

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4188228号

(P4188228)

(45) 発行日 平成20年11月26日(2008.11.26)

(24) 登録日 平成20年9月19日(2008.9.19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G O 1 N	33/15	(2006.01)	G O 1 N	33/15	Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N	33/50	Z
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M

請求項の数 6 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-505360 (P2003-505360)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月14日(2002.6.14)
 (65) 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)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2002/001155
 (87) 国際公開番号 W02002/103039
 (87) 国際公開日 平成14年12月27日(2002.12.27)
 審査請求日 平成17年5月24日(2005.5.24)
 (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)

(73) 特許権者 501494539
 カビディ、テック、アクチボラグ
 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、サイエ
 ンス、パーク
 (74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

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) 【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) プライマーであって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、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、5末端から、(A)nポリマーおよび可変部分(CTGA)mまたは(CTG)mおよびa)のプライマーに相補的な配列からなる一本鎖のデオキシヌクレオチド鋳型構築物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。

【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。

10

20

【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。

【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) プライマーであって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) 5' 末端から、(A)_nポリマーおよび可変部分(CTGA)_mまたは(CTG)_mおよび a) のプライマーに相補的な配列からなる一本鎖のデオキシヌクレオチド鑄型構築物、

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、パッケージ。

【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。

【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/鑄型としての使用、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なってきており、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ピ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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【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。

20

【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。

30

40

【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

50

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】

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。

10

【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。

【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-プ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。

20

【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。

【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、比較的短い鋳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。

30

【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

40

段階を含んでなる、方法に関する。

【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

50

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。

【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パッケージにも関する。このパッケージは、少なくとも下記の項目

- 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鑄型、
- 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。

【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時間インキュベーションし、2 MN aOH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 °Cで凍結保管した。

【0026】

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鑄型を含んでいる。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に組込まれるブロモデオキシウリジン三リン酸(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

20

30

40

50

【 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3mMホウ酸緩衝液 (pH8.9) 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2MNaOH中2mMEDTA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。

10

【 0 0 2 8 】

次に、プレートを、50mMNaCl、37.5mM(NH₄)₂SO₄、1mg/ml硫酸デキストラン、1% TritonX-100および25mg/mlのSigma製脱脂乾燥乳を含む25mM(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 (pH7.2) 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。

【 0 0 2 9 】

次いで、プレートを1.5%(v/v) TritonX-100を含む3mMホウ酸緩衝液 (pH8.9) 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 (pH8.9) 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460nmでWallac Victor 2リーダーで読み取った(励起355nm)。

20

【 0 0 3 0 】

可変DNA鋳型についての第二の鎖の合成の障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、障害を検討した。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。

30

【 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(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)の組込みの鋳型として働く。DNAに組込まれたプロモデオキシウリジン-三リン酸(BrdUMP)の量は、アルカリホスファターゼ(Ap)に接合した抗BrdUモ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。

40

【 0 0 3 2 】

逆転写の障害の測定のプロトコール

障害の検討は、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

50

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。

【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6.6mM溶液100µl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。

【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できる。下記のプロトコールは、Fractogel (商品名) E MD 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、1500µl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。

【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。

【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)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)9ml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。

【0044】

10) 600µl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

10

20

30

40

50

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 µl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 µlの溶解物は、試料中のRT活性の測定に十分である。残りの575 µlの試料は、-70 °C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테인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테인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

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】

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-ジヒドロ-2H-3, 1-ベンズオキサジン-2-オン(EFV)。

【0052】

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(Pileur et al 2000)。

【0053】

HIV-1RTのNNRTI耐性突然変異体を製造した(L1001, K103N, L1001/K103N, Y181Q)。突然変異の鋳型として、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

20

30

40

50

【 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。

分離ゲル：例えば、314 mMの(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)(MES) pH 5.1, 413 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)。

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 pH 5.4, 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) pH 7.6, 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。

C) リーシス緩衝液：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, pH 7.6, BrdUTP 28.3 μM, odT₂₂ 120 ng/ml, MgCl₂ 4 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', 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。

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

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) 2.0 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%。

【 0 0 6 2 】

DNAポリメラーゼ反応混合物 2.4 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。

【 0 0 6 3 】

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。

10

【 0 0 6 4 】

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。

20

【 0 0 6 5 】

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。

【 0 0 6 6 】

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。

30

【 0 0 6 7 】

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。

40

【 0 0 6 8 】

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的関係を示した。分析バックグラウンドは、3800 rfu/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

50

を用いると、10 nUまでのHIV1野生型RT、6 nUまでの哺乳類DNAポリメラーゼ、および3 nUまでのE. coli DNAポリメラーゼIを検出することができた。

【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。

10

【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

80 fg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。

20

【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20 nMからddATPについての80 nM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。

30

【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IC₅₀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IC₅₀値には有意差がなかった。

40

【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。

【0075】

所定の組換えHIV1 RT 4 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

50

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 (")。

【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。

符号：(') 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。

【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)。

【0081】

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2~190倍の範囲であった。

【0082】

10

20

30

40

【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。

20

^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。

【 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 】

10

20

30

40

【表4】

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。

【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鋳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.

10

20

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4,637,977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ブ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

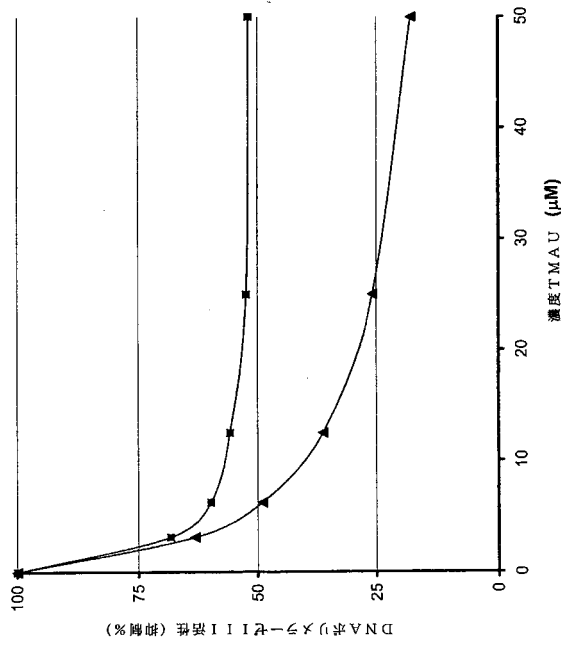
10

20

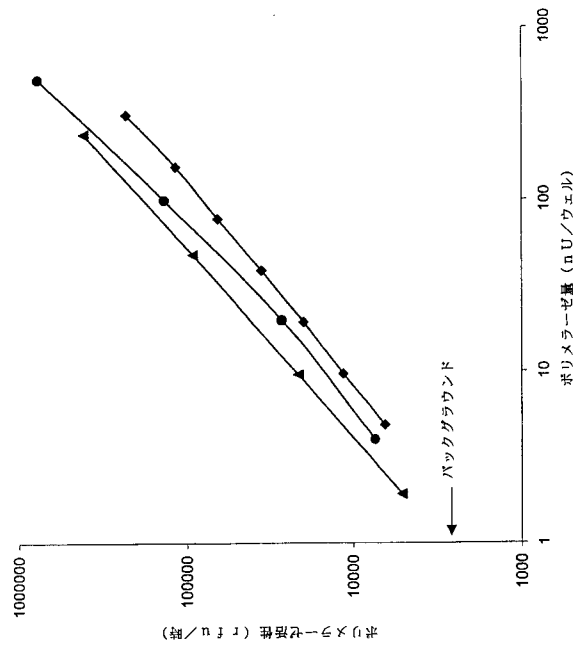
30

40

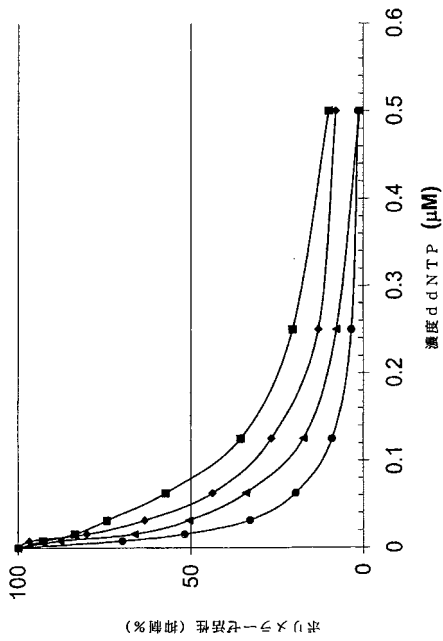
【 図 1 】



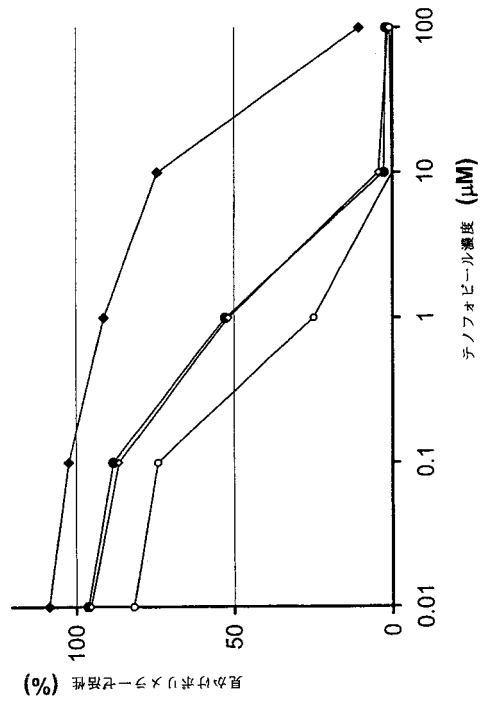
【 図 2 】



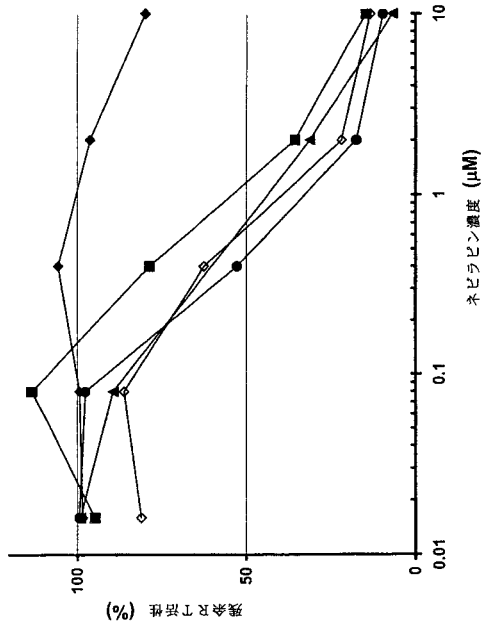
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0004188228000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/566 (2006.01) G 0 1 N 33/566

- (72)発明者 クラス、ケランダー
スエーデン国ウプサラ、フスピーーボリ、フスピーーゴルド
- (72)発明者 イングバル、ペーターソン
スエーデン国ウプサラ、スタグネリウスガタン、3
- (72)発明者 シモン、グロノビッツ
スエーデン国ウプサラ、ノルビーベーゲン、5 1
- (72)発明者 シンウー、シャオ
スエーデン国ウプサラ、ラッカルベルグスガタン、9 6 : 2 3 0

審査官 引地 進

- (56)参考文献 国際公開第01/001129(WO, A1)
特開平04-148698(JP, A)
特表平11-504528(JP, A)
特表平06-509477(JP, A)
Biotechnol. Appl. Biochem., 1996年, Vol.23, pp.95-105

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00-3/00
C12N 15/00-15/90
G01N 33/48-33/98
BIOSIS/WPI(DIALOG)
JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	测量DNA聚合的方法及其应用		
公开(公告)号	JP4188228B2	公开(公告)日	2008-11-26
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		
当前申请(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	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12Q1/6834 C12Q1/70		
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		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
审查员(译)	进Hikichi		
优先权	60/297773 2001-06-14 US		
其他公开文献	JP2004533255A JP2004533255A5		
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链脱氧核苷酸模板和含有四种脱氧核苷三磷酸的反应混合物，其中一种经过修饰以便被标记抗体特异性识别，并进行逆转录病毒逆转录向混合物中加入含有DNA聚合酶如酶(RT)的生物样品，使聚合酶反应进行，将固定化的反应产物与标记的抗体一起孵育，检测结合的标记抗体的量，包括通过标记结合的抗体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，其中药物它可用于药敏试验。还公开了商业包装。

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 ⁺ 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