と識別する特徴の一つは、その優れた感度であり、3nUまでのE. coli DNAポリメラーゼI活性を検出することができる。

50

【0017】

従って、本発明の一態様は、生物学的試料でのDNA依存的DNA重合を測定する方法であって、

- a) 内部で塩基対とすることができない、固相に結合した一本鎖の短い特定配列を有するプライマーを供給し、
- b) プライマー構築物を、プライマーに相補的な配列の一部を有する一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型と、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸であってその一つを修飾して標識抗体によって特異的に認識されるようにしたものを含む反応混合物と接触させ、
- c) DNAポリメラーゼを含んでなる生物学的試料をb)の混合物に加え、
- d) ポリメラーゼ反応を進行させ、
- e) d)から生成する固定化反応生成物を標識抗体と共にインキュベーションし、
- f) 結合した標識抗体の量を、用いた標識によって検出し、
- g) DNA重合の尺度としての組込まれた修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸の量を結合した抗体の標識によって測定する段階を含んでなる、方法に関する。

10

【0018】

一態様では、DNA重合は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)RTのようなレトロウイルス逆転写酵素(RT)によって行われる。

【0019】

もう一つの態様では、修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸は5 - ブロモデオキシウリジン5' - 三リン酸(BrdUTP)であり、標識抗体はアルカリホスファターゼ(Ap)に結合した抗BrdUモノクローナル抗体である。

20

【0020】

本発明による方法の好ましい態様では、測定したDNA重合を用いて薬剤感受性試験を行う。

【0021】

薬剤感受性試験を行ってある種の薬剤が哺乳類個体で有効であるかどうかを評価し、その結果を用いてその個体に対する薬剤投与療法を選択することができる。実際には、個体を幾つかの時点で試験して、上記個体における薬剤治療の展開を観察する。

【0022】

本発明は、本発明によるDNA依存的DNA重合を測定するための記載されたまたはデータキャリアー使用説明書を含んでなる商業用包装にも関する。この包装は、少なくとも下記の項目

30

- a) 内部で塩基対とすることができない、固相に結合した一本鎖の短い特定配列を有するプライマー、
- b) a)のプライマーに相補的な配列の一部を有する一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型、
- c) 4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸であって、その一つを修飾して標識抗体によって特異的に認識されるようにしたもの、および
- d) c)の修飾したデオキシヌクレオシド三リン酸を認識する標識抗体を含んでなる。

【0023】

本発明は、後記の本発明の態様の非制限的記載および図面によって説明されている。

40

【0024】

引用文献の教示内容は、引用によって本明細書に包含されている。

【0025】

態様の説明

プライマーをコーティングしたマイクロタイタープレートの製造

1 - エチル(3 - ジメチルアミノ - プロピル)カルボイミド塩酸(最終濃度10 mg/ml)を100 mMの1 - メチルイミダゾール緩衝液(pH7.0)に加え、この混合物を用いてプライマー構築物を最終濃度1 µg/mlに希釈した。100 µl分量のプライマー溶液を、Nalge Nunc NucleoLink(商品名)透明ストリップ(カタログ番号248259)からなるマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに入れた。プレートを37°Cで6~8時間インキ

50

ユベーションし、2 MN a O H 中で 2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で十分に洗浄し、3 個の 5 リットルバイアル中で水で浸漬した。ウェル中に残っている流体を、吸収布または紙の上から下へプレートを軽く叩いて除いた。プレートを室温で 30 分間乾燥させ、最後に - 20 で凍結保管した。

【 0 0 2 6 】

DNAポリメラーゼ分析法のプロトコール

DNAポリメラーゼ分析法は、96穴マイクロタイタープレートのウェルに共有結合している特異配列を有する短プライマーに基づいている。反応混合物は、プライマーに相補的な配列の一部と4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸を有する一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型を含んでいる。しかしながら、チミジン三リン酸は、5 - ブロモデオキシウリジン 5 - 三リン酸 (BrdUTP) に置換されている。ポリメラーゼ反応中にDNAに組込まれるプロモデオキシウリジナーリン酸 (BrdUMP) は、アルカリホスファターゼ (Ap) に接合した抗 BrdUモノクローナル抗体で検出される。Ap基質である4 - メチルウンベリフェリルホスフェートを用いて、蛍光生成物を検出する。

10

【 0 0 2 7 】

DNAポリメラーゼ反応混合物 100 μ l を、プライマーをコーティングしたマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに加えた。試料をDNAポリメラーゼ塩基緩衝液で希釈し、50 μ l 試料希釈物をプレートのそれぞれのウェルに移すことによってポリメラーゼ反応を開始した。マイクロタイタープレートを 33 でインキュベーションし、所定時間の後にプレートを 3 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8 . 9) 中で 1 . 5 % (v/v) オクトフェノキシポリエトキシエタノール (Triton X-100) で洗浄することによって反応を終結した。通常は、4時間および一晩 (16時間) の2種類のインキュベーション時間を用いて、重合反応の直線性をチェックした。プレートを 2 MN a O H 中 2 mM E D T A で十分に洗浄し、3個の5リットルバイアル中水で浸漬した。

20

【 0 0 2 8 】

次に、プレートを、50 mM N a C l 、 37 . 5 mM (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 1 mg/ml 硫酸デキストラン、1% Triton X-100 および 25 mg/ml の Sigma 製 脱脂乾燥乳を含む 25 mM (ビス [2 - ヒドロキシエチル] イミノトリス [ヒドロキシメチル] メタン ; 2 - ビス [2 - ヒドロキシエチル] アミノ [ヒドロキシメチル] - 1 , 3 - プロパンジオール) (Bis Tris) 緩衝液 (pH 7 . 2) 中で 4 . 8 μ g/ml に希釈した 100 μ l アルカリホスファターゼ (Ap) に接合した抗 BrdUモノクローナル抗体と共に 33 で 90 分間インキュベーションした。

30

【 0 0 2 9 】

次いで、プレートを 1 . 5 % (v/v) Triton X-100 を含む 3 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8 . 9) で再度洗浄して、未結合標識抗体を除去した。アルカリホスファターゼ活性は、Tris緩衝液 (pH 8 . 9) に溶解した 4 - メチルウンベリフェリルホスフェート基質を用いて測定した。蛍光は、定義された間隔で 460 nm で Wallac Victor 2リーダで読み取った (励起 355 nm) 。

【 0 0 3 0 】

可変DNA鋳型についての第二の鎖の合成の阻害の測定のプロトコール

修飾したDNAポリメラーゼ分析法で、阻害を検討した。薬剤を5段階で連続希釈し、25 μ l 分量をマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに移し、100 μ l DNAポリメラーゼ反応混合物と混合し、25 μ l の酵素希釈物を加えることによって酵素反応を開始した。非ヌクレオシド類似体は、4種類総てのデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP) の濃度を dNTP 競合阻害薬の研究で 1 μ M まで減少しながら、標準反応条件で検討した。ポリメラーゼ反応を、一晩進行させた (33、16 ~ 24 時間) 。その後、プレートを洗浄することによって、反応を終結した。IC₅₀ 値は、検討を行ったポリメラーゼ活性を 50 % 阻害する薬剤の濃度と定義した。

40

【 0 0 3 1 】

RT活性の測定のプロトコール

Cavidi Tech (ウプサラ, スウェーデン) から発売されている比色によるRT分析法 (Cavidi

50

(商品名) Lenti RTキット)を用いて、検討を行ったウイルス製剤のRT活性のレベルを測定した。この方法は、文献に記載されている(Ekstrand et al 1996)。要約すれば、96穴マイクロタイタープレートのウェルに共有結合したポリ(rA)は、33の逆転写段階中に5-プロモ-デオキシウリジン5'-三リン酸(BrdUTT)の組み込みの鋳型として働く。DNAに組み込まれたプロモデオキシウリジン-リン酸(BrdUMP)の量は、アルカリホスファターゼ(Ap)に接合した抗BrdUMノクローナル抗体を用いて検出される。Ap基質である4-メチルウンベリフェリルホスフェートを最後に用いて、蛍光検出を行う。

【0032】

逆転写の阻害の測定のプロトコール

阻害の検討は、改良Cavidi HSキットLenti RT分析法で行った。阻害薬を5段階で連続希釈し、25 μ l分量をマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに移して、100 μ lのRT反応混合物と混合し、50 μ lの酵素希釈液を加えることによって酵素反応を開始した。最終ヌクレオシド三リン酸基質(BrdUTP)濃度は16 μ Mであり、プライマー(odT₂₂)量は12ng/ウェルであった。RT反応を一晩進行させた(33、16~24時間)。その後、プレートの洗浄によって反応を終結した。IC₅₀値は、検討を行ったRT活性を50%阻害する薬剤の濃度と定義した。

10

【0033】

可溶性の細胞酵素の破壊後にミニカラムからのウイルスRTの単離に基づく、RT遮断抗体を含む材料からのウイルスRTの単離のプロトコール

1) 用いる4.5mlプラスチックチューブを標識する。それらをNalgeneボックスに入れる。試料(例えば、HIV感染個体からのEDTA血漿)1mlをそれぞれの標識したチューブに加える。5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)を緩衝水に溶解した66mM溶液100 μ lを加え、試料を室温で1時間攪拌してインキュベーションする。

20

【0034】

この手続き中に、ピリオン内に含まれる酵素を損なわないままに、遊離の血漿酵素の活性を破壊する。次に、ピリオンを、幾つかの分離手続きによって、5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)、酵素活性遮断抗体およびウイルスRTの定量を妨害することがある他の物質から精製することができる。下記のプロトコールは、Fractogel(商品名)EMD TMAE Hicapゲルの使用に基づいている。

【0035】

2) 分離ゲルを注意深く懸濁し、1500 μ lのゲルスラリーをそれぞれの試料前処理チューブに移す。

30

【0036】

3) チューブをオービタルシェーカー(orbital shaker)上で水平に横倒しにして、試料をゲルスラリーと共に室温で90分間インキュベーションする。

【0037】

4) 所望な量の10mlプラスチックミニカラムを標識して、分析を行う試料を同定する。カラム洗浄装置、すなわちSupelco Visiprep固相抽出真空マニホールドにカラムを設置する。結合チューブの内容物をそれらの相当するカラムに移す。移す前に、チューブを軽く攪拌して、ゲルを均等に分布させる。

40

【0038】

5) 総てのカラムを充填したならば、真空にして、ゲルを吸引乾燥する。真空を止め、それぞれのカラムに9ml緩衝液Aを満たすことによって洗浄を開始する。総てのカラムが満たされたならば、真空にして、ゲルを吸引乾燥する。

【0039】

6) 段階5を更に3回繰り返し、全部で4つの洗浄液を得る。それぞれの洗浄の後に、ゲルを吸引乾燥する。4回目の洗浄の後、ゲルを吸引乾燥した後、真空を止め、段階7に進む。

【0040】

洗浄段階では、未結合のRT遮断抗体および5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸

50

)を系から除去する。

【0041】

7) 総ての乾燥ゲルにコンディショニング緩衝液(B) 9 mlを加える。1分後、真空にして、ゲルを吸引乾燥する。

【0042】

8) 段階7を繰り返す。真空を止める前に、総てのコンディショニング緩衝液(B)が総てのゲルから除去されたことをチェックする。

【0043】

9) カラム洗浄装置の上部を持ち上げる。標識したチューブを有するチューブホルダーを、清浄な容器に設置する。装置の上部を再装備する。それぞれのカラムからの小チュービングがそれらの相当するチューブに下ることを確認する。 10

【0044】

10) 600 μ lのリーシス緩衝液(C)を、それぞれのカラムに加える。緩衝液をカラム中に5分間静止させる。次に、徐々に真空にして、ゲルを吸引乾燥する。これにより、それぞれのチューブに、結合したゲルからウイルス溶解物約600 μ lを生じる。

【0045】

段階10からの溶解物における回収されたRT活性は、本質的にRT遮断抗体、薬剤および細胞ポリメラーゼ活性を持たず、感受性RT活性分析法、すなわちCavidi HSキットLenti RTであって、Ekstrand et al [7]によって報告された方法に基づくもので定量することができる。このプロトコールに準じて得られる25 μ lの溶解物は、試料中のRT活性の測定に 20
十分である。残りの575 μ lの試料は、-70 以下で凍結して、後で薬剤感受性試験に使用するものとする。

【0046】

注： システイン改質剤に感受性でないRT酵素、例えば、野生型HIV1RTは、場合によっては5 mMまでの5, 5 -ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)の存在下で分析することができる。他方、MULVRTおよびある種の治療耐性HIV1株(例えば、突然変異Y181Cを含む)由来のRTのような感受性酵素は、スルフヒドリル還元剤、すなわちシステインまたはシステアミンをリーシス緩衝液に加える必要がある。

【0047】

材料

30

DNAポリメラーゼ分析法のプライマー/鋳型

プライマー配列は、18塩基の5'-GTC-CCT-GTT-CCG-GCG-CCA-3' (配列番号: 12)であり、一次アミンにC6スパーサーアームによって5'末端で結合している。

【0048】

鋳型構築物は、異なる機能を有する3個の部分を含んでいる。5'末端から: BrdUシグナルの増幅に用いる(A)_nポリマー、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸に依存するポリメラーゼ反応を得るための可変部分(GTCA)_m、およびプライマーに相補的な配列。

【0049】

例に包含される実験では、特に断らない限り、n = 12およびm = 5である。

【0050】

40

ヌクレオシド、酵素阻害薬、および抗ウイルス薬

ddATP、2', 3'-ジデオキシアデノシン三リン酸; ddGTP、2', 3'-ジデオキシグアノシン三リン酸; ddCTP、2', 3'-ジデオキシシチジン三リン酸; ddTTP、2', 3'-ジデオキシチミジン三リン酸。TMAU、6-([3, 4-トリメチレン] アニリノ) ウラシル。

【0051】

テノフォビル、(R)-9-(2-ホスホニルメトキシ-プロピル)アデニン; ネビラピン、(11-シクロプロピル-5, 11-ジヒドロ-4-メチル-6H-ジピリド[3, 2-b: 2', 3'-f])[1, 4]ジアゼピン-6-オン(NVP); およびエファビレンツ、(-)-6-クロロ-4-シクロプロピルエチニルトリフルオロメチル-1, 4 50

- ジヒドロ - 2 H - 3 , 1 - ベンズオキサジン - 2 - オン) (EFV)。

【 0 0 5 2 】

酵素

DNAポリメラーゼI (E. coli) は、Amersham Bioscienceから購入した。Staphylococcus aureus由来の組換えDNAポリメラーゼIIIは、文献記載の方法で製造した(Brown et al 1998)。哺乳類DNAポリメラーゼ (子ウシ胸腺) および (ヒト) は、CHIMERx (ミルウォーキー) から購入した。DNAポリメラーゼ は、文献記載の方法でウシ心臓から精製した(Pi leur et al 2000)。

【 0 0 5 3 】

HIV-1RTのNNRTI耐性突然変異体を製造した(L1001, K103N, L100I/K103N, Y181Q)。突然変異の鑄型として、BH10単離物から構築したpETRT発現ベクターを用いた。市販の位置指定突然変異誘発キットQuikChange (Stratagene)を用いて、突然変異を行った。突然変異は、DNA配列分析によって確かめた。RTの突然変異した形態および本来の形態を、上記の方法で単離した[Lindberg et al 2002]。 10

【 0 0 5 4 】

AZT特異的突然変異を有する組換えHIV-1RTの製造の手続きは、突然変異をHXB2-D単離物からRTコード領域に導入することを除き、同様であった。

【 0 0 5 5 】

HIV感染個体由来の血漿試料

未治療患者または通常の組合せ治療で治療した患者由来の血漿試料を、遡及的に選択した。それぞれの試料のHIV-1RNAの量は標準HIV1RNAPCRによって測定した(Cobas, Roche Diagnostics)。リンパ増殖疾患の患者からの血清試料は、the Department of Internal Medicine, Uppsala University, Akademiska sjukhuset, Uppsalaから得た。 20

分離ゲル： 例えば、3.14 mMの(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)(MES) pH 5.1, 4.13 mMのヨウ化カリウムおよびヘパリン0.5 mg/mlにFractogel (商品名) EMD TMAEまたはFractogel (商品名) EMD TMAE Hicapを加えたもの。

ミニカラム、例えば、Biorad Poly-Prep (商品名) (7311553)

ミニカラム洗浄装置、すなわちSupelco Visiprep固相抽出真空マニホールド。

プラスチックチューブ、例えば、Nunc 4.5ml低温チューブ。

固定prAを有するマイクロタイタープレート、すなわちNalge Nunc NucleoLinck (商品名)。 30

システイン改質剤、例えば、0.87 Mのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(pH 8.3)で緩衝した66 mMの5,5-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)水溶液。

穏和なスルフヒドリル還元剤、例えば、33 mMのシステアミン水溶液。

【 0 0 5 6 】

使用緩衝液

A) 洗浄緩衝液： 20 mM MES pH5.4, 500 mM酢酸カリウム(KAc)。

【 0 0 5 7 】

B) コンディショニング緩衝液： RT分析適合性緩衝液、例えば、50 mMの(N-(2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-(2-エタンスルホン酸))(Hepes) pH7.6, KAc 25 mM, 塩化マグネシウム(MgCl₂) 20 mM, エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル), N, N, N', N'-四酢酸(EGTA) 0.2 mM, スペンニン 2 mM、および熱不活性化したウシ血清アルブミン(BSA) 0.5 mg/ml。 40

C) リース緩衝液： 洗剤、例えば、1.25%ポリオキシエチレン4ラウリルエーテル(Brij 30)、13 ng/mlのodT₂₂およびコンディショニング緩衝液(B)と同一成分を含むRT分析適合性緩衝液。SH酸化/修飾に感受性のRTでウイルスを加工するときには、場合によってはスルフヒドリル還元剤、すなわち0.2 mMシステアミンを加える。

【 0 0 5 8 】

RT反応混合物： (N-(2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-(2-エタンスルホン酸))(Hepes) 11.7 mM, pH7.6, BrdUTP 28.3 μM, odT₂₂ 120 ng/ml, MgCl₂ 4 50

mM、デキストラン硫酸 0.5 g/l、スペルミン 2 mM、Triton-X 100 0.5%(v/v)、N, N, N - 四酢酸(EGTA) 0.2 mM、スペンニン 2 mM、および熱不活性化したウシ血清アルブミン(BSA) 0.5 mg/ml。

【0059】

DNAポリメラーゼ およびレトロDNAポリメラーゼ塩基緩衝液 Hepes 50 mM, pH 8.0、MgCl₂ 8 mM、デキストラン硫酸 1.5 g/l、スペルミン 1 mM、Triton-X 100 0.5%(v/v)、EGTA 0.2 mM、ジチオトレイトール(DTT) 1.5 mM、およびウシ血清アルブミン(BSA) 0.5 mg/ml。

【0060】

DNAポリメラーゼ III 塩基緩衝液 (2 - (N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES) 40 mM, pH 6.8, 酢酸カリウム(KAc) 40 mM, MgCl₂ 10 mM, スペルミン 2 mM, ポリオキシソルビタンものラウレート(Tween 20), 0.5%(v/v), EDTA 0.1 mM, ジチオトレイトール 1 mM、およびウシ血清アルブミン(BSA) 50 μg/ml。 10

【0061】

DNAポリメラーゼ 塩基緩衝液 3 - [(1, 1 - ジメチル - 2 - ヒドロキシエチル)アミノ]ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸(AMPSO) 20 mM, pH 8.3, MgCl₂ 1 mM, スペルミジン 3 mM, BSA 1 μg/ml, EDTA 10 μM, DTT 0.1 mM, Tween 20 0.01%。

【0062】

DNAポリメラーゼ反応混合物 24 μMのBrdUTP, 49.5 μMのdGTP, 49.5 μMのdATP, 49.5 μMのdCTP、および500 ngの鋳型/mlで補強したDNAポリメラーゼ塩基緩衝液 20

【0063】

ATPとのレトロDNAポリメラーゼ反応混合物 DNAポリメラーゼ およびレトロDNAポリメラーゼ反応混合物を3.2 mMのATPで強化し、pHを7.1に調整した。

【0064】

例

例 1 HIVRTによる第二の鎖の合成のための異なる鋳型の利用

200 ng/mlから出発する指示された鋳型構築物の2段階希釈シリーズを、「プライマーをコーティングしたマイクロタイタープレートの製造」に準じて固定化プライマーを有するマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに加えた。100 fgの組換えHIV1RTをそれぞれのウェルに加え、RT反応の時間を18時間とした。それぞれの鋳型におけるポリメラーゼ活性を、DNAポリメラーゼ およびレトロDNAポリメラーゼ塩基緩衝液を用いて「DNAポリメラーゼ分析法のプロトコール」に準じて測定した。50 mM NaClあるいは100 mMを、抗BrdUモノクローナル抗体の結合の際に用いた。測定した活性を鋳型の濃度に対してプロットし、それぞれの鋳型の種類について得た最大シグナルをそれぞれのグラフのプラトー値から計算した。 30

【0065】

結果を、表1にまとめる。A-尾の長さとはポリメラーゼ分析法で得ることができる最大シグナルとの間には、明らかな相関が見られた。A-尾の長さは、増加したイオン強度で結合する生成物検出に用いられる抗体の能力にも影響した。 40

【0066】

例 2 DNAポリメラーゼ III のTMAUによる阻害に対する鋳型配列の影響

6 - アニリノウラシルは、グラム陽性菌由来のDNAポリメラーゼ III の選択的阻害薬である。アニリノウラシル分子は、それを不活性なDNA-薬剤-タンパク質複合体に封鎖することによってそのポリメラーゼ III ターゲットを阻害する(Tarantino et al 1990)。薬剤TMAUは、GTPの類似体と考えることができる。1.25 ng/ウェルの組換えDNAポリメラーゼ III に対する所定濃度のTMAUの阻害能は、(CTGA)6-A12(配列番号: 10)(!)または(CTG)6-A3(配列番号: 11)(%)を鋳型として用いる「可変DNA鋳型についての第二の鎖の合成の阻害の測定のプロトコール」に準じて測定した。ポリメラーゼ反応時間は1時間であり、DNAポリメラーゼ III 反応混合物中のGTP濃度は2.5 μMに減少した。所定の鋳型で得られ 50

るポリメラーゼ活性を、阻害薬の非存在下でインキュベーションした同一ポリメラーゼで測定した活性の%に再計算した。

【0067】

結果を、図1に示す。この高度に特異的な阻害薬は、使用した鋳型の配列によって様々な阻害能を示した。本発明は、検討を行う酵素または阻害薬が必要とする特異的条件を説明する目的で容易に変化させることができるDNA鋳型である系を提供する。

【0068】

例3 DNAポリメラーゼ分析法の検出感度

HIV1野生型RT (")、哺乳類DNAポリメラーゼ (#)、およびE. coli DNAポリメラーゼI (%)の連続希釈の活性を、所定の酵素に最適化した塩基緩衝液を用いて「DNAポリメラーゼ分析法のプロトコール」に準じて測定した。用いたポリメラーゼ反応時間は、一晚(18時間)であった。結果を、図2に示す。3種類の酵素製剤のそれぞれは、用いた酵素の量と回収した生成物の量との間に直線関係を示した。分析バックグラウンドは、3800rfu/時であった。有意なシグナル検出のためのカットオフ値として二重バックグラウンドを用いると、10nUまでのHIV1野生型RT、6nUまでの哺乳類DNAポリメラーゼ、および3nUまでのE. coli DNAポリメラーゼIを検出することができた。

10

【0069】

例4 異なる分析系における5種類のDNAポリメラーゼの活性

DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、非ホジキンリンパ腫の患者由来の血清、およびHIV-1 RTを、「DNAポリメラーゼ分析法のプロトコール」および「RT活性の測定のプロトコール」に準じて所定のポリメラーゼ塩基緩衝液に基づく反応溶液を用いて測定した。用いたポリメラーゼ反応時間は、2時間であった。実測した活性を、それぞれの酵素についての最適版条件での可変DNA鋳型での活性の%に再計算した。結果を、表2に示す。検討した5種類の酵素製剤のそれぞれは、最適反応条件に関してそれらを個々に選択した。しかしながら、DNAポリメラーゼ およびヒト血清ポリメラーゼは、同様なパターンを示した。HIV-1 RTおよびDNAポリメラーゼ のみが、逆転写酵素分析法において有意な活性を示した。

20

【0070】

例5 4種類総てのDNA塩基に対するジデオキシ類似体による阻害を測定するためのDNAポリメラーゼ分析法の能力の証明

80fgの組換え野生型HIV1 RTの活性に対する所定濃度のddATP (!)、ddGTT (")、ddCTP (#)およびddTTP (%)の阻害能を、「可変DNA鋳型に対する第二の鎖の合成の阻害の測定のプロトコール」に準じて測定した。それぞれの阻害薬濃度でのポリメラーゼ活性を、阻害薬の非存在下でのコントロールの活性の%に再計算した。結果を、図3に示す。

30

【0071】

鋳型 (CTGA)₆-A₁₂ (配列番号: 10) を用いるポリメラーゼ反応は、4種類のDNA塩基総てに対するジデオキシ類似体による阻害に感受性であることが分かった。IC₅₀の測定値は、ddCTPについての20nMからddATPについての80nMまで変化した。

【0072】

例6 HIV1 RTによる第一および第二の鎖のDNA合成についての非ヌクレオシド阻害薬の影響の比較

所定の組換えHIV1 RTに対する3種類の非ヌクレオシド阻害薬の影響は、DNAポリメラーゼ およびレトロDNAポリメラーゼ塩基緩衝液を用いる「可変」DNA鋳型に対する第二の鎖の合成の阻害の測定のプロトコール および「逆転写の阻害の測定のプロトコール」に準じてそれぞれ測定した。重合反応の時間は、それぞれ(CTGA)₆-A₁₂ (配列番号: 10) での第二の鎖の合成については19時間であり、prAでの第一の鎖の合成については2時間であった。得られたRT活性を、阻害薬の非存在下でインキュベーションした同一RTで測定した活性の%に再計算した。

40

【0073】

結果を、表3にまとめる。これらの分析系はいずれも、耐性(Y181C, V179D)および感受性

50

RT酵素を識別する能力を有していた。阻害薬のいずれかについての IC_{50} 値は、2種類の分析系のいずれかで用いられる酵素の量の5倍の差では有意に影響されなかった。更に、第一または第二の鎖のDNA合成の阻害の測定によって得られる IC_{50} 値には有意差がなかった。

【0074】

例7 抗ウイルス薬テノフォビルに対する耐性の基礎となる生化学機構の証明
ヌクレオシド類似体を用いるHIV感染個体の長期間の治療により、耐性ウイルスが発生する。この過程は、ウイルスpol遺伝子における突然変異の漸進的出現と関連する。酵素レベルでのこれらの置換の影響は複雑であり、原始的なDNAエディティング機能の増加が挙げられる。この反応はヌクレオチド依存性であり、ジヌクレオシドポリホスフェートと伸長性のDNAの3'末端を生成する。 10

【0075】

所定の組換えHIV1 RT4 pg/ウェルに対するテノフォビル三リン酸の連続希釈の影響を、DNAポリメラーゼ およびレトロDNAポリメラーゼ塩基緩衝液に基づく標準反応溶液、およびATPを補足した同一反応溶液を用いて「可変DNA鋳型に対する第二の鎖の合成の阻害の測定のプロトコール」に準じて測定した。重合反応の時間は、19時間であった。得られたRT活性を、阻害薬の非存在下でインキュベーションした同一RTの活性の%に再計算した。結果を、図4に示す。

符号：標準反応溶液中のHIV-1野生型RT (○)、ATPとのDNAポリメラーゼ反応溶液中のHIV-1野生型RT (●)、標準DNAポリメラーゼ反応溶液中のT69S SS/L210W/T215Y HIV-1突然変異体RT (◇)、ATPとのDNAポリメラーゼ反応溶液中のT69S SS/L210W/T215Y HIV-1突然変異体RT (△)。 20

【0076】

図4に示した結果は、ATP依存的加リン酸分解反応を支持する能力を有する反応溶液を用いるときに、野生型と突然変異体RTの薬剤感受性の差が約10倍に増加することを示している。

【0077】

例8 血漿由来RTを用いるネビラピンに対する感受性の測定
ストックホルム、スウェーデンからの3HIV感染個体由来の血漿の1ml試料を、「可溶性細胞酵素を破壊した後、ミニカラムからウイルスRTを単離することに基づく、RT遮断抗体を含む材料からウイルスRTの単離プロトコール」に準じて処理した。それぞれの血漿RTおよび2種類のコントロール酵素を、「DNAポリメラーゼ およびレトロDNAポリメラーゼ塩基緩衝液」を用いる「可変DNA鋳型での第二の鎖の合成の阻害の測定のプロトコール」に準じてネビラピンの連続希釈の組に対して滴定した。図5参照。 30

符号：(1) 140000のゲノムコピー/mlを有する患者1由来のRT、(!) 180000のゲノムコピー/mlを有する患者2由来のRT、および(%) 390000のゲノムコピー/mlを有する患者3由来のRT、(#) 組換えHIV-1野生型RTからなるコントロール、(") 中位のネビラピン耐性を有する組換えHIV-1RT突然変異体RT (L100I)からなるコントロール。

【0078】

患者RTについて測定されたネビラピンに対する IC_{50} 値は、0.7から1.2 μ Mまで変化した。コントロールの野生型RTについては0.5 μ Mであり、中位のネビラピン耐性を有する突然変異体RTについては>10 μ Mであることと比較されたい。 40

【0079】

例9 リンパ増殖性疾患の患者由来の血清におけるDNAポリメラーゼ活性の検出
非ホジキンリンパ腫の4名の患者および6名の健康な血液ドナー由来の血清を、DNAポリメラーゼIII塩基緩衝液で連続希釈した。各希釈段階のポリメラーゼ活性を、2および6時間のポリメラーゼ反応時間を用いる「DNAポリメラーゼ分析のプロトコール」に準じて測定した。

【0080】

DNAポリメラーゼ活性/ μ l血清試料および時間ポリメラーゼ分析法を希釈段階で計算した 50

ところ、形成した生成物の量と分析に加えた血漿の量には直線関係があった（表 4 参照）。

【 0 0 8 1 】

非ホジキンリンパ腫の患者由来のそれぞれの血清試料は、個々の量の DNA ポリメラーゼ活性を含み、DNA-ポリメラーゼと同様の特性を有した（表 3 参照）。活性の量は、健康な血液ドナーで見られた平均値の約 2 ~ 1 9 0 倍の範囲であった。

【 0 0 8 2 】

【表 1】

表 1 HIV RT による第二の鎖の合成のための様々な鋳型の利用

使用した鋳型	最大シグナル* (rfu/時)	バックグラ ウンド(rfu/ 時)	100mM NaCl ^a でのシグナル (最大シグナル の%)	配列番号
(CTGA)5	89444	1629	20	配列番号：1
(CTGA)5-A	63694	1958	25	配列番号：2
(CTGA)5-AA	184421	613	33	配列番号：3
(CTGA)5-AAAA	239688	2565	44	配列番号：4
(CTGA)5-A8	198894	1544	58	配列番号：5
(CTGA)6	60627	1285	22	配列番号：6
(CTGA)6-AAA	83555	1009	ND	配列番号：7
(CTGA)6-A5	119326	914	ND	配列番号：8
(CTGA)6-A9	202668	963	ND	配列番号：9
(CTGA)6-A12	226062	726	ND	配列番号：10
(CTG)6-A3	124334	814	ND	配列番号：11

* 200ng/ml から出発する所定鋳型の二段階希釈シリーズを、固定化プライマーを有するマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに入れた。100fg の組換え HIV1 RT をそれぞれのウェルに加え、RT 反応の時間を 18 時間とした。抗 BrdU モノクローナル抗体の結合の際には、50mM を用いた。実測した活性を鋳型の濃度に対してプロットし、それぞれの鋳型について得られた最大シグナルを計算した。

^aRT 反応条件および計算値は、抗体結合の際に 100mM NaCl を用いたことを除き、「最大シグナル」の場合と同一であった。

【 0 0 8 3 】

【表 2】

表2 様々な分析系における4種類の哺乳類のDNAポリメラーゼおよびHIV RTの見かけの活性

塩基緩衝液	所定分析法におけるDNAポリメラーゼアイソザイムの活性(%*)				
	DNA pol α	DNA pol β	DNA pol γ	血清 DNAp	HIV RT
Pol III	100	17	0	100	0
DNA pol β	40	100	5	30	33
DNA pol γ ^a	1	13	100	9	100
prA/Lenti ^b	0	0	10	0	2175

10

* 所定アイソザイムについての最適塩基緩衝液を有する可変DNA鋳型に対する活性の%。

^a DNAポリメラーゼ γ およびレトロDNAポリメラーゼ塩基緩衝液。

^b プライマー鋳型としてprA/odTを有するRT分析法における活性。

20

【 0 0 8 4 】

【 表 3 】

表3 HIV1 RTによる第一および第二の鎖のDNA合成に対する非ヌクレオシド阻害薬の影響の比較

阻害薬	RT 酵素		鋳型上の IC ₅₀ *	
	種類	量 (fg)	(CTGA) ₆ -A ₁₂	prA
ネビラピン	wt	100	2.0	2.2
	wt	20	2.0	2.5
	Y181C	100	>500	200
	Y181C	20	>500	180
	V179D	100	8	7
	V179D	20	12	8
エファビレンツ	wt	100	0.04	0.02
	wt	20	0.03	0.02
	Y181C	100	0.12	0.15
	Y181C	20	0.14	0.13
	V179D	100	0.5	0.7
	V179D	20	0.4	0.6
フォスカーネツト	wt	100	0.5	0.7
	wt	20	0.5	0.6

* 所定の組換え HIV1 RT に対する 3 種類の非ヌクレオシド阻害薬の影響を、それぞれ「可変 DNA 鋳型での第二の鎖の合成の阻害の測定プロトコール」および「逆転写の阻害の測定のプロトコール」に準じて測定した。重合反応の時間は、それぞれ (CTGA)₆-A₁₂ (配列番号: 10) 上での第二の鎖の合成については 19 時間であり、prA 上での第一の鎖の合成については 2 時間であった。得られた RT 活性を、阻害薬の非存在下でインキュベーションした同一 RT を用いて測定した活性の%に再計算した。

【 0 0 8 5 】

【 表 4 】

10

20

30

40

表4 リンパ増殖性疾患の患者由来の血清における DNA ポリメラーゼ活性の検出

血清コード	血清起源	ポリメラーゼ活性 (rfu/時/ μ l 血清/時間ポリメラーゼ反応)
T1	NHL 患者 ^a	158521
T2	NHL 患者	1305
T3	NHL 患者	3405
T4	NHL 患者	16619
B1-B6	血液ドナー	841 \pm 180

^a 非ホジキンリンパ腫の患者。

* NS, 有意差なし。

10

20

【0086】

非ホジキンリンパ腫の4名の患者および6名の健康な血液ドナー由来の血清を、DNAポリメラーゼIII塩基緩衝液で連続希釈した。各希釈段階でのポリメラーゼ活性を、「DNAポリメラーゼ分析法のプロトコール」に準じて測定した。表にまとめたDNAポリメラーゼ活性を希釈範囲から計算したところ、形成した生成物の量と加えた血漿の量には直線関係があった。分析バックグラウンド854 flU/時を、総ての値から差し引いた。

【0087】

参考文献

Aposhian HV, Kornberg A. J.Biol.Chem. 1962, 237, 519

Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. 「3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)に対するHIV-1の表現型機構：突然変異体ウイルス逆転写酵素のピロリン酸に対する重合加工性の増加および感受性の増加 (Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase)」 Biochemistry. 1998 Nov 10;37(45):15908

Barnes MH, Leo CJ, Brown NC. 「グラム陽性ユーバクテリアのDNAポリメラーゼIIIは必須フィンガー様ドメインを保存する亜鉛金属タンパク質である (DNA polymerase III of Gram-positive eubacteria is a zinc metalloprotein conserving an essential finger-like domain)」. Biochemistry. 1998 Nov 3;37(44):15254-60

Eberle J, Seibl R, Kessler, C, Konig, Bernhard B. 「ポリメラーゼ活性の測定用試薬およびキット(Reagents and kits for determining polymerase activity)」. 1997 米国特許第5,635,350号明細書.

Ekstrand DH, Awad RJ, Kallander CF, Gronowitz JS. 「特にヒト免疫不全ウイルス単離に関するキャリアー結合鑄型と非放射性生成物検出の使用に基づく逆転写酵素活性の定量のための感受性分析法(A sensitive assay for the quantification of based on the use of carrier-bound template and non-radioactive-product detection, with special reference to human-immunodeficiency-virus isolation)」. Biotechnol Appl Biochem. 1996 Apr;23 (Pt 2):95-105.

30

40

50

Goff, S.P. (1990) 「レトロウイルス逆転写酵素：合成、構造および機能(Retrovirus reverse transcriptase: Synthesis, Structure, and Function)」. Review. J Acquir Imm Defic Syndr 3: 817-831.

Gronowitz; J S, Kallander, C F R 「dTkアイソザイム活性の測定方法およびその使用(Method of determining dTk isoenzyme activity and the use thereof)」. 1987 米国特許第 4, 6 3 7, 9 7 7号明細書.

Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. 関連文献。「AZT耐性の機構：突然変異体HIV-1逆転写酵素によるヌクレオチド依存的プライマーのアンプロッキングにおける増加(A mechanism of AZT resistance: an increase in unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase)」. Mol Cell. 1999 Jul;4(1):35-43

Pileur F, Toulme JJ, Cazenave C. 「真核生物のリボヌクレアーゼHIおよびHIIはDNA-RNAハイブリッドに対して特徴的な加水分解パターンを生じる：ミトコンドリアRNアーゼHがRNアーゼHIIであることの更なる証拠(Eukaryotic ribonucleases HI and HII generate characteristic hydrolytic patterns on DNA-RNA hybrids: further evidence that mitochondrial RNase H is an RNase HII)」. Nucleic Acids Res. 2000 Sep 15;28(18):3674-83

Seville M, West AB, Cull MG, McHenry CS. 「DNAポリメラーゼおよび逆転写酵素の蛍光分析法(Fluorometric assay for DNA polymerase and reverse transcriptase)」. Biotechniques. 1996 Oct;21(4):664, 666, 668, 670, 672.

Tarantino PM Jr, Zhi C, Wright GE, Brown NC. 「グラム陽性ユーバクテリアに対する新規な抗微生物薬としてのDNAポリメラーゼIIIの関連阻害薬(Related Inhibitors of DNA polymerase III as novel antimicrobial agents against gram-positive eubacteria)」. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Aug;43(8):1982-7.

Tveit H, Kristensen T. 「蛍光に基づくDNAポリメラーゼ分析法(Fluorescence-based DNA polymerase assay)」. Anal Biochem. 2001 Feb 1;289(1):96-8.

Vandamme AM, Van Vaerenbergh K, De Clercq E. 「抗ヒト免疫不全ウイルス薬の併用法(Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies)」. Antivir Chem Chemother. 1998 May;9(3):187-203.

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】 鋳型配列での変動のTMAUによるDNAポリメラーゼIIIの阻害に対する影響。

【図2】 DNAポリメラーゼ分析法の検出感度。 HIV-1野生型RT()、哺乳類DNAポリメラーゼ (#)、および E. coli DNAポリメラーゼI(%)

【図3】 4種類総てのDNA塩基に対するジデオキシ類似体による阻害を測定するためのDNAポリメラーゼ分析法の能力。 符号：ddATP(!)、ddGT(")、ddCTP(#)、および ddTP(%)

【図4】 抗ウイルス薬テノフォビルに対する耐性の元になっている生化学機構は、ATP依存的加リン酸分解反応の高まりに基くことを示す。 符号：標準反応溶液中のHIV-1野生型RT ()、ATPとの反応溶液中のHIV-1野生型RT()、標準反応溶液中のHIV-1突然変異体RT()、ATPとの反応溶液中のHIV-1突然変異体RT(")

【図5】 HIVに感染した個体由来の血漿から単離したRTを用いる抗ウイルス薬ネビラピンに対する感受性の測定。 符号：('), (!)および(%) 感染個体由来のRT、(#) 組換えHIV-1野生型RTからなるコントロール、(") 突然変異した(L100I)中位のネビラピン耐性を有する組換えHIV-1RTからなるコントロール

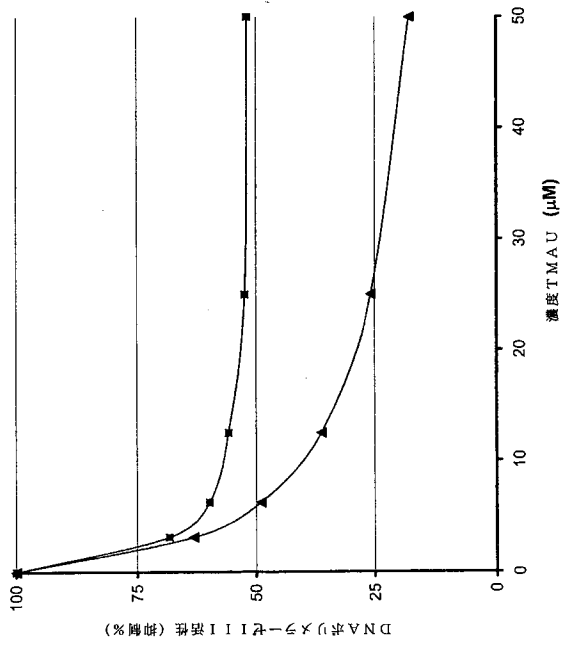
10

20

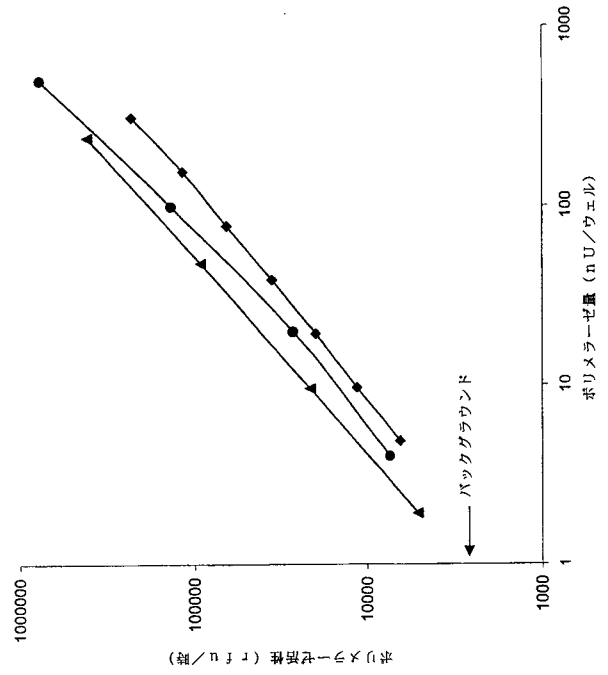
30

40

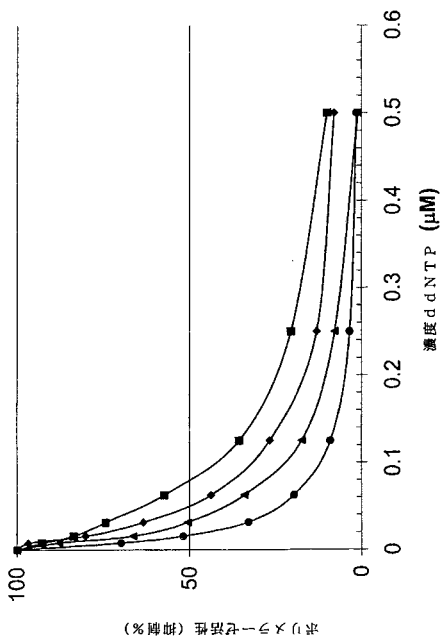
【 図 1 】



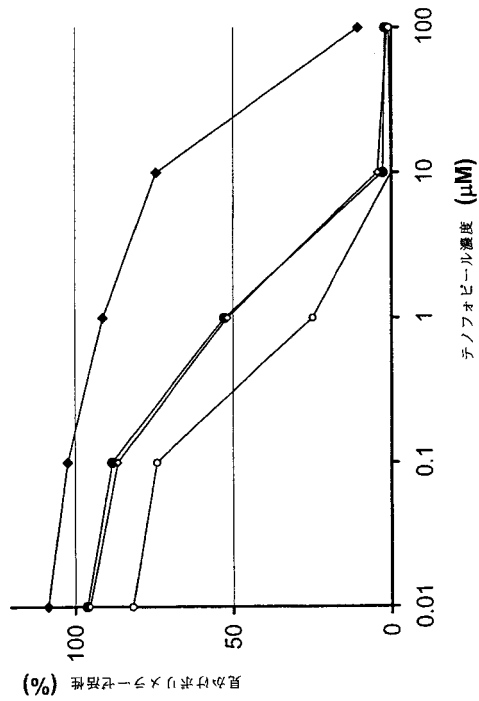
【 図 2 】



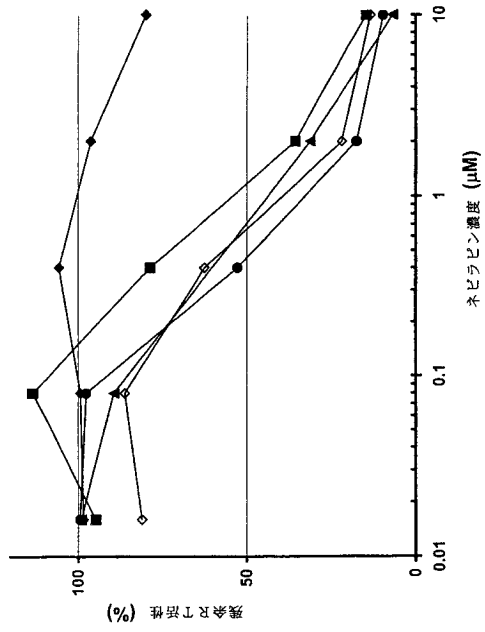
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/103039 A1(51) International Patent Classification: C12Q 1/48, (74) Agents: NILSSON, Brita et al.; Stockholms Patentbyrå
1/70, 1/68 // C12N 9/12 Zacco AB, Box 23101, S-104 35 Stockholm (SE).

(21) International Application Number: PCT/SE02/01155

(22) International Filing Date: 14 June 2002 (14.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/297,773 14 June 2001 (14.06.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): CAVIDI
TECH AB [SE/SE]; Uppsala Science Park, S-751 83 Uppsala (SE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KÅLLANDER, Clas [SE/SE]; Husbygård, Husbyborg, S-755 92 Uppsala (SE); PETTERSSON, Ingvar [SE/SE]; Stagnellsgatan 3, S-754 27 Uppsala (SE); GRONOWITZ, Simon [SE/SE]; Norrbyvägen 51, S-752 39 Uppsala (SE); SHAO, Xingwu [CN/SE]; Rackarbergsgatan 96:230, S-752 32 Uppsala (SE).

(81) Designated States (national): AI, 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, GI, 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, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UZ), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/103039 A1

(54) Title: A METHOD FOR MEASURING DNA POLYMERIZATION AND APPLICATIONS OF THE METHOD

(57) Abstract: A method for measuring DNA-dependent DNA polymerisation in a biological sample, is described. The method comprises the steps of providing a primer with a single stranded short specific sequence, which is unable to base pair internally, bound to a solid phase; contacting the primer construct with a reaction mixture containing a single stranded deoxynucleotide template with a part of the sequence complementary to the primer and the four deoxynucleoside triphosphates, one of which is modified so that it is specifically recognized by a labeled antibody; adding a biological sample comprising the DNA polymerase, such as retrovirus reverse transcriptase (RT), to the mixture; allowing the polymerase reaction to proceed; incubating the immobilized reaction product with the labeled antibody; detecting the amount of bound labeled antibody; and measuring the amount of incorporated modified deoxynucleoside triphosphate, as a measure of the DNA polymerisation, which may be used drug susceptibility testing. A commercial package is also disclosed.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

1

A method for measuring DNA polymerization and applications of the method.

The present invention relates to a method for measuring DNA polymerization and applications of the method. More precisely, the invention relates to a method for measuring
5 DNA-dependent DNA polymerization.

Background

The latest decades have experienced a rapid development of new methods for measurement of reverse transcription, RNA dependent DNA polymerization. The more complex issue concerning methods for quantification of DNA dependent DNA
10 polymerization has so far received much less attention.

The classic DNA polymerase activity assays involve use of DNase treated DNA ("activated DNA") as primer / template and incorporation of radiolabeled nucleotides into DNA (Aposhian and Kornberg 1962). Measurement of acid precipitable radioactivity allows calculation of the amount of nucleotides incorporated and the number of enzyme units
15 present. However, use of radioactivity is currently restricted and discouraged in many laboratories and there is due to this a general trend away from radioactivity-based techniques.

For DNA polymerases a commercial assay based on ELISA detection of digoxigenine labeled nucleotides incorporated in newly made DNA is available (Roche Molecular Biochemicals Cat. no 1468120, US5635350). This assay is hampered by the use of
20 two different nucleotide substrate analogues with bulky groups, digoxigenine as label and biotin for product immobilization. As a result the polymerization reaction velocity and subsequent detection sensitivity is reduced. The utilization of substrate analogues with highly deviating kinetic properties makes this system less relevant for studies of drug susceptibility of different polymerases.

Another more attractive alternative method is a fluorescence-based assay for
25 DNA polymerase holoenzyme, based on the specific reaction of the dye PicoGreen with double-stranded DNA (Seville et al 1996). The latter process has recently been modified to make it suitable for a broader range of different DNA polymerizing enzymes (Tveit and Kristensen 2001). This assay is technically simple and based on the utilization of natural
30 nucleotides. The detection sensitivity is, however, still in the same range as the classic radioactive DNA polymerase assay and the applications described demonstrates a detection range of 0.05-0.5 U DNA polymerase / sample.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

2

HIV therapy today is based on multidrug therapy. The regimens are based on combinations of all three types of drugs available: nucleoside analogues, non-nucleoside analogues and protease inhibitors. The strategy is to minimize the probability for a mutant virus to survive.

5 The reverse transcriptase (RT) inhibitors are either nucleoside analogues or non-nucleoside analogues. The non-nucleoside inhibitors bind to a hydrophobic pocket in the RT enzyme close to, but not contiguous with, the active site. HIV-1 replication is inhibited allosterically by displacing the catalytic aspartate residues relative to the polymerase binding site.

10 The nucleoside inhibitors used today terminates the DNA chain elongation as they lack a 3'-hydroxyl group. Prolonged therapy with nucleoside inhibitors commonly leads to the development of resistant virus. This process is associated with the gradual appearance of mutations in the virus pol gene, each leading to defined amino acid substitutions (for a review see Vandamme et al 1998). The effects of these substitutions at the enzymatic levels is
15 complicated and includes enhancement of a primitive DNA editing function. This reaction is nucleotide dependent and produces dinucleoside polyphosphate and an extendible DNA 3' end (Arion et al 1998, Meyer et al 1999).

 The HIV-1 RT as well as other reverse transcriptases perform three different enzymatic reactions: RNA-dependent DNA polymerization, DNA-dependent DNA
20 polymerization, and degradation of RNA in the DNA-RNA hybrid (RNase H). The HIV reverse transcriptase, encoded by the pol gene, is a heterodimer consisting of a p66 and a p51 subunit. Both RNA-dependent DNA polymerization and DNA-dependent DNA polymerization are performed by the same active site localized in the p66 subunit (for a review see Goff 1990). The reaction mechanism of these drugs has mainly been defined
25 according to their action on the RNA-dependent DNA polymerization reaction. The effect on the DNA-dependent DNA polymerization reaction is comparatively less studied.

 Provided that the reaction mechanism and the active metabolized drug is known and available, phenotypic virus drug susceptibility could be determined at the enzyme level. Depending on the capacity of the enzyme assays and the virus isolation techniques used, the
30 drug sensitivity testing can theoretically be done either on supernatants from virus culture propagation, the primary virus isolation or on virus preparations recovered directly from the patients. Conventional RT activity assay is performed by utilizing an artificial template-primer construction and labeled deoxynucleoside triphosphate as nucleotide substrate. The template / primer pair poly(rA) /oligo(dT) is the most efficient and most used combination for

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

3

determination of HIV as well as for other retroviral RTs. A drawback of this type of assay when drug sensitivity testing is concerned, is that only non-nucleoside analogues or analogues that can base pair with rA can be tested. Analogues to the other nucleotide bases will require an assay based on a variable polymer template. RNA polymers containing pyrimidine bases are notoriously sensitive to RNases and in practice not compatible with biological samples. It would therefore be advantageous to base a polymerase assay intended for drug sensitivity testing on a variable DNA template, provided that the assay system gives results that correlate with those from inhibition of reverse transcription and classic phenotypic drug resistance tests.

HIV therapy used today is only one example of the potency of DNA polymerase inhibitors. The current situation concerning resistance development among bacteria and other microorganisms motivates the search for new classes of antimicrobial drugs. DNA polymerases are one of the major targets during this effort. As such there is a great demand for technically simple polymerase assays, which do not cause potential environmental hazards and can be applied for drug screening towards a broad range of microbial DNA polymerase isozymes. The toxicity of the drug leads found must further be evaluated towards the corresponding mammalian DNA polymerases.

Quantification of proliferation associated polymerases such as polymerase α and δ can be used for monitoring cell proliferation. It may be mentioned in this context that the serum levels of thymidine kinase, another cell proliferation associated enzyme, are currently used for prognosis and classification of malignant disease (US4637977). Phosphorylation of thymidine is just one of the two intracellular synthetic pathways, which provides thymidine triphosphate for DNA synthesis. Measurement of the DNA polymerase itself has the potential to give a more correct estimation of total DNA synthesis compared to thymidine kinase activity or thymidine incorporation.

Description of the invention

The present invention provides a non-radioactive DNA polymerase assay in microtiter plate format enabling colorimetric or fluorimetric product detection.

In a preferred embodiment it utilizes, as nucleoside triphosphate substrate, 5-bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP). The difference in Van der Waals' radius between the 5' position bromine in BrdUTP and the 5' position methyl group in thymidine triphosphate is minimal (1.95 Å compared to 2.0 Å) and the enzyme kinetic properties of

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

4

these two nucleotides are quite similar. The method can be aromatized and have a detection range down to 3nU polymerase activity /sample.

One of the applications of the present invention is drug susceptibility testing. All anti-retroviral drugs approved hitherto interfere with the enzymatic reaction of either the viral protease or the RT. There are in addition candidate drugs in the pipeline which affect the function of the retroviral integrase.

In particular, the present invention provides a procedure to measure a broad range of different DNA-dependent DNA polymerases. It has proved suitable even for studies of highly processive DNA polymerase systems in spite of the comparatively short template used. The usefulness for determination of the activity of bacterial polymerase I and III, mammalian DNA polymerase α , β and γ , a proliferation associated polymerase activity in human serum and DNA dependent DNA polymerization by HIV RT is demonstrated, but the method can be used for studies of virtually all viral and cellular DNA polymerases. One of the features that distinguish the present DNA polymerase assay from previous art is its outstanding sensitivity, which makes detection of down to 3nU E. coli DNA polymerase I activity feasible.

Thus, one aspect of the invention is directed to a method for measuring DNA dependent DNA polymerisation in a biological sample, comprising the steps of

- a) providing a primer with a single stranded short specific sequence, which is unable to base pair internally, bound to a solid phase,
- b) contacting the primer construct with a reaction mixture containing a single stranded deoxy nucleotide template with a part of the sequence complementary to the primer and the four deoxy nucleoside triphosphates, one of which is modified so that it is specifically recognized by a labeled antibody,
- c) adding a biological sample comprising the DNA polymerase to the mixture of b),
- d) allowing the polymerase reaction to proceed,
- e) incubating the immobilized reaction product resulting from d) with the labeled antibody,
- f) detecting the amount of bound labeled antibody with the aid of the label used, and
- g) measuring the amount of incorporated modified deoxynucleotide, as a measure of the DNA polymerization, with the aid of the label of the bound antibody.

In an embodiment the DNA polymerization is made by a retrovirus reverse transcriptase (RT), such as human immunodeficiency virus (HIV) RT.

In another embodiment the modified deoxy nucleoside triphosphate is 5-bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP) and the labeled antibody is an alkaline phosphatase (Ap) conjugated anti-BrdU monoclonal antibody.

In a preferred embodiment of the method according to the invention, the measured DNA polymerisation is used for drug susceptibility testing.

The drug susceptibility testing is performed to evaluate if a certain drug is effective in a mammalian individual, and the result may be used for selecting drug treatment therapy for that individual. In practice, the individual will be subjected to testing at several points of time to monitor the development of drug treatment in said individual.

The invention is also directed to a commercial package comprising written and/or data carrier instructions for measuring DNA-dependent DNA polymerisation according to the invention. The package will comprise at least the following items:

- a) a primer with a single stranded short specific sequence, which is unable to base pair internally, bound to a solid phase,
- b) a single stranded deoxynucleotide template with a part of the sequence complementary to the primer in a),
- c) the four deoxynucleoside triphosphates, one of which is modified so that it is specifically recognized by a labeled antibody, and
- d) the labelled antibody that recognizes the modified deoxynucleoside triphosphate in c).

The invention will now be illustrated by the following unlimiting description of embodiments and drawings of the invention.

The teachings of the cited literature is incorporated herein by reference.

Short descriptions of the drawings.

Figure 1. demonstrates the effects of variation in template sequence on inhibition of DNA polymerase III with TMAU.

Figure 2. exemplifies the detection sensitivity of the DNA polymerase assay. HIV-1 wild type RT (◆), mammalian DNA polymerase β (●) and E. coli DNA polymerase I (▲).

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

6

Figure 3. demonstrates the ability of the DNA polymerase assay to measure inhibition by the dideoxy analogues to all the four DNA bases. Symbols: ddATP (■), ddGT (◆), ddCTP (●) and ddTP (▲).

Figure 4. shows that the biochemical mechanism underlying resistance to the antiviral drug tenofovir is based on enhancement of an ATP dependent phosphorolysis reaction. Symbols: HIV-1 wild type RT in standard reaction solution (○), HIV-1 wild type RT in reaction solution with ATP (●), HIV-1 mutant RT in standard reaction solution (◇), HIV-1 mutant RT in reaction solution with ATP(◆).

Figure 5. exemplifies determination of susceptibility to the antiviral drug Nevirapine using RTs isolated from plasma from HIV infected individuals. Symbols: (□), (■) and (▲) RTs from infected individuals (●) a control consisting of recombinant HIV-1 wild type RT, (◆) a control consisting of mutated (L100I) recombinant HIV-1 RT with intermediate Nevirapine resistance.

15 Description of embodiments

Production of primer coated microtiter plates

1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carboimide hydrochloride (final concentration 10 mg / ml) was added to a 100 mM 1-Methylimidazole buffer (pH 7.0) and the mixture was used to dilute the primer construct to a final concentration of 1 µg /ml. 100 µl of the primer solution was aliquoted to each well of a microtiter plate consisting of Nalge Nunc NucleoLink® transparent strips (Cat no 248259). The plates were incubated 6-8 hours at 37 °C, washed thoroughly in 2M NaOH with 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and soaked in three 5 L vials with water. Residual fluid in the wells was removed by tapping the plates upside down on absorbing cloth or paper. The plates were allowed to dry for 30 min at room temperature and finally frozen for storage at -20 °C.

Protocol for DNA-polymerase assay.

The DNA-polymerase assay is based on a short primer with a specific sequence that is covalently bound to the wells of a 96 well microtiter plate. The reaction mixture contains a single stranded deoxynucleotide template with a part of the sequence complementary to the primer and the four deoxynucleoside triphosphates. Thymidine triphosphate is, however, replaced by 5-bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP). The amount of bromodeoxyuridine monophosphate (BrdUMP) incorporated into DNA during the

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

7

polymerase reaction, is detected with an alkaline phosphatase (Ap) conjugated anti-BrdU monoclonal antibody. An Ap substrate, 4-methylumbelliferyl phosphate, is used for fluorimetric product detection.

- 100 μ l of DNA polymerase reaction mixture was added to each well of the primer coated microtiter plates. The samples were diluted in DNA polymerase base buffer and the polymerase reaction was initiated by transferring 50 μ l sample dilution to each well on the plate. The microtiter plate was incubated at 33 °C and reaction was terminated after indicated times by washing the plate in 3 mM borate buffer (pH 8.9) with 1.5 % (v/v) octaphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100). Usually two incubation times, 4 hours and over night (16 hours), were used to check the linearity of the polymerization reaction. The plates were washed thoroughly in 2M NaOH with 2 mM EDTA and soaked in three 5 L vials with water.

- Next the plates were incubated for 90 minutes at 33 °C with 100 μ l alkaline phosphatase (Ap) conjugated anti-BrdU monoclonal antibody diluted to 4.8 μ g/ml in 25 mM (bis[2-Hydroxyethyl]iminotris[hydroxymethyl]methane; 2-bis[2-Hydroxyethyl]amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propanediol) (Bis Tris) buffer (pH 7.2) with 50 mM NaCl, 37.5 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mg/ ml Dextran sulphate, 1 % TritonX-100 and 25 mg/ ml Sigma non-fat dried milk.

- The plates were thereafter washed again in 3 mM borate buffer (pH 8.9) with 1.5 % (v/v) TritonX-100 to remove unbound labeled antibody. The alkaline phosphatase activity was determined using 4-methylumbelliferyl phosphate substrate dissolved in Tris-buffer (pH 8.9). Fluorescence was read at 460 nm with a Wallac Victor 2 reader at defined intervals (excitation 355 nm).

Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template.

- The inhibition studies were performed in a modified DNA polymerase assay. The drugs were serially diluted in five steps and 25 μ l aliquots were transferred to each well in the microtiter plate, mixed with 100 μ l DNA polymerase reaction mixture and the enzyme reaction was initiated by addition of 25 μ l enzyme dilution. Non-nucleoside analogues were studied at standard reaction conditions while the concentration of all four deoxynucleoside triphosphates (dNTP) were reduced to 1 μ M in the studies of dNTP competing inhibitors. The polymerase reaction was allowed to proceed over-night (16-24 hours at 33°C). Thereafter the reaction was terminated by a wash of the plate. The IC₅₀ value was defined as the concentration of drug giving 50% inhibition of the polymerase activity studied.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

8

Protocol for determination of RT activity.

A modification of the colorimetric RT assay (Cavidi® Lenti RT activity kit), available from Cavidi Tech, Uppsala, Sweden was used for the determination of the level of RT activity in the virus preparations studied. The method has been described (Ekstrand et al 1996). In short, poly(rA) covalently bound to the wells of a 96 well microtiter plate serves as
5 template for the incorporation of 5-bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP) during the reverse transcription step at 33°C. The amount of bromodeoxyuridine monophosphate (BrdUMP) incorporated into DNA, is detected with an alkaline phosphatase (Ap) conjugated anti-BrdU monoclonal antibody. An Ap substrate, 4-methylumbelliferyl phosphate, is finally
10 used for fluorimetric detection.

Protocol for determination of inhibition of reverse transcription.

The inhibition studies were performed in a modified Cavidi HS-kit Lenti RT assay. The inhibitors were serially diluted in five steps and 25 µl aliquots were transferred to each well in the microtiter plate, mixed with 100 µl RT reaction mixture and the enzyme
15 reaction was initiated by addition of 50 µl enzyme dilution. The final nucleoside triphosphate substrate (BrdUTP) concentration was 16 µM and the primer (odT₂₂) amount 12 ng per well. The RT reaction was allowed to proceed overnight (16-24 hours at 33°C). Thereafter the reaction was terminated by a wash of the plate. The IC₅₀ value was defined as the concentration of drug giving 50% inhibition of the RT activity studied.

20 *Protocol for isolation of viral RT from material which contains RT blocking antibodies, based on destruction of soluble cellular enzymes followed by isolation of viral RT from mini columns.*

1) Label the 4.5ml plastic tubes to be used. Place them in a Nalgene box. Add 1 ml of sample (e.g. EDTA plasma from HIV infected individuals) to each labeled tube. Add 100 µl of a
25 66 mM solution of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in buffered water, vortex and incubate the samples for one hour at room temperature.

The activity of the free plasma enzymes is destroyed during this procedure while the enzymes contained within the virions remain intact. The virions can then be purified from 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), enzyme activity blocking antibodies and other substances
30 that may interfere with quantification of viral RT by several separation procedures. The protocol below is based on the use of Fractogel® EMD TMAE Hicap gel.

2) Suspend the separation gel carefully and transfer 1500 µl gel slurry to each sample pre-treatment tube.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

9

- 3) Incubate the samples with the gel slurry for 90 minutes at room temperature with the tubes lying down horizontally on an orbital shaker.
- 4) Label the desired amount of 10 ml plastic mini columns to identify the samples being analyzed. Mount the columns in a column washing device i.e. a Supelco Visiprep solid
5 phase extraction vacuum manifold. Transfer the contents in the binding tubes to their corresponding columns. Before transfer vortex the tube briefly to evenly distribute the gel.
- 5) When all the columns are filled, apply the vacuum and suck the gels dry. Turn off the vacuum and start the washing by filling each column with 9 ml buffer A. When all columns have been filled, apply the vacuum and suck the gels dry.
- 10 6) Repeat step 5 three more times, giving a total of four washes. Suck the gels dry after each wash. After sucking the gels dry after the fourth wash, turn off the vacuum and proceed to step 7.
The washing step removes unbound RT blocking antibodies and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) from the system.
- 15 7) Add to all dry gels 9 ml of conditioning buffer (B). After one minute apply vacuum and suck the gels dry.
- 8) Repeat step 7. Before turning off the vacuum check that all conditioning buffer (B) has been removed from all gels.
- 9) Lift off the upper part of the column wash device. Mount the tube holder with the labeled
20 tubes into a clean container. Refit the upper part of the device. Control that the small tubings from each column go down in their corresponding tubes.
- 10) Add 600 μ l lysis buffer (C) to each column. Let the buffer stand in the column for five minutes. Then apply the vacuum slowly and suck the gels dry. This will in each tube give approximately 600 μ l of virus lysate from the connected gel.
- 25 The RT activity recovered in the lysates from step 10 are essentially free from RT blocking antibodies, drugs and cellular polymerase activity, and can be quantified with a sensitive RT activity assay, i.e. the Cavid HS-kit Lenti RT, which is based on the method described by Ekstrand et al [7]. 25 μ l lysate obtained according to the current protocol is sufficient for determination of the RT activity in the sample. The Remaining 575 μ l sample
30 should be frozen at -70°C or below for later use in the drug sensitivity test.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

10

Note: RT enzymes that are not sensitive to cystein modifying agents e.g. wild type HIV 1 RT can optionally be assayed in the presence of up to 5 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Sensitive enzymes such as MULV RT and RT from certain therapy resistant HIV 1 strains (containing e.g. the mutation Y181C) on the other hand require addition of a sulfhydryl reducing agent i.e. cystein or cysteamine to the lysis buffer.

5

Materials

Primer / Template for DNA polymerase assay.

The primer sequence is 18 bases 5'-GTC-CCT-GTT-CCG-GCG-CCA-3' (SEQ ID NO: 12) and linked at the 5' end to a primary amine by a C6 spacer arm.

10 The template construct contains three parts with different functions. From the 5' end: A (A)_n polymer used to amplify the BrdU signal, a variable part (GTCA)_m to obtain a polymerase reaction that is dependent on the four deoxynucleoside triphosphates and a sequence complementary to the primer.

In the experiments included in the examples n=12 and m=5, if not otherwise is stated .

15 *Nucleosides, enzyme inhibitors and antiviral drugs*

ddATP, 2'3' dideoxyadenosine triphosphate; ddGTP, 2'3' dideoxyguanosine triphosphate; ddCTP, 2'3' dideoxy cytidine triphosphate; ddTTP, 2'3' dideoxy thymidine triphosphate. TMAU, 6-([3,4-trimethylene]anilino)uracil

20 Tenofovir, (R)-9-(2-phosphonylmethoxy-propyl)adenine; Nevirapine, (11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-f][1,4]diazepin-6-one) (NVP); and Efavirenz, (-)-6-chloro-4-cyclopropylethynyl-4-trifluoromethyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoxazin-2-one) (EFV).

Enzymes

DNA polymerase I (*E. coli*) was purchased from Amersham Bioscience.

25 Recombinant DNA polymerase III from *Staphylococcus aureus* was produced as described (Brown et al 1998). Mammalian DNA polymerase α (calf thymus) and β (human) were purchased from CHIMERx (Milwaukee). DNA polymerase γ was purified from beef heart as described (Pileur et al 2000).

30 NNRTI resistant mutant forms of HIV-1 RT were produced (L100I, K103N, L100I/K103N, Y181C). As template for the mutations was used the pETRT expression vector, which was constructed from the BH10 isolate. Mutations were generated using commercial site-directed mutagenesis kits, QuikChange (Stratagene). The mutations were verified by DNA sequence analysis. The mutated and native forms of RT were isolated as previously described (Lindberg et al 2002).

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

11

The procedure for production of recombinant HIV-1 RTs with AZT specific mutations were similar but the mutations were introduced into the RT-coding region from the HXB2-D isolate.

Plasma samples from HIV infected individuals.

- 5 Plasma samples from treatment naïve patients or from patients treated with ordinary combination therapy were selected retrospectively. The amount of HIV-1 RNA in each sample was measured by standard HIV 1 RNA PCR (Cobas, Roche Diagnostica).
- Serum samples from patients with lympho proliferative disorders* were obtained from the Department of Internal Medicine, Uppsala University, Akademiska sjukhuset, Uppsala
- 10 Separation gel: e.g. Fractogel® EMD TMAE or Fractogel® EMD TMAE Hicap in 314 mM (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) (MES) pH 5.1, 413 mM Potassium iodide and Heparin 0.5 mg / ml.
- Mini columns, e.g. Biorad Poly-Prep® (7311553)
- Mini column washing device, i.e. Supelco Visiprep solid phase extraction vacuum manifold.
- 15 Plastic tubes, e.g. Nunc 4.5 ml cryogenic tubes.
- Microtiter plates with immobilised prA, i.e. Nalge Nunc NucleoLinck®
- Cysteine modifying agent, e.g. 66 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) in water buffered with 0.87 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane (pH 8.3).
- Mild sulfhydryl reducing agent, e.g. 33 mM cysteamine in water.
- 20 *Buffers used:*
- A) Wash buffer: 20 mM MES pH 5.4, 500 mM Potassium acetate (KAc)
- B) Conditioning buffer. An RT assay compatible buffer e.g. 50 mM (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (Hepes) pH 7.6, KAc 25 mM, magnesium chloride (MgCl₂) 20 mM, EthyleneGlycol-bis(β-aminoethyl Ether)
- 25 N,N,N',N'-Tetraacetic Acid (EGTA) 0.2 mM, spermine 2 mM and heat inactivated bovine serum albumin (BSA) 0.5 mg / ml.
- C) Lysis buffer: An RT assay compatible buffer including a detergent e.g. 1.25 % Polyoxyethylene 4 Lauryl Ether (Brij 30), 13 ng / ml odT₂₂ and the same components as in the conditioning buffer (B). A sulfhydryl reducing agent, i.e. 0.2 mM cysteamine is
- 30 optionally added when processing viruses with RT that are sensitive to SH oxidation / modification.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

12

RT Reaction mixture: (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (Hepes) 11.7 mM pH 7.6, BrdUTP 28.3 μ M, odT₂₂ 120 ng/ml, MgCl₂ 4 mM, dextrane sulphate 0.05 g/l, spermine 2 mM, Triton-X 100 0.5 %(v/v), EthyleneGlycol-bis(β -aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraacetic Acid (EGTA) 0.2 mM and bovine serum albumin (BSA) 0.5 mg/ml.

5

DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase base buffer. Hepes 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 8 mM, dextrane sulphate 1.5 μ g/l, spermine 1mM, Triton-X 100 0.5 %(v/v), EGTA 0.2 mM, dithiothreitol (DTT) 1.5 mM and bovine serum albumin (BSA) 0.5 mg/ml.

10 *DNA polymerase III base buffer.* (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) (MES) 40 mM pH 6.8, Potassium acetate (KAc) 40mM, MgCl₂ 10 mM, spermine 2 mM, polyoxyethylenesorbitan monolaureate (Tween 20) 0.5 %(v/v), EDTA 0.1 mM, dithiothreitol 1 mM and bovine serum albumin (BSA) 50 μ g/ml.

15 *DNA polymerase β base buffer.* 3-[(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid (AMPSO) 20 mM pH 8.3, MgCl₂ 1 mM, Spermidine3 mM, BSA1 μ g/ml, EDTA10 μ M, DTT 0.1 mM, Tween 20 0.01%.

20 *DNA polymerase reaction mixture.* DNA polymerase base buffer reinforced with 24 μ M BrdUTP, 49.5 μ M dGTP, 49.5 μ M dATP, 49.5 μ M dCTP and 500 ng template / ml.

Retro DNA polymerase reaction mixture with ATP. The DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase reaction mixture was reinforced with 3.2 mM ATP and pH was adjusted to 7.1.

25 Examples

Example 1. Utilization of different templates for second strand synthesis by HIV RT.

Two step dilution series of indicated template constructs starting from 200 ng / ml were included in each well of microtiter plates with immobilized primer according to "Production of primer coated microtiter plates". 100 fg recombinant HIV 1 RT was added to each well and the duration of the RT reaction was 18 hours. The polymerase activity on each template was determined according to "Protocol for DNA-polymerase assay" using DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase base buffer. 50 mM NaCl or alternatively 100 mM was used during the binding of anti-BrdU monoclonal antibody. The activities found were

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

13

plotted towards concentration of template and the maximal signal achieved for each template type were calculated from the plateau value of respective graph.

The results are summarized in Table 1. A clear correlation was found between the length of the A-tail and maximal signal obtainable in the polymerase assay. The length of the A-tail did also affect the ability of the antibody used for product detection to bind at increased ionic strength.

Example 2. Effects of template sequence on inhibition of DNA polymerase III with TMAU.

6-anilinouracils are selective inhibitors of DNA polymerase III from gram-positive bacteria. The anilinouracil molecule inhibits its polymerase III target by sequestering it into an inactive DNA-drug-protein complex (Tarantino et al 1990). The drug TMAU can be regarded as an analogue to GTP. The inhibitory capacity of indicated concentrations of TMAU towards 1.25 ng / well recombinant DNA polymerase III was determined according to "Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template" utilizing either (CTGA)6-A12 (SEQ ID NO: 10) (■) or (CTG)6-A3 (SEQ ID NO: 11) (▲) as template. The polymerase reaction time was one hour and the GTP concentration in the DNA polymerase III reaction mixture was reduced to 2.5 μM. The polymerase activities obtained on indicated template were recalculated into % of the activities found with the same polymerase incubated in absence of inhibitor.

The results are depicted in Figure 1. This highly specific inhibitor exhibited varying inhibitory capacity depending on the sequence of the template used. The current invention provides a system where the DNA template used easily can be changed to account for the specific conditions required by the enzyme or inhibitor studied.

Example 3. Detection sensitivity of the DNA polymerase assay.

The activity of serial dilutions of: HIV 1 wild type RT (◆), mammalian DNA polymerase β (●) and E. coli DNA polymerase I (▲) were measured according to "Protocol for DNA-polymerase assay" utilizing base buffers optimized for indicated enzyme. The polymerase reaction time used was over-night (18 hours). The results are depicted in Figure 2. Each of the three enzyme preparations displayed a linear relationship between amount of enzyme used and amount of product recovered. The assay background was 3800 rfu/ hour. Utilizing double background as cut-off value for significant signal detection it was possible to

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

14

detect down to 10nU HIV 1 wild type RT, 6 nU mamalian DNA polymerase β and 3nU E. coli DNA polymerase I.

Example 4. The activity of five DNA polymerases in different assay systems.

The activity of serial dilutions of DNA polymerase α , DNA polymerase β , DNA polymerase γ , serum from a patient suffering from non-Hodgkin's lymphoma and HIV-1 RT were measured according to "Protocol for DNA-polymerase assay" and "Protocol for determination of RT activity" using reaction solutions based on indicated polymerase base buffers. The polymerase reaction time used was 2 hours. The activities found were recalculated into % of the activity on variable DNA template at the optimal reaction conditions for each enzyme. The results are shown in Table 2. Each of the five enzyme preparations investigated had their individual preferences concerning optimal reaction conditions. DNA polymerase α and the human serum polymerase, however, displayed a similar pattern. Only HIV-1 RT and DNA polymerase γ gave a significant activity in the reverse transcriptase assay.

Example 5. Demonstration of the ability of the DNA polymerase assay to measure inhibition by the dideoxy analogues to all the four DNA bases.

The inhibitory capacity of indicated concentrations of ddATP (■), ddGTT (◆), ddCTP (●) and ddTTP (▲) towards the activity of 80 fg recombinant wild type HIV 1 RT was determined according to "Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template". The polymerase activity at each inhibitor concentration was recalculated into % of the activity of a control in absence of inhibitor. The results are depicted in Figure 3.

The polymerase reaction utilizing the template (CTGA)₆-A₁₂ (SEQ ID NO: 10) was found sensitive to inhibition by the dideoxy analogues to all the four DNA bases. The IC₅₀ values found varied from 20 nM for ddCTP to 80 nM for ddATP.

Example 6. Comparison of the effect of non-nucleoside inhibitors on first and second strand DNA synthesis by HIV 1 RT.

The effects of three non-nucleoside inhibitors on indicated recombinant HIV 1 RT were determined according to "Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template" using DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase base buffer and "Protocol for determination of inhibition of reverse transcription"

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

15

respectively. The duration of the polymerization reactions were 19 hours for the second strand synthesis on (CTGA)₆-A₁₂ (SEQ ID NO: 10) and 2 hours for the first strand synthesis on pRA respectively. The RT activities obtained were recalculated into % of the activities found with the same RT incubated in absence of inhibitor.

5 The results are summarized in Table 3. Both assay systems had the capacity to distinguish between resistant (Y181C, V179D) and sensitive RT enzymes. The IC₅₀ values for any of the inhibitors was not significantly affected of a five fold difference in the amount of enzyme used in any of the two assay systems. Further there was no significant difference between the IC₅₀ values achieved by measuring inhibition of first or second strand DNA
10 synthesis.

Example 7. Demonstration of the biochemical mechanism underlying resistance to the antiviral drug tenofovir.

Prolonged therapy of HIV infected individuals with nucleoside analogues leads to the development of resistant virus. This process is associated with the gradual appearance
15 of mutations in the viral pol gene. The effects of these substitutions at the enzymatic levels are complicated and include enhancement of a primitive DNA editing function. This reaction is nucleotide dependent and produces dinucleoside polyphosphate and an extendible DNA 3' end.

The effects of serial dilutions of tenofovir triphosphate on 4 pg /well of
20 indicated recombinant HIV 1 RT were determined according to "Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template" utilizing standard reaction solution based on DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase base buffer and the same reaction solution supplemented with ATP. The duration of the polymerization reactions was 19 hours. The RT activities obtained were recalculated into % of the activity of the same RT
25 incubated in absence of inhibitor. Figure 4 shows the results.

Symbols: HIV-1 wild type RT in standard DNA polymerase reaction solution (○). HIV-1 wild type RT in DNA polymerase reaction solution with ATP (●), T69S→SS/L210W/T215Y HIV-1 mutant RT in standard DNA polymerase reaction solution (◇),
30 T69S→SS/L210W/T215Y HIV-1 mutant RT in DNA polymerase reaction solution with ATP (◆).

The results depicted in figure 4 demonstrate that the difference in drug susceptibility between wild type and mutant RT increased approximately 10 fold when a

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

16

reaction solution with capacity to support an ATP dependent phosphorolysis reaction was used.

Example 8. Determination of the susceptibility to Nevirapine using plasma derived RT.

One ml samples of plasma from 3 HIV infected individuals from Stockholm, Sweden were processed according to "Protocol for isolation of viral RT from material which contains RT blocking antibodies, based on destruction of soluble cellular enzymes followed by isolation of viral RT from mini columns." Each plasma RT and two control enzymes were titrated towards a set of serial dilutions of Nevirapine according to "Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template" using "DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase base buffer". See Figure 5.

Symbols: (□) RT from patient 1 having 140 000 genome copies /ml, (■) RT from patient 2 having 180 000 genome copies /ml, (▲) RT from patient 3 having 390 000 genome copies /ml, (●) a control consisting of recombinant HIV-1 wild type RT, (◆) and a control consisting of the recombinant HIV-1 mutant RT (L100I), with intermediate Nevirapine resistance.

The IC50 values towards Nevirapine found for the patient RTs varied from 0.7 to 1.2 μ M. To be compared with 0.5 μ M for the control wild type RT and >10 μ M for the mutant RT with intermediate Nevirapine resistance (L100I).

Example 9. Detection of a DNA polymerase activity in serum from patients with lymphoproliferative disorders.

Serum from four patients suffering from non-Hodgkin's lymphoma and from six healthy blood donors were serially diluted in DNA polymerase III base buffer. The polymerase activity at each dilution step were measured according to "Protocol for DNA-polymerase assay" using two and six hours polymerase reaction time.

The DNA polymerase activity / μ l serum sample and hour polymerase assay was calculated at the dilution range where there was a linear relationship between the amount of product formed and the amount of plasma added to the assay (see table 4).

Each serum sample from the patients with non-Hodgkin's lymphoma contained individual amounts of DNA polymerase activity, with similar properties as DNA-polymerase α (see table 3). The amount of activity ranged from approximately 2 to 190 times the average value found among healthy blood donors.

Table 1. Utilization of different templates for second strand synthesis by HIV RT.

5	Template used	Maximal signal* (rfu / hour)	Background (rfu/hour)	Signal at 100 mM		SEQ ID NO:
				NaCl ^a (% of maximal signal)		
	(CTGA)5	89444	1629	20		SEQ ID NO: 1
	(CTGA)5-A	63694	1958	25		SEQ ID NO: 2
	(CTGA)5-AA	184421	613	33		SEQ ID NO: 3
10	(CTGA)5-AAAA	239688	2565	44		SEQ ID NO: 4
	(CTGA)5-A8	198894	1544	58		SEQ ID NO: 5
	(CTGA)6	60627	1285	22		SEQ ID NO: 6
	(CTGA)6-AAA	83555	1009	ND		SEQ ID NO: 7
	(CTGA)6-A5	119326	914	ND		SEQ ID NO: 8
15	(CTGA)6-A9	202668	963	ND		SEQ ID NO: 9
	(CTGA)6-A12	226062	726	ND		SEQ ID NO: 10
	(CTG)6-A3	124334	814	ND		SEQ ID NO: 11

* Two step dilution series of indicated template starting from 200 ng / ml were included in each well of microtiter plates with immobilized primer. 100 fg recombinant HIV 1 RT was added to each well and the duration of the RT reaction was 18 hours. 50 mM was used during the binding of anti-BrdU monoclonal antibody. The activities found were plotted towards concentration of template and the maximal signal achieved for each template was calculated.

^a RT reaction conditions and calculations was identical as in "maximal signal", but 100 mM NaCl was used during the antibody binding.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

18

Table 2. Apparent activity of four mammalian DNA polymerases and HIV RT in different assay systems

		Activity of DNA polymerase isozyme in indicated assay (% *)				
5	Base buffer	DNA pol α	DNA pol β	DNA pol γ	serum DNAP	HIV RT
	Pol III	100	17	0	100	0
	DNA pol β	40	100	5	30	33
	DNA pol γ^a	1	13	100	9	100
10	prA/Lenti ^b	0	0	10	0	2175

* % of activity on variable DNA template with optimal base buffer for indicated isozyme

^a DNA polymerase γ and Retro DNA polymerase base buffer.^b Activity in RT assay with prA / odT as primer template.

15

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

19

Table 3. Comparison of the effect of non-nucleoside inhibitors on first and second strand DNA synthesis by HIV 1 RT.

5	Inhibitor	RT enzyme		IC ₅₀ (µM) on template*	
		Type	amount (fg)	(CTGA) ₆ -A ₁₂	prA
10	Nevirapine	wt	100	2.0	2.2
		wt	20	2.0	2.5
	Y181C	100	>500	200	
	Y181C	20	>500	180	
	V179D	100	8	7	
	V179D	20	12	8	
15	Efavirenz	wt	100	0.04	0.02
		wt	20	0.03	0.02
	Y181C	100	0.12	0.15	
	Y181C	20	0.14	0.13	
	V179D	100	0.5	0.7	
	V179D	20	0.4	0.6	
20	Foscarnet	wt	100	0.5	0.7
		wt	20	0.5	0.6

* The effects of three non-nucleoside inhibitors on indicated recombinant HIV 1 RT were determined according to "Protocol for determination of inhibition of second strand synthesis on variable DNA template" and "Protocol for determination of inhibition of reverse transcription" respectively. The duration of the polymerization reactions were 19 hours for the second strand synthesis on (CTGA)₆-A₁₂ (SEQ ID NO: 10) and 2 hours for the first strand synthesis on prA respectively. The RT activities obtained were recalculated into % of the activities found with the same RT incubated in absence of inhibitor.

30

35

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

20

Table 4. Detection of a DNA polymerase activity in serum from patients with lymphoproliferative disorders.

5	Serum code	Serum origin	Polymerase activity (rfu /hour / μ l serum
			/ hour polymerase reaction))
	T1	NHL patient ^a	158521
	T2	NHL patient	1305
10	T3	NHL patient	3405
	T4	NHL patient	16619
	B1-B6	Blood donors	841 \pm 180

^a Patient suffering from non-Hodgkin's lymphoma.

15 * NS, not significant.

Serum from four patients suffering from non-Hodgkin's lymphoma and from six healthy blood donors were serially diluted in DNA polymerase III base buffer. The polymerase activity at each dilution step were measured according to "Protocol for DNA-polymerase assay". The DNA polymerase activities tabulated was calculated from the dilution range were

20 there was a linear relationship between the amount of product formed and the amount of plasma added. The assay background 854 flu/ h has been subtracted from all values.

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

21

References

- Aposhian HV, Kornberg A. *J.Biol.Chem.* 1962, 237, 519
- Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1
5 resistance to 3'-azido-2'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and
enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry.*
1998 Nov 10;37(45):15908-17.
- Barnes MH, Leo CJ, Brown NC. DNA polymerase III of Gram-positive eubacteria is a zinc
10 metalloprotein conserving an essential finger-like domain. *Biochemistry.* 1998 Nov
3;37(44):15254-60
- Eberle J, Seibl R, Kessler, C, Konig, Bernhard B. Reagents and kits for determining polymerase
activity. 1997 US5635350:
15
- Ekstrand DH, Awad RJ, Källander CF, Gronowitz JS. A sensitive assay for the quantification of
reverse transcriptase activity based on the use of carrier-bound template and non-radioactive-
product detection, with special reference to human-immunodeficiency-virus isolation.
Biotechnol Appl Biochem. 1996 Apr;23 (Pt 2):95-105.
20
- Goff, S.P. (1990) Retrovirus reverse transcriptase: Synthesis, Structure, and Function. Review.
J Acquir Imm Defic Syndr 3: 817-831.
- Gronowitz, J S, Källander, C F R Method of determining dTk isoenzyme activity and the use
25 thereof. 1987 US4637977:
- Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. Related Articles. A mechanism of AZT
resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse
transcriptase. *Mol Cell.* 1999 Jul;4(1):35-43
30
- Pileur F, Toulme JJ, Cazenave C. Eukaryotic ribonucleases HI and HII generate characteristic
hydrolytic patterns on DNA-RNA hybrids: further evidence that mitochondrial RNase H is an
RNase HII. *Nucleic Acids Res.* 2000 Sep 15;28(18):3674-83

WO 02/103039

PCT/SE02/01155

22

- Seville M, West AB, Cull MG, McHenry CS. Fluorometric assay for DNA polymerases and reverse transcriptase. *Biotechniques*. 1996 Oct;21(4):664, 666, 668, 670, 672.
- 5 Tarantino PM Jr, Zhi C, Wright GE, Brown NC. Related Inhibitors of DNA polymerase III as novel antimicrobial agents against gram-positive eubacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Aug;43(8):1982-7.
- Tveit H, Kristensen T. Fluorescence-based DNA polymerase assay. *Anal Biochem*. 2001 Feb 10 1;289(1):96-8.
- Vandamme AM, Van Vaerenbergh K, De Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies. *Antivir Chem Chemother*. 1998 May;9(3):187-203.

15

Claims

1. A method for measuring DNA-dependent DNA polymerisation in a biological sample, comprising the steps of
 - a) providing a primer with a single stranded short specific sequence, which is unable to base pair internally, bound to a solid phase,
 - b) contacting the primer construct with a reaction mixture containing a single stranded deoxynucleotide template with a part of the sequence complementary to the primer and the four deoxynucleoside triphosphates, one of which is modified so that it is specifically recognized by a labeled antibody,
 - c) adding a biological sample comprising the DNA polymerase to the mixture of b),
 - d) allowing the polymerase reaction to proceed,
 - e) incubating the immobilized reaction product resulting from d) with the labeled antibody,
 - f) detecting the amount of bound labeled antibody with the aid of the label used, and
 - g) measuring the amount of incorporated modified deoxynucleoside triphosphate, as a measure of the DNA polymerization, with the aid of the label of the bound antibody.
2. The method according to claim 1, wherein the DNA polymerase is a retrovirus reverse transcriptase (RT).
3. The method according to claim 2, wherein the retrovirus RT is human immunodeficiency virus (HIV) RT.
4. The method according to any one of claims 1 - 3, wherein the modified deoxynucleoside triphosphate is 5-bromodeoxyuridine 5'-triphosphate (BrdUTP) and the labeled antibody is an alkaline phosphatase (Ap) conjugated anti-BrU monoclonal antibody.
5. The method according to any one of claims 1 - 4, wherein the measured DNA polymerisation is used for drug susceptibility testing.

6. Commercial package containing written and/or data carrier instructions for measuring DNA-dependent DNA polymerisation according to any one of claims 1 - 4, comprising
- a) a primer with a single stranded short specific sequence, which is unable to base pair internally, bound to a solid phase,
 - 5 b) a single stranded deoxynucleotide template with a part of the sequence complementary to the primer in a),
 - c) the four deoxynucleoside triphosphates, one of which is modified so that it is specifically recognized by a labeled antibody, and
 - 10 d) the labelled antibody that recognizes the modified deoxynucleoside triphosphate in c).

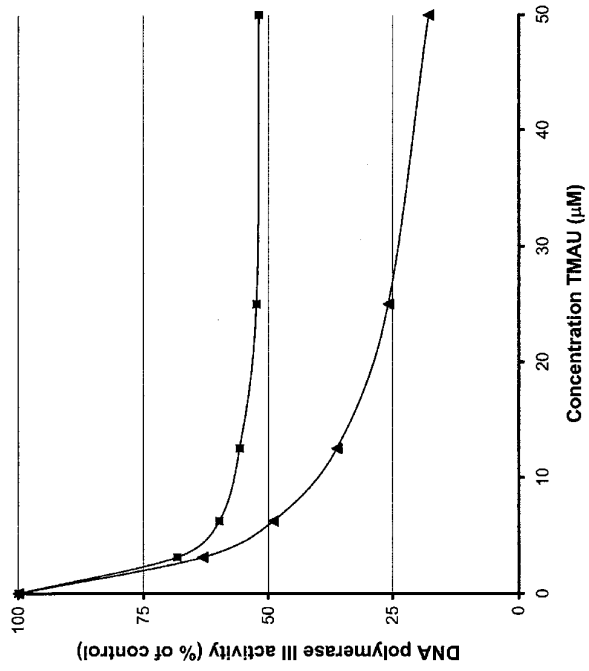
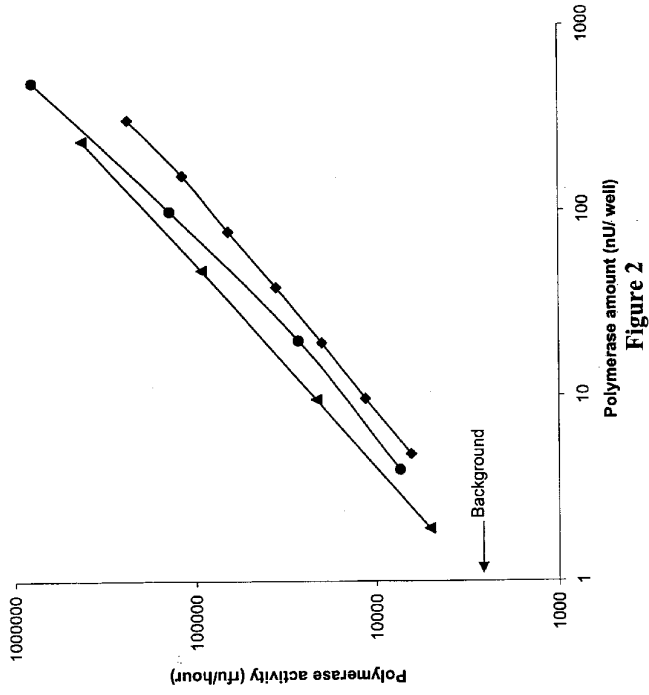


Figure 1



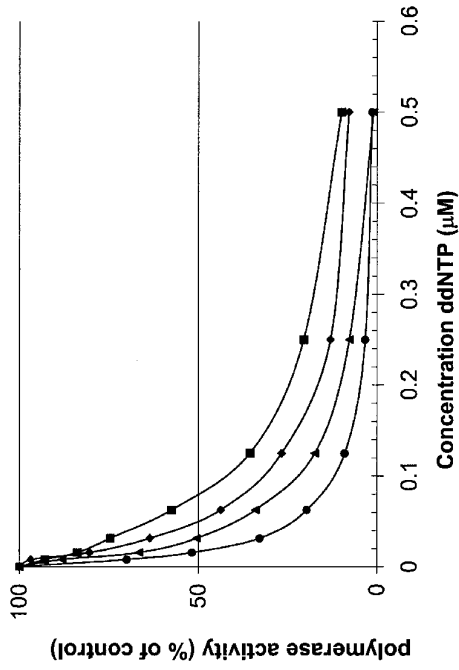


Figure 3

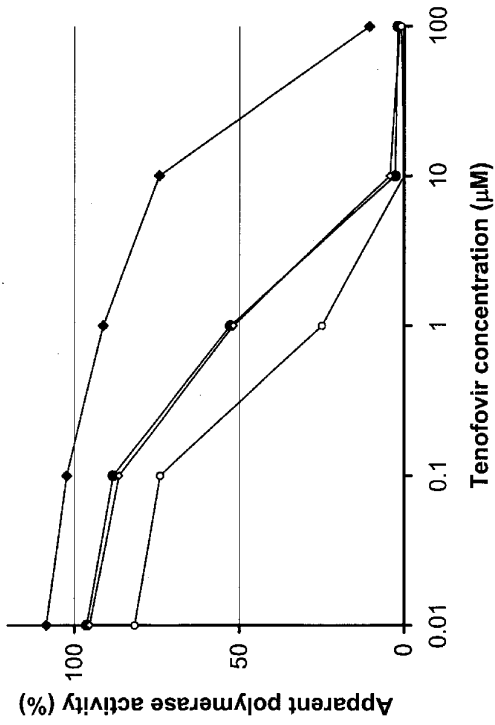


Figure 4

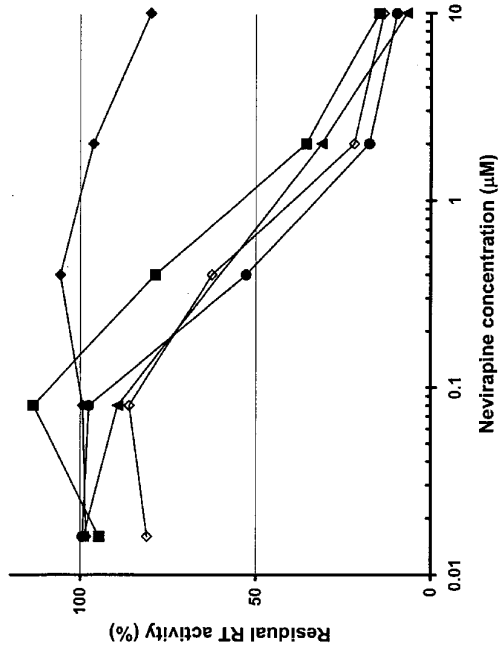


Figure 5

WO 02/103039

1/3

PCT/SE02/01155

SEQUENCE LISTING

<110> Caviidi Tech AB

<120> A method for measuring DNA polymerization and applications of the method.

<130> 110063501

<140>

<141>

<150> US 60/297,773

<151> 2001-06-14

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 1

ctgactgact gactgactga 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 2

ctgactgact gactgactga a 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 3

ctgactgact gactgactga aa 22

WO 02/103039
2/3
PCT/SE02/01155

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 4
ctgactgact gactgactga aaaa 24

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 5
ctgactgact gactgactga aaaaaaaaa 28

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 6
ctgactgact gactgactga ctga 24

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 7
ctgactgact gactgactga ctgaaaa 27

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

WO 02/103039 3/3 PCT/SE02/01155

<400> 8
ctgactgact gactgactga ctgaaaaaa 29

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 9
ctgactgact gactgactga ctgaaaaaaa aaa 33

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 10
ctgactgact gactgactga ctgaaaaaaa aaaaaa 36

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: template

<400> 11
ctgctgctgc tgctgctgaa a 21

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
gtccctgttc cggcgcca 18

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/01155
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C12Q 1/48, C12Q 1/70, C12Q 1/68 // C12N 9/12 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)		
IPC7: C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NO 0101129 A2 (CAVIDI TECH AB), 4 January 2001 (04.01.01), page 3, line 32 - line 35; page 5, line 22; page 8, line 6 - line 10 ----- -----	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance * "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to specify) * "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 * "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 October 2002		10-10-2002
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer PATRICK ANDERSSON/BS Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

30/09/02 International application No.
PCT/SE 02/01155

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0101129 A2	04/01/01	AU 3093200 A	03/07/00
		AU 6150300 A	31/01/01
		BR 0011812 A	02/04/02
		CN 1358232 T	10/07/02
		EP 1185705 A	13/03/02
		SE 9902410 D	00/00/00

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/566

F I

G 0 1 N 33/566

テーマコード(参考)

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 クラス、ケランダー

スエーデン国ウブサラ、フスビーボリ、フスビーゴルド

(72)発明者 イングバル、ペーターソン

スエーデン国ウブサラ、スタグネリウスガタン、3

(72)発明者 シモン、グロノビッツ

スエーデン国ウブサラ、ノルビーベージェン、5 1

(72)発明者 シンウー、シャオ

スエーデン国ウブサラ、ラッカルベルグスガタン、9 6 : 2 3 0

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB50 DA12 DA13 FB03 FB07 FB15

4B024 AA11 AA20 CA01 HA08 HA12 HA15 HA20

4B063 QA01 QA06 QA18 QQ28 QQ42 QQ61 QQ95 QR07 QR08 QR13

QR14 QR32 QR38 QR42 QR50 QR58 QR62 QR66 QR67 QR82

QS15 QS25 QS28 QS33 QS34 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	测量DNA聚合的方法及其应用		
公开(公告)号	JP2004533255A	公开(公告)日	2004-11-04
申请号	JP2003505360	申请日	2002-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	模具技术迪激活Boragu 卡维迪技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Kabidi, 技术, Akuchiboragu		
[标]发明人	クラスケランダー イングバルペーターソン シモングロノビッツ シンウーシャオ		
发明人	クラス、ケランダー イングバル、ペーターソン シモン、グロノビッツ シンウー、シャオ		
IPC分类号	G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6834 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/5308 C12Q1/6834 C12Q1/703 C12Q2563/131 C12Q2533/101 C12Q2525/117		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB15 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ28 4B063/QQ42 4B063/QQ61 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR13 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR67 4B063/QR82 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/297773 2001-06-14 US		
其他公开文献	JP2004533255A5 JP4188228B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了一种测量生物样品的DNA依赖性DNA聚合的方法。这种方法不能是内部碱基对，引物供应具有结合于固相单链短特异性序列，引物构建体，具有一个与引物互补的序列的一部分和脱氧核苷酸模板链，和4种类型的修改中的一个一脱氧三磷酸核苷目标与反应混合物，其包括那些由识抗体特异性地识别接触，向混合物中加入的生物样品，包括DNA聚合酶，诸如逆转录病毒逆转录酶（RT），聚合酶反应使固定的反应产物与标记的抗体一起孵育并孵育结合的标记通过标记结合的抗体检测抗体的量并测量掺入的修饰的脱氧核苷三磷酸的量作为DNA聚合的度量，并且可以用于药物敏感性测试。还公开了商业包装。

(51) Int. Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 2 4
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	Z 4 B O 6 3
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	Z
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に

(21) 出願番号	特願2003-505360 (P2003-505360)	(71) 出願人	501484539 カビダイ、テック、アクチボラジ C A V I D I T E C H A B スエーデン国ウブサラ、ウブサラ、サ ンス、パーク
(86) (22) 出願日	平成14年6月14日 (2002.6.14)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月15日 (2003.12.15)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/001155	(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(87) 国際公開番号	W02002/103039	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		
(31) 優先権主張番号	60/297,773		
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続