

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97192932.7

[51] Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1263867C

[22] 申请日 1997.1.29 [21] 申请号 97192932.7

[30] 优先权

[32] 1996.1.29 [33] US [31] 08/593,009

[86] 国际申请 PCT/US1997/001609 1997.1.29

[87] 国际公布 WO1997/027319 英 1997.7.31

[85] 进入国家阶段日期 1998.9.10

[71] 专利权人 病毒科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 丹尼尔·J·卡彭

克里斯托·约翰·彼得罗普洛斯

审查员 郭晓勇

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 李 悦

权利要求书 8 页 说明书 109 页 附图 22 页

[54] 发明名称

用于确定抗病毒药物敏感性和抗性和筛选抗
病毒药物的组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供了确定抗病毒药物的敏感性的方法，包括：(a)将含有来源于病人的区段和指示基因的抗性测试载体导入宿主细胞；(b)培养来自(a)的宿主细胞；(c)测量靶宿主细胞中指示基因的表达；和(d)将来自(c)的指示基因的表达与当缺乏抗病毒药物时进行步骤(a)-(c)时测量的指示基因的表达进行比较，其中抗病毒药物以测试浓度存在于步骤(a)-(c)；步骤(b)-(c)；或步骤(c)。本发明同时提供了确定病人的抗病毒药物抗性的方法。本发明也提供了对候选的抗病毒药物化合物的生物学效力进行评估的方法。提供了含有包括来源于病人的区段和指示基因的抗性测试载体的组合物和抗性测试载体转化的宿主细胞。

1. 一种用于确定病毒对抗病毒药物的敏感性的方法，所述方法包括：
 - (a) 在存在所述抗病毒药物条件下培养寄主细胞，其中所述寄主细胞包含病人起源的区段和指示基因，其中所述指示基因的表达依赖于由所述病人起源的区段编码的基因的活性；
 - (b) 测量所述寄主细胞中所述指示基因的表达量；
 - (c) 将在步骤(b)中测量的所述指示基因的表达量与所述指示基因的表达参考量比较，其中将敏感性确定为所述抗病毒试剂的浓度，在所述浓度下给定百分数的所述指示基因表达被抑制。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述指示基因的表达参考量通过在缺乏所述抗病毒药物的条件下实施权利要求 1 的方法而确定。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述指示基因的表达参考量是通过在缺乏所述抗病毒药物的条件下，用标准实验病毒区段实施权利要求 1 的方法而确定的表达量。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述寄主细胞包含抗性测试载体，所述抗性测试载体包含所述病人起源的区段和所述指示基因。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括基因组病毒载体的 DNA。
6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括亚基因组病毒载体的 DNA。
7. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括衍生自逆转录病毒的 DNA。
8. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括衍生自 HIV 的 DNA。
9. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括编码 *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, 或 *nef* 的 DNA，或其组合。
10. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括肝炎病毒的 DNA。
11. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述抗性测试载体包括 HBV 的 DNA。

12. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述抗性测试载体包括编码 *C*, *P*, 或 *X* 的 DNA, 或其组合。

13. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述病人起源区段包括 *P* 基因。

14. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述病人起源区段包括 HBV 基因。

15. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括 HBV DNA 聚合酶基因。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括功能性病毒序列。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述病人起源的区段编码一种为所述抗病毒药物的靶的蛋白质。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述病人起源的区段编码两种为所述抗病毒药物的靶的蛋白质。

19. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括逆转录病毒基因。

20. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括 HIV 基因。

21. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括 HIV *gag-pol* 基因。

22. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述指示基因是功能性指示基因, 其中所述方法另外包括用抗性测试载体病毒颗粒感染所述寄主细胞的步骤, 所述抗性测试载体病毒颗粒制备自包含抗性测试载体寄主细胞的细胞培养物的过滤上清液, 其中所述感染的步骤是在权利要求1的方法的步骤(a)之前进行的。

23. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述指示基因是非功能性指示基因。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述方法另外包含用抗性测试载体病毒颗粒感染所述寄主细胞的步骤, 所述抗性测试载体病毒颗粒制备自包含抗性测试载体寄主细胞的细胞培养物的过滤上清液, 其中所述感染的步骤是在权利要求1的方法的步骤(a)之前进行的。

25. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述寄主细胞与抗性测试载体寄主细胞一起培养。

26. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中所述抗性测试载体寄主细胞是人细胞。

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述抗性测试载体寄主细胞是人胚胎肾细胞。

28. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述抗性测试载体寄主细胞是 293 细胞。

29. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述指示基因是荧光素酶基因。

30. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述指示基因是大肠杆菌 *lacZ* 基因。

31. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述寄主细胞是人 T 细胞。

32. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述寄主细胞衍生自人 T 细胞白血病细胞。

33. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述寄主细胞是 Jurkat 细胞。

34. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述寄主细胞是 H9 细胞。

35. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述寄主细胞是 CEM 细胞。

36. 一种抗性测试载体, 其包含:

(a) HIV-LTR U3 区或 CMV IE 增强子-启动子;

(b) HIV-LTR R 区;

(c) 包含具有与 LTR 相反的转录方向的插入的 T7 启动子的 HIV-LTR U5 区

(d) 1 个或多个 HIV 或 CMV 基因的编码区, 其包含病人起源的区段;

(e) 插入到缺失的 *env* 基因的指示基因; 和

(f) 3' HIV-LTR,

其中所述指示基因的表达依赖于由所述病人起源的区段编码的基因的活性。

37. 根据权利要求 36 所述的抗性测试载体, 其中所述病人起源的区段包括两个基因。

38. 根据权利要求 36 所述的抗性测试载体, 其中所述病人起源的区

段包括逆转录病毒基因。

39. 根据权利要求 38 所述的抗性测试载体，其中所述病人起源的区段包括 HIV 基因。

40. 根据权利要求 39 所述的抗性测试载体，其中所述病人起源的区段包括 HIV *gag-pol* 基因。

41. 根据权利要求 36 所述的抗性测试载体，其中所述指示基因是功能性指示基因。

42. 根据权利要求 36 所述的抗性测试载体，其中所述指示基因是非功能性指示基因。

43. 根据权利要求 36 所述的抗性测试载体，其中所述指示基因是荧光素酶基因。

44. 根据权利要求 36 所述的抗性测试载体，其中所述病人起源的区段包括肝炎病毒基因。

45. 根据权利要求 44 所述的抗性测试载体，其中所述病人起源的区段包括 HBV 基因。

46. 根据权利要求 45 所述的抗性测试载体，其中所述病人起源区段包括 HBV P 基因。

47. 根据权利要求 45 所述的抗性测试载体，其中所述病人起源区段包括 HBV DNA 聚合酶基因。

48. 一种包装寄主细胞，其包含权利要求 36 的抗性测试载体。

49. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞，其中所述包装寄主细胞是哺乳动物寄主细胞。

50. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞，其中所述包装寄主细胞是人寄主细胞。

51. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞，其中所述包装寄主细胞是人胚胎肾细胞。

52. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞，其中所述包装寄主细胞是 293 细胞。

53. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞，其中所述包装寄主细胞衍生自人肝癌细胞。

54. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞, 其中所述包装寄主细胞是 HepG2 细胞。

55. 根据权利要求 48 所述的包装寄主细胞, 其中所述包装寄主细胞是 Huh7 细胞。

56. 一种用于确定病毒对抗病毒药物的敏感性的方法, 所述方法包括:

(a) 在所述抗病毒药物存在的条件下培养寄主细胞, 其中所述寄主细胞含有病人起源区段和非功能性指示基因, 其中所述非功能性指示基因的表达依赖于由所述病毒区段编码的基因的活性;

(b) 测量所述非功能性指示基因在所述寄主细胞中的表达量; 和

(c) 比较在步骤(b)中测量的所述非功能性指示基因的表达量与所述非功能性指示基因的表达参考量, 其中将敏感性确定为所述抗病毒试剂的浓度, 在所述浓度下给定百分数的所述指示基因表达被抑制。

57. 根据权利要求 56 的方法, 其中所述指示基因的表达参考量是通过在缺乏所述抗病毒药物的条件下, 通过实施权利要求 56 的步骤(a)、(b)和(c)而确定的。

58. 根据权利要求 56 的方法, 其中所述指示基因的表达参考量是在缺乏所述抗病毒药物的条件下, 用标准实验病毒区段实施权利要求 56 的方法确定的表达的标准量。

59. 根据权利要求 56 的方法, 其中所述寄主细胞包含抗性测试载体, 所述抗性测试载体包含所述病人起源的区段和所述指示基因。

60. 根据权利要求 59 所述的方法, 其中所述抗性测试载体包括基因组病毒载体的 DNA。

61. 根据权利要求 59 所述的方法, 其中所述抗性测试载体包括亚基因组病毒载体的 DNA。

62. 根据权利要求 59 所述的方法, 其中所述抗性测试载体包括衍生自逆转录病毒的 DNA。

63. 根据权利要求 59 所述的方法, 其中所述抗性测试载体包括衍生自 HIV 的 DNA。

64. 根据权利要求 59 所述的方法, 其中所述抗性测试载体包括编码 *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* 或 *nef* 的 DNA, 或其组合。

65. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述病人起源的区段编码一种蛋白质。

66. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述病人起源的区段编码两种蛋白质。

67. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括逆转录病毒基因。

68. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括 HIV 基因。

69. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述病人起源的区段包括 HIV *gag-pol* 基因。

70. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述指示基因是荧光素酶基因。

71. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述非功能性指示基因包括置换启动子。

72. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述非功能性指示基因包括置换编码区。

73. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述非功能性指示基因包括颠倒的内含子。

74. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述寄主细胞是人细胞。

75. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述寄主细胞是人 T 细胞。

76. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述寄主细胞与抗性测试载体寄主细胞一起培养。

77. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述方法另外包含用抗性测试载体病毒颗粒感染所述寄主细胞的步骤, 所述抗性测试载体病毒颗粒制备自包含抗性测试载体寄主细胞的细胞培养物的过滤上清液。

78. 根据权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗性测试载体寄主细胞是人细胞。

79. 根据权利要求 78 所述的方法, 其中所述抗性测试载体寄主细胞是人胚胎肾细胞。

80. 根据权利要求 77 所述的方法, 其中所述抗性测试载体寄主细胞

是 293 细胞。

81. 根据权利要求 77 所述的方法，其中所述抗性测试载体寄主细胞衍生自人肝癌细胞。

82. 根据权利要求 77 所述的方法，其中所述抗性测试载体寄主细胞是 HepG2 细胞。

83. 根据权利要求 77 所述的方法，其中所述抗性测试载体寄主细胞是 Huh7 细胞。

84. 根据权利要求 77 所述的方法，其中所述寄主细胞和所述抗性测试载体寄主细胞是相同的细胞类型。

85. 一种确定病毒感染的病人对抗病毒药物抗性的方法，包括：

(a) 根据权利要求 1 所述的方法，确定所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性；和

(b) 比较步骤(a)中确定的所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性与所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性的标准曲线，其中相对于所述标准曲线，所述病毒对所述抗病毒药物敏感性的下降表明了所述病毒对所述抗病毒药物是抗性的，并且所述病毒对所述抗病毒药物敏感性降低的量指示所述病毒对所述抗病毒药物抗性的程度。

86. 一种确定病毒感染的病人对抗病毒药物抗性的方法，包括：

(a) 根据权利要求 56 的方法确定所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性；

(b) 比较步骤(a)中确定的所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性与所述病毒对所述抗病毒药物敏感性的标准曲线，其中相对于所述标准曲线，所述病毒对所述抗病毒药物敏感性的下降表明所述病毒对所述抗病毒药物是抗性的，并且所述病毒对所述抗病毒药物敏感性降低的量指示所述病毒对所述抗病毒药物抗性的程度。

87. 一种确定病毒感染的病人对抗病毒药物抗性的进展或发展的方法，包括：

(a) 根据权利要求 1 所述的方法在第一个时间确定所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性，其中所述病人起源的区段是在大约所述的第一个时间从所述病人获得的：

(b) 在后面的第二个时间与在步骤(a)中所实施的一样确定所述抗病毒药物的有效性；和

(c) 比较步骤(a)和(b)确定的抗病毒药物的有效性，其中与所述第一个时间比较，在所述后面的第二个时间所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性下降表明在所述病毒感染的所述病人中抗病毒药物抗性的发展或进展。

88. 一种确定病毒感染的病人对抗病毒药物抗性的进展或发展的方法，包括：

(a) 根据权利要求 56 所述的方法在第一个时间确定所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性，其中所述病人起源的区段是在大约所述第一个时间从所述病人得到的；

(b) 在后面的第二个时间与在步骤(a)中所实施的一样确定所述抗病毒药物的有效性；和

(c) 比较步骤(a)和(b)中确定的抗病毒药物的有效性，其中与所述第一个时间比较，在所述后面的第二个时间所述病毒对所述抗病毒药物的敏感性的下降表明在所述病毒感染的所述病人中抗病毒药物抗性的发展或进展。

用于确定抗病毒药物敏感性和抗性和 筛选抗病毒药物的组合物和方法

技术领域

本发明涉及用于鉴定用于治疗病毒感染的有效药物方式的抗病毒药物敏感性和抗性的测试。本发明进一步涉及用于进行这些新的抗病毒药物的敏感性和抗性测试的新的载体，宿主细胞和组合物。本发明还涉及对候选药物的抑制选定的病毒序列和/或病毒蛋白质的能力进行筛选。更具体地说，本发明涉及利用重组 DNA 技术首先构建含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体，然后将抗性测试载体导入宿主细胞，并确定在存在抗病毒药物时靶宿主细胞中指示基因产物的表达和抑制。本发明也涉及鉴定当与现存的抗病毒药物比较时具有明显的抗性图谱的抗病毒药物的手段和方法。本发明也涉及用于鉴定和评估潜在的治疗化合物的生物学效力的方法和组合物。更具体地说，本发明涉及用于提供用于治疗各种病毒疾病例如包括 HIV/艾滋病和肝炎的最佳治疗方式的药物敏感性和抗性测试。

发明背景

病毒药物抗性

在传染病领域中，特别是当与 50 多年的抗细菌抗生素的经验比较，将抗病毒化合物用于病毒疾病化学治疗和化学预防是相当新的发展领域。抗病毒化合物的设计途径并不是平坦的，因为病毒存在许多独特的问题。病毒必须在细胞内复制并且常常利用宿主细胞的酶，大分子，和细胞器用于合成病毒颗粒。所以，安全和有效的抗病毒化合物必须能够以高效率地区别细胞特异性的和病毒特异的功能。另外，由于病毒复制的特性，对病毒分离株对抗病毒化合物的体外敏感性的评估必须在含有活细胞(如，组织培养物)的复合培养系统中进行。由于所用的组织培养细胞的类型和测试的

条件不同,从这样的测试系统获得的结果变化很大。尽管存在这些复杂性,九种药物已被同意用于艾滋病治疗,它们是五种逆转录酶抑制剂 AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, 一种非核苷逆转录酶抑制剂, nevirapine, 和三种蛋白酶抑制剂 saquinavir, ritonavir 和 indinavir, 并且最近已经开发了另外几种抗病毒候选药物如 nelfinavir, delaviridine, VX-478 和 1592。

病毒药物抗性是由高速率的病毒复制和突变频率产生的具体问题。首先识别出了对氨硫脲的痘病病毒的 (Appleyard 和 Way(1966) Brit.J.Exptl.Pathol.47,144-51), 对豚的脊髓灰质炎病毒的(Melnick 等(1961) 科学 134, 557), 对金刚烷胺的 A 型流感病毒的(Oxford 等(1970)自然 226, 82-83; Cochran 等(1965) Ann. NY Acad Sci 130, 423 — 429)和对碘苷的单纯疱疹病毒的(Jawetz 等 (1970) Ann. NY Acad Sci 173, 282 — 291)药物抗性突变体。目前已经鉴定了大约 75 种抗各种抗病毒试剂的 HIV 药物抗性突变体(Mellors 等(1995) Intl. Antiviral News, supplement 和 condra, J.H.等(1996)病毒学杂志 70, 8270-8276)。

病毒的小而有效的基因组可使人们对大多数重要的人病毒致病原的分子遗传学、结构和复制循环进行广泛的研究。结果,将它们用于对抗病毒药物的活性和抗性的位点和机制的定性比任何其它类别的药物更为精确 (Richman (1994) 微生物学趋势 2, 401 — 407)。出现抗性突变体可能性与至少四种因素有关: 1) 病毒突变频率; 2) 有关特异性抗病毒的病毒靶位点的突变能力; 3) 抗病毒药物的选择压力; 和。 4) 病毒复制的倍数和速度。关于到第一个因素,对于单链 RNA 病毒来说,其基因组复制缺乏校对读码机制,突变频率约为每复制循环每碱基对 3×10^{-5} 次 (Holland 等 (1992) 当前的微生物免疫论坛 176, 1 — 20; Mansky 等 (1995) 病毒学杂志 69, 5087 — 94; Coffin (1995) 科学 267, 483 — 489)。所以单个 10kb 基因组,如人免疫缺陷病毒(HIV),将有望平均在每三代病毒基因组中平均含有一个突变。关于第二个因素,在响应特异性抗病毒试剂时,病毒靶位点的内在突变能力可以明显地影响产生抗性突变体的可能性。例如, zidovudine(AZT)比其它可行的胸苷类似物 d4T(stavudine)在体外和体内更容易筛选出 HIV 的逆转录酶中的突变。

抗病毒药物的作用的可能的一个不可避免的结果是它对病毒复制给出

足够的选择性压力，从而筛选出药物抗性突变体(Herrmann 等 (1977) *Ann NY Acad Sci* 284, 632 — 7)。关于第三个因素，随着药物接触的增加，对复制病毒群落的选择性压力提高了，从而促进更快速地出现药物抗性突变体。例如，较高剂量比较低剂量的 AZT 趋向于能更快速地选出药物抗性病毒(Richman 等 (1990) *艾滋病杂志* 3, 743 — 6)。只要保持显著水平的病毒复制，这一抗性突变体的选择性压力增加了突变体产生的可能性。

第四个因素，病毒群落的复制的倍数和速度，对于出现抗性突变体的可能性有重要的影响。许多病毒感染的特征是高水平的病毒复制和高速度的病毒产生。这一点对于 HIV 以及乙肝和丙型肝炎 DNA 病毒的慢性感染尤其正确。在具有与 HIV 复制水平的提高相关的 CD4 淋巴细胞数目减少的 HIV 感染病人中出现的 AZT 抗性的可能性提高。

较高水平的病毒增加了预先存在突变体的可能性。已经显示抗性群落的出现产生于预先存在的亚群落的存活和选择性增殖，而该亚群落是在缺乏选择性压力的情况下任意出现的。所有病毒有一个基本突变速度。计算在 HIV 感染过程中每天出现的约 10^{10} 个新病毒粒子(Ho 等人, (1995) *自然* 373, 123 — 126)，每核苷酸 10^{-4} 到 10^{-5} 的突变速度保证了在 HIV 感染过程中在任何时间点差不多预存在任何突变。药物抗性突变体确实存在于 HIV 感染个体的 HIV 的亚群落中的证据正在积累(Najera 等 (1994) *艾滋病研究 人反录病毒* 10, 1479 — 88; Najera 等 (1995) *病毒学杂志* 69, 23 — 31)。同时有文献记载药物抗性细小核糖核酸病毒突变体以约为 10^{-5} 的比率预存在(Ahmad 等 (1987) *抗病毒研究* 8, 27 — 39)。

人免疫缺陷病毒(HIV)

获得性免疫缺陷综合症(艾滋病)是致命的人类疾病，通常认为是至今影响人类的较严重的疾病之一。就全球来说，人免疫缺陷病毒(HIV)感染个体和艾滋病病例的数目无情地增加，并且一些人确信治疗这种疾病的努力的效果有限。现已认识到有两种类型的 HIV：HIV — 1 和 HIV — 2。到 1994 年 1 月 31 日，世界卫生组织已经报道了总数为 1, 025, 073 例艾滋病病例。这只是总病例的一部分，WHO 估计，在 1994 年后期，包括未诊断的，未报告的，和推迟报告的，并根据 HIV 感染的估计数目，在世界范围累计已经有超过 4.5 百万的艾滋病病例(Mertens 等 (1995) *艾*

滋病 9(Suppl A),S259-S272)。由于 HIV 开始传播于北美, 欧洲和亚沙哈拉非洲, 估计超过 19.5 百万男人, 妇女和儿童已经被感染(出处同上)。艾滋病流行的一个明显的特征是它在近 20 年中全球传播, 今天大约 190 个国家有艾滋病病例报道。WHO 的世界范围的 HIV 感染项目才刚刚起步。据推测, 到 2000 年成年人艾滋病病例总数将累计近 1 千万。到 2000 年, 成年人中 HIV 相关的累计死亡人数将从目前的约 3 百万总数上升到超过 8 百万。

HIV - 1 和 HIV - 2 是含有两个相同的 RNA 分子的二倍体基因组的带被膜的逆转录病毒。HIV 的分子结构是(5') U3 - R - U5 - gag - pol - env - U3 - R - U5(3'), 如图 1a 所示。U3, R 和 U5 序列形成长的末端重复(LTR), 它是促进病毒基因表达的调节元件, 有时靠近感染寄主的细胞基因。病毒 RNA 的内部区域编码结构蛋白: gag(p55, p17, p24 和 p7 核心蛋白质), pol(p10 蛋白酶, p66 和 p51 逆转录酶和 p32 整合酶)和 env(gp120 和 gp41 被膜糖蛋白)。Gag 编码多聚蛋白质前体, 该前体被病毒蛋白酶切割成 3 个或 4 个结构蛋白; pol 编码逆转录酶(RT)和病毒蛋白酶和整合酶; env 编码病毒的跨膜和外层糖蛋白。gag 和 pol 基因被表达为基因组 RNA, 而 env 基因被表达为拼接亚基因组 RNA。除了 env 基因, 还存在其它拼接亚基因组 RNA 产生的 HIV 基因, 而对病毒的复制和生物学活性起作用。这些基因包括: 编码激活病毒和一些细胞基因的表达的蛋白质的 tat; 编码促进未拼接或单个拼接的病毒 mRNA 的表达的蛋白质的 rev; 编码似乎是在某些条件下调节病毒繁殖的肉豆蔻酰化蛋白质的 nef; 编码影响病毒颗粒感染靶细胞的能力但似乎不影响病毒的表达或通过细胞与细胞接触而传播的蛋白质的 vif; 编码与病毒颗粒相关的蛋白质的 vpr; 和编码似乎是促进细胞外释放病毒颗粒的蛋白质的 vpu。

没有比艾滋病更好的疾病可以举证病毒药物抗性的问题。已经鉴定出对核苷和非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的药物抗性 HIV 分离物。对 AZT 抗性的 HIV 分离物的出现并不令人惊讶, 因为 AZT 和其它逆转录酶抑制剂只使病毒复制降低约 90%。在存在药物治疗的选择性压力时高速度的病毒复制提供了出现药物抗性突变体出现的理想条件。用 AZT 处理具有高水平病毒复制的感染后期病人比早期感染病人能更快发展出

抗性病毒(Richman 等 (1990) 艾滋病杂志 3, 743 — 6)。对 AZT 的抗性的出现的最初描述是识别出了进行性的和逐步的药物敏感性的减弱(Larder 等人, (1989)科学 243, 1731 — 1734)。通过在编码逆转录酶的基因中识别出的多个突变来解释这一敏感性的降低(Larder 等人(1989)科学 246, 1155 — 1158),这些突变对降低的敏感性的表现型有附加的甚至增效的作用。(Kellam 等 (1992) Pro.Natl.Acad.Sci. 89, 1934 — 1938)。这种突变的累积导致敏感性的进行性降低。用非核苷逆转录酶抑制剂已经看到了同样的效果(Nunberg 等 (1991), 病毒学杂志 65, 4887 — 4892; Sardanna 等 (1992), 生物化学杂志 267, 17526 — 17530)。对蛋白酶抑制剂的研究已经发现具有减弱的药物敏感性的 HIV 菌株的选择发生在几星期内(Ho 等 (1994), 病毒学杂志 68, 2016 — 2020; Kaplan 等(1994) Proc.Natl.Acad.Sci. 91, 5597 — 5601)。最近的研究显示蛋白酶抑制剂比逆转录酶抑制剂更具有效力, 尽管已经产生了抗性。(Condra 等, 同上, 逆病毒和随机感染的第三次会议的报告, 1996 年 3 月)。由剂量减少, 药物反应, 吸收障碍, 或其它因素引起的生物可获得性引起的亚治疗药物水平或自身原因的药物停用, 都使病毒复制增加和突变和抗性机率的提高。

药物治疗的选择性压力使预存在的突变体生长超出。随着在缺乏完全抑制性抗病毒药物活性时病毒复制的继续, 长时间内可获得多重突变的累积, 正如已经对 AZT 和 HIV 的蛋白酶抑制剂叙述过的。确实已经观察到对不同的药物有多重抗性的病毒突变体(Larder 等 (1989) 科学 243, 1731 — 1734; Larder 等 (1989) 科学 246, 1155 — 1158; Condra 等 (1995) 自然 374, 569 — 71)。由于在许多病毒感染中不可避免地出现抗性, 正如 HIV, 面对抗性病毒群落必须设计最佳的治疗方案。确定药物失败对药物抗性的作用是困难的, 因为更容易发展药物抗性的病人更容易有其它混淆的因素, 这些因素将使他们先倾向于更小的预诊断可能性(Richman (1994) 艾滋病研究人反录病毒 10, 901 — 905)。另外, 病人含有具有不同敏感性的病毒的混合物。

B 型肝炎(HBV)

HBV 是急性和慢性肝炎的致病因子, 世界范围内约 2 亿人被感染。Zuckerman A.J. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene(1982) 76,711-718。成人

被 HBV 感染在临床上常常是不明显的，大多数急性感染病人能从疾病中完全恢复并清除病毒。但是，少数情况下，急性肝病可以严重到使病人死于爆发性的肝炎。小部分，也许只有 5 到 10 % 的急性感染病人变成永久性地被病毒感染并发展成各种严重程度的慢性肝病。但是，新生儿传染的 HBV 感染，很少能清除，并且超过 90 % 的这样的儿童变成慢性感染。由于在人口密度高的地区，非洲和亚洲，HBV 通常是通过感染的母亲传播给新生儿，全世界几亿人的肝被 HBV 永久性地感染并遭受各种程度的慢性肝病，这大大地增加了发展成肝硬化和肝细胞癌(HCC)的危险。确实，在具有慢性肝炎的病人中 HCC 的危险增加 100 倍，在出生时感染的男性中 HCC 的生命危险达到 40 %。Beasley RP 等，Lancet (1981) 2,1129-1123。因此，大部分世界人口遭受和死于 HBV 感染的这些后来的并发症。开发抗 HBV 药物已经是众望所归，但是这受到 HBV 特别狭窄的寄主范围的限制：HBV 主要在人和黑猩猩的肝中而不是实验动物或培养细胞中复制。Tiollais, P 等 自然(伦敦)(1985) 317, 489-495。

乙型嗜肝 DNA 病毒是具有紧密基因组结构的 DNA 病毒，它的小的，环形的，3200 碱基对的 HBV DNA 编码四套病毒产物并具有复杂的，多重颗粒结构。HBV 依靠从四个重叠基因：S，C，P，和 X 编码蛋白质的有效的方案获得它的基因组机制。HBV 是动物病毒，嗜肝 DNA 病毒，家族中的一个，并且被分类成 1 型嗜肝 DNA 病毒。相似的病毒感染北美土拨鼠，地下的和树上的松鼠，和北京鸭子的某些种类。所有的嗜肝 DNA 病毒，包括 HBV，具有下面的特征：1) 存在三个明显的形态学特征，2) 所有成员具有与 HBV 的被膜和核衣壳抗原的相应的功能和结构的蛋白质，3) 它们在肝内复制但也能存在于肝外位点，4) 它们含有依赖 RNA 和 DNA 的 DNA 聚合酶活性的内源 DNA 聚合酶，5) 它们的基因组是部分双链环形 DNA 分子，6) 它们与急性和慢性肝炎和肝癌相关，和 7) 它们的基因组的复制是以类似于在逆转录病毒中看到的方式利用病毒内源的 RNA 依赖性 DNA 聚合酶活性通过一个逆转录成 DNA 的 RNA 中间产物进行的。在感染的肝细胞的核中，通过依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶将部分双链 DNA 转化成共价环形双链 DNA(cccDNA)。通过寄主 RNA 聚合酶完成了病毒 DNA 的转录并产生几个起始位点有区别但都终止在共

同的多聚腺苷酸化信号的 RNA 转录物。它们中最长的 RNA 的作用是病毒的前基因组以及一些病毒蛋白质的信息 RNA。由前基因组 RNA 翻译成病毒蛋白质，蛋白质和 RNA 前基因组被包装进入病毒颗粒，并从肝细胞中分泌出来。尽管在体外难于培养 HBV，用 HBV DNA 已经成功地传染了几个细胞导致体外产生 HBV 颗粒。

存在几种 HBV 的特定形式：非感染的 22 纳米的颗粒，它显示为椭圆形或长丝状体形式，和 42 纳米的双壳的球形颗粒，它代表了完整的感染的乙型嗜肝 DNA 病毒颗粒。被膜蛋白质，HBsAg，是 HBV 的 S 基因的产物，并发现存在于病毒粒子的外表面和更小的球形和管形结构上。S 基因开放读码框架的上游是前一 S 基因开放读码框架，前一 S1 和前 S2，它们编码前 S 基因产物，包括用于聚合人血清球蛋白的 HBV 表面的受体和肝细胞受体的附着位点。采用温和的去污剂可以分解完整的 42 纳米的病毒粒子并分离出 27 纳米的核被膜核心颗粒。该核心包括两个 C 基因编码的核衣壳蛋白质。该 C 基因有两个确定核心和前核心区域的起始密码子。核心区域编码的核衣壳核心表面上表达的主要抗原被称为乙型肝炎核心抗原(HBcAg)。通过在前核心 ATG 开始从同样的 C 基因产生乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)。

同时被包装在核衣壳核心内的是 DNA 聚合酶，它指导 HBV DNA 的复制和修复。P 基因，第三个和最大的 HBV 基因，编码 DNA 聚合酶。该酶具有依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶和依赖于 RNA 的逆转录酶活性，并且也是有效地给前基因组 RNA 安装衣壳所必须的。第四个基因 X 编码小的、非颗粒相关的蛋白质，已经证明该蛋白质能够反式激活病毒和细胞基因的转录。

尽管对 HBV 的复制了解很多，HBV 感染的早期步骤还没有很好的确定。没有适当的组织培养测试，不能研究病毒粒子上的细胞受体或附着位点。为解决这一问题，已经研制了某些细胞系，用于评估抗 HBV 药物的人肝胚细胞瘤细胞 Huh (HB 611)(Ueda, K. 等, 病毒学(1989) 169, 213—216)和 HepG2 细胞(Galle, P.R. 和 Theilmann, L. *Arzneim-Forsch. Drug Res.* (1990) 40, 1380—1382)。

最近，注意力已经集中到 HBV 的分子突变体。在整个 HBV 基因组中

存在着各种变化,已经可以将不表达病毒蛋白质的 HBV 的临床分离物归功于在个体中甚至多个基因定位中的突变。例如,已经描述了缺乏核衣壳蛋白质,被膜蛋白质,或两者的突变体。已经有两种突变体引起了注意。第一个是在患有严重慢性 HBV 感染的某些病人中发现的。发现这些感染的病人具有 HBV 突变体,这些突变体含有变化的前核心区域,使病毒不能编码 HBeAg。在这些病人中最通常遇到的突变是从 G 到 A 的单碱基替代,它存在于核苷酸 1896 的前 C 基因的最后的密码子的第二个碱基。这一替代导致终止密码子(TAG)替代了 TGG 色氨酸密码子,阻止了 HBeAg 的翻译。不能分泌 HBeAg 的具有这样的前核心突变体的病人趋向于具有严重的快速发展成肝硬化,并且不容易对抗病毒治疗应答的肝病。第二类 HBV 突变体包括逃逸突变体,其中从甘氨酸到精氨酸的单个氨基酸的替代发生于所有 HBsAg 的亚型共有的免疫决定簇的 1 4 5 位置。HBsAg 的这种变化导致关键性的构型变化,构型的变化导致抗 HBs 抗体的中和活性的损失。

目前可得的病毒抗性测试

通常将病毒药物敏感性定义为在给定的病毒复制抑制百分数的抗病毒试剂的浓度(如,抗病毒剂的 IC_{50} 即是在该浓度下 50 % 的病毒复制受抑制)。所以,病毒药物敏感性的下降是该抗病毒剂已经筛选出了抵抗该抗病毒药物的突变体病毒的公用标记。病毒药物抗性通常定义为在一定时间内给定病人中病毒药物敏感性的下降。在临床上,抗病毒药物效力减小或不再具有临床效力证实了病毒药物抗性。

目前,研究工作人员和临床工作人员可得到的评估抗病毒药物敏感性和抗性的工具是不够的。用于确定 HIV 对抗病毒试剂的抗性和敏感性的临床测试是复杂的,耗时的,昂贵的,并且是危险的,因为它需要培养来自各个和每个病人的致病病毒(Barre — Sinoussi 等 (1983) 科学 220 , 868 — 871 ; Popovic 等 (1984) 科学 224 , 497 — 500)。在这个过程中,首先培养病人的外周血单核细胞(PBMC)以便建立感染复数(moi)已知的病毒原种,并将由此产生的病毒原种用于感染靶指示细胞系。然后通常通过确定细胞培养物中病毒抗原的产生,在存在和缺乏抗病毒试剂时测量获得的病毒复制的爆发。这样的测试只能依赖于专家研究者的手操作,并且每

个病人，每种测试的试剂需要两到三个月，花费成千美元。另外，由于具有足够感染复数的病毒原种不能从一些 HIV 病人的 PBMC 建立，不能对所有 HIV 感染个体进行经典的 HIV 抗性测试。更为重要的是，在通过病毒培养产生病毒原种的传代过程中，病毒本身的特征可以改变，可能会掩盖病人的病毒的真实特性。所以，经典的测试已被局限于关于临床测试趋势的信息的收集，并且不用于对给定病人按个别需要进行抗病毒治疗的前景分析。尽管有这些限制，经典测试具有两个重要的优点：他在评估时特异于该试剂，和它提供病人自身病毒的表现型的信息，即是，50 %抑制病毒复制的药物的浓度(IC₅₀)。

已经作了许多努力对经典测试加以改善，但其中各有严重的缺点。这些测试的第一种类型可以描述为非特异性，因为它们完全不能确定病人本身的病毒的特征，但是却提供了感染过程的独立测量方法。这些测试是测量病人的 CD4⁺ T 细胞数，HIV 疾病进展的公用标记(Goedert 等 (1987) JAMA 257, 331 — 334)，测量病毒抗原水平(如，p24 核心抗原(Allain 等(1987) N.Engl.J.Med. 317, 1114 — 1121))，和测量病毒 RNA 和 DNA 水平(如，定量的聚合酶链式反应和支链 DNA 测试(Piatlak 等(1993)科学 259, 1749 — 1754；Urdea (1993) 临床化学 39, 725 — 726))。这些非特异测试最初的缺点是它们不提供病毒药物抗性的任何信息，而试图从病人疾病的表观过程中推断这一信息。另外，除病毒药物抗性外的许多因素可以影响所考虑的参数的水平。用另一句话说，在疾病期间，除了药物抗性以外的原因可以使 CD4⁺ T 细胞计数，p24 抗原水平和 HIV 病毒 RNA 水平发生变化。

另一个改良的经典测试是扩增病毒基因，该基因是抗病毒试剂的靶。在这一测试中，扩增了来自给定病人的病毒基因，然后被重组进入 HIV 的生物学活性原病毒克隆。将这一原病毒克隆转染进入人细胞以便产生随后可以用于感染靶指示细胞系的已知感染复数的病毒原种。在经典测试的方式中，在存在或缺乏抗病毒试剂时可以确定病毒抗原的生产。Kellam 和 Larder(1994) 抗微生物试剂和 Chemo.38, 23 — 30, 叙述的这样一个测试包括将来自病人的逆转录酶编码序列进行 PCR 扩增，然后通过同源重组将其导入原病毒 DNA 克隆以便重新构建含有缺失的逆转录酶基因的

完全的病毒基因组。然后在 T 一细胞系培养从这样的克隆产生得到的重组病毒，并且在 HeLa CD4⁺噬菌斑减弱测试中测试该药物的敏感性。但是，这类测试仍然需要培养病毒以便确定药物的抗性，因而是困难的，耗时的和昂贵的，并需要实验室研究者操作危险的病毒培养物。另外，考虑到培养过程中的病毒本身伴随着变化，结果相应地可能是不精确的。

第二类测试试图提供关于病人的 HIV 的基因型的信息，而最终的目的是将这一基因型信息与病毒的药物抗性表现型相联系。事实上，已经证明在病毒基因如逆转录酶和蛋白酶基因内的特定的氨基酸替代分别对应于病毒对逆转录酶和蛋白酶抑制剂抗性的特定水平(Larder 等 (1994) 病毒遗传学杂志 75, 951 - 957)。与这一分析相关的主要的缺点是，它是间接的，并且可以被第二次突变掩盖，该第二次突变已显示出可增加或抵销第一个突变的效果。正是在给定病毒多肽内的所有氨基酸残基的复杂的相互作用最终确定了在存在或缺乏抑制剂时基因产物的活性。所以，鉴于 HIV 基因组中的潜在的氨基酸变化，需要巨大的和不同寻常比例的数据库来说明给定基因型的药物抗性或敏感性状况。

第三类测试，最新开发的基于细菌的测试，利用了分子克隆的病毒基因(具体地说是逆转录酶基因)，该基因已经插入细菌表达载体。在转化了其中细菌 DNA 聚合酶 I 有缺陷的大肠杆菌的特殊菌株之后，克隆的逆转录酶基因可以在选择性生长条件下挽救细菌的生长。使大肠杆菌的生长依赖于逆转录酶之后，我们就确定某些逆转录酶抑制剂对该病毒基因的活性的效果(PCT 申请号 WO 95/22622)。但是，这一途径的一个主要的缺点是该抑制剂可以穿过细胞膜并通过细菌进行不同于人细胞的代谢，结果，逆转录酶的真正代谢抑制剂的浓度在细菌中与在相关的感染的人细胞靶中可以完全不同，或者真正的抑制剂可能完全缺乏。确实，已知核苷代谢在人和细菌细胞中明显不同。这一途径的另一个明显的缺点是这一测试方法测量了逆转录酶的依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性而不是依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性，逆转录酶的链转移或 RNA 酶 H 活性。所以，在这一测试中至少部分地对这些其它活性起作用的抗病毒化合物将不具有它的整个抑制活性。这一途径的另一个难点是它是生长基础上的测试；所以如果抑制剂（如核苷类似物）由于对逆转录酶的影响外的原因阻止细

菌的生长，它就不能在这一系统中得到充分的测试。

病毒载体

由于逆病毒载体高效率感染靶细胞和整合进靶细胞基因组的能力，已经将病毒载体，特别是逆病毒载体用于修饰哺乳动物细胞。由于它们插入哺乳动物基因组的能力，更多的关注集中在用于基因治疗的逆病毒载体。在包括欧洲专利申请 EP A 0 178 220，美国专利 4，405，712，PCT 申请 WO92/07943，美国专利 4，980，289，美国专利 5，439，809 和 PCT 专利 WO 89/11539 的专利和专利公开物中可以发现逆病毒载体和它们的用途的详细情况。这些专利和公开物的内容引入本文作为参考。

把重点放在逆病毒载体技术上的一个结果是已经开发了包装细胞系。使用逆病毒的一个主要的问题是可能传播有能力复制的逆病毒。所以需要生产不能加工成病毒粒子的辅助载体。结果开发出了包装缺陷载体和包装细胞系。在包括美国专利 5，124，263，欧洲专利申请公开号 0386 882，PCT 申请号 WO91/19798，PCT 申请号 WO88/08454，PCT 申请号 WO93/03143，美国专利号 4，650，764，美国专利 4，861，719 和美国专利 5，278，056 的专利和专利公开物中可以发现包装缺陷的载体和包装细胞系的详细情况，这些公开物引入本文作为参考。

本发明的一个目的是提供一种能够显示病人中的病毒群落是否对给定的药物有抗性的药物敏感性和抗性测试。本发明的另一个目的是提供一种能够使医生在先期治疗后，对治疗方法中给定的药物产生抗性的病人替换一种或多种药物的测试。本发明的另一个目的，是提供一种能够对用于治疗病毒感染的有效治疗方式进行选择的测试。本发明的另一个目的是提供一种对用于临床和研究的药物的敏感性和抗性进行测试的安全、标准、经济、快速、精确和可靠的测试。本发明的另一个目的是提供一种用于评估候选药物化合物的生物学效力的测试和方法，就病毒药物抗性和交叉抗性而言该化合物特定地作用于特异的病毒基因和/或病毒蛋白质。提供一种用于评估病毒药物的抗性和敏感性的组合物和手段也是本发明的一个目的。根据整个说明书，本发明的这些和其它目的将是显而易见的。

发明概述

通过用于确定抗病毒药物的敏感性的新测试达到本发明的目的，该测

试包括：(a) 在宿主细胞中导入含有起源于病人的区段和抗性指示基因的抗性测试载体；(b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞；(c) 测量靶宿主细胞中指示基因的表达；和(d) 比较来自步骤(c)的指示基因的表达与在缺乏抗病毒药物时进行步骤(a)到(c)时测量的指示基因的表达，其中，抗病毒药物以测试浓度存在于步骤(a)到(c)；步骤(b)到(c)；或步骤(c)。

本发明也提供了一种用于确定病人中抗病毒药物抗性的方法，包括(a) 作出抗病毒药物的药物敏感性的标准曲线；(b) 利用如上所述的敏感性测试确定病人中的抗病毒药物敏感性；和(c) 比较步骤(b)中的抗病毒药物的敏感性和步骤(a)中确定的标准曲线，其中，抗病毒敏感性的下降表明病人产生了对抗病毒药物抗性。

本发明还提供了一种用于确定病人的抗病毒药物抗性的方法，包括：(a) 根据上面的方法在第一个时间确定病人对抗病毒药物的敏感性，其中起源于病人的区段是在所述时间从病人得到的；(b) 在后一个时间确定同一病人的抗病毒药物敏感性；和(c) 比较步骤(a)和(b)中确定的抗病毒药物敏感性，其中第一个时间与后一个时间相比较抗病毒药物敏感性的下降表明病人产生了或加重了对抗病毒药物的抗性。

本发明的测试使医生能够评估编码病毒蛋白或功能性病毒序列的病毒基因，其中的每一个可以是抗病毒剂的靶，是否已经突变而使药物效力更小。更具体地说，本发明的新测试使人们可以确定病毒是否已经变成对特定的抗病毒药物有抗性了。而且，本发明使医生能够评估联合治疗的药物敏感性和抗性。另外，该测试使人们能够通过测试特定的药物或药物的组合，并确定这些药物，单独的或联合的，是否能够抑制一个或多个病毒基因和/或病毒蛋白质，来改变治疗的方法。本发明比现有测试具有明显的优点，它提供了一种更安全、更经济、更可靠、更快速、和更有效的药物敏感性和抗性测试来评估抗病毒药物或药物的联合的治疗效力，使医生能够优化治疗方案。本发明的测试所具有的明显优点是能够在药物开发的任何时期评估抗性和敏感性，这些时期包括：1) 在候选化合物的预临床评估时期；2) 在新药的临床评估时期；3) 在病人的治疗时期，从而能够设计出有效的治疗方法以克服药物抗性问题和；4) 作为流行病监测的一部分，在已批准和试验药物的使用期间评估药物的抗性的流行性。

本发明涉及用于评估药物敏感性和抗性的方法和组合物，包括：a) 确定病人起源的区段对抗病毒药物的敏感性和抗性的测试方法；b) 包括含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体的组合物；和c) 含有抗性测试载体的宿主细胞。本发明还涉及构建用于本发明的药物敏感性和抗性测试的载体和宿主细胞的组合物和方法。

本发明一方面提供了一种用于确定抗 HIV 药物的敏感性的方法，包括：(a) 在宿主细胞中导入含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体；(b) 培养来自(a)步骤的宿主细胞；(c) 测量指示基因在宿主细胞中的表达；和(d) 将来自步骤(c)的指示物基因的表达与在缺乏抗 HIV 药物时进行步骤(a)到(c)时测量的指示基因的表达进行比较，其中抗 HIV 药物以测试浓度存在于步骤(a)到(c)；步骤(b)到(c)；步骤(c)。

本发明另一方面，提供了一种用于测定抗 HIV 药物的敏感性的方法，包括：(a) 在寄主中导入含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体；(b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞；(c) 测量靶宿主细胞中的指示基因，其中所述的指示基因是 DNA 或 RNA 结构；和(d) 将来自步骤(c)的指示物的测量结果与当缺乏抗 HIV 药物时进行步骤(a)到(c)时指示物的测量结果进行比较，其中抗 HIV 药物以测试浓度存在于步骤(a)到(c)；步骤(b)到(c)；或步骤(c)。

本发明又一方面，提供了一种用于测定抗 HBV 药物的敏感性的方法，包括：(a) 将含有起源于病人的区段和指示基因的抗性测试载体导入宿主细胞；(b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞；(c) 测量靶宿主细胞中指示基因的表达；和(d) 将来自步骤(c)的指示基因的表达与当步骤(a)–(c)在没有抗 HBV 药物时测量到的指示基因的表达进行比较，其中抗 HBV 药物以测试浓度存在步骤(a)–(c)；步骤(b)–(c)；或步骤(c)。

本发明又一方面，提供了一种用于确定抗 HBV 药物的敏感性的方法，包括：(a) 在宿主细胞中导入含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体；(b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞；(c) 测量靶宿主细胞中的指示物，其中所述的指示物是 DNA 或 RNA 结构；和(d) 比较来自步骤(c)的指示物的测量结果与在缺乏抗 HBV 药物时进行步骤(a)–(c)时指示物的测量结果，其中测试浓度的抗 HBV 药物存在于步骤(a)到(c)；步骤(b)到(c)；

或步骤(c)。

本发明还提供了一种用于确定病人的抗 HIV 药物抗性的方法，包括：

(a) 作出抗 HIV 药物的药物敏感性的标准曲线；(b) 利用如上所述的敏感性测试确定病人的抗 HIV 药物敏感性；和(c) 将步骤(b)中的抗 HIV 药物敏感性与步骤(a)中确定的标准曲线进行比较，其中，抗 HIV 敏感性的下降表明病人产生了抗 HIV 药物抗性。

本发明也提供了一种用于确定病人的抗 HBV 药物抗性的方法，包括：

(a) 作出抗 HBV 药物的药物敏感性的标准曲线；(b) 利用如上所述的敏感性测试确定病人的抗 HBV 药物敏感性；和(c)比较步骤(b)中的抗 HBV 药物敏感性与步骤(a)中确定的标准曲线，其中抗 HBV 敏感性的下降表明病人产生出了抗 HBV 药物抗性。

本发明也提供了一种用评估候选抗病毒药物化合物的生物学效力的方法，包括(a) 在宿主细胞中导入含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体；(b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞；(c)测量靶宿主细胞中指示基因的表达；和(d) 将来自步骤(c)的指示基因的表达与当缺乏候选抗病毒药物化合物时进行步骤(a)到(c)时测量的指示基因的表达进行比较，其中，测试浓度的候选抗病毒药物化合物存在于步骤(a)到(c)；步骤(b)到(c)；步骤(c)。

本发明还提供了一种用于评估候选抗病毒药物化合物的生物学效力的方法，包括：(a) 在宿主细胞中导入含有病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体；(b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞；(c) 测量靶宿主细胞中的指示物，其中所述的指示物是 DNA 或 RNA 结构；和(d) 将来自步骤(c)的指示物的测量结果与当缺乏候选抗病毒药物化合物时进行步骤(a)到(c)时指示物的测量结果进行比较，其中测试浓度的候选抗病毒药物化合物存在于步骤(a)到(c)；步骤(b)到(c)；或步骤(c)。

含有病人起源病毒区段(如，HIV，HBV 等等)和指示基因的抗性测试载体可以还包括一个或更多非病人起源的区段。在一个实施方案中，抗性测试载体是从可能包括一个或更多的基因中的缺失的基因组病毒载体构建的。例如，在 HIV 的情况下，抗性测试载体中缺失了 env 而保留了完整的病毒 mRNA 表达和加工特性。或者，抗性测试载体是从亚基因组

病毒载体构建的,它可以仅包括一个或几个通常是抗病毒药物靶的病毒基因。例如在 HBV 的情况下,编码 HBV DNA 复制和病毒颗粒形成所需要的某些结构和酶功能的一个或多个 HBV 基因(即 C, S 和 X 基因)可以从抗性测试载体中缺失,但保留完整的病毒的 mRNA 表达和加工特性。抗性测试载体将还包括用于抗病毒靶基因的表达的特定病毒的天然增强子/启动子或外源增强子/启动子。

靶细胞内抗性测试载体中的指示基因的表达最终依赖于病人起源的区段的序列的作用。指示基因可以是有功能的或非功能的。在非功能的指示基因的情况下,指示基因在抗性测试载体转染的宿主细胞中是不能有效地表达的,除非它通过一个或多个病人起源的区段的产物的作用转化成功能性指示基因。在一个实施方案中,通过使用置换启动子,即一种虽然与指示基因处于相同的转录方向,但它跟随而不是引导指示基因编码序列的启动子,使指示基因成为非功能性。另外,非功能性指示基因的定向与病毒启动子或 LTRs 相反。所以,非功能的指示基因的编码序列既不能通过置换启动子转录也不能通过病毒启动子转录。在 HIV 的情况中,指示基因是通过逆转录而进行重排,使置换启动子现在处于指示基因序列的前面,它因此可以进行功能性地表达。在 HBV 的情况中,在 HBV 复制的过程中,基因组环化的结果使指示基因重排。在第二个实施方案中,通过使用置换编码区域,即指示基因编码区中编码区的 5' 部分跟随而不是引导 3' 编码区部分而使指示基因成为非功能性的。在这一构型中,没有表达可产生功能指示基因产物的 mRNA。在 HIV 的情况中,指示基因由于逆转录的结果而进行了重排,使指示基因的 5' 编码区现在引导 3' 编码区,并由此指示基因可以功能性地表达。在 HBV 的情况中,指示基因是在 HBV 复制过程中由于基因组环化的结果而进行重排。在第三个实施方案中,通过使用反向内含子,即一种以与指示基因呈相反的转录方向插入指示基因编码序列的内含子,使指示基因成为非功能性。另外,指示基因本身含有一种整个转录单位与病毒启动子方向相反的功能启动子。所以,在 HIV 或 HBV 增强子-启动子的情况中,非功能指示基因是在被病毒的 LTR 转录的错误方向上,并且它不能通过它本身的启动子功能性地转录,因为反向内含子不能通过拼接被适当地切除。但是,在逆病毒和嗜肝 DNA 病毒,

具体地说 HIV 和 HBV 的情况中, 病毒启动子的转录导致 mRNA 的形成, 其中可以通过拼接除去反向内含子。在逆病毒中, 作为得到的拼接转录物进行逆转录和得到的原病毒在宿主细胞染色体中整合的结果, 指示基因现在可以功能性地通过它自身的启动子转录。在 HBV 中, 作为在宿主细胞中所产生的拼接转录物的逆转录和基因组 DNA 的环化的结果, 现在指示基因可以通过它自身的启动子功能性地转录。

含有非功能性的指示基因的抗性测试载体可被用于基于颗粒的或非颗粒的测试中的抗性测试。基于颗粒的测试是以抗性测试载体病毒颗粒为基础的, 它是复制缺陷的, 是由抗性测试载体宿主细胞产生的。用于产生抗性测试载体病毒颗粒所必须的反式激活作用因子是由转染进包装宿主细胞的包装表达载体提供的。相反, 基于非颗粒的抗性测试是在缺乏包装表达载体时用抗性测试载体转染单个宿主细胞而进行的。

在功能性指示基因的情况中, 功能指示基因在由抗性测试载体转染的第一个宿主细胞(本文称为抗性测试载体宿主细胞)中高效地表达。所以, 在抗性测试载体宿主细胞中指示基因的功能是不依赖于病人起源的区段。但是, 在第二个宿主细胞(本文称为靶宿主细胞)中指示基因被表达的能力依赖于在抗性测试载体的宿主细胞中功能性抗性测试载体病毒颗粒的产生。所以, 在靶宿主细胞中指示基因的活性依赖于病人起源的区段的活性。

另一方面, 本发明涉及 HIV/艾滋病或 HBV 的抗病毒药物的敏感性和抗性测试。识别出了本发明的用于 HIV/艾滋病的抗病毒药物的敏感性和抗性测试的特定的抗性测试载体以及抗性测试载体的宿主细胞。另一方面, 本发明涉及对于肝炎的抗病毒药物敏感性和抗性测试。同样在 HBV 的情况中, 鉴别出了本发明的用于 HBV 抗病毒药物敏感性和抗性测试的特定的抗性测试载体(本文也称为抗性测试载体系统)以及测试载体的宿主细胞。

再一方面, 本发明提供了对用于治疗病毒疾病的潜在的治疗性抗病毒化合物的生物学效力进行鉴定和评估的方法。另一方面, 本发明涉及用于药物敏感性的评估的被一个或更多载体转染的宿主细胞。另一方面, 本发明涉及含有病人起源的病毒基因和指示基因的新的抗性测试载体。

附图的简要说明

图1.A. 图解说明HIV-1的DNA基因组的结构。病毒蛋白质是在三个读码框架的每一个中由gag, pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, env和nef基因编码的。RNA是从病毒DNA转录的, 并通过病毒和细胞酶加工, 产生基因组病毒RNA和mRNA。标明了病毒长末端重复(LTR)的U3, R和U5元件。

B. 概括性地图解说明在5' 到3' 方向含有下面的元件的HIV基因组病毒载体: 1)HIV-LTR U3区, 2)HIV-LTR R区, 3)HIV-LTR U5区, 4) HIVgag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env, 和nef基因的编码区, 和5)3' HIV-LTR。

C. 概括性地图解说明含有下面5' 到3' 方向的HIV基因组病毒载体: 1) CMV IE 增强子-启动子, 2)HIV-LTR R区, 3) HIV-LTR U5区, 4) HIVgag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env,和nef基因的编码区, 和5)3' HIV-LTR。

D. 概括性地图解说明含有下面5' 到3' 方向的元件的HIV亚基因组病毒载体: 1) HIV-LTR U3区, 2) HIV-LTR R区, 3) HIV-LTR U5区, 4) HIV gag-pol 基因的编码区, 和5) 3' HIV-LTR。

E. 概括性地图解说明含有下面5' 到3' 方向的元件的HIV亚基因组病毒载体: 1) CMV IE增强子-启动子, 2) HIV-LTR R区, 3) HIV-LTR U5区, 4) HIV gag-pol基因的编码区, 和5) 3' HIV-LTR 。

图2.A. 图解说明HIV-1的DNA基因组结构。

B. 图解说明含有非功能性指示基因的抗性测试载体, 该非功能性指示基因含有一种置换启动子, 它在5'至3'方向上具有以下元件: 1) HIV-LTR U3区(pLG-lucPP-HS和pLG-lucPP-PB)或CMV IE增强子-启动子(pCG-lucPP-HS和pCG-lucPP-PB), 2) HIV-LTR R区, 3) 含有以与LTR相反的转录方向插入的T7噬菌体RNA聚合酶启动子(本文称为T7启动子)的HIV-U5区, 4) HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env,和nef基因的编码区, 5) 插入在病人序列接受位点的病人起源的区段, 6) 插入在缺失的env 基因中的指示基因盒, 和7) 3' HIV-LTR。

C. 图解说明通过逆转录酶将在2(a)中叙述的抗性测试载体中的非功能性的指示基因(置换启动子)变换成功能性的指示基因。功能性指示基因的变换是T7启动子相对于指示基因的编码区的再定位产生的。

图3.A. 图解说明HIV-1的DNA基因组结构。

B. 图解说明提供vif, vpr, tat, rev, vpu和nef基因的包装表达载体pLTR-HIV3', 这些基因中的每一个以从HIV-LTR U3区转录的拼接的亚基因组mRNA得到表达。

C. 图解说明提供vif, vpr, tat, rev, vpu和nef基因的包装表达载体pCMV-HIV3', 这些基因中的每一个以从CMV IE 增强子-启动子转录的拼接亚基因组mRNA得到表达。

D. 图解说明包装表达载体pVL-env4070A[pCXAS(4070A env)], 它通过从CMV IE增强子-启动子转录提供两亲性的MLV env基因产物。

图4.A. 图解说明HIV-1的DNA基因组结构。

B. 概括性地图解说明包括一种非功能性指示基因的抗性测试载体, 该载体在5' 到3' 方向含有下面的元件: 1) HIV-LTR U3区(pLG-lucPC-HS和pLG-lucPC-PB)或第一CMV IE 增强子-启动子(pCG-lucPC-HS和pCG-lucPC-PB), 2) HIV-LTR R和U5区, 3)HIVgag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env,和nef基因的编码区, 4) 插入在病人序列的受体位点的病人起源的区段, 5) 含有插入在缺失的env基因中的荧光素酶基因的5' 编码区的第一指示基因盒, 6) 含有插入在缺失的3' HIV-LTR U3区中的荧光素酶的3' 编码区的第二指示基因盒, 和7) 3' HIV-LTR R和U5区。

C. 图解说明通过逆转录酶将在4(a)中叙述的抗性测试载体中的非功能指示基因(置换编码区)变换成功能性指示基因, 在逆转录和链转移之后, 荧光素酶3' 编码区被从3' LTR拷贝成5' LTR, 从而允许可以拼接产生功能性荧光素酶编码区的mRNA的转录。

图5.A. 图解说明HIV-1的DNA基因组结构。

B. 概括性地图解说明具有非功能的指示基因的抗性测试载体, 该非功能性指示基因含有一个反向内含子, 它在5' -3' 方向含有以下元件: 1) HIV-LTR U3区(pLG-lucII-HS和pLG-lucII-PB)或第一CMV IE 增强子-启动子(pCG-lucII-HS 和 pCG-lucII-PB), 2)HIV-LTR R和U5区, 3) HIVgag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env, 和nef基因的编码区, 4)插入在病人序列接受位点的病人起源的区段, 5) 插入在缺失的env基因中的

指示基因盒，和5) 3' HIV-LTR。

C. 图解说明通过逆转录酶将描述于5(a)的在抗性测试载体中的非功能性指示基因(反向内含子)变换成功能性指示基因。整个指示基因盒的转录方向与第一CMV增强子-启动子和病毒LTR的相反，而人工内含子的方向与后面的元件相同。通过第二CMV增强子-启动子的指示基因的转录并不产生功能性转录物，因为反向内含子不能以这一方向拼接。但是，通过5' 病毒LTR或第一CMV IE增强子-启动子的指示基因的转录导致反向内含子通过RNA拼接而除去，尽管指示基因仍然没有功能性地表达，因为得到的转录物具有反义方向。在这一转录物的逆转录和得到的原病毒的DNA的整合之后，通过第二CMV增强子-启动子可以功能性地转录指示基因，因为反向内含子已经在前面除去了。

图6.A. 图解说明HIV-1的DNA基因组结构，如上面(a)和(b)所示。

B. 概括性地图解说明含有功能性的指示基因的抗性测试载体，它在5' 到3' 方向含有下面的元件：1) HIV-LTR U3区(pLG-luc-HS-1和pLG-luc-PB-1)或第一CMV IE增强子-启动子(pCG-luc-HS-1和pCG-luc-PB-1)，2) HIV-LTR R和U5区，3) HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env,和nef基因的编码区，4) 以相反于病毒LTR的方向插入在缺失的env基因中的功能性指示基因盒，和5) 3' HIV-LTR。

C. 概括性地图解说明含有功能性的指示基因盒的抗性测试载体(pLG-luc-HS-2,pLG-luc-PB-2,pCG-luc-HS-2和pCG-luc-PB-2)，其中指示基因盒的转录方向与病毒LTR的相同。

图7.A. 利用抗性测试载体pCG-CXCN(F-lucP)2-AA和pCG-CXAT(F-lucP)2-AA的药物敏感性的证明。数据由缺乏AZT或存在5毫摩尔AZT时靶宿主细胞中荧光素酶基因活性以相对光单位(RLU)表示。

B. 利用含有AZT处理前和AZT处理后的“测试”病人起源的区段的抗性测试载体pCG-CXCN(F-lucP)2-AA进行药物敏感性和抗性测试。抗性测试载体起源于基因组指示基因病毒载体，pCG-CXCN(F-lucP)2-AA.数据表示为靶宿主细胞中荧光素酶基因活性的抑制百分数对AZT浓度(log10)的关系。pCG-CXCN(F-lucP)2-AA描绘为实心盒。含有在AZT处理之前病人起源的区段的pCG-CXCN(F-lucP)2-AA描绘为实心圆环，和AZT 处理

后的描绘为实心三角。

C. 利用含有起源于生物学活性原病毒克隆, pNL4-3, 的逆转录酶区段的抗性测试载体, pCG-CXCN(F-lucP)2-AA, 进行的药物敏感性和抗性测试。数据表示为靶宿主细胞中的荧光素酶基因活性的抑制百分数对 nevirapine 浓度 ($\log_{10}$) 关系, 并描绘为实心盒。

D. 利用含有起源于生物学活性原病毒克隆, pNL4-3, 的蛋白酶区段的抗性测试载体, pCG-CXCN(F-lucP)2-AA, 进行的药物敏感性和抗性测试。数据表示为靶宿主细胞中的荧光素酶基因活性的抑制百分数与 indinavir 浓度 ($\log_{10}$) 的关系并被描绘为实心盒。

图8.A. 图解说明HBV的RNA前基因组结构。将前基因组RNA表示为实线。直接重复序列(DR)表示为闭合的矩形。衣壳化的信号序列的位置表示为($\circ$)。C, P, S, 和X基因表示为开放的矩形。标出了终端蛋白(TP), 间隔, DNA聚合酶/逆转录酶(pol/RT), 和P基因的RNA酶 H区。由阴影三角表示了C, P, S和X翻译起始位点。

B. 概括性地图解说明含有指示基因盒和含有反向内含子的亚基因组指示基因病毒载体, pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-), 抗性测试载体系统的一个成份, 它在5' -3' 方向含有以下元件: (1) CMV IE 增强子—启动子区, (2) HBV基因组的5' 区和DR1和5' ((删除了前-C ORF翻译起始密码子), (3) 非功能性指示基因盒, 其中指示基因ORF含有反向内含子, (4) 含有DR2, DR1*, 3'ε, 和 3' HBV多聚腺苷酸化(pA)信号区的HBV基因组的区。

C. 图解说明含有由于HBV病毒复制而组装的功能性指示基因盒的亚基因组指示基因病毒载体, pCS-HBV(F-IG)II(PSAS-), 的共价闭环环DNA(cccDNA)形式。

D. 图解说明包装载体的一个例子, pPK-CPX, 它是一个包括病人起源区段的抗性测试载体系统的一个成份, 它在5' -3' 方向含有以下元件: (1) CMV IE增强子—启动子区, (2) 跨越C ORF翻译起始密码子到 3' pA信号并包括C, P, S, 和X基因的HBV基因组的区域。将包装载体 pPK-CPX的C基因进行修饰使其不含有前一C ORF序列并不表达S蛋白质 (由翻译起始位点处X表示)。

E. 图解说明提供S基因蛋白质的附加的包装载体pPK-S,它是与含有指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)的抗性测试载体系统,和包装质粒pPK-CPX共转染的。

F. 概括性地图解说明包括含有反向内含子非功能性指示基因的抗性测试载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+),它在5' -3' 方向含有以下元件: (1) CMV IE 增强子-启动子区, (2) HBV基因组的5' 区和DR1和5' ((删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 含有病人起源的P基因区段的HBV基因组区域内的指示基因盒(含有反向内含子)。 (4) 含有DR2, DR1*, 3' ε, 和3' HBVpA信号区的HBV基因组的区域。

G. 图解说明含有由于HBV病毒复制而组装的功能性的指示基因盒和病人起源的P基因区段的抗性测试载体, pCS-HBV(F-IG)II-(PSAS+), 的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

H. 图解说明提供C, S和X基因蛋白质的包装载体pPK-CSX,它是与抗性测试载体, pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+), 共转染的。

图9.A. 图解说明HBV的RNA前基因组结构。

B. 图解说明含有非功能性的指示基因盒的HBV 指示基因病毒载体。显示了用于靶DNA序列的扩增的引物结合位点。正向引物(Pf)和反向引物(Pr)结合位点的定位和定向不构成用于转染包装宿主细胞的线性形式载体中的功能性扩增单位。将Pr结合位点设计成跨越通过将前基因组RNA的拼接产生的连接序列。

C. 图解说明10B中叙述的指示基因病毒载体的rc-DNA形式。显示了用于靶DNA序列的扩增的引物接合位点。Pf和Pr引物结合位点的定位和定向构成了载体中的rc-DNA形式的正链DNA成份和cccDNA形式的正和负链DNA成份中的功能性的扩增单位, 该载体是通过在包装宿主细胞中产生的病毒颗粒内的HBV DNA复制产生的。通过前基因组RNA的拼接组装Pr接合位点。

D. 图解说明含有非功能性的指示基因盒的HBV指示基因病毒载体。显示了用于靶DNA序列的扩增的引物结合位点。Pf和Pr结合位点的定位和定向构成了用于转染包装宿主细胞的线性形式载体中的功能性扩增单位,但是在非拼接线性形式的载体中, Pf结合位点不与外切核酸酶检测

探针(probe)的结合位点邻接。Pf, Pr, 和探针结合位点的这一安排不构成有效的外切核酸酶的检测单位。

E. 图解说明图9D叙述的指示基因病毒载体的rc-DNA形式。显示了用于靶DNA序列的扩增的引物结合位点。Pf和Pr引物结合位点的定位和定向构成了通过在包装宿主细胞中HBV DNA的复制而产生的rc-DNA和cccDNA形式的载体中的功能性扩增单位。在rc-DNA和cccDNA形式的载体中Pf结合位点的定位与外切核酸酶检测探针(probe)的结合位点紧紧邻接。Pf, Pr, 和探针结合位点的这一安排构成了有效的外切核酸酶检测单位。

F. 图解说明HBV指示基因病毒载体。显示了用于靶DNA序列的扩增的引物结合位点。正向引物(Pf)和反向引物(Pr)结合位点的定位和定向不构成用于转染包装宿主细胞的线性形式的载体中的功能性扩增单位。

G. 图解说明10F中描述的指示基因的病毒载体的rc-RNA形式。显示了用于靶DNA序列的扩增的引物结合位点。Pf和Pr引物结合位点的定位和定向在载体的rc-DNA形式的正链的DNA成份和cccDNA形式的正和负链DNA成份中构成了功能性扩增单位, 该载体是通过包装宿主细胞中产生的病毒颗粒内的HBV DNA的复制产生的。

图10.A. 图解说明HBV的RNA前基因组结构。

B. 概括性地图解说明亚基因组指示基因病毒载体, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-), 含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体系统的一个成份, 它在5' -3' 方向含有下面的元件: (1) CMV IE增强子—启动子区域, (2) HBV基因组的5' 区和DR1和5' ((删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3)其组装使启动子区定位于指示基因ORF的3' , 即下游, 的非功能性指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ε, 和3' HBVpA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF 翻译起始密码子)。图8D显示了含有病人起源的P基因区段的抗性测试载体系统的一个成份, 包装载体pPK-CPK, 图8E显示了S包装载体pPK-S。

C.图解说明含有由于HBV病毒复制而组装的功能性指示基因盒的亚基因组指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)PP(PSAS-)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

D. 概括性地图解说明含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体pCS-HBV(NF-IG)PP(PSAS+), 它在5' -3' 方向含有下面的元件: (1) CMV IE增强子—启动子区, (2) HBV基因组的5' 区和DR1和5' 拷贝(删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 增强子—启动子区(置换启动子), (4) 含有病人起源的区段的P基因, (5) 指示基因ORF, (6) 内部核糖体进入位点(IRES), 和(7) 含有DR2, DR1*, 3' ε, 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF 翻译起始密码子)。如图8H所示, 提供C, S和X基因的包装载体pPK-CSX是与抗性测试载体pCS-HBV(NF-IG)PP(PSAS+)共转染的。

E. 图解说明含有由于HBV病毒复制而组装的功能性指示基因盒和病人起源的P基因区段的抗性测试载体, pCS-HBV(F-IG)PP(PSAS+)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

图11. A. 图解说明HBV的RNA前基因组结构。

B. 概括性地图解说明亚基因组指示基因病毒载体, pCS- HBV(NF-IG)PPTIS-(PSAS-), 它是含有具有置换启动子和翻译起始位点的非功能性指示基因的抗性测试载体系统的一个成份, 它在5' -3' 方向含有下面的元件: (1) CMV IE 增强子—启动子区, (2) 包括DR1和5' 的HBV基因组的5' 区((删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 缺乏翻译起始位点的指示基因ORF, (4) 增强子—启动子区(置换启动子), (5) 含有DR2, 前一C ORF翻译起始密码子, DR1*, 3' ε, 3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区。图8D显示了含有病人起源的区段的抗性测试载体系统的一个成份, 包装载体pPK-CPX, 图8E显示了S包装载体pPK-S。

C. 图解说明含有由于HBV病毒复制而组装的功能性指示基因的亚基因组指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)PPTIS(PSAS-)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

D. 概括性地图解说明包括具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+), 它在5' -3' 方向含有下面的元件: (1) CMV IE增强子—启动子区, (2)包括DR1和5' 的HBV基因组的5' 区((删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 缺乏翻译起始位点的指示基因ORF, (4) 含有病人起源的区段的P基因, (5) 增强子—启

动子区域(置换启动子)，(6) 含有DR2，前一C ORF 翻译起始密码子，DR1*，3' ϵ ，和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区。如图8H所示，提供C，S和X基因的包装载体pPK-CSX是与抗性测试载体pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)共转染的。

E，图解说明含有由于HBV病毒复制而组装的功能性指示基因盒和病人起源的P基因区段的抗性测试载体pCS-HBV(F-IG)PPTIS(PSAS+)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

图12A，概括性地图解说明HBV的RNA前基因组结构。

B. 概括性地图解说明亚基因组指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS-)，它是包括具有置换编码区的非功能性指示基因的抗性测试载体系统的一个成份，它在5' -3' 方向含有下面的元件：(1) CMV IE 增强子—启动子区，(2) 含有DR1和5' (的HBV 基因组的5' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子)，(3) 其组装使启动子区和编码区的5' 部分定位于剩余的编码区3' 部分的3' ，即下游，的非功能性指示基因盒，(4) 含有DR2，DR1*，3' ϵ ，和3' HBVpA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子)。图8D显示了含有病人起源的P基因区段的抗性测试载体系统的一个成份，包装载体pPK-CPX，图8E显示了S包装载体，pPK-S。

C. 图解说明了含有由于HBV病毒的复制而组装的功能性指示基因盒的亚基因组指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)PCR(PSAS-)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

D. 概括性地图解说明包括具有置换编码区的非功能性指示基因的抗性测试载体pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS+)，它在5' -3' 方向含有下面的元件：(1) CMV IE 增强子—启动子区，(2) 包括DR1和5' (的HBV基因组的5' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子)，(3) 以反向的拼接受体序列开始的指示基因ORF的3' 部分，(4) 含有病人起源的区段的P基因，(5)增强子—启动子区，(6) 以反向的拼接供体序列为末端的指示基因ORF的5' 部分，(7) 含有DR2，DR1*，3' ϵ ，3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF 翻译起始密码子)。如图8H所示，提供C，S和X基因的包装载体pPK-CSX是与抗性测试载体pCS-

HBV(NF-IG)PCR(PSAS+)共转染的。

E. 图解说明了含有由于HBV病毒的复制而组装的功能性指示基因盒和病人起源的P基因区段的抗性测试载体, pCS-HBV(F-IG)PCR(PSAS+)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

图13.A. 图解说明了HBV的RNA前基因组的结构。

B. 概括性地图解说明亚基因组指示基因病毒载体成份pCS-HBV(F-IG)(PSAS-), 它是含有功能性指示基因盒的抗性测试载体系统的一个成份, 它在5' -3' 方向含有下面的元件: (1) CMV IE 增强子-启动子区域, (2) 包括DR1和5' (的HBV基因组的5' 区(删除了前一C ORF 翻译起始密码子), (3) 功能性指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ε, 3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF 翻译起始密码子)。图8D显示了含有病人起源P基因区段的抗性测试载体系统的一个成份, 包装载体pPK-CPX, 图8E显示了S包装载体, pPK-S。

C. 图解说明含有功能性指示基因的亚基因组指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)的共价闭合环形DNA(cccDNA)形式。

D. 概括性地图解说明包括功能性指示基因的抗性测试载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS+), 它在5' 到3' 方向含有下面的元件: (1) CMV IE 增强子-启动子区, (2) 包括DR1和5' (的HBV基因组的5' 区(删除了前一C ORF 翻译起始密码子), (3) 功能性指示基因盒, (4) 含有病人起源的区段的P基因, (5) 含有DR2, DR1*, 3' ε, 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子)。如图8H所示, 提供C, S和X基因的包装载体pPK-CSX是与抗性测试载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)共转染的。

E. 图解说明含有功能性指示基因的抗性测试载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)的共价闭合环形DNA(cccDNA)的形式。

发明的详细说明

为了可以更充分地理解本文叙述的发明, 下文进行详细说明。

本发明提供了新的药物敏感性和抗性测试, 包括步骤: (a) 在宿主细胞中导入含有病人起源区段和指示基因的抗性测试载体; (b) 培养来自步骤(a)的宿主细胞; (c) 测量靶宿主细胞中的指示基因的表达; 和(d) 将

来自步骤(c)的指示基因的表达与在缺乏抗病毒药物时进行步骤(a)到(c)时测量的指示基因的表达进行比较,其中试验浓度的抗病毒药物存在于步骤(a)到(c);步骤(b)到(c);或步骤(c)。

本发明一方面提供了用于确定抗病毒药物的敏感性的方法,包括(a)在宿主细胞中导入包括病人起源的区段和指示基因的抗性测试载体;(b)培养来自步骤(a)的宿主细胞;(c)测量靶宿主细胞中的指示物,其中所述的指示物是DNA或RNA结构;和(d)将来自步骤(c)的指示物的测量结果与在缺乏抗病毒药物时进行步骤(a)到(c)时指示物的测量结果进行比较,其中试验浓度的抗病毒药物存在于步骤(a)到(c),步骤(b)到(c);或步骤(c)。

本发明也提供了用于确定病人的抗病毒药物抗性的方法,包括:(a)作出抗病毒药物的药物敏感性的标准曲线;(b)利用上述敏感性测试之一确定病人的抗病毒药物的敏感性;和(c)将步骤(b)中的抗病毒药物的敏感性与步骤(a)中确定的标准曲线进行比较,其中抗病毒敏感性的下降表明病人产生了抗病毒药物抗性。

本发明也提供了确定病人的抗病毒药物的抗性的方法,包括:(a)根据上面的方法之一,在第一个时间确定病人中的抗病毒药物的敏感性,其中病人起源的区段是在大约所述的时间从病人得到的;(b)在后来的一个时间,确定同一个病人的抗病毒药物的敏感性;和(c)比较在步骤(a)和(b)确定的抗病毒药物的敏感性,其中与第一个时间比较在后来的时间抗病毒药物的敏感性的下降表明病人产生或增加了抗病毒药物的抗性。

本发明的测试可以用于任何与抗病毒药物敏感性和抗性相关的病毒疾病,包括例如,HIV,单纯疱疹病毒,巨细胞病毒,水痘带状疱疹病毒,其它的人疱疹(HIV)病毒,流感A病毒,肺结核病毒,甲,乙和丙型嗜肝DNA病毒,鼻病毒,人乳头瘤病毒。前面是某些病毒的代表,对于它们目前存在可得的抗病毒化学治疗,并代表了病毒家族逆病毒,疱疹病毒,正粘病毒,肺病毒,和嗜肝DNA病毒。本发明的测试将用于由于这些家族内的其它病毒的感染产生的其它的病毒感染以及从其它病毒家族中的病毒产生的病毒感染。另外,本发明的药物敏感性和抗性测试可用于筛选治疗病毒疾病的化合物,对于这些疾病目前还没有治疗方法。

在本发明的药物敏感性和抗性测试中可以测试的病毒的结构, 生命周期和遗传元件将是本领域的普通技术人员已知的。了解逆病毒的生命周期, 以及逆病毒的生存和感染性所必需的病毒基因对于本发明的实施来说是有用的。逆病毒感染的细胞排出含有二倍体RNA基因组的膜病毒。该病毒上密布着被膜糖蛋白(它的作用是确定感染的寄主宿主), 附着于待感染的细胞的质膜中的细胞受体。在受体结合后, 病毒被内在化并脱去包衣, 穿过宿主细胞的细胞质。在它走向核的途中或在核内, 存在于病毒核心的逆转录酶分子驱动双链DNA原病毒的合成, 这是一种由tRNA分子与基因组病毒RNA结合引发的合成。随后, 双链DNA原病毒整合于宿主细胞的基因组中, 在这里它可以充当编码病毒蛋白质的mRNA和病毒颗粒基因组RNA的转录模板, 该病毒颗粒基因组RNA将被包装进病毒核心颗粒。在它们离开感染细胞的过程中, 核心颗粒穿过细胞质, 附着于新感染的细胞的质膜的内侧, 并开始顶出, 伴随它们的是含有病毒编码的被膜糖蛋白基因产物的大片膜。这一感染周期——逆转录、转录、翻译、病毒粒子的组装、和顶出——在感染的传播中一遍又一遍地重复着。

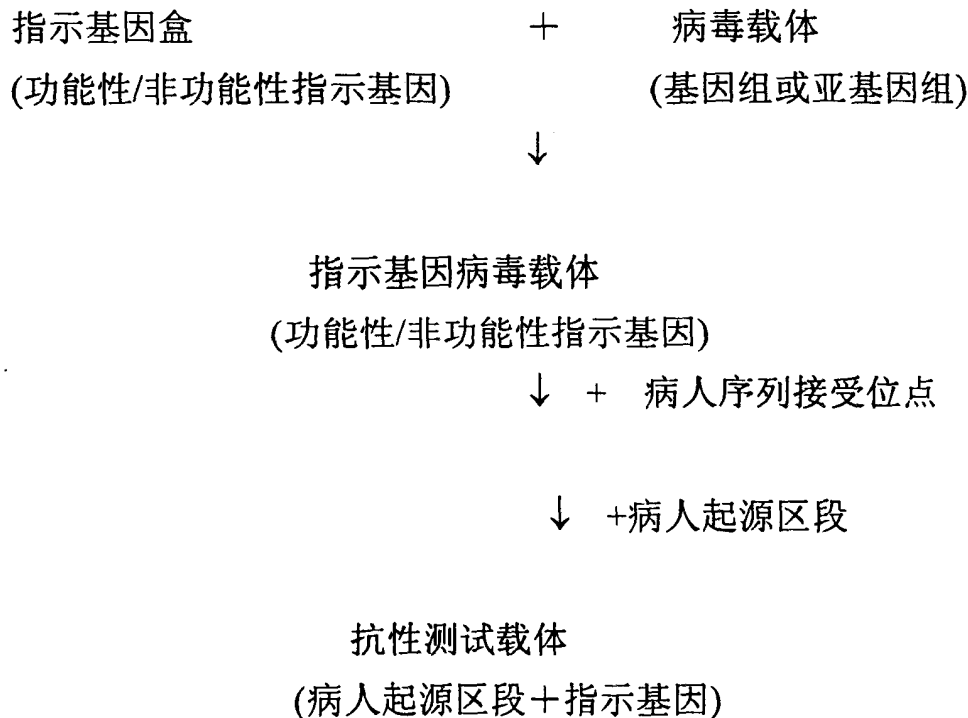
结果, 病毒RNA和原病毒DNA编码几个对成功地完成病毒生命周期至关重要的顺式作用元件。病毒粒子RNA在它的3'末端携带病毒启动子。复制的特技将病毒启动子置于原病毒基因组的5'末端, 因为基因组是逆转录的。只有逆病毒LTR的3'到5'存在病毒的包装位点。逆病毒的生命周期需要存在病毒编码的反式激活因子。同时在病毒核心内也含有依赖于病毒RNA的DNA聚合酶(pol)——逆转录酶, 并且对病毒生命循环是至关重要的, 因为它负责基因组RNA到整合中间体原病毒DNA的转换。病毒附着于非感染的细胞和病毒传播需要病毒被膜糖蛋白env。也存在转录反式活化作用因子, 称为反式活化子, 它能调节整合亲本原病毒的转录水平。通常, 有能力复制(非缺陷型)的病毒是整套装在一起的, 因为它们编码所有这些反式激活作用因子, 它们的缺陷型不是自给自足的。

在DNA病毒的情况中, 如嗜肝DNA病毒, 了解其生命周期和感染所必需的病毒基因对于实施本发明是有用的。对于HBV的进入的过程还了解得不多。HBV的复制利用了RNA中间模板。在感染细胞中, 复制的第一步

是将不对称的松弛的环形DNA(rc-DNA)变换成共价闭合环形DNA(cccDNA)。发生在感染的肝细胞的核中的这一过程，包括完成DNA正链合成和DNA末端的连接。第二步，通过寄主RNA聚合酶将cccDNA转录以产生一个3.5kB RNA模板(前基因组)。这一前基因组在病毒核心中是蛋白质复合的。第三步包括利用病毒编码的P蛋白质逆转录酶拷贝前基因组RNA合成第一个反义DNA链。P蛋白质也具有作为负链DNA引物的作用。最后，利用P蛋白质DNA聚合酶活性和病毒RNA的低聚物作为引物通过拷贝第一个DNA链合成第二个正向意义的DNA链。前基因组也转录主要的结构核心蛋白的mRNA。

下面的流程说明了可以用于本发明的某些载体和宿主细胞。但并没有包括全部。

载体



宿主细胞

包装宿主细胞—用包装表达载体转染

抗性测试载体宿主细胞—利用抗性测试载体转染的包装宿主细胞

靶宿主细胞—由抗性测试载体宿主细胞产生的抗性测试载体病毒颗粒感染的宿主细胞

抗性测试载体

“抗性测试载体”指一个或多个载体，它们组合在一起含有病人起源区段和指示基因的DNA或RNA。在抗性测试载体含有超过一个载体的情况中，病人起源的区段可以包含在一个载体中而指示基因包含在一个不同的载体中。为了清楚起见，这样的含有超过一个载体的抗性测试载体本文称为抗性测试载体系统，但仍然理解为抗性测试载体。所以抗性测试载体的DNA或RNA可以包含于一个或多个DNA或RNA分子中。在一个实施方案中，通过在指示基因病毒载体中插入病人起源的区段制备抗性测试载体。在另一个实施方案中，通过在包装载体中插入病人起源的区段产生抗性测试载体而指示基因包含于第二个载体中，例如指示基因病毒载体。如本文所用，“病人起源的区段”是指利用各种手段直接从病人得到的一个或更多病毒区段，例如，利用从存在于感染病人的细胞(如，外周血液单核细胞，PBMC)、血清或其它体液的病毒RNA制备的病毒DNA或互补的DNA(cDNA)的病人起源的区段，并使用这样制备的病人起源的区段通过分子克隆或聚合酶链式反应扩增(PCR)而得到。当从病人“直接得到”病毒区段是指没有通过培养的病毒传代过程，或如果病毒被培养，则通过了最小数目的传代过程，从而基本上排除了培养中对突变的筛选。术语“病毒区段”指任何编码一个基因产物(如，蛋白质)的功能性病毒序列或病毒基因，该基因产物是抗病毒药物的靶。本文所用的术语“功能性病毒序列”指具有功能活性的任一种核酸序列(DNA或RNA)，如增强子，启动子，多聚腺苷酸化位点，反式活化因子的作用位点，如tar和RRE，包装序列，整合序列，或拼接序列。如果一种药物是针对一个以上的功能性病毒序列或病毒基因产物的，那么对应于每个所述病毒基因的病人起源的区段将被插入在抗性测试载体中。在联合治疗的情况中，其中要评估靶击两个不同的功能性病毒序列或病毒基因产物的两个或多个抗病毒药物，对应于每个功能性病毒序列或病毒基因产物的病人起源的区段将被插入在抗性测试载体中。根据如上所述所用的特定的构建体，病人起源的区段被插入在指示基因病毒载体或例如包装载体中的独特的限制性位点或特异位置，被称为病人序列接受位点。

如本文所用,“起源于病人的区段”包括起源于人和各种动物种类的区段。这样的种类包括,但不限于黑猩猩,马,小牛,猫和狗。

也可使用几种克隆技术中的任何一种将病人起源的区段掺入抗性测试载体中。例如,通过在质粒主链和病人起源的区段导入II类限制性位点的克隆或通过尿嘧啶DNA糖基化酶引物的克隆(refs)。

可采用分子克隆或基因扩增,或其改良方法中的任何一种,通过在待导入抗性测试载体的病人起源的区段的末端导入如下所述的病人序列接受位点,可以得到病人起源的区段。例如,在基因扩增方法,(如PCR)中,可在用于PCR反应的引物的末端导入对应于病人序列的受体位点的限制性位点。同样,在分子克隆方法如cDNA克隆中,可以在用于第一或第二链cDNA合成的引物的末端导入所述的限制性位点,或在如DNA的引物修复的方法中,不管克隆或未克隆的DNA,可以在用于修复反应的引物中导入所述的限制性位点。将病人序列接受位点和引物设计成提高病人起源的区段的呈现。已经设计了病人序列接受位点的一系列抗性测试载体提供了将在单独的一个抗性测试载体中呈现不足的病人起源的区段的呈现。

抗性测试载体是通过在指示基因病毒载体中导入病人序列接受位点(如下所述)进行修饰,扩增或克隆病人起源的区段并将该扩增的或克隆的序列在病人序列接受位点插入指示基因病毒载体来制备。抗性测试载体是从指示基因病毒载体构建的,指示基因病毒载体起源于基因组病毒载体或亚基因组病毒载体和指示基因盒(如下所述)。然后将抗性测试载体导入宿主细胞。或者,通过在包装载体中导入病人序列接受位点,扩增或克隆病人起源的区段,并在包装载体中的病人序列接受位点精确地插入该扩增的或克隆的序列,并与指示基因病毒载体共转染这一包装载体来制备抗性测试载体(也称为抗性测试载体系统)。

在一个优选的实施方案中,如下面所述,抗性测试载体可以与包装表达载体一起被导入包装宿主细胞,以便产生用于药物抗性和敏感性测试的抗性测试载体病毒颗粒,本文称为“基于颗粒的测试”。在另一个的优选实施方案中,抗性测试载体可在缺乏包装表达载体的情况下被导入宿主细胞中,以便进行药物抗性和敏感性测试,本文称为“基于非颗粒的测试”。如本文所用,“包装表达载体”提供复制缺陷型逆病毒或嗜肝DNA病毒

所需要的因子，如包装蛋白(如核心和被膜多肽的结构蛋白)，反式激活因子，或基因。在这一情况下，以它本身不能复制的方式使能复制的病毒基因组衰弱。这意味着虽然包装表达载体能产生挽救存在于含有衰弱的基因组的细胞中的缺陷型病毒基因组所需要的反式激活作用或失去的基因，衰弱的基因组不能挽救它本身。

指示物或指示基因

“指示物或指示基因”是指一种核酸，它编码可直接或通过反应产生可测量的或可注意的指标，如产生颜色和可测量波长的光的蛋白质、DNA或RNA结构，或在DNA或RNA被用作指示物的情况中，特异DNA或RNA结构的变化或产生。优选的指示基因的例子是编码 β -半乳糖苷酶的大肠杆菌lacZ基因，编码来自*photinus pyralis*(萤火虫)或*renilla reniformis*(海产三色堇)的荧光素酶的luc基因，编码碱性磷酸酶，绿色荧光蛋白的大肠杆菌phoA基因和编码氯霉素乙酰转移酶的细菌CAT基因。其它优选的指示基因的例子是容易通过测验，如放射性免疫测验(RIA)，或荧光活性细胞分类(FACS)测量的分泌蛋白质或细胞表面蛋白，包括例如生长因子，细胞因子和细胞表面抗原(如分别为生长激素，IL-2或CD4)。将“指示基因”理解为也包括选择基因，也被称作可选择性标记。哺乳动物细胞的适当的可选择性标记的例子是二氢叶酸还原酶(DHFR)，胸苷激酶，潮霉素，新霉素，zeocin或大肠杆菌gpt。在前面的指示基因的例子情况中，指示基因和病人起源的区段是分离的，即完全不同的和分离的基因。在某些情况中，病人起源的区段也可以用作指示基因。在一个这样的实施方案中，其中病人起源的区段对应于超过一个以上的抗病毒药物的靶的病毒基因，所述的病毒基因中的一个也可以作为指示基因。例如，借助于切割色原底物，或活化失活的酶原而切割色原底物以在各种情况下产生颜色反应的能力，病毒蛋白酶基因可以作为指示基因。在所有上面的指示基因的例子中，指示基因可以是“功能性的”或“非功能性的”，但在每种情况下，靶细胞中指示基因的表达最终依赖于病人起源的区段的作用。

功能性指示基因

在“功能性指示基因”的情况中，指示基因可以是能够在如下所述的“包装宿主细胞/抗性测试载体宿主细胞”中表达，而不依赖于病人起源的

区段,但是,没有功能性抗性测试载体颗粒的产生和它们对靶宿主细胞的有效感染,指示基因不能在靶宿主细胞中表达,如下所述。在功能性指示基因的一个实施方案中,将包括反应控制元件和编码指示蛋白的基因的指示基因盒以与病毒载体的天然或外源增强子/启动子同样的或相反的转录方向插入在指示基因病毒载体中。在HIV或HBV的情况中的功能性指示基因的一个例子是将指示基因和它的启动子(CMV IE 增强子/启动子)以分别与HIV-LTR或HBV增强子-启动子,或与病毒载体相关的CMV IE 增强子/启动子相同或相反的转录方向放置。

非功能性指示基因

指示基因也可以是“非功能性的”,其中指示基因不能在用抗性测试载体转染的包装宿主细胞中有效地表达,该细胞随后被称为抗性测试载体宿主细胞,直到它通过一个或更多的病人起源区段产物的作用被转换成功能性指示基因。通过本发明的遗传操作使指示基因变成非功能性的。

1. 置换启动子 在一个实施方案中,由于启动子的定位,使指示基因变成非功能性,因为,虽然启动子是在与指示基因相同的转录方向,它在指示基因编码序列的后面而不是前面。这一错位的启动子称为“置换启动子”。除了置换启动子,非功能性指示基因的定向是与病毒载体的天然或外源启动子/增强子相反的。所以,非功能性指示基因的编码序列既不通过置换启动子也不通过病毒启动子转录。通过一个或多个病毒蛋白质的作用使非功能性指示基因和它的置换启动子变成功能性的。在HIV的情况中的一个具有置换启动子的非功能性的指示基因的例子是将5' LTR的T7噬菌体RNA聚合酶启动子(本文称为T7启动子)放置于与指示基因相同的转录方向上。通过T7启动子不能转录指示基因,因为指示基因盒处于T7启动子的上游。在感染靶细胞之后,通过逆转录酶的相对于指示基因编码区来说从5' LTR到3' LTR的拷贝导致T7启动子的再定位,使抗性测试载体中的非功能性指示基因被转换成功能性指示基因。在HIV整合酶将修复的指示基因整合进靶细胞染色体后,由靶细胞表达的T7 RNA聚合酶转录该指示基因。在HBV的情况中的具有置换启动子的非功能性指示基因的例子是将增强子-启动子区放置于指示基因的下游或3'末端,两者具有同样的转录方向。通过增强子-启动子不能转录指示基因,因为指示基因盒

定位于上游。通过HBV指示基因病毒载体的逆转录和环化，使指示基因编码区增强子—启动子再定位于上游，从而将抗性测试载体中的非功能性指示基因转换成功能性指示基因。

置换启动子可以是可在靶宿主细胞中转录的任一种真核或原核生物的启动子。优选启动子的大小是小的从而使其能够插入病毒基因组而不影响病毒复制。更优选使用小的，并能通过导入靶宿主细胞的单个RNA聚合酶亚单位进行转录的启动子，如噬菌体启动子。这样的噬菌体启动子的例子和它们的同族RNA聚合酶包括噬菌体T7，T3和Sp6的那些。一种核定位序列(NLS)可以附着于RNA聚合酶上，以便将RNA聚合酶的表达限于核内，在核内，可能需要它们转录修复的指示基因。这样的NLS可以从任何如SV40 T抗原的核运输蛋白获得。如果利用噬菌体RNA聚合酶，为了通常没有加帽的转录物的翻译，在指示基因的前面应加上内部核糖体进入位点(IRES)，如EMC病毒5'未翻译区(UTR)。在HIV的情况下，置换启动子本身可以导入在逆转录过程中拷贝成3'LTR的5'LTR内的任何位置，只要LTR的功能不被破坏，优选在LTR的U5和R部分，最优选在U5和R的功能重要和高度保守的区域的外面。在HBV的情况下，置换启动子可以置于不打乱HBV DNA复制所必需的顺式作用元件的任何位置。如果由于转染的人工效应(DNA连锁)非功能性指示基因有不适当的表达，可将封闭序列加在抗性测试载体的末端。在上面给出的置换T7启动子的HIV例子中，这样的封闭序列可以由T7转录终止子组成，其定位阻止由DNA连锁造成的阅读转录，但不阻止逆转录过程中从5'LTR到3'LTR的置换T7启动子的再定位造成的转录。

2. 置换编码区 在第二个实施方案中，由于指示基因的5'和3'编码区的相对定位使指示基因变成非功能性，因为3'编码区在5'编码区的前面而不是后面。这样错位的编码区称为“置换编码区”。非功能性指示基因的定向可以与病毒载体的天然或外源的启动子/增强子的定向相同或相反，因为编码功能性指示基因的mRNA将在任一定向状况中产生。一个或多个病人起源的区段产物的作用使非功能性指示基因和它的置换编码区成为功能性的。在HIV的情况下中具有置换编码区的非功能性指示基因的第二个例子是将具有相关的启动子的5'指示基因编码区放置于3'LTR U3

区, 和将3' 指示基因编码区放置于HIV基因组的上游位置, 而每个编码区具有同样于病毒LTR的转录方向。在两个例子中, 5' 和3' 编码区也可以分别具有相关的拼接供体和受体序列, 它们可以是异种的或人工的拼接信号。指示基因不能通过相关的启动子或病毒启动子功能性地转录, 因为置换编码区阻止了功能性拼接转录物的形成。在感染靶细胞之后, 通过逆转录酶将3' LTR拷贝成5' LTR, 导致5' 和3' 指示基因编码区相互之间重新定位, 使抗性测试载体中的非功能性指示基因变换成功能性指示基因。由5' 编码区相关的启动子转录后, RNA拼接可以将5' 和3' 编码区连接, 产生出功能性指示基因产物。在HBV的情况中, 具有置换编码区的非功能性指示基因的一个例子是将3' 指示基因编码区放置于增强子-启动子和指示基因的5' 编码区的上游或5' 末端。指示基因的5' 和3' 编码区的转录定向相同, 并与指示基因病毒载体相同。但是, 由于指示基因的5' 和3' 编码区在抗性测试载体中置换(即, 5' 编码区在3' 编码区的下游), 没有转录出可以拼接产生功能性指示基因编码区的mRNA。在指示基因病毒载体的逆转录和环化后, 指示基因3' 编码区定位于增强子-启动子和5' 编码区的下游或3' 末端, 从而允许可以拼接生产功能性指示基因编码区的mRNA的转录。

3.反向内含子 在第三个实施方案中, 通过使用“反向内含子”, 即以相反于指示基因的转录的方向插入在指示基因的编码序列中的内含子, 使指示基因变成非功能性。包括它自身、连接启动子的指示基因盒的整个转录定向是与病毒控制元件相反的, 而人工内含子的定向是与病毒控制元件相同的。指示基因通过它自身连接的启动子的转录不产生功能性转录物, 因为反向内含子不能在这一定向中拼接。但是, 通过病毒控制元件的指示基因的转录确实导致通过RNA拼接使反向内含子除去, 虽然指示基因仍然不是功能性地表达, 因为得到的转录物是反义方向的。在这一转录物的逆转录和产生的逆病毒DNA的整合, 或嗜肝DNA病毒DNA的环化后, 指示基因可以利用它自身连接的启动子功能性地转录, 因为反向内含子已经在前面除去。在这种情况下, 指示基因本身可以含有与病毒控制元件定向相反的整个转录单位的它本身的功能性启动子。所以, 非功能性指示基因是在通过病毒控制元件转录的错误方向, 并且它不能通过自身的启动子

功能性地转录，因为反向内含子不能通过拼接适当地切除。但是，在逆转病毒特别是HIV，嗜肝DNA病毒，特别是HBV的情况中，通过病毒启动子(HIV LTR或HBV增强子—启动子)的转录导致反向内含子通过拼接而除去。作为产生的拼接转录物的逆转录和产生的这一原病毒整合进宿主细胞染色体或HBV载体的环化的结果，现在指示基因可以通过它自身的启动子功能性地转录。为了打乱指示基因的翻译，含有拼接供体和受体位点以便除去内含子的反向内含子，优选定位于指示基因的编码区。拼接供体和受体可以是任何拼接供体和受体。优选的拼接供体—受体是CMV IE拼接供体和人 α -球蛋白基因(“内含子A”)的第二个外显子的拼接受体。

指示基因病毒载体—构建

如本文所用，“指示基因病毒载体”是指含有指示基因和它的控制元件和一个或多个病毒基因的载体。指示基因病毒载体是从指示基因盒和下文定义的“病毒载体”组装的。另外指示基因病毒载体还可以包括增强子，拼接信号，多聚腺苷酸化序列，转录终止子，或其它调节序列。另外，指示基因病毒载体可以是功能性的或非功能性的。在作为抗病毒药物的靶的病毒区段没有包括在指示基因病毒载体中的情况下，它们存在于第二个载体中。“指示基因盒”包括指示基因和控制元件。“病毒载体”指含有一些或所有下面基因的载体：编码一种基因产物的病毒基因，控制序列，病毒包装序列，和在逆病毒的情况中的整合序列。另外，病毒载体还可以包括一个或更多的病毒区段，它们中的一个或更多可以是抗病毒药物的靶。本文将含有病毒基因的病毒载体的两个例子称为“基因组病毒载体”和“亚基因组病毒载体”。“基因组病毒载体”是可以包括一个或多个病毒基因的缺失以致使不能进行病毒复制，但保留完全病毒的mRNA表达和完全的病毒的加工特征的载体。在一个用于HIV药物敏感性和抗性测试的实施方案中，基因组病毒载体含有HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu和nef基因(一些，大部分，或所有的env可以缺失)。“亚基因组病毒载体”是指包括一个或多个可以编码作为抗病毒药物的靶的蛋白质的病毒基因的编码区的载体。在HIV的情况中，一个优选的实施方案是一种含有HIV gag-pol基因的亚基因组病毒载体。在HBV的情况中，优选的实施方案是含有HBV P基因的亚基因组病毒载体。在HIV的情况中，两个用于病毒载体构建的原

病毒克隆的例子是：HXB2(Fisher等, (1986) 自然, 320, 367—371)和NL4—3(Adachi等, (1986)病毒学杂志, 59, 284-291)。在HBV的情况中, 已经鉴定了大量的全长基因组序列并可以用于HBV病毒载体的构建：GenBank Nos.M54923, M38636, J02203和X59795。病毒编码基因可以在天然增强子/启动子或外源病毒或细胞增强子/启动子的控制下。一个用于HIV的药物敏感性和抗性测试的优选的实施方案是将基因组或亚基因组病毒编码区放置于HIV—LTR U3区的天然增强子/启动子或CMV即早期(IE)增强子/启动子的控制下。一个用于HBV药物敏感性和抗性测试的优选的实施方案, 是将基因组或亚基因组病毒的编码区放置于CMV的即早期(IE)的增强子/启动子的控制下。在含有一个或多个是抗病毒药物的靶的, 或编码是抗病毒药物的靶的蛋白质的病毒基因的指示基因病毒载体的情况中, 所述的载体含有病人序列接受位点。将病人起源的区段插入在指示基因病毒载体中的病人序列接受位点中, 在下文中被称为抗性测试载体。

“病人序列接受位点”是用于病人起源的区段插入的载体中的位点, 并且所述的位点可以是：1) 通过位点特异的诱变在载体中引入的独特的限制性位点；2) 天然存在于载体中的独特限制性位点；或3) 选择位点, 利用可选择的克隆方法(如, UDG克隆)可以将病人起源的区段插入其中的选择位点。在一个实施方案中, 在指示基因病毒载体中导入病人序列接受位点。病人序列接受位点优选地定位于抗病毒药物的靶的病毒蛋白的编码区内或附近。选用的用于引入病人序列接受位点的病毒序列最好使那个位点存在的氨基酸编码序列中没有产生变化, 或保守变化。优选地病人序列接受位点定位于病毒基因组的相对保守区域以便于病人起源的区段的导入。或者, 病人序列接受位点定位于功能重要的基因或调节序列之间。病人序列接受位点可以定位于病毒基因组中相对保守的区域中或其附近, 以便于使用引物在病人起源的区段中导入相应的限制性位点。为了进一步改善病人起源的区段的呈现, 可以简并库的形式设计引物以便适应病毒序列的异质性, 或可以掺入如具有多重碱基配对能力的脱氧肌苷(I)的残基。可以在药物抗性和敏感性测试中一起使用具有定义同样或重叠限制位点间隔的病人序列接受位点的一系列抗性测试载体, 以便提供含有相同于给定病人序列接受位点的中间限制性位点的病人起源区段的呈现, 并且在每一

个单独的抗性测试载体中亚呈现。

宿主细胞

在宿主细胞中导入抗性测试载体。适当的宿主细胞是哺乳动物细胞。优选的宿主细胞来源于为病毒感染的主要靶的人组织的细胞。在HIV的情况下，它们包括人细胞如人T细胞，单细胞，巨噬细胞，树突细胞，胰细胞，造血干细胞或前体细胞，和其它细胞。在HBV的情况下，适当的宿主细胞包括肝癌细胞系(HepG2,Huh7)，初级人肝细胞，可以由假型HBV感染的哺乳动物细胞，和其它细胞。人起源的宿主细胞将保证抗病毒药物有效地进入细胞并通过细胞的酶机制转换成抗病毒抑制剂的相关代谢形式。本文将宿主细胞称为“包装宿主细胞”，“抗性测试载体宿主细胞”，或“靶宿主细胞”。“包装宿主细胞”是指提供本文所用的复制缺陷病毒载体，如抗性测试载体，所需要的反式激活作用因子和病毒包装蛋白以产生抗性测试载体病毒颗粒的宿主细胞。包装蛋白可以通过抗性测试载体本身，包装表达载体，或两者内含有的病毒基因的表达式来提供。包装宿主细胞是指用一个或多个包装表达载体转染的宿主细胞，并且当用抗性测试载体转染时，在本文中将被称为“抗性测试载体宿主细胞”，有时被称为包装宿主细胞/抗性测试载体宿主细胞。用作HIV的包装宿主细胞的优选的宿主细胞包括293人胚胎肾细胞(293, Graham,F.L.等，病毒遗传学杂志36:59, 1977), BOSC23(Pear等，Proc,Natl.Acad.Sci. 90, 8392, 1993), tsa54和tsa201细胞系(Heinzel等，病毒学杂志62, 3738, 1988)，对于HBV优选的是，HepG2(Galle和 Theilmann,L.Arzhim.-Forschy Drug Res.(1990)40,1380-1382)。(Huh,Ueda,K等，病毒学*(1989)169,213-216)。“靶宿主细胞”指由抗性测试载体病毒颗粒感染的细胞，该颗粒是由抗性测试载体宿主细胞产生的，在该宿主细胞中发生了指示基因的表达或抑制。用作靶宿主细胞的优选的宿主细胞包括人T细胞白血病细胞系，该细胞系包括Jurkat(ATCC T1B-152)，H9(ATCC HTB-176)，CEM (ATCC CCL-119)，HUT78(ATCC TIB-161)和它们的衍生物。

药物敏感性和抗性测试

本发明的药物敏感性和抗性测试可以在一个或多个宿主细胞中进行。病毒药物敏感性确定为抗病毒试剂的浓度，在该浓度给定百分数的指示基

因表达被抑制(如, 抗病毒试剂的IC₅₀是50%的指示基因的表达受抑制的浓度)。对于标准实验室病毒区段或来自首次用药物做实验的病人(即, 没有接受过任何抗病毒药物的病人)的病毒区段可利用本发明的方法可以作出给定的抗病毒药物的药物敏感性的标准曲线。相应地, 对于给定病人来说病毒药物抗性是病毒药物敏感性的下降, 这是通过将药物敏感性与给定标准相比较或者通过在一定时间内对同一病人作出一系列的测试, 这是通过对指示基因表达的抑制的提高(即指示基因表达的降低)来确定的。

在第一种类型的药物敏感性和抗性实验中, 抗性测试载体病毒颗粒是由第一宿主细胞(抗性测试载体宿主细胞)产生的, 该细胞是通过用抗性测试载体和包装表达载体转染包装宿主细胞而制备的。然后将抗性测试载体病毒颗粒用于感染第二个宿主细胞(靶宿主细胞), 其中指示基因的表达得到测量。在功能性或非功能性指示基因的情况中利用了这种两细胞系统, 该两细胞系统包括一个包装宿主细胞, 该细胞被抗性测试载体转染, 随后被称为抗性测试载体宿主细胞, 和靶细胞。在转染包装宿主细胞之后, 功能性指示基因被有效地表达并将需要用抗性测试载体宿主细胞上清液感染靶宿主细胞, 以便进行本发明的测试。在包装宿主细胞转染之后, 具有置换启动子, 置换编码区, 或反向内含子的非功能性指示基因不被有效地表达, 这样靶宿主细胞的感染可通过将抗性测试载体宿主细胞与靶宿主细胞共培养或通过利用抗性测试载体宿主细胞上清液感染靶宿主细胞来达到。在第二类型的药物敏感性和抗性测试中, 单个的宿主细胞(抗性测试载体宿主细胞)也充当靶宿主细胞。包装宿主细胞被转染并产生抗性测试载体病毒颗粒并且一些包装宿主细胞也变成抗性测试载体颗粒感染的靶。利用含有具有置换启动子, 置换编码区或反向内含子的非功能性指示基因的病毒抗性测试载体使应用单个宿主细胞类型的药物敏感性和抗性测试成为可能。在第一个细胞转染之后, 这样的指示基因不被有效地表达, 但只在第二个细胞的感染之后才被有效地表达, 这样提供了一个测量待测抗病毒试剂的效果的机会。在利用含有功能性指示基因的抗性测试载体的药物敏感性和抗性测试的情况中, 共培养方法或者利用单个细胞类型的抗性与敏感性测试都不能用于靶细胞的感染。含有功能性指示基因的抗性测试载体需要利用来自抗性测试载体宿主细胞的过滤的上清液感染靶宿主

细胞的两细胞系统。

在本发明的一个实施方案中,对于HIV的情况,利用起源于与包装表达载体pVL-ENV4070A(也称为pCXAS-4070Aenv)共转染的基因组病毒载体,即pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLG-lucPC-HS, pCG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-PB, pLG-lucII-HS, pCG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pCG-lucII-PB和pCG-CXCN(F-lucP)2-AA的抗性测试载体进行基于颗粒的抗性测试。或者,利用起源于与包装表达载体pVL-env4070A和, pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'两者之一,共转染的亚基因组表达载体,即pLS-lucPP-HS, pCS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS, pCS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-PB, pLS-lucII-HS, pCS-lucII-HS, pLS-lucII-PB和pCS-lucII-PB的抗性测试载体进行基于颗粒的抗性测试。在本发明的另一个实施方案中,在HIV的情况中,通过在缺乏包装表达载体时的选定宿主细胞的转染,利用如上所述的抗性测试载体之一进行基于非颗粒的抗性测试。

在基于颗粒的敏感性和抗性测试中,抗性测试载体病毒颗粒是通过第一宿主细胞(抗性测试载体宿主细胞)产生的,该细胞是通过利用抗性测试载体和包装表达载体转染包装宿主细胞来制备的。然后将抗性测试载体病毒颗粒用于感染第二宿主细胞(靶宿主细胞),测量其中的指示基因的表达。在第二类型的基于颗粒的敏感性和抗性测试中,单个宿主细胞类型(抗性测试载体宿主细胞)用于两个目的:给定培养物中的一些包装宿主细胞被感染并产生抗性测试载体病毒颗粒,在同一培养物中的一些宿主细胞是这样产生的抗性测试载体颗粒感染的靶。利用含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体进行应用单个宿主细胞类型的抗性测试是可能的,因为在许可的宿主细胞感染之后这样的指示基因得到有效的表达,在同样的宿主细胞类型感染之后它们不被有效地表达,这样提供了一个测量待测抗病毒试剂的效果的机会。基于同样的原因,通过两种细胞类型的共转染可以进行利用两种细胞类型的抗性测试,作为使用从第一个细胞类型的上清液得到的病毒颗粒感染第二个细胞类型的可选择的一种方法。

在基于非颗粒的敏感性和抗性测试的情况中,通过利用在缺乏包装表

达载体时的抗性测试载体转染单个宿主细胞进行抗性测试基于非颗粒的抗性测试是利用含有具有置换启动子，置换编码区，或反向内含子的非功能性指示基因的抗性测试载体进行的。基于非颗粒的抗性测试是通过在缺乏包装表达载体时的各个抗性测试载体对单个宿主细胞类型的转染进行的。虽然包含在这些抗性测试载体内的非功能性指示基因在宿主细胞的转染之后不被有效地表达，存在着由基于非病毒颗粒的逆转录产生的可检测的指示基因的表达。逆转录和链转移导致置换的非功能性指示基因与非置换的功能性指示基因的转变。由于逆转录完全依赖于每个抗性测试载体内的pol基因的表达，可以测试抗病毒试剂抑制包含在抗性测试载体内的病人起源的区段编码的pol基因产物的能力。在HIV的情况中，逆转录和链转移导致非功能性指示基因变换成功能性指示基因。由于逆转录完全依赖于包含在每个抗性测试载体内的病人起源的区段的表达，可以测试抗病毒试剂抑制包含在抗性测试载体内的病人起源的区段编码的基因产物的能力。

利用抗性测试载体和适当的包装表达载体转染包装宿主细胞以产生抗性测试载体宿主细胞。将包括逆转录酶抑制剂AZT，ddI,ddC,d4T和3TC和蛋白酶抑制剂saquinavir, ritonavir和indinavir的单个抗病毒试剂以及它们的联合在它们转染时，以适当的浓度范围加入到包装宿主细胞的单个平板中。在转染24小时到48小时后，通过与抗性测试载体宿主细胞或从抗性测试载体宿主细胞的过滤上清液得到的抗性测试载体病毒颗粒共培养感染靶宿主细胞。在感染之前或感染之时，将每个抗病毒试剂，或它们的联合加入到靶宿主细胞中，以获得存在于转染过程中的给定试剂的相同的最后浓度。

通过指示基因表达的测试，例如在指示基因是萤火虫luc基因的情况中，通过测量荧光素酶活性，可以对通过共培养或利用过滤的病毒上清液感染的靶宿主细胞中的指示基因的表达或抑制进行确定。当与缺乏抗病毒试剂时进行的对照比较时，在存在给定的一种或几种抗病毒试剂时，在利用给定的抗性测试载体病毒颗粒制备物感染的靶宿主细胞中观察到的荧光素酶的活性的减弱，通常以S形曲线与抗病毒试剂的浓度的对数值相关。将这一抑制曲线用于计算该试剂或几种试剂的联合对于存在于抗性测试载体中的病人起源的区段编码的病毒靶产物的表观抑制浓度(IC₅₀)。

在一个细胞敏感性和抗性测试的情况中，用抗性测试载体和适当的包装表达载体转染宿主细胞，以产生抗性测试载体宿主细胞。在它们转染的时候，将单个抗病毒试剂，或它们的联合，以适当范围的浓度加入转染细胞的各个平板。在转染24小时到72小时后，收集细胞并测试萤火虫的荧光素酶活性。由于培养物中的转染细胞没有有效地表达指示基因，培养物中的转染细胞，以及培养物中的超感染细胞，可以作为指示基因表达的靶宿主细胞。当与在缺乏抗病毒试剂时进行的对照比较时，在存在给定的一种或几种抗病毒试剂时观察到的转染细胞的荧光素酶活性的减弱通常以S形曲线与抗病毒试剂的浓度的对数值相关。将这一抑制曲线用于计算一种试剂或几种试剂的联合对存在于抗性测试载体中的病人起源的区段编码的病毒靶产物的表观抑制浓度(IC)。

抗病毒药物/候选药物

根据抗病毒药物的靶在选定时间将待加入测试系统的抗病毒药物加入。例如，在HIV蛋白酶抑制剂，包括saquinavir, ritonavir, indinavir和nelfinavir, 的情况中，将它们在用抗性测试载体转染的时候，以适当范围的浓度，加入包装宿主细胞的单个平板。也将HIV蛋白酶抑制剂在感染时加入靶宿主细胞，以得到与转染期间得到的相同的最终浓度。将包括AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC和nevaripine的HIV逆转录酶抑制剂在由抗性测试载体病毒颗粒感染的时候，以测试浓度加入靶宿主细胞的各个平板。或者，抗病毒药物可以存在于整个检测过程。测试浓度选自一个范围的浓度，这一范围通常在约0.1纳摩尔和约100(摩尔之间, 更具体地说对于各个下面的药物: AZT, 从约1纳摩尔到约5(摩尔; ddI, 从约1纳摩尔到约25(摩尔; 3TC, 从约1纳摩尔到约50(摩尔; d4T, 从约1纳摩尔到25(摩尔; 和nevaripine, 从约1纳摩尔到约100(摩尔。

在本发明的另一个实施方案中，在本发明的药物敏感性和抗性测试中测试了候选抗病毒化合物。根据候选的抗病毒的蛋白质靶，在选定时间，以适当的浓度将该候选抗病毒化合物加入测试系统。或者，可以测试一个以上候选抗病毒化合物，或可以测试与已被许可的抗病毒药物如AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, saquinavir, 或正在进行临床测试的化合物如ritonavir或indinavir联合的候选抗病毒化合物。通过测量指示基因的表达或抑制可以

评估候选抗病毒药物的效力。在这一实施方案的另一方面，药物敏感性和抗性测试可以用于筛选病毒突变体。在对已知的抗病毒药物或候选的抗病毒药进行抗性突变体的鉴定后，分离抗性突变体并分析DNA。这样，可以建立病毒抗性突变体的文库以便能够筛选单独的或联合的候选抗病毒剂。这将能使普通技术人员能够鉴定有效的抗病毒剂和设计有效的治疗方法。

总的材料和方法

用于构建载体，和转染和感染细胞的大部分技术在本领域已得到广泛的实践，并且大多数技术人员熟悉叙述特定条件和方法的标准来源的材料。但是，为了方便，下面的章节可以作为指导。

用小写字母p以及跟随的字母和/或数字命名“质粒”和“载体”。本文的起始质粒是商业可得的，公众可没有限制地得到，或能够根据公知的方法从已有质粒构建。另外，对那些已描述的质粒的等质粒是本领域已知的并是普通技术人员了解的。

本发明的载体的构建利用了本领域很容易理解的标准连接方法和限制技术(参见Ausubel等，(1987)当前分子生物学方法，Wiley-Interscience或Maniatis等(1992)分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，N.Y.)。将分离的质粒，DNA序列，或合成的低聚核苷酸切割，剪切，和再连接成需要的形式。通过DNA序列分析证实涉及合成的DNA的所有DNA构建体的序列。

DNA的“消化”是指利用仅在DNA的某些序列，限制性位点起作用的限制性酶催化裂解DNA。本文所用的各种限制酶是商业可得的并且它们的反应条件，辅助因子和其它要求是普通技术人员已知的。为了分析的目的，通常1（克质粒或DNA片段与在约20升缓冲液溶液的2单位的酶一起使用。或者，将过量的限制酶用于保证DNA底物的完全消化。温育时间约为在37℃时1小时到2小时是适宜的，虽然可以有一些变化。在每个温育步骤之后，通过用酚/氯仿萃取除去蛋白质，并可以接着醚提取，然后通过用乙醇沉淀从水相部分回收核酸。如果需要，利用标准方法通过聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳进行被切割的片段的大小分离。在酶学方法 65: 499—560(1980)描述了通常的大小分离的总的描述。

在存在四种脱氧核苷三磷酸(dNTPS),利用20℃时约15到25分钟的温育时间,在50mM Tris(pH7.6), 50mM氯化钠, 6mM 氯化镁, 6mM DTT和5-10mM dNTPs中,通过利用大肠杆菌DNA聚合酶I(Klenow)大片段处理可以将限制性切割的片段的末端平齐化。Klenow片段填平5' 粘性末端,但是锯短突出的3' 单链,尽管四种dNTPs存在。如果需要,在粘性末端的特性规定的限制内,供应唯一的一个dNTPs,或供应选择的dNTPs可以进行选择性修复。在用Klenow处理后,利用酚/氯仿和乙醇沉淀提取混合物。在用S1核酸酶或Bal-31,在适当的条件下处理导致任何单链部分的水解。

在下面的标准条件和温度下在15到50升体积中进行连接反应: 20mM Tris-Cl pH7.5, 10mM 氯化镁, 10mM DTT, 33毫克/毫升BSA, 10毫摩尔—50毫摩尔氯化钠,和40毫摩尔ATP, 0.01-0.02(Weiss)单位T4 DNA连接酶,在0℃(对于“粘性末端”连接)或1毫摩尔ATP, 0.3-0.6(Weiss)单位 T4 DNA连接酶,在14℃(对于“锯短末端”的连接)。分子间“粘性末端”的连接通常在33—100克/毫升总DNA浓度(5—100毫摩尔总末端浓度)进行。分子间平齐末端连接(通常应用10到30倍摩尔过量的接头)在1毫摩尔总末端浓度进行。

“瞬时表达”是指在转染的约1天到2星期内未扩增的表达。特定需要的异种蛋白质的瞬时表达的最适时间可以根据几个因子包括例如,任何可以利用的反式激活因子,翻译控制机制和宿主细胞而变化。当转染的特定质粒发生作用时,即发生转录或翻译时,发生瞬时表达。在这一时间过程中,进入细胞中的质粒DNA被转移到核中。该DNA在核中是非整合状态,游离的。细胞对质粒的转录发生在这一时期。在转染后,质粒DNA通过细胞分裂可被降解或被稀释。细胞染色质内会发生随机整合。

总的来说,将含有起源于与宿主细胞相容的种类的启动子和控制序列的载体与特定宿主细胞一起使用。适于与原核寄主一起使用的启动子包括 β 内酰胺酶和乳糖启动子系统,碱性磷酸酶,色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子如tac启动子。但是,其它功能性细菌启动子也是适用的。除了原核生物,真核微生物如酵母培养物也可以使用。啤酒酵母或普通的烘烤酵母是最通常使用的真核微生物,尽管通常可得许多其它菌株。在哺乳动物宿主细胞中控制从载体的转录的启动子可以从各种来源,例如病毒的基

基因组如：乳腺病毒，猴病毒40(SV40)，腺病毒，逆病毒，乙型嗜肝DNA病毒，和优选的是巨细胞病毒，或从异种哺乳动物启动子如b-肌动蛋白启动子得到。SV40病毒的早期的和后期的启动子可以方便地以含有SV40病毒复制起点的SV限制片段形式得到。人巨细胞病毒的即早期的启动子可以以HindIII E限制性片段形式得到。当然，本文也利用了来自宿主细胞或相关种类的启动子。

本文所用的载体可以包括选择基因也命名为选择性标记。选择基因编码载体转染的宿主细胞的生存或生长所必须的蛋白质。适当的哺乳动物细胞的选择性标记的例子包括二氢叶酸还原酶基因(DHFR)，鸟氨酸脱羧酶基因，多重药物抗性基因(mdr)，腺苷脱氨基酶基因，和谷氨酸合成酶基因。当将这样的选择性标记成功地转移到哺乳动物宿主细胞中，如果放置于在选择性压力下，转化的哺乳动物宿主细胞可以生存。存在两个广泛使用的截然不同的选择方法。第一类是根据细胞的代谢和丧失了独立于补充培养基而生长的能力的突变的细胞系的使用。第二类被称为显性选择方法，它是指用于任何细胞类型并且不需要使用突变细胞系的选择方案。这些方案通常使用药物阻止宿主细胞的生长。这些具有新基因的细胞将表达药物抗性的蛋白质并在选择中生存。这样的显性筛选的例子利用了药物新霉素(Southern和Berg(1982) 分子应用遗传学杂志1, 327), 霉酚酸(Milligan和Berg(1980)科学209, 1422), 或潮霉素(Sugden等(1985)分子细胞生物学5,410-413)。上面给出的三个例子利用了真核控制下的细菌基因以便使其具有对适当的药物新霉素(G418或庆大霉素), xgpt(霉酚酸)或潮霉素的抗性。

“转染”指在宿主细胞中导入DNA而使DNA表达，不论是功能性地表达或者相反；DNA也可以作为染色体外元件或通过整合进染色体中而复制。除非另有说明，本文使用的宿主细胞的转化方法是Graham和van der Eb(1973)病毒学52, 456—457的磷酸钙共沉淀方法。转染的其它可供选择的方法是电穿孔，DEAE-葡聚糖方法，脂质转染法和biolistics(Kriegler(1990)基因转移和表达：实验室手册，Stockton出版社)。

可利用本发明的表达载体转染宿主细胞并在为适用于诱导启动子、选择转化体或扩增基因而改良的常规的培养基中培养。在含有加入的谷氨酸

和没有抗生素的F12: DMEM(Gibco)50:50中培养宿主细胞。培养条件,如温度、pH等,是前面与选择用于表达的宿主细胞所使用的那些,并且是普通技术人员所了解的。

下面的实施例仅说明了已知的实施本发明的最好的方式。但不应该构成对本发明的限制。所有出现的文献参考引入本文作为参考。

实施例1

利用含有病人起源的区段和具有置换启动子
的非功能性指示基因的抗性测试载体的HIV
药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体一构建方法

利用含有抗病毒药物的靶的病毒基因的HIV基因组和亚基因组病毒载体设计含有具有置换启动子的非功能性指示基因的指示基因病毒载体。指示基因病毒载体pLG-lucPP和pCG-lucPP是基于基因组病毒载体pLG和pCG的;各在HIVenv基因中携带缺失。起源于基因组指示基因病毒载体pLG-lucPP和pCG-lucPP的抗性测试载体含有用于将病人起源的区段插入的病人序列接受位点并与编码两亲性的MLV 4070A env 基因产物的包装表达载体一起使用。指示基因病毒载体pLS-lucPP和pCS-lucPP是基于亚基因组病毒载体pLS和pCS的;每个仅编码HIV gag-pol基因。起源于亚基因组指示基因病毒载体pLS-lucPP和pCS-lucPP的抗性测试载体含有用于病人起源的区段的插入的序列受体位点并与编码HIVvif,vpr,tat,rev,vpu和nef基因的第二个包装表达载体和编码两亲性的MLV 4070A env基因产物的第二个包装载体的一起使用。

HIV病毒载体一基因组和亚基因组

利用生物学活性原病毒克隆HXB2(Fisher等(1986)自然320, 367-371)的序列设计HIV病毒载体。设计了两类病毒载体:在单一基因如env中具有缺失,但保留了完整病毒的mRNA表达和加工特征的基因组病毒载体,和可以仅包括一个或少数几个通常是敏感性和抗性测试的特异的靶,如gag-pol,或完全缺失病毒基因的亚基因组病毒载体。两类载体在病毒基因

组内具有独特的限制位点，以用于将指示基因盒以及病人序列接受位点，即抗病毒靶基因(如pol)附近或其中的另外的独特的限制性位点插入病毒基因组内，以便插入病人起源的HIV序列。另外，将两类载体设计为整合进了HIV-LTR U3区的天然增强子-启动子，或来自CMV即早期(IE)区的外源的增强子-启动子。在构建质粒DNA时利用标准方法(Ausubel等(1987)现代分子生物学方法, Wiley-Interscience)。通过DNA序列分析证实整合了合成DNA的所有DNA构建体的序列(Sanger等(1977)Proc.Natl. Acad.Sci.74, 5463-5467)。

从含有插入在pBluescript KS(+)质粒克隆载体(Stratagene, San Diego CA)的多接头中的HpaI到XbaI限制片段上的HXB2原病毒DNA序列的质粒pBS-HIV(Page等(1990) 病毒学杂志 64,5270-5276)得到HIV序列。因为这一原病毒克隆含有来自原病毒整合位点的未鉴定的，侧接的人DNA，利用两步位点特异性的诱变并将质粒pBS-HIV作为模板除去这样的序列。在第一步骤中，利用从5' 到3' 方向含有下面序列的低聚核苷酸1除去与5' LTR邻接的人序列：1) 与左面U3区内的整合原病毒开头的18个核苷酸互补的序列，2)六核苷酸SmaI位点，和3)与刚在多接头和噬菌体T 3 启动子之外的pBluescript KS(+)中的区域互补的18个核苷酸序列。在第二个步骤中，利用含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸2除去与5' LTR邻接的人序列：1) 与LacZ基因内的刚在PvuI位点之外的pBluescript KS(+)中的区域互补的一个18个核苷酸的序列，2) 一个六核苷酸的XbaI位点，和3) 与右面U5区内的后18个整合的原病毒的后18个核苷酸互补的序列。得到的质粒称为pBS-HXB2。

通过单一步骤的位点特异性诱变，从质粒pBS-HXB2产生利用HIV-LTR U3区作为用于抗病毒靶基因(图1)的表达的增强子-启动子的基因组和亚基因组病毒载体。利用含有下面序列(5'-3')的低聚核苷酸制备缺失了env基因的基因组病毒载体pLG：1)与env基因内HXB2的位置7626到7643互补的一个18个核苷酸的序列(HXB2中的编号是参照GenBank, 登记号K03455)，2) 8核苷酸的NotI位点，和3) 与env基因内的HXB2的6384到6401位置互补的一个18个核苷酸的序列。利用含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸4制备缺失了env,tat,rev,vif,vpr和vpu基因的亚基因组病毒载体

pLS: 1) 与env基因内HXB2的7626到7643位置互补的一个18个核苷酸的序列, 2) 8核苷酸的NotI位点, 和3) 与vif基因内的HXB2的5109到5126位置互补的一个18个核苷酸的序列。

使用CMV IE区作为用于抗病毒靶基因的表达的增强子—启动子的基因组和亚基因组病毒载体起源于质粒pLG和pLS并分别称为pCG和pCS(图1)。基因组病毒载体pCG是通过两个步骤制备的。在第一个步骤中, 从两个DNA片段制备该中间质粒: 1) 利用SmaI消化质粒pLG和利用碱性磷酸酶处理该载体制备的11.2kB的载体片段, 和2) 含有通过利用SmaI消化质粒pVL-1(如下所述)制备的CMV IE增强子—启动子的0.9kB的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定在与病毒LTR相同的转录方向含有CMV IE区的质粒。在第二个步骤中, 通过位点特异性的诱变以使CMV IE增强子—启动子与5' LTR R区相连, 其连接位置应允许在R区开始起始转录, 利用含有下面的序列(5'-3')的低聚核苷酸5, 从这一中间质粒制备质粒pCG: 1) 与R区开头的HXB2的455到472位置互补的一个18个核苷酸的序列, 和2) 与CMV IE增强子—启动子的-18到-1位置互补的一个18个核苷酸的序列(座标参照Boshart等(1985)细胞41, 521—530)。亚基因组病毒载体pCS起源于质粒pCG并是从两个DNA片段制备的: 1) 利用SmaI和ClaI消化质粒pLS制备的9.1kB的载体DNA, 和2) 利用SmaI和ClaI消化质粒pCG制备1.3kB的DNA片段。

基因组指示基因病毒载体—置换启动子

指示基因病毒载体pLG-lucPP和pCG-lucPP和由其衍生的抗性测试载体在5' 到3' 方向含有下面的元件(图2B): 1) HIV—LTR U3区(pLG-lucPP)或CMV IE增强子—启动子(pCG-lucPP), 2) HIV—LTR R区, 3) 含有具有与LTR相反的转录方向的插入的T7启动子的HIV—LTR U5区, 4) HIVgag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env, 和nef基因的编码区, 5) 插入在缺失的env基因的指示基因盒, 和6) 3' HIV—LTR。将相同的指示基因盒插入在pLG-lucPP和pCG-lucPP中, 并含有下面元件: 1) 允许内部核糖体进入的EMC 5' —UTR区, 2) 荧光素酶基因(luc)的完整的编码区, 和3) T7转录终止子。指示基因具有与HIV—LTR或CMV IE增强子—启动子相反的转录方向并且所以不能通过这些元件功能性地转录。通

过T7启动子也不能转录指示基因，因为指示基因盒定位于T7启动子的上游。在逆转录和链转换之后，T7启动子被从5' LTR拷贝到3' LTR，从而允许通过T7 RNA聚合酶(图2C)从新产生的T7启动子功能性地转录指示基因。

含有指示基因盒的质粒plucPP是通过三个步骤制备的。在第一个步骤中，从两个DNA片段中制备含有由独特的NotI位点侧接的盒的质粒pVL-EMC/T7，该盒含有EMC 5' -UTR元件和T7转录终止子：1) 用NotI消化质粒pVL(如下所述)和用碱性磷酸酶处理该质粒制备的3.0kB的载体DNA，和2) 利用质粒pTM1(Moss等(1990) 自然348,91-92)作为模板，低聚核苷酸6和7作为引物的PCR，接着用 NotI消化而制备的含有EMC 5' UTR和T7终止子的0.8kB的DNA片段。低聚核苷酸6和7各掺入一个NotI限制性位点。在第二步中，从两个DNA片段制备含有插入在哺乳动物表达载体pVL-1(如下所述)的萤火虫荧光素酶基因的编码区的质粒pVL-luc：1) 利用NruI和BglII消化质粒pVL-1制备的4.1kB的载体DNA，和2) 利用质粒pGEM-luc(Promega, Madison, WI)作为模板和利用低聚核苷酸8和9作为引物的PCR，接着利用NruI和BglII消化制备的含有完整的荧光素酶编码区的1.7kB的DNA片段。低聚核苷酸8和9分别掺入NruI和NcoI和BglII和XhoI限制性位点。在第三个步骤中，从两个DNA片段制备含有插入在EMC 5' -UTR元件和T7转录终止子之间的荧光素酶基因的编码区的质粒plucPP：1) 利用NcoI和SacI消化质粒pVL-EMC/T7制备的3.8kB的载体DNA，和2) 利用NcoI和XhoI消化质粒pVL-luc制备的含有完整的荧光素酶编码区的1.7kB的DNA片段。

质粒pLG-lucPP是通过两个步骤制备的。在第一个步骤中，通过利用含有下面的序列(5'-3')的低聚核苷酸10的位点特异性诱变将噬菌体T7启动子插入在质粒pLG的上游LHIV-LTR U5区制备质粒pLG-T7：1) 与U5区内的HXB2的位置552到569互补的一个18个核苷酸的序列，2) 与T7启动子互补的一个20个核苷酸的序列，和3)与U5区内的HXB2的位置534到551互补的一个20个核苷酸的序列。在第二个步骤中，从两个DNA片段制备质粒pLG-lucPP：1) 利用NotI消化质粒pLG-T7并利用碱性磷酸酶处理得到的载体制备的11.2kB的载体DNA，和2) 含有利用NotI消化质粒plucPP

制备的荧光素酶基因盒的2.5kB的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定了含有以相反于病毒LTR的转录方向插入在病毒载体中的指示基因盒的对应于pLG-lucPP的克隆。

质粒pCG-lucPP是通过两个步骤制备的。在第一个步骤中,通过利用低聚核苷酸10的位点特异性诱变将噬菌体T7启动子插入在质粒pCG的上游HIV-LTR U5区制备质粒pCG-T7。在第二个步骤中用两个DNA片段制备质粒pCG-lucPP: 1) 通过利用NotI消化质粒pCG-T7和利用碱性磷酸酶处理得到的载体制备11.7kB的载体DNA, 和2) 含有通过利用NotI消化质粒plucPP制备的荧光素酶指示基因盒的2.5kB的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定了含有以相反于CMV IE增强子-启动子和病毒LTR的转录方向插入在病毒载体中的指示基因盒的对应于pCG-lucPP的克隆。

亚基因组指示基因病毒载体—置换启动子

指示基因病毒载体pLS-lucPP和pCS-lucPP和起源于它们的抗性测试载体在5' 到3' 方向含有下面的元件(图2B): 1)HIV-LTR U3区(pLS-lucPP)或CMV IE 增强子-启动子(pCS-lucPP), 2) HIV-LTR R区, 3) 含有与相反于LTR的转录方向插入的T7启动子的HIV-LTR U5区, 4) HIV gag-pol基因的编码区, 5) 指示基因盒, 6) 来自含有病毒包装序列的HIVenv基因的RRE元件, 和7) 3' HIV-LTR。pLS-lucPP和pCS-lucPP的指示基因盒与pLG-lucPP和pCG-lucPP的相同。对后一载体, pLS-lucPP和pCS-lucPP的指示基因不能功能性地转录, 直到逆转录和链转换导致T7启动子从5' LTR拷贝成3' LTR(图2C)。

质粒pLS-lucPP是通过两个步骤制备的。在第一个步骤中,从两个DNA片段制备含有插入在质粒pLS的上游HIV-LTR U5区的噬菌体T7启动子的质粒pLS-T7:1) 利用SmaI和ClaI消化质粒pLS制备9.1kB的载体DNA, 和2)通过利用SmaI和ClaI消化质粒pLG-T7制备的含有具有插入的T7启动子的R5区的HIV-LTR的0.8kB的DNA片段。在第二步中,从两个DNA片段制备质粒pLS-lucPP: 1) 利用NotI消化质粒pLS-T7和利用碱性磷酸酶处理得到的载体制备的9.9kB的载体DNA, 和2) 含有通过利用NotI消化质粒plucPP制备的荧光素酶指示基因盒的2.5kB的DNA片段。通过限制性图谱鉴定含有以相反于病毒LTR的转录方向插入在病毒载体中的指示基因

盒的对应于pLS-lucPP的克隆。

从两个DNA片段制备质粒pCS-lucPP: 1) 通过利用SmaI和ClaI消化质粒pLS-lucPP制备的11.6kB的载体DNA, 和2) 通过用SmaI和ClaI消化质粒pCG-T7制备的含有CMV IE启动子的1.3KB的DNA片段, 该CMV IE启动子与具有插入的T7启动子的R5区相融合。

抗性测试载体—构建方法

通过1) 在pol基因中或附近导入独特的限制性位点, 称为病人序列接受位点, 对指示基因病毒载体pLG-lucPP, pCG-lucPP, pLS-lucPP和pCS-lucPP进行修饰, 2) 通过利用从感染病人的血清或细胞中存在的病毒RNA或DNA制备的互补的DNA(cDNA)的PCR扩增对应于HIV蛋白酶和逆转录酶编码区的病人起源的区段, 和3) 在指示基因病毒载体的病人序列接受位点精确地插入扩增的序列(图2B), 制备抗性测试载体。将两套病人序列接受位点通过位点特异性诱变导入四个指示基因病毒载体的每一个。第一套病人序列接受位点由HpaI位点和SalI位点组成, 它们限定含有整个蛋白酶编码区和大部分逆转录酶编码区的间隔, 产生质粒pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS和pCS-lucPP-HS。第二套病人序列接受位点由PvuI位点和BamHI位点组成, 它们限定同样的间隔, 分别产生质粒pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB和pCS-lucPP-PB。在一些抗性测试中一起使用限定同样的限制性位点间隔的同源的一对抗性测试载体(例如, 起源于pLG-lucPP-HS和pLG-lucPP-PB的那些), 以便提高这些含有相同于给定病人序列接受位点的内部限制性位点的病人起源的区段的呈现, 并因而不在单独的抗性测试载体中呈现。

通过利用质粒pLG-lucPP作为模板的位点特异性诱变的三个连续的步骤制备质粒pLG-lucPP-HS。前两个步骤是为了导入两个新限制性位点, 其中一个(HpaI)是独特的, 其中另一个是已经在每个指示基因病毒载体中出现过一次。第三步是为了在各个载体中缺失预存在的SalI位点, 以使导入的SalI成为唯一的位点。在步骤1中, 利用含有下面的序列(5'到3')的低聚核苷酸11, 将HpaI位点导入紧接HIV蛋白酶的成熟的编码区的上游的2243位置: 1) 与HXB2的位置2249到2266互补的一个18个核苷酸的序列, 2) 使在这一位置的gag蛋白序列不改变并在pol前体序列中导入保守的氨

基酸变化(Phe到Val)的一个6个核苷酸的HpaI位点,和3) 与HXB2的 2225到2242位置互补的一个18个核苷酸的序列。在步骤2中,利用含有下面的序列(5' 到3')的低聚核苷酸12在HIV逆转录酶的羧基末端编码区在4190位置导入SalI位点: 1) 与HXB2的位置4196到4213互补的一个18个核苷酸的序列, 2) 使逆转录酶蛋白序列在这一位置不改变的一个6个核苷酸的SalI位点, 和3) 与HXB2的4172到4189位置互补的一个18个核苷酸的序列。在第三步中,利用含有下面序列(5' 到3')的低聚核苷酸13使HXB2的vpr编码区内位置5785的预存在的SalI位点缺失: 1) 与HXB2的5791到5808位置互补的一个18个核苷酸的序列, 2) 切除了SalI位点但使vpr蛋白序列在这一位点不改变的一个6个核苷酸的序列GCCGAC, 3) 与HXB2的位置5767到5784互补的一个18个核苷酸的序列。

如下所述,质粒pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS和pCS-lucPP-HS起源于pLG-lucPP-HS。从两个DNA片段制备质粒pCG-lucPP-HS: 1) 利用SmaI和ClaI消化质粒pLG-lucPP-HS制备12.9kb的载体DNA, 2) 利用SmaI和ClaI消化质粒pCG-lucPP制备的1.3kb的DNA片段。从两个DNA片段制备质粒pLS-lucPP-HS: 1) 利用NdeI和XhoI消化质粒pLG-lucPP-HS制备的11.1kb的载体DNA, 和2) 利用NdeI和XhoI消化质粒pLS-lucPP制备的1.3kb的DNA片段。从两个DNA片段制备质粒pCS-lucPP-HS: 1) 利用SmaI和ClaI消化质粒pLS-lucPP-HS制备的11.6kb的载体DNA, 和2) 利用SmaI和ClaI消化质粒pCS-lucPP制备的1.3kb的DNA片段。

通过利用质粒pLG-lucPP作为模板的位点特异性诱变的四个连续的步骤制备质粒pLG-lucPP-PB。前两个步骤的目的是为了导入两个新的限制性位点(PvuI和BamHI), 它们中的每一个已经在每个指示基因病毒载体中出现过一次。第三和第四个步骤是为了在各个载体中缺失预存在的PvuI和BamI位点以使新导入的位点成为唯一的。在步骤1中,利用含有下面序列(5' 到3')的低聚核苷酸14, 将PvuI位点导入紧接HIV蛋白酶的成熟编码区的上游的2221位置: 1) 与HXB2的位置2227到2244互补的一个18个核苷酸的序列, 2) 使gag和pol前体蛋白质序列在这一位置不改变的一个6个核苷酸的PvuI位点, 和3) 与HXB2的位置2203到2220互补的一个18个核苷酸的序列。在步骤2中,利用含有下面序列(5' 到3')的低聚核苷酸15在

HIV逆转录酶的羧基末端编码区的第4212位置导入BamHI位点：1) 与HXB2的位置4218到4235位置互补的一个18核苷酸序列，2) 使逆转录酶蛋白序列在这一位置不改变的一个6个核苷酸的BamHI位点，和3) 与HXB2的4194到4211位置互补的一个18核苷酸序列。在步骤3中，利用含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸16使b-乳糖酶编码区内预存在的位置2413的PvuI位点缺失(坐标参照GenBank,登记号X52331)：1) 与pBluescript KS(+)的位置2395到2412互补的一个18核苷酸的序列，2) 切除了PvuI位点但使b-乳糖酶蛋白序列在这一位点不改变的一个6核苷酸的序列CAATCG，和3) 与pBluescript KS(+)的2419到2436位置互补的一个18核苷酸的序列。在步骤4中，利用含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸17使HXB2的HIV rev编码区内位置8474预存在的BamHI位点缺失：1) 与HXB2的位置8480到8497互补的一个18核苷酸的序列，2) 切除了BamHI但使HIV rev蛋白序列在这一位置不改变的一个6个核苷酸的序列GGATTC，和3) 与HXB2的位置8456到8473互补的一个18个核苷酸的序列。

如下所述，质粒pCG-lucPP-PB，pLS-lucPP-PB和pCS-lucPP-PB起源于pLG-lucPP-PB。从两个DNA片段制备质粒pCG-lucPP-PB：1) 利用SmaI和ClaI消化质粒pLG-lucPP-PB制备12.9kB的载体DNA，和2) 利用SmaI和ClaI消化质粒pCG-lucPP制备的1.3kB的DNA片段。从三个DNA片段制备质粒pLS-lucPP-PB：1) 利用NdeI和XhoI消化质粒pLG-lucPP-PB制备的11.1kB的载体DNA，2) 利用NdeI和HindIII消化质粒pLS-lucPP制备的0.5kB的DNA片段，和3) 利用HindIII和XhoI消化质粒pLG-lucPP-PB制备的0.8kB的DNA片段。从两个DNA片段制备质粒pCS-lucPP-PB：1) 利用SmaI和ClaI消化质粒pLS-lucPP-PB制备的11.6kB的载体DNA，和2) 利用SmaI和ClaI消化质粒pCS-lucPP制备的1.3kB的DNA片段。

利用从HIV感染的病人的血清中分离的病毒RNA，通过逆转录聚合酶链式反应方法扩增对应于HIV蛋白酶和逆转录酶编码区的病人起源的区段。如本文所述利用两个RT-PCR方法。在第一个方法(Piatak等(1993)科学259, 1749-1754)中，将分离的酶，莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶(BRL, Bethesda, MD)和Taq DNA聚合酶(Roche 分子分析, Ontario, 加拿大)

分别用于cDNA的制备和PCR反应。在第二个方法(Mulder等(1994)临床微生物学杂志32, 292—300)中, 将单个的酶, *Thermus thermophilus*(Tth)DNA聚合酶用于进行cDNA合成和PCR反应。将两个由低聚核苷酸18和19, 和低聚核苷酸20和21组成的引物对用于能够分别精确地插入在含有HpaI/SalI和PvuI/BamHI病人受体位点的指示基因病毒载体中的病人起源的区段的扩增。

从下面的两个DNA制剂构建使用了第一个引物对的第一套四个抗性测试载体: 1) 从利用HpaI和SalI消化的质粒pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS或pCS-lucPP-HS制备的载体DNA, 和2) 通过利用从HIV感染的个体的血清中分离的病毒RNA作为模板, 和低聚核苷酸18和19作为引物的RT—PCR, 并利用HpaI和Sal I消化而制备的2.0kB扩增的DNA产物。从下面的两个DNA制剂构建第二套四个使用第二个引物对的抗性测试载体: 1)从利用PvuI和BamHI消化的质粒pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB或pCS-lucPP-PB制备的载体DNA, 和2) 通过利用从HIV感染的个体的血清中分离的病毒RNA作为模板, 和低聚核苷酸18和19作为引物进行RT—PCR, 接着用PvuI和BamHI消化而制备的2.0kB的扩增的DNA产物。低聚核苷酸18, 19和20分别含有HpaI, SalI, PvuI和BamHI限制性位点。

为了保证对应于8个得到的抗性测试载体中的每一个的质粒DNA含有存在于给定病人血清中的HIV病毒准种类的代表性样品, 至少将一百个在给定的抗性测试载体的构建中得到的独立的大肠杆菌转化体用于质粒DNA的制备。

为了提高病人起源的区段的呈现, 利用部分简并的PCR引物库, 称为低聚核苷酸22, 23, 24和25, 它们分别基于低聚核苷酸序列18, 19, 20和21, 制备第三和第四套抗性测试载体。根据Los Alamos HIV序列数据库(Myers等(1993)人逆病毒和AIDS1993, Los Alamos 国家实验室, Los Alamos,NM)中分类的不同病人分离物中展示的序列变化, 在亲本引物的3'末端的18个核苷酸位置的每一个中掺入超过一个核苷酸碱基(G,A,T或C)的方式合成各个引物库。利用从质粒pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS或pCS-lucPP-HS制备的载体并利用低聚核苷酸22和23制备的扩增的病人序列构建第三套四个抗性测试载体; 利用从质粒pLG-

lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB或pCS-lucPP-PB制备的载体并利用低聚核苷酸24和25制备的扩增的病人序列构建第四套四个抗性测试载体。低聚核苷酸22, 23, 24和25分别掺入HpaI, Sall, PvuI和BamHI限制性位点。

宿主细胞—制备

包装宿主细胞和抗性测试载体宿主细胞

利用抗性测试载体从表达病毒包装蛋白的包装宿主细胞制备抗性测试载体宿主细胞。可以通过抗性测试载体本身、包装表达载体或两者内含有的病毒基因的表达提供包装蛋白。可使用包装宿主细胞的短暂或稳定转染生产包装蛋白。编码两亲性的MLV env基因产物的包装表达载体能够使抗性测试载体宿主细胞中产生能够有效地感染人靶细胞的抗性测试载体病毒颗粒。起源于质粒pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS和pCG-lucPP-PB的抗性测试载体编码除了env的所有HIV基因, 并用于生产抗性测试载体宿主细胞。将编码两亲性MLV 4070A env 基因产物的pVL-env 4070A包装表达载体与前面的基于基因组的抗性测试载体一起使用以便能够在抗性测试载体宿主细胞中产生抗性测试载体病毒颗粒。起源于质粒pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS和pCS-lucPP-PB的抗性测试载体只编码HIV gag-pol基因产物, 并用于制备抗性测试载体宿主细胞。将提供env的pVL-env4070A, 和pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'包装表达载体两者之一, 它们中的每一个提供HIV vif, vpr, tat, rev, vpu和nef基因, 与前面的基于亚基因组的抗性测试载体一起使用, 使抗性测试载体宿主细胞中能够产生抗性测试载体病毒颗粒。

通过分别从基因组病毒载体pLG和pCG中除去大部分gag-pol编码区产生质粒pLTR-HIV3' 和pCMV-HIV3'。通过利用质粒pLG作为模板与含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸26的位点特异性诱变制备质粒pLTR-HIV3'(图3B): 1)与pol基因内的HXB2的位置4712到4729互补的18核苷酸序列, 2) 与gag基因内的HXB2位置925到942互补的18核苷酸序列。从两个DNA片段制备质粒pCMV-HIV3'(图3C): 1) 通过利用SmaI和ClaI消化质粒pLTR-HIV3'制备的6.8KB的载体片段, 和2) 通过利用SmaI和ClaI消化质粒pCG制备的1.3kB的DNA片段。

从两个DNA片段构建质粒pVL-Aenv4070A(图3D): 1) 通过利用NruI

和BglII消化pVL-2哺乳动物表达载体制备的4.3kB的载体片段,和2) 含有通过利用质粒pCRIPamgag-2(Danos 和Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 6460)作为模板,和低聚核苷酸27和28作为引物,的PCR,接着通过利用NruI和BglII消化制备的含有MLV4070A env基因产物(核苷酸37到2001, 坐标由GenBank确定,登记号M33469, Ott等(1990)病毒学杂志64, 757-766)的完全的编码区的2.0Kb的DNA片段。低聚核苷酸27掺入了独特的NruI位点, 该位点后跟着用于哺乳动物翻译起始的共有序列(例如, Kozak(1991)生物化学杂志266, 19867-19870), 而低聚核苷酸28掺入了独特的BglII位点。

哺乳动物表达载体pVL-2在5' 到3' 方向含有下面的元件: CMV IE 启动子/增强子, CMV IE 第一个外显子拼接供体, 人(1球蛋白第二个外显子拼接受体, 克隆位点多接头, SV40 T抗原基因的多聚腺苷酸化位点, 和复制的SV40原点。质粒pVL-2是以如下所述的四个步骤构建的。在第一个步骤中,通过利用含有BssHII, NotI, SmaI, HindIII, SphI, SmaI, EcoRI, NruI, ApaI, BglII, NheI, NotI, XhoI和BssHII限制性位点的克隆位点多接头代替质粒pBluescript II KS(+)的克隆位点多接头和噬菌体T7和T3启动子制备质粒pVL。从两个DNA片段构建pVL: 1) 通过用BssHII切割质粒pBluescript II KS(+)并用碱性磷酸酶处理得到的载体制备的3.0KB的载体片段, 和2) 通过将交叠的低聚核苷酸29和30退火, 利用Klenow DNA聚合酶延伸和利用BssHII消化制备的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定含有相对于pBluescript II KS(+)质粒图谱(GenBank登记号X52327)的5' 到3' 顺序的HindIII到XhoI位点的质粒。在第二个步骤中,通过插入CMV IE 增强子-启动子和第一个外显子拼接供体, 和人(1球蛋白第二个外显子拼接受体从质粒pVL制备该中间质粒。从三个DNA片段制备该中间质粒: 1) 通过利用HindIII和EcoRI消化质粒pVL制备3.0kB的载体片段, 2) 含有CMV IE增强子-启动子和第一个外显子拼接供体(核苷酸-674到-19, 坐标参照Bashart等(1985)细胞41, 521-530)的0.9kB的DNA片段, 它是通过利用含有来自HCMV菌株AD169(Boshart等, Ibid)的Pst I m-片段的质粒pCM5027作为模板和低聚核苷酸31和32作为引物的PCR, 接着利用HindIII和SphI消化而制备的, 和3) 含有通过利用质粒ppSVaHP(Treisman

等(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 7428-7432)作为模板, 和低聚核苷酸33和34作为引物的PCR, 接着利用SphI和EcoRI消化制备的人球蛋白(1第二个外显子拼接受体(核苷酸6808到6916, 坐标参照GenBank, 登记号J00153)的0.1kB的DNA片段。低聚核苷酸31, 32, 33, 和34分别在它们的末端掺入HindIII, SphI, SphI和EcoRI限制性位点。在第三个步骤中, 通过在这一中间质粒中插入SV40 T抗原低聚腺苷酸化位点制备质粒pVL。从两个DNA片段制备质粒pVL-1: 1) 通过利用BglII和NheI切割中间质粒制备的4.0kB的载体片段, 和2) 通过利用质粒pSV2(Southern和Berg(1982)J.Mol.Appl.Gen.1, 327-341)作为模板, 和低聚核苷酸35和36作为引物的PCR, 接着用BglII和NheI消化制备的含有SV40 T抗原多聚腺苷酸化位点(SV40的核苷酸2770到2533, 坐标参照Reddy等, (1978)科学200, 494-502)的0.2kB的DNA片段。低聚核苷酸35和36分别在它们的末端掺入独特的BglII和NheI位点。在第四个步骤中, 通过在质粒pVL-1中插入SV40复制起点制备质粒pVL-2。从两个DNA片段制备质粒pVL-2: 1) 通过利用NheI和XhoI消化质粒pVL-1制备的4.2kB的载体片段, 和2) 通过利用质粒pSV2作为模板和低聚核苷酸37和38作为引物的PCR, 接着利用NheI和SalI消化制备的含有SV40复制起点(SV40的核苷酸5725到5578, 出处同上)的0.2kBd DNA片段。低聚核苷酸37和38各自的末端插入了NheI和SalI限制性位点。

靶宿主细胞

从人胚胎肾细胞系293和Jurkat白血病T细胞系(美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD)制备用于利用起源于质粒pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS, 或pCS-lucPP-PB的抗性测试载体进行的抗性测试的靶宿主细胞。利用编码变异的噬菌体T7 RNA聚合酶的表达载体稳定地转染各个细胞系。这一变异体含有与T7 RNA聚合酶的N-末端同框融合的SV40 T抗原核定位信号(NLS), 从而允许它被运输进入细胞核和在细胞核中起作用 (Lieber等(1989) 核酸研究17, 8485-8493)。在靶细胞感染后, 通过逆转录酶使T7启动子相对于指示基因编码区重新定位, 将抗性测试载体中的非功能性的指示基因转换进功能性的指示基因。在通过HIV整合酶将修复的指示基因

整合进靶细胞染色体后，靶细胞表达的核T7 RNA聚合酶能功能性地转录指示基因。

将质粒pVL-T7RNAP-NLS在人和其它哺乳动物细胞和细胞系中用于指导与NLS连接的变异的T7 RNA聚合酶的表达。从三个DNA片段制备pVL-T7RNAP-NLS: 1) 利用EcoRI和BglII消化质粒pVL-2制备的4.3kB的载体片段, 2) 利用质粒pT7-G1(Deng等(1994)基因143, 245—249)作为模板以及低聚核苷酸39和40作为引物的PCR, 接着用NruI和BglII消化制备的编码T7 RNA聚合酶氨基酸残基34到883(核苷酸267到2817, 坐标参照GenBank, 登记号M38308, Grachev和Pletnev(1984)Bioorg.Khim.10,824-843)的2.6KB的DNA片段, 和3) 通过将交叠的低聚核苷酸41和42退火, 利用Klenow DNA聚合酶延伸和利用EcoRI和NruI消化制备的编码开始三个SV40 T抗原的氨基酸以后接的含有NLS(Lieber等, 出处同上)的SV40 大T抗原的氨基酸118到133的合成DNA片段。低聚核苷酸39, 40, 41, 42分别掺入NruI, BglII, EcoRI和NruI限制性位点。将质粒pVL-Neo用作通过共转染建立的人和其它哺乳动物细胞和细胞系的稳定转染体的可选择标记。pVL指导新霉素磷酸转移酶的表达并赋予抗生素G418抗性。从两个DNA片段制备质粒pVL-Neo: 1) 利用EcoRI和BglII消化质粒pVL-2制备4.3kB的载体片段, 和2) 利用质粒pSV2neo(Southern和Berg(1982)J.Mol.Appl.Gen.1,327-341)作为模板, 和低聚核苷酸43和44作为引物的PCR, 接着利用EcoRI和BglII消化而制备的含有完全的Neo 编码区(Tn5转座子序列的核苷酸1551至2345, 坐标参照GenBank, 登记号U00004, Beck等(1982) 基因19, 327—336)的0.8kB的DNA片段。低聚核苷酸43掺入了后接用于哺乳动物翻译起始的共有序列的独特的EcoRI位点, 而低聚核苷酸44掺入独特的BglII位点。

通过磷酸钙共沉淀方法将质粒pVL-T7RNAP通过稳定的转染导入293细胞(Wigler等(1979)细胞16, 777), 通过电穿孔进入Jurkat细胞(Irving等(1991)细胞64, 891—901)。将293细胞培养在补充了1克/升的蔗糖, 10%供体小牛血清(组织培养生物学试剂公司)的DMEM培养基(JRH生物科学公司)中。将Jurkat细胞培养在补充了10%小牛胎盘血清(Irvin科学), 谷氨酰胺, 青霉素和链霉素的RPMI1640培养基中。用于293细胞和Jurkat细胞

转染的混合物各以重量比例10:1到20:1含有10毫克pVL-T7RNAP和选择标记pVL-Neo的混合物。在转染后24到48小时,在含有抗生素G418(GIBCO,Grand 岛, N.Y.)的同样的培养基上再铺板细胞。在两个星期后,直接从选择平板上挑出抗G418的独立的293细胞克隆并扩展用于分析。通过药物筛选2到3星期后,通过限制稀释得到抗G418的独立的Jurkat细胞系并扩展用于分析。

通过利用Northern印迹杂交方法(Ausubel等(1987)当代分子生物学方法, Wiley-Interscience)确定细胞合成的稳定状态的特异于T7 RNA聚合酶的mRNA的水平,筛查抗G418的293和Jurkat的细胞克隆的T7 RNA聚合酶的表达水平。然后通过确定在利用质粒pEMCLucbgAn(Deng等(1991)基因109, 193—201)的短暂转染中支持特异于T7 RNA聚合酶的转录的能力鉴定最适水平表达T7 RNA聚合酶的293和Jurkat细胞克隆,其中荧光素酶的转录是由T7启动子引导的。选择支持最高水平的荧光素酶基因表达的293和Jurkat克隆用于进一步使用;它们被分别称为293/T7RNAP-NLS细胞和Jurkat/T7 RNAP-NLS细胞。

药物敏感性和抗性测试

利用两个类型的宿主细胞或一个类型的宿主细胞,利用基于指示基因病毒载体pLG-lucPP-HS,pLG-lucPP-PB,pCG-lucPP-HS,pCG-lucPP-PB,pLS-lucPP-HS,pLS-lucPP-PB,pCS-lucPP-HS,或pCS-lucPP-PB的抗性测试载体进行抗性测试。在第一类型的抗性测试中,通过利用抗性测试载体和包装表达载体转染包装宿主细胞制备的第一个宿主细胞(抗性测试载体宿主细胞)生产抗性测试载体病毒颗粒。然后将抗性测试载体病毒颗粒用于感染第二个宿主细胞(靶宿主细胞),其中测量了指示基因的表达。在第二类型的抗性测试中,单个宿主细胞类型(抗性测试载体宿主细胞)的作用有两个:给定培养物中的一些包装宿主细胞被转染并产生抗性测试载体病毒颗粒,以及在同一个培养物中的一些宿主细胞是这样产生的抗性测试载体颗粒感染的靶。使用含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体使使用单个宿主细胞类型的抗性测试成为可能:当在感染许可的宿主细胞之后这样的指示基因被有效地表达,它们在转染同样的宿主细胞类型之后不被有效地表达,从而,提供了一个测量待测的抗病毒试剂的效果的机会。

出于同样的原因,通过共培养两种细胞类型可以进行利用两种细胞类型的抗性测试,作为用第一种细胞类型的上清液中得到的病毒颗粒感染第二种细胞类型的一种可供选择的方法。

敏感性和抗性测试一两细胞

利用293细胞系,tsa54或tsa201细胞系(Heinzel等(1988)病毒学杂志62,3738),或BOSC 23细胞系(Pear等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.90,8392)作为包装宿主细胞,通过抗性测试载体和适当的包装表达载体的共转染制备抗性测试载体宿主细胞。将包装表达载体pVL-env4070A与通过在pLG-lucPP-HS,pCG-lucPP-HS,pLG-lucPP-PB,和pCG-lucPP-PB中插入病人起源的区段而构建的抗性测试载体共转染,而将包装表达载体pVL-env4070A和, pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'二者之一,与通过在pLS-lucPP-HS,pCS-lucPP-HS,pLS-lucPP-PB和pCS-lucPP-PB中插入病人起源的区段而制备的抗性测试载体共转染。将Jurkat/T7RNAP-NLS用作靶宿主细胞。

使包装宿主细胞生长在DMEM培养基中,1克/升蔗糖,10%供体小牛血清中,每三天以1:10的稀释度传代。以 1×10^6 个细胞每10厘米的平板,在转染之前48小时将细胞铺板。利用均为5到10毫克抗性测试载体和适当的包装表达载体通过磷酸钙沉淀方法转染细胞来生产抗性测试载体宿主细胞。将各个抗病毒试剂,包括逆转录酶抑制剂AZT, ddI,d4T和3TC,和蛋白酶抑制剂saquinavir,ritonavir和indinavir以及它们的联合在它们转染的时候以适当范围的浓度加入转染细胞的各个平板。在转染后24到48小时,利用抗性测试载体宿主细胞或利用从抗性测试载体宿主细胞的过滤上清液得到的病毒颗粒,通过共转染感染靶宿主细胞。将每个抗病毒试剂,或它们的联合,在感染的时候加入靶宿主细胞以获得与转染过程中相同的给定试剂或试剂的最后浓度。

对于通过共培养感染,从24到48小时前的转染而制备的抗性测试载体宿主细胞的10厘米平板中除去培养基,并在平板中加入含有适当浓度的抗病毒试剂的Jurkat细胞培养基中的 0.5 至 1.0×10^6 Jurkat/T7RNAP-NLS靶细胞。将靶细胞与抗性测试载体宿主细胞共培养24小时,然后除去,并加入新鲜制备的存在于含有适当浓度的抗病毒试剂的Jurkat细胞培养基中的抗性测试载体宿主细胞,进行第二次共培养。24小时后,从第二次共培养

中收获靶宿主细胞，离心收集，用冰冷的磷酸缓冲液(PBS)洗三次，并测试荧光素酶活性。对于利用过滤的上清液的感染，从24到48小时前的转染而制备的抗性测试载体宿主细胞的10厘米的平板中除去培养基。通过0.45毫米的滤纸在收获时过滤培养基，在-70℃冰冻，在转导前融解。在5毫升Jurkat细胞培养基和过滤的上清液的等份混合物中加入Jurkat/T7RNAP-NLS细胞(0.5 到 1.0×10^6)，制成8毫克/毫升的polybrene (1, 5-二甲基-1, 5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物)(Sigma, St. Louis, MI)和适当浓度的抗病毒试剂。转染后24到48小时，通过离心收集靶宿主细胞，用冷冻的磷酸缓冲盐洗涤三次，并测试指示基因的表达。以所述方法(Ausubel等(1987)当前分子生物学方法, Wiley-Interscience)测试通过共培养或利用过滤的病毒上清液感染的靶宿主细胞的萤火虫荧光素酶活性。与在缺乏抗病毒试剂时进行的对照相比，在存在给定的抗病毒试剂时观察到的利用给定的抗性测试载体病毒颗粒制备物感染的靶宿主细胞的荧光素酶活性的减弱通常与抗病毒试剂的浓度对数值以S形曲线相关。将这一抑制曲线用于计算该试剂或试剂的联合对存在于抗性测试载体中的病人起源的区段编码的病毒靶产物的表观抑制浓度(IC)。

敏感性和抗性测试—单细胞

利用293/T7RNAP-NLS细胞或Jurkat/T7RNAP-NLS细胞作为包装宿主细胞，通过抗性测试载体和适当的包装表达载体共转染制备抗性测试载体宿主细胞。将包装表达载体pVL-env4070A通过在pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB和pCG-lucPP-PB中插入病人起源的区段构建的抗性测试载体共转染，而将包装表达载体pVL-env4070A和, pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'二者之一，与通过在pLS-lucPP-HS, pCS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB和pCS-lucPP-PB中插入病人起源的区段而制备的抗性测试载体共转染。

利用抗性测试载体和适当的包装表达载体各5到10毫克转染细胞，以产生抗性测试载体宿主细胞。通过磷酸钙共沉淀方法转染293/T7RNAP-NLS细胞，通过电穿孔转染Jurkat/T7RNAP-NLS细胞。在转染的时候，以适当范围的浓度在转染细胞的个别平板中加入各个抗病毒试剂或它们的联合。在转染后24小时到72小时，通过离心收集细胞，用冰冷的磷酸缓冲盐洗涤

三次，并如所述方法测试萤火虫荧光素酶活性。由于培养物中的转染细胞没有有效地表达指示基因，培养物中的转染细胞，以及培养物中的超感染细胞，可以充当指示基因表达的靶宿主细胞。与缺乏抗病毒试剂时进行的对照相比，在存在给定的抗病毒试剂时观察到的转染细胞的荧光素酶活性的减弱，通常与抗病毒试剂的浓度的对数值以S形曲线相关。将这一抑制曲线用于计算试剂或试剂的联合对存在于抗性测试载体中的病人起源的区段编码的病毒靶产物的表观抑制浓度(IC)。

实施例2

利用含有病人起源的区段和具有置换编码区的非功能性
指示基因的抗性测试载体的HIV药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体—构建方法

具有病人序列的受体位点的基因组指示基因病毒载体pLG-lucPP-HS, pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-HS和pCG-lucPC-PB和起源于它们的抗性测试载体各在5' 到3' 方向含有下面的元件(图4B): 1) HIV—LTR U3区(pLG-lucPP-HS和pLG-lucPC-PB)或第一CMV IE增强子—启动子(pCG-lucPC-HS和pCG-lucPC-PB), 2) HIV—LTR R和U5区, 3) HIVgag-pol, vif, fpr, tat, rev, vpu, 缺失的env, 和nef基因的编码区, 4) 插入在缺失的env 基因中的含有荧光素酶基因的5' 编码区的第一指示基因盒, 5) 插入在缺失的3' HIV—LTR U3区的含有荧光素酶基因的3' 编码区的第二指示基因盒, 和6) 3' HIV—LTR R和U5区。pLG-lucPC-HS和pCG-lucPC-HS分别在HXB2的核苷酸2243和4190含有独特的HpaI和SalI病人序列接受位点; pLG-lucPC-PB和pCG-lucPC-PB分别在HXB2的核苷酸2221和4212含有独特的PvuI和BamHI病人序列位点, 详情见实施例1。第一个指示基因盒含有: 1) 第二CMV增强子—启动子, 2) 荧光素酶基因的5' 编码区(氨基酸1到446), 和3) CMV IE拼接供体。第二个指示基因盒含有: 1) 一球蛋白基因第二个外显子拼接受体, 2) 荧光素酶基因的3' 编码区(氨基酸447到550), 和3) SV40多聚腺苷酸化位点。荧光素酶的5' 和3' 编码区的转录方向相互相同, 并与第一CMV增强子—启动子和病毒LTR的

相反。但是，因为在抗性测试载体中，荧光素酶5'和3'编码区是置换的(即，5'编码区在3'编码区的下游)，没有可以拼接产生功能性荧光素酶编码区的mRNA的转录。在逆转录和链转移之后，荧光素酶被从3'LTR拷贝成5'LTR，从而允许可以拼接产生功能性荧光素酶编码区的mRNA的转录(图4C)。

具有病人序列接受位点的亚基因组指示基因病毒载体pLS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS和pCS-lucPC-PB，以及起源于它们的抗性测试载体各在5'到3'方向含有下面的元件(图4B)：1) HIV-LTR U3区(pLS-lucPC-HS和pLS-lucPC-PB)或第一个CMV IE增强子-启动子(pCS-lucPC-HS和pCS-lucPC-PB)，2) HIV-LTR R和U5区，3) HIVgag-pol基因的编码区，4) 含有荧光素酶基因5'编码区的第一指示基因盒，5) 来自含有病毒包装序列的HIVenv基因的RRE元件，6) 含有插入在缺失的3'HIV-LTR U3区的荧光素酶基因的3'编码区的第二指示基因盒，和7) 3'HIV-LTR R和U5区。pLS-lucPC-HS和pCS-lucPC-HS在HXB2的核苷酸2243和4190分别含有独特的HpaI和SalI病人序列接受位点；pLS-lucPC-PB和pCS-lucPC-PB分别在HXB2的核苷酸2221和4212含有独特的PvuI和BamHI病人序列接受位点。第一指示基因盒含有：1) 第二CMV增强子-启动子，2) 荧光素酶基因的5'编码区(氨基酸1到446)，和3) CMV IE 拼接供体。第二指示基因盒含有：1) (-球蛋白基因第二个外显子拼接受体，2) 荧光素酶基因的3'编码区(氨基酸447到550)，和3) SV40多聚腺苷酸化位点。因为荧光素酶5'和3'编码区在抗性测试载体中是置换的，必须发生逆转录和链转换方可产生非置换的荧光素酶5'和3'编码区，从而允许可以拼接产生功能性荧光素酶编码区的mRNA的转录(图4C)。

含有第一指示基因盒的质粒pVL-luc5'是通过三个步骤制备的。在开始两个步骤中，将包含在由CMV IE拼接供体和(-球蛋白基因拼接受体组成的pVL-1中的人工内含子进行位点特异性诱变以便产生限制性位点，在该位点消化之后产生5'和3'末端精确地对应于该人工内含子的开始和末端的DNA片段。在第一个步骤中，对pVL-1利用含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸45进行位点特异性诱变：1) 在CMV IE拼接供体前面的18

核苷酸序列, 2) 对应于SnaBI限制性位点的开始一半的TAC三核苷酸序列, 和3) 在人工内含子的开端的18核苷酸序列。因为该内含子的开始三个核苷酸的序列是GTA, 得到的质粒pVL-SnaBI含有一个SnaBI限制性位点, 消化后以DNA平端释放该内含子的5' 序列。在第二个步骤中, 对pVL-SnaBI利用含有下面序列(5'到3')的低聚核苷酸46进行位点特异性诱变: 1) 在人工内含子的末端的18核苷酸的序列, 2) 对应于PvuII限制性位点的后半的CTG三核苷酸序列, 和3) 在(一球蛋白拼接受体后的18核苷酸的序列。因为内含子的后三个核苷酸序列是CAG, 得到的质粒pVL-SnaBI/PvuII含有一个PvuII限制性位点, 消化后以DNA平端释放该内含子的3' 序列。在第三个步骤中, 从两个DNA片段制备质粒pVL-luc5': 1) 通过利用EcoRV和NheI消化质粒pVL-luc并用Klenow DNA聚合酶和碱性磷酸酶处理得到的载体而制备的5.3kB载体DNA, 和2) 通过利用SnaBI和SmaI消化质粒pVL-SnaBI/PvuII制备的含有CMV IE拼接供体的0.1kB DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定对应于含有以正确的方向插入在荧光素酶编码区的CMV IE的拼接供体的pVL-luc5'克隆。

含有第二指示基因盒的质粒pVL-luc3'是通过两个步骤制备的。在步骤一中, 从两个DNA片段制备质粒pBS-LTR, 其中pBS-HXB2的3' LTR被亚克隆: 1) 利用XhoI和XbaI消化质粒pBluescript II KS(+)而制备的3.0KB载体DNA, 和2) 利用XhoI和XbaI消化pBS-HXB2制备的含有3' LTR的0.8kB的DNA片段。在步骤二中, 从两个片段制备质粒pBS-LTR-luc3', 该质粒含有插入在缺失的3' LTR中的后接SV40多聚腺苷酸化位点的荧光素酶3' 编码区: 1) 利用EcoRV消化pBS-LTR并利用碱性磷酸酶处理得到的载体而制备的3.5kB的载体DNA, 和2) 利用EcoRV和NheI消化质粒pVL-luc,接着利用Klenow DNA聚合酶处理得到的片段而制备的含有3' 荧光素酶编码区和SV40多聚A位点的0.5kB的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定具有以正确方向(即相反于3' LTR的转录方向)插入的3' 荧光素酶编码区的克隆。在步骤三中, 从两个DNA片段制备质粒pVL-luc3': 1) 利用EcoRV消化质粒pBS-LTR-luc3', 接着利用碱性磷酸酶处理得到的载体而制备的4.0kB的载体DNA, 和2) 通过利用PvuII和SmaI消化质粒pVL-SnaBI/PvuII而制备的含有(一球蛋白基因第二个外显子拼接受体的0.1kB

的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定对应于含有以正确方向插入在荧光素酶编码区的(一球蛋白第二个外显子拼接受体的pVL-luc3'克隆。

通过相同的三步骤方法制备质粒pLG-lucPC-HS,pLG-lucPC-PB,pLS-lucPC-HS和pLS-lucPC-PB。在第一个步骤中,从两个DNA片段制备质粒pLG-lucDP-PB,pLG-lucDP-PB,pLS-lucDP-HS和pLS-lucDP-PB: 1)利用SmaI和ClaI分别消化质粒pLG-lucPP-HS,pLG-lucPP-PB,pLS-lucPP-HS,pLS-lucPP-PB制备的载体DNA,和2)利用SmaI和ClaI消化质粒pLG制备的0.8kB的DNA片段。在第二个步骤中,从两个DNA片段制备质粒pLG-luc5'-HS,pLG-luc5'-PB,pLS-luc5'-HS和pLS-luc5'-PB: 1)通过分别消化质粒pLG-lucDP-HS,pLG-lucDP-PB,pLS-lucDP-HS和pLS-lucDP-PB和利用碱性磷酸酶处理得到的载体而制备的载体DNA,和2)利用NotI消化pVL-luc5'制备的含有第一指示基因盒的2.5kB的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定含有以相反于病毒LTR的转录方向插入在病毒载体中的第一指示基因盒的克隆。在步骤三中,从两个DNA片段制备质粒pLG-lucPC-HS,pLG-lucPC-PB,pLS-lucPC-HS和pLS-lucPC-PB: 1)通过利用XhoI和XbaI分别消化质粒pLG-luc5'-HS,pLG-luc5'-PB,pLS-luc5'-HS和pLS-luc5'-PB制备的载体DNA,和2)通过利用XhoI和XbaI消化质粒pVL-luc3'制备的含有第二指示基因盒的1.1kB的DNA片段。

各从两个DNA片段制备质粒pCG-lucPC-HS,pCG-lucPC-PB,pCS-lucPC-HS和pCS-lucPC-PB: 1)利用SmaI和ClaI分别消化质粒pLG-lucPC-HS,pLG-lucPC-PB,pLS-lucPC-HS和pLS-lucPC-PB制备的载体DNA,和2)利用SmaI和ClaI消化质粒pCG制备的1.3kB的DNA片段。

抗性测试载体—构建方法

利用含有实施例1中所述的抗病毒靶基因的HIV基因组和亚基因组病毒载体设计了含有具有置换编码区的非功能性指示基因的抗性测试载体。

通过实施例1所述的方法,从质粒pLG-lucPC-HS,pLG-lucPC-PB,pCG-lucPC-HS,pCG-lucPC-PB,pLS-lucPC-HS,pLS-lucPC-PB,pCS-lucPC-HS和pCS-lucPC-PB(图4B)制备抗性测试载体。利用低聚核苷酸18和19和低聚核苷酸22和23制备的扩增的病人序列,从质粒pLG-lucPC-HS,pCG-lucPC-HS,pLS-lucPC-HS或pCS-lucPC-HS制备的载体构建抗性测试载体。利用低聚核

苷酸20和21, 和低聚核苷酸24和25制备的扩增的病人序列, 从质粒pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-PB, pLS-lucPC-PB或pCS-lucPC-PB制备的载体构建抗性测试载体。

药物敏感性和抗性测试

通过如下所述的实施例1所述的方法进行抗性测试。从质粒pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-HS和pCG-lucPC-PB制备的抗性测试载体缺乏功能性HIVenv基因, 并与包装表达载体pVL-env4070A一起使用。从质粒pLS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS和pCS-lucPC-PB制备的抗性测试载体仅编码HIVgag-pol基因产物, 并与pVL-env4070A和, pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'包装表达载体二者之一, 一起使用。在利用两宿主细胞类型进行的抗性测试中, 将293细胞系, tsa54细胞系, tsa201细胞系, 或BOSC23细胞系用作包装宿主细胞, 未修饰的Jurkat细胞用作靶细胞。因为包含在这些抗性测试载体内的具有置换编码区的非功能性指示基因在包装宿主细胞转染之后没有有效地表达, 通过利用与包装宿主细胞的共培养, 或通过利用来自包装宿主细胞上清液的病毒都可以进行靶宿主细胞的感染。基于同样的原因, 利用这些抗性测试载体的抗性测试可以利用单个宿主细胞类型。利用293, tsa54, tsa201, BOSC23或Jurkat细胞都可以进行利用单个宿主细胞类型的抗性测试。

实施例3

利用含有病人起源的区段和具有反向内含子的
非功能性指示基因的抗性测试载体的HIV

药物敏感性和抗性测试

利用含有实施例1所述的抗病毒靶基因的HIV基因组和亚基因组病毒载体设计含有具有反向内含子的非功能性指示基因的抗性测试载体。

指示基因病毒载体—反向内含子

具有病人序列接受位点的基因组指示基因病毒载体pLG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pCG-lucII-HS和pCG-lucII-PB, 和起源于它们的抗性测试载体, 各在5' 到3' 方向含有下面的元件(图5B): 1) HIV—LTR U3区

(pLG-lucII-HS和pLG-lucII-PB)或第一CMV IE增强子—启动子(pCG-lucII-HS和pCG-lucII-PB), 2) HIV—LTR R和U5区, 3) HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, 缺失的env, 和nef基因的编码区, 4) 插入在缺失的env基因中的指示基因盒, 和5) 3' HIV—LTR。pLG-lucII-HS和pCG-lucII-HS分别在HXB2的核苷酸2243和4190含有独特的HpaI和SalI病人序列接受位点; pLG-lucII-PB和pCG-lucII-PB分别在HXB2的核苷酸2221和4212含有独特的PvuI和BamHI病人序列接受位点(参见实施例1详细情况)。指示基因盒含有: 1) 第二CMV增强子—启动子, 2) 由颠倒的人工内含子中断的荧光素酶基因的编码区, 和3) SV40多聚腺苷酸化序列。指示基因盒的整个转录方向与第一CMV 增强子—启动子和病毒LTR的方向相反, 而人工内含子的方向与后面的元件相同。通过第二CMV增强子—启动子的指示基因的转录不导致功能性转录物的产生, 因为反向内含子不能在这一方向中拼接。但是通过5' 病毒LTR或第一CMV IE 增强子—启动子的指示基因的转录却导致通过RNA拼接除去反向内含子, 虽然指示基因仍然非功能性地表达, 因为得到的转录物具有反义方向。在这一转录物的逆转录和得到原病毒DNA整合之后, 通过第二CMV增强子—启动子可以功能性地转录指示基因, 因为反向内含子已被除去(图5C)。

具有病人序列接受位点的亚基因组指示基因病毒载体pLS-lucII-HS, pLS-lucII-PB, pCS-lucII-HS, 和pCS-lucII-PB和起源于它们的抗性测试载体, 各在5' 到3' 方向含有下面的元件(图5B): 1) HIV—LTR U3区(pLS-lucII-HS和pLS-lucII-PB)或第一CMV IE 增强子—启动子(pCS-lucII-HS和pCS-lucII-PB), 2) HIV—LTR R和U5区, 3) HIV gag-pol基因的编码区, 4) 指示基因盒, 5) 来自含有病毒包装序列的HIV env 基因的RRE元件, 和6) 3' HIV—LTR。pLS-lucII-HS和pCS-lucII-HS分别在HXB2的核苷酸2243和4190含有独特的HpaI和SalI病人序列接受位点; pLS-lucII-PB和pCS-lucII-PB分别在HXB2的核苷酸2221和4212含有独特的PvuI和BamHI病人序列接受位点。指示基因盒含有1)第二CMV 增强子—启动子, 2) 颠倒的人工内含子中断的荧光素酶基因的编码区, 和3) SV40多聚腺苷酸化序列。正如pLG-lucII和pCG-lucII基因组病毒载体的情况, pLS-lucII和pCS-lucII的指示基因不能功能性地转录直到反向内含子被

除去并且逆转录和原病毒整合发生之后(图5C)。

从两个DNA片段制备含有指示基因盒的质粒pVL-lucII, 在指示基因盒中, 来自pVL-SnaBI/PvuII的人工内含子以颠倒的方向插入在荧光素酶编码区: 1) 通过利用EcoRV消化pVL-luc和利用碱性磷酸酶处理得到的载体制备的5.8kB的载体片段, 和2) 精确地对应于通过利用SnaI和PvuII消化pVL-SnaBI/PvuII制备的人工内含子序列的0.2kB DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定对应于含有以颠倒的方向插入在荧光素酶编码区的人工内含子的pVL-lucII克隆。

从两个DNA片段制备质粒pLG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pLS-lucII-HS和pLS-lucII-PB: 1) 通过分别消化质粒pLG-lucDP-HS, pLG-lucDP-PB, pLS-lucDP-HS和pLS-lucDP-PB和利用碱性磷酸酶处理得到的载体制备的载体DNA, 和2) 通过利用NotI消化pVL-lucII制备的含有荧光素酶指示基因盒的3.2kB的DNA片段。通过限制性图谱分析鉴定含有以相反于病毒LTR的转录方向插入在病毒载体中的正确的plucII指示基因盒的克隆并用于抗性测试载体的制备。

从两个DNA片段制备各个质粒pCG-lucII-HS, pCG-lucII-PB, pCS-lucII-HS和pCS-lucII-PB: 1) 分别利用SmaI和ClaI消化质粒pLG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pLS-lucII-HS和pLS-lucII-PB制备的载体DNA, 和2) 利用SmaI和ClaI消化质粒pCG制备的1.3kB的DNA片段。

抗性测试载体—构建方法

通过实施例1所述的方法, 从质粒pLG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pCG-lucII-HS, pCG-lucII-PB, pLS-lucII-HS, pLS-lucII-PB, pCS-lucII-HS和pCS-lucII-PB(图5B)制备抗性测试载体。利用低聚核苷酸18和19, 和低聚核苷酸22和23制备的扩增病人序列, 从质粒pLG-lucII-HS, pCG-lucII-HS, pLS-lucII-HS或pCS-lucII-HS制备的载体构建抗性测试载体。利用低聚核苷酸20和21, 和低聚核苷酸24和25制备的扩增病人序列, 从质粒pLG-lucII-PB, pCG-lucII-PB, pLS-lucII-PB或pCS-lucII-PB制备的载体构建抗性测试载体。

药物敏感性和抗性测试

通过如下所述的实施例1叙述的方法进行抗性测试。从质粒pLG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pCG-lucII-HS和pCG-lucII-PB制备的抗性测试载体缺乏功

能性HIV env基因，并与包装表达载体pVL-env4070A一起使用。从质粒pLS-lucII-HS, pLS-lucII-PB, pCS-lucII-HS和pCS-lucII-PB制备的抗性测试载体仅编码HIVgag-pol基因产物，并与pVL-env4070A和，pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'包装表达载体二者之一，一起使用。在利用两宿主细胞类型进行的抗性测试中，将293细胞系，tsa54细胞系，tsa201细胞系,或BOSC 23细胞系用作包装宿主细胞，将未修饰的Jurkat细胞用作靶细胞。由于包含在这些抗性测试载体中的具有反向内含子的非功能性指示基因是不能在包装宿主细胞转染后有效地表达的，通过与包装宿主细胞的共培养，或通过利用来自包装宿主细胞上清液的病毒可以进行靶宿主细胞的感染。由于同样的原因，利用这些抗性测试载体进行的抗性测试可以利用单个宿主细胞类型。利用293, tsa54, tsa201, BOSC23或Jurkat细胞进行利用单个宿主细胞类型的抗性测试。

实施例4

利用含有病人起源的区段和非功能性指示基因的抗性测试载体的基于非颗粒的HIV 药物敏感性和抗性测试

药物敏感性和抗性测试

如实施例1, 2和3所述，利用含有具有置换启动子，置换编码区或反向内含子的非功能性指示基因的抗性测试载体进行基于非颗粒的抗性测试。在缺乏包装表达载体时，通过利用各个抗性测试载体的单个宿主细胞类型的转染进行这些基于非颗粒的抗性测试。虽然在宿主细胞转染之后包含在这些抗性测试载体内的非功能性指示基因没有有效地表达，存在人由基于非病毒颗粒的逆转录产生的可检测的指示基因的表达。逆转录和链转移导致置换的，非功能性的指示基因转换成非置换的，功能性的指示基因。由于逆转录完全依赖于包含在各个抗性测试载体内的pol基因的表达，可以测试抗病毒试剂抑制包含在抗性测试载体内的病人起源的区段编码的pol基因产物的能力。将实施例1所述的通用方法进行下述改良而进行基于非颗粒的抗性测试：1) 将抗性测试载体转染进适当的宿主细胞，2) 将抗

病毒试剂或它们的联合以适当浓度在转染后立即加入转染宿主细胞的各个别培养物中, 3) 在转染后24到72小时收获宿主细胞并测试荧光素酶活性。与缺乏抗病毒试剂时进行的对照比较, 在存在给定抗病毒试剂时观察到的利用给定抗性测试载体转染的宿主细胞的荧光素酶活性的减弱可用于计算该试剂或试剂的联合对存在于抗性测试载体中的病人起源的区段编码的病毒靶基因产物的表观抑制含量(Ki)。

抗性测试载体—构建方法

对于利用含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体的基于非颗粒的抗性测试, 如实施例1所述利用质粒pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS或pCS-lucPP-PB制备抗性测试载体。将各个抗性测试载体转染进入表达细胞质T7 RNA聚合酶的宿主细胞(如293/T7 RNAP细胞或Jrukat/T7 RNAP细胞)。如实施例1所述, 利用质粒pVL-T7 RNAP, 通过293细胞和Jurkat细胞的稳定转染制备这样的宿主细胞, 该质粒指导人和其它哺乳动物细胞和细胞系中细胞质噬菌体T7 RNA聚合酶的表达。从下面两个DNA片段构建pVL-T7 RNAP: 1) 利用EcoRI和BglII消化哺乳动物表达载体pVL-2制备的4.3kB的DNA片段, 和2) 通过用质粒pT7-G1作为模板, 和低聚核苷酸47和40作为引物的PCR, 接着用EcoRI和BglII消化而制备的, 含有T7 RNA聚合酶的完全的编码区(核苷酸166到2815, 基因库登记号M38308给出的坐标, Grachev和Pletnev(1984)Bioorg.Khim.10,824-843)的2.6kB的DNA片段。低聚核苷酸47掺入了独特的EcoRI位点, 后接用于真核翻译起始的共有序列(如, Kozak(1991)生物化学杂志, 266, 19867—19870), 而低聚核苷酸40掺入了独特的BglII位点。

对于利用含有具有置换编码区或反向内含子的非功能性指示基因的抗性测试载体的基于非颗粒的抗性测试, 如实施例1所述利用质粒pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-HS, pCG-lucPC-PB, pLS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS, pCS-lucPC-PB, pLG-lucII-HS, pLG-lucII-PB, pCG-lucII-HS, pCG-lucII-PB, pLS-lucII-HS, pLS-lucII-PB, pCS-lucII-HS或pCS-lucII-PB制备抗性测试载体。将各个抗性测试载体转染进入293, tsa54, tsa201, BOSC23或Jurkat细胞。

实施例5

利用含有病人起源的区段和功能性指示基因的抗性测试载体的 HIV 药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体—功能性指示基因

具有病人序列的受体位点的基因组指示基因病毒载体，质粒pLG-luc-HS-1,pLG-luc-HS-2,pLG-luc-PB-1,pLG-luc-PB-2,pCG-luc-HS-1,pCG-luc-HS-2,pCG-luc-PB-1和pCG-luc-PB-2,和起源于它们的抗性测试载体，各在5' 到3' 方向含有下面的元件(图6): 1) HIV—LTR U3区(pLG-luc-HS-1,pLG-luc-HS-2,pLG-luc-PB-1和pLG-luc-PB-2)或第一CMV IE增强子—启动子(pCG-luc-HS-1,pCG-luc-HS-2,pCG-luc-PB-1和pCG-luc-PB-2) , 2) HIV—LTR R和U5区, 3) HIVgag-pol,vif,vpr,tat,rev,vpu, 缺失的env,和nef基因的编码区, 4) 插入在缺失的env基因中的指示基因盒, 和5) 3' HIV—LTR。pLG-luc-HS-1,pLG-luc-HS-2,pCG-luc-HS-1和pCG-luc-HS-2分别在HXB2的核苷酸2243和4190含有独特的HpaI和SalI病人序列接受位点; pLG-luc-PB-1,pLG-luc-PB-2,pCG-luc-PB-1和pCG-luc-PB-2分别在HXB2的核苷酸2221和4212含有独特的PvuI和BamHI病人序列接受位点(参见实施例1详细情况)。各个质粒的指示基因盒含有1) 第二CMV 增强子—启动子, 2) 荧光素酶基因的编码区, 和3) SV40多聚腺苷酸化序列。pLG-luc-HS-1,pLG-luc-PB-1,pCG-luc-HS-1和pCG-luc-PB-1的指示基因盒以与病毒LTR或第一CMV增强子—启动子相反转录方向插入载体中(图6B), 而pLG-luc-HS-2,pLG-luc-PB-2,pCG-luc-HS-2和pCG-luc-PB-2的指示基因盒以相同方向插入载体中(图6C)。

具有病人序列接受位点的亚基因组指示基因病毒载体，质粒pLS-luc-HS-1,pLS-luc-HS-2,pLS-luc-PB-1,pLS-luc-PB-2,pCS-luc-HS-1,pCS-luc-HS-2,pCS-luc-PB-1和pCS-luc-PB-2, 和它们衍生的抗性测试载体各在5' 到3' 方向在含有下面的元件(图6): 1)HIV—LTR U3区(pLS-luc-HS-1,pLS-luc-HS-2,pLS-luc-PB-1 和 pLS-luc-PB-2)或第一CMV IE 增强子—启动子

(pCS-luc-HS-1, pCS-luc-HS-2, pCS-luc-PB-1 和 pCS-luc-PB-2), 2) HIV — LTR R和U5区, 3) HIV gag-pol基因的编码区, 4) 指示基因盒, 5) 来自含有病毒包装序列的HIV env基因的RRE元件, 和6) 3' HIV — LTR。pLS-luc-HS-1, pLS-luc-HS-2, pCS-luc-HS-1 和 pCS-luc-HS-2 分别在HXB2的核苷酸2243和4190含有独特的HpaI和SalI酶切位点; pLS-luc-PB-1, pLS-luc-PB-2, pCS-luc-PB-1 和 pCS-luc-PB-2 分别在HXB2的核苷酸2221和4212含有独特的PvuI和BamHI酶切位点。各质粒的指示基因盒含有1) 第二CMV增强子—启动子, 2) 荧光素酶基因的完全编码区, 和3) SV40多聚腺苷酸化序列。pLS-luc-HS-1, pLS-luc-PB-1, pCS-luc-HS-1 和 pCS-luc-PB-1 的指示基因盒以相反于病毒LTR或第一CMV增强子—启动子的转录方向插入在该载体中(图6B), 而pLS-luc-HS-2, pLS-luc-PB-2, pCS-luc-HS-2 和 pCS-luc-PB-2 的指示基因盒以相同方向插入载体中(图6C)。

质粒pLG-luc-HS-1 和 pLG-luc-HS-2, pLG-luc-PB-1 和 pLG-luc-PB-2, pCG-luc-HS-1 和 pCG-luc-HS-2, pCG-luc-PB-1 和 pCG-luc-PB-2, pLS-luc-HS-1 和 pLS-luc-HS-2, pLS-luc-PB-1 和 pLS-luc-PB-2, pCS-luc-HS-1 和 pCS-luc-HS-2, pCS-luc-PB-1 和 pCS-luc-PB-2 各从两个DNA片段制备的: 1) 利用NotI分别消化 pLG-luc-HS, pLG-lucII-PB, pCG-lucII-HS, pCG-lucII-PB, pLS-luc-HS, pLS-lucII-PB, pCS-lucII-HS 和 pCS-lucII-PB 和利用碱性磷酸酶处理得到的载体而制备的载体DNA, 和2) 通过利用NotI消化制备的含有荧光素酶指示基因盒的3.0kB的DNA片段。通过限制性图谱鉴定含有以相对于病毒LTR的两个转录方向插入在给定的病毒载体中的指示基因盒的克隆(如, pLG-luc-HS-1 和 pLG-luc-HS-2)。

抗性测试载体—构建方法

利用实施例1所述的含有抗病毒靶基因的HIV基因组和亚基因组病毒载体设计含有功能性指示基因的抗性测试载体。从上述质粒(图6)通过实施例1所述的方法制备抗性测试载体。利用低聚核苷酸18和19, 和低聚核苷酸22和23制备的扩增病人序列, 从质粒pLG-luc-HS-1, pLG-luc-HS-2, pCG-luc-HS-1, pCG-luc-HS-2, pLS-luc-HS-1, pLS-luc-HS-2, pCS-luc-HS-1 或 pCS-luc-HS-2 制备的载体构建抗性测试载体。利用低聚核苷酸20和21, 和低聚核苷酸24和25制备的扩增病人序列, 从质粒pLG-luc-PB-1, pLG-luc-

PB-2, pCG-luc-PB-1, pCG-luc-PB-2, pLS-luc-PB-1, pLS-luc-PB-2, pCS-luc-PB-1或pCS-luc-PB-2制备的载体构建抗性测试载体。

药物敏感性和抗性测试

通过实施例1所述的方法进行抗性测试,如下所述。从质粒pLG-luc-HS-1, pLG-luc-HS-2, pLG-luc-PB-1, pLG-luc-PB-2, pCG-luc-HS-1, pCG-luc-HS-2, pCG-luc-PB-1和pCG-luc-PB-2制备的抗性测试载体缺乏功能性HIVenv基因,并与包装表达载体pVL-env4070A一起使用。从质粒pLS-luc-HS-1, pLS-luc-HS-2, pLS-luc-PB-1, pLS-luc-PB-2, pCS-luc-HS-1, pCS-luc-HS-2, pCS-luc-PB-1和pCS-luc-PB-2制备的抗性测试载体仅编码HIVgag-pol基因产物,并与pVL-env4070A和, pLTR-HIV3'和pCMV-HIV3'包装表达载体二者之一,一起使用。利用两宿主细胞类型进行抗性测试,利用293细胞系,tsa54细胞系,tsa201细胞系或BOSC23细胞系作为包装宿主细胞,利用未修饰的Jurkat细胞作为靶细胞。如实施例1所述,利用从抗性测试载体指示基因宿主细胞得到的过滤上清液中得到的抗性测试载体病毒颗粒感染的方法进行含有功能性指示基因的这些或其它抗性测试载体对靶细胞的感染。与含有具有置换启动子或反向内含子的非功能性指示基因病毒载体的抗性测试载体相反,含有功能性指示基因的那些通常能够在转染的包装宿主细胞中表达它们的指示基因。测试共培养方法和利用单个细胞类型的抗性测试都不能容易地适用于利用具有功能性指示基因的抗性测试载体的靶细胞的感染,因为难以区分在感染的靶宿主细胞中和在转染的包装宿主细胞中的指示基因的表达。

所有本说明书引证的公开物和专利申请以它们的全部引入本文作为参考,正如各个单个公开物或专利申请特定地和个别地指出以便引入本文作为参考。

正如对本发明所从属的领域的技术人员所明了的,本发明可以以除了上面特定地公开的形式为实施方案,例如,不离开本发明的精神或基本特征进行其它毒力的药物敏感性和抗性测试。所以,将如上所述的本发明的特定的实施方案考虑为说明性的而不是限制性的。本发明的范围正如附加的权利要求中陈述的,不限于包含在前面的说明中的实施例。

实施例6

利用含有病人起源的区段和功能指示基因的 抗性测试载体的HIV药物敏感性和抗性测试 药物敏感性和抗性测试

利用两宿主细胞类型，基于两个与实施例5中所述的pCG-luc-2相似的指示基因病毒载体pCG-CXCN(F-lucP)2,和pCG-CXAT(F-lucP)2的抗性测试载体进行抗性测试。在pCG-CXCN(F-lucP)2的情况中，将指示基因病毒载体进行修饰，使指示基因盒缺乏内含子A(如上所述的CMV/ α -球蛋白内含子)，不含有多聚腺苷酸化信号并在构建时删除了下游的3' U5序列。用SV40polyA信号和复制区的起点替代了下游U5。指示基因病毒载体pCG-CXAT(F-lucP)2与pCG-CXCN(F-lucP)2的区别在于指示基因盒在CMV增强子-启动子和TK多聚腺苷酸化信号区下游含有人工内含子。通过利用抗性测试载体和包装表达载体转染包装宿主细胞制备的第一宿主细胞(抗性测试载体宿主细胞)产生抗性测试载体病毒颗粒。然后利用抗性测试载体病毒颗粒感染第二宿主细胞(靶宿主细胞)，测量其中指示基因的表达。

AZT 药物敏感性/抗性测试

构建含有功能性荧光素酶基因盒的抗性测试载体pCG-luc-2，利用该抗性测试载体DNA转染宿主细胞。该抗性测试载体含有对核苷逆转录酶抑制剂AZT(Sigma)有敏感性或有抗性的“测试”病人起源的逆转录酶序列。通过将该抗性测试载体DNA转染进入宿主细胞产生的抗性测试载体病毒颗粒被用于感染在缺乏AZT 或存在逐步增高的浓度的该药物(范围约0.0001微摩尔到1000微摩尔)时生长的靶宿主细胞。将在存在药物时感染的靶宿主细胞中产生的荧光素酶活性的量与缺乏药物时感染的靶宿主细胞中荧光素酶的量比较。药物抗性是以抑制50%(50%抑制浓度，IC₅₀)的缺乏药物时检测的荧光素酶活性所需要的药物的量来测定的。通过描绘药物抑制百分数对药物浓度的对数值的图确定IC₅₀值。

在10厘米直径的盘中播种宿主细胞(293)，在用抗性测试载体质粒DNA和包衣表达载体pCXAS(4070A-env)铺板后几天转染。利用磷酸钙沉淀方法进行转染。在转染后，从1到24小时，利用新鲜的培养基替代含有DNA

沉淀的细胞培养基。在转染后一到四天收获含有抗性测试载体病毒颗粒的细胞培养基并在储藏于-80℃之前通过0.45毫米的滤纸。按照制造商的说明(SIAC; Frederick, MD)通过EIA方法确定收获的细胞培养基中的HIV包衣蛋白质水平(p24)。在感染之前6到48小时,在不含有AZT或含有从100微摩尔到0.00005微摩尔的系列两倍稀释的AZT的细胞培养基中铺板靶细胞(293和293/T)。在感染过程中保持AZT浓度。利用90微升的转染的抗性测试载体宿主细胞上清液接种靶宿主细胞。利用来自模仿转染(没有DNA)或含有没有包衣表达质粒DNA的抗性测试载体质粒DNA(pCXAS(4070A-env))的转染的细胞培养基进行对照感染。在接种后一到24小时,在每个孔中加入新鲜培养基。12到36小时后,培养基被新鲜培养基完全替代。感染后1到3或更多天,除去培养基,在每个孔中加入细胞溶解缓冲液(Promega)。在溶解缓冲液中稀释细胞溶解物100倍,测量每个稀释的细胞溶解物的荧光素酶活性(图7A)。利用下面的方程确定AZT的抑制效果:

$$\% \text{ 荧光素酶抑制} = 1 - (\text{RLU}_{\text{luc}}(\text{AZT}) / \text{RLU}_{\text{luc}})$$

其中RLU_{luc}(AZT)是在存在AZT时感染细胞中的荧光素酶活性的相对光单位,RLU_{luc}是缺乏AZT时感染细胞中的荧光素酶活性的相对光单位。IC₅₀值是通过描绘荧光素酶活性的抑制百分数对药物浓度对数值产生的S形曲线得到的。AZT抑制曲线显示在(图7B)。

Nevirapine 药物敏感性/抗性测试

基于指示基因病毒载体pCG-CXCN(F-lucP)2的抗性测试载体含有起源于生物活性原病毒克隆pNL4-3的逆转录酶序列,该克隆对非核苷逆转录酶抑制剂nevirapine(BI-RG-587,Boehringer Igleheim)敏感。以上文对AZT药物敏感性/抗性测试所述进行寄主包装细胞的转染和寄主靶细胞的感染。利用范围为0.0001微摩尔到100微摩尔的nevirapine浓度评估nevirapine敏感性/抗性。如上对AZT所述确定nevirapine抑制曲线并示于图7C。

Indinavir药物敏感性/抗性测试

基于指示基因病毒载体pCG-CXCN(F-lucP)2的抗性测试载体含有起源于生物活性原病毒克隆, pNL4-3,的蛋白酶序列,该克隆是敏感于蛋白酶抑制剂indinavir(MK-639, Merck)。除了该蛋白酶抑制剂, indinavir, 存在于转染的包装宿主细胞培养物以及感染的靶宿主细胞培养物外, 如对

AZT药物敏感性/抗性测试所述, 进行寄主包装细胞的转染和寄主靶细胞的感染。利用范围为1.5皮摩尔到3微摩尔的indinavir浓度评估indinavir敏感性/抗性。如上对AZT所述确定indinavir抑制曲线并示于图7D。

实施例7

利用含有病人起源的区段和含有反向内含子的
的非功能性指示基因的抗性测试载体的肝炎-
药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体一构建方法

利用含有抗病毒药物的靶的病毒基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有反向内含子的非功能性指示基因的指示基因病毒载体。指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)是在亚基因组病毒载体pCS-HBV的基础上的。该指示基因病毒载体含有一个反向内含子的指示基因盒和所有HBV DNA复制所必须的顺式作用的调节元件(即DR1, 5' εDR2, DR1*, 3' PA), 但缺乏提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成必须的反式激活作用结构和酶的功能的HBV 基因序列(即C, P, S, X基因)(图8B)。C, P, S和X基因和病人序列接受位点包含在包装载体pPK-CPX(如下所述, 图8D)和pPK-S(如下所述, 图8E)内。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)和包装载体pPK-CPX构成抗性测试载体系统。非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子-启动子区, (2) HBV基因组的5' 区和DR1和衣壳化信号区(ε)的5' 拷贝(删除了前一C ORF翻译起始密码), (3) 非功能性指示基因盒, 其中指示基因ORF含有反向内含子, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ε, 和3' HBV多聚腺苷酸化(pA)信号区的HBV基因组的区域。非功能性指示基因表达盒在5' -3' 方向含有一些或全部下面的元件: (1) 质粒增强子-启动子区, (2) 内含子, (3) 含有反向内含子的指示基因, (4) 转录多聚腺苷酸化信号序列(如SV40), (HSV-1胸苷激酶基因)。该指示基因表达盒的转录方向与HBV序列元件的相反(图8B)。但是, 指示基因ORF内的内含子具有与HBV序列元件相同的转录方向。

在第二个实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II(PSAS+)含有具有反向内含子的非功能性指示基因盒, 所有HBV DNA复制所必须的顺式作用调节元件, 和一些或全部提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式激活作用结构和酶功能的HBV 基因序列(即C, P, S, X基因)(图8F)。起源于指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II(PSAS+)的抗性测试载体含有病人序列接受位点(PSAS)与包装载体pPK-CSX一起使用(图8H)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体也可以提供一些或全部包装功能如P。利用另外的包装载体pPK-CSX(如下所述, 图8H)提供指示基因病毒载体不提供的但是HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的结构和酶活性。在这一实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II(PSAS+)含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子-启动子区, (2) HBV基因组的5' 区, 和DR1和5' ϵ (删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 翻译反向内含子, 定位于可能含有一些或全部C, P, S, 和X基因以及病人起源P基因区段的HBV基因组区内的指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ϵ , 和3' ϵ HBV pA信号区的HBV基因组的区域。在非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)内, 指示基因表达盒具有相反于HBV序列元件的转录方向(图8F)。但是在指示基因ORF内的内含子具有与HBV序列元件相同的转录方向。

在转染细胞中, 包装载体提供HBV DNA复制和表达颗粒形成所必须的但不是抗性测试载体或指示基因病毒载体提供的反式-结构和酶功能。在指示基因病毒载体如pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)与包装载体, 如pPK-CPX, 共转染的实施方案中, 这些载体的联合构成了一个抗性测试载体系统, 该系统是含有用于病人起源的P基因区段(如上所述)的插入的病人序列接受位点的包装载体。包装载体pPK-CPX含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE 增强子-启动子区, (2) 从C ORF翻译起始密码子到3' pA信号并包括C, P, S和X基因的HBV基因组的区域。修饰包装载体的C基因使它不含有和/或表达前一C ORF序列和不表达S蛋白质(如下所述)。

在HBV中, 优先以顺式包装编码C和/或P蛋白质的RNA并因而干扰含有非功能性指示基因的抗性测试载体和不编码C和P蛋白质的非功能性指示基因表达载体RNA的有效包装。采取两个步骤防止从包装载体产生的

RNA的衣壳化和提高抗性测试载体或非功能性指示基因病毒载体RNA的衣壳化效力。首先,包装载体产生的RNA不含有5'衣壳化信号区(ϵ)(图8D, 8E和8H)。其次,在C基因和/或P基因包装功能是由抗性测试载体或非功能性指示基因病毒载体提供的情况中,利用了不表达C和/或P基因产物的包装载体如pPK-S或pPK-CSK(图8E和8H)。

抗性测试载体—构建方法

如下制备抗性测试载体: 1) 通过在P基因区导入独特的限制性位点,称为病人序列接受位点(PSAS)修饰指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-), 2) 通过扩增存在于感染病人的血清或细胞中的病毒DNA,扩增对应于HBV药物靶,如逆转录酶或DNA聚合酶,的病人起源的区段,和3) 在病人序列接受位点将扩增序列准确地插入指示基因病毒载体(图8F)。可选择地,通过如下制备抗性测试载体系统: 1) 通过在P基因导入病人序列接受位点修饰包装载体pPK-CPX, 2) 通过利用存在于感染病人的血清或细胞中的病毒DNA的扩增,扩增对应于HBV药物靶,如逆转录酶或DNA聚合酶的病人起源的区段, 3) 在病人序列接受位点将扩增的序列准确地插入在包装载体中(图8D)。在一个实施方案中, 5' PSAS的位置靠近P蛋白的间隔和RT区的边界(紧接着S蛋白翻译起始位点的下游), 而3' PSAS位置靠近P蛋白的RNase H区的C-末端。在病人序列接受位点插入病人起源的P基因区段导致形成嵌合P基因序列, 其中载体P基因序列编码TP和间隔区, 而病人起源的区段编码逆转录酶/聚合酶和RNase H区(图8D和8F)。

在HBV中, 整个S基因ORF与P基因ORF交叠, 但利用不同的读码框架得到表达(Nassal,M.和Schaller,H.(1993)微生物学趋势1, 221—228)。所以, 从病人得到的HBV P基因序列(逆转录酶和RNase H区)也含有相应的病人S基因序列。通过在pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)或pPK-CPK载体(图8F和8D)中删除三个S基因ORF(前一S1, 前一S2, 和S)翻译起始位点和/或导入框架内终止密码防止来自交叠的S基因 ORF的病人起源的S基因区的表达。利用提供已被清楚表征的S基因产物(图8E和8H)的分离的包装载体反式提供S基因表达。没有在P基因的终端蛋白(TP)或间隔区编码的交叠的氨基酸序列中导入变化进行了删除S基因表达的修饰。

药物敏感性和抗性测试

利用一种类型的宿主细胞或两种类型的宿主细胞,使用基于指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)的抗性测试载体,或者基于指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)和包装载体pPK-CPX的抗性测试载体系统进行药物敏感性和抗性测试。利用抗性测试载体如pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)和包装载体pPK-CSX,或利用指示基因病毒载体如pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)和含有病人起源区段的包装载体如pPK-CPX(即,抗性测试载体系统)的包装宿主细胞的共转染产生含有衣壳化的指示基因“前基因组”RNA的HBV病毒颗粒,由于反向内含子的拼接,它含有功能性指示基因(图8B和8C)。

对生长在缺乏抗病毒药物或逐渐增高的浓度的抗HBV药物(如,HBV P蛋白逆转录酶或聚合酶抑制剂)时的一系列包装宿主细胞培养物进行复制转染。在存在或缺乏抗HBV药物时生长包装宿主细胞几天后,可直接在寄主包装细胞溶解物,或通过收获寄主包装细胞培养基得到的分离的HBV颗粒中可以评估药物敏感性或抗性水平。可以利用其它的方法评估细胞溶解物和分离的HBV颗粒中的药物敏感性和抗性。

在一个称为一细胞测验的实施方案中,通过测量存在或缺乏抗病毒药物时,在转染包装宿主细胞中指示基因的表达如荧光素酶活性,评估药物敏感性或抗性。与缺乏抗病毒试剂相比,存在给定抗病毒试剂,或试剂的联合时观察到的转染细胞的荧光素酶活性的减弱通常以S形曲线与抗病毒试剂的浓度的对数值相关。

在第二个称为两细胞测试的实施方案中,通过测量分别用HBV颗粒或HBV颗粒DNA感染或转染后的靶宿主细胞中指示基因,如荧光素酶活性的表达,评估药物敏感性或抗性。将来自包装宿主细胞的HBV病毒颗粒用于感染靶宿主细胞,或将来自这些颗粒的DNA用于转染靶宿主细胞。在感染或转染时,在细胞培养物中加入适当浓度的抗病毒药物。在感染或转染几天后,溶解靶宿主细胞并测量指示基因的表达。在存在例如通过抑制HBV P蛋白质的逆转录酶(-链DNA)或DNA聚合酶活性抑制HBV复制的药物,与缺乏药物时进行的对照相比,可以观察到转染或感染的细胞中指示基因表达的减弱。

在第三个称为DNA结构指示物测试的实施方案中,通过测量发生在转染包装宿主细胞或包装宿主细胞产生的病毒颗粒内的HBV DNA复制的水平评估药物敏感性或抗性。在转染宿主细胞中,HBV亚基因组病毒载体被转录,并且该RNA转录物以“前基因组”RNA被包装。在病毒成熟的过程中,前基因组RNA被转换成由完全一链和部分+链DNA拷贝组成的基因组DNA的松弛圆环形式(rc-DNA)。在随后的步骤中,rc-DNA被转换成共价闭合圆环DNA形式(cccDNA)。为了测量HBV DNA复制,设计扩增引物以便扩增通过前基因组RNA的拼接和这一拼接的RNA转换成rc-DNA和cccDNA形式而形成的HBV DNA结构。

在HBV颗粒内的正确的扩增靶结构的形成需要成功地完成导致rc-DNA和cccDNA的HBV DNA复制。抑制HBV DNA复制(逆转录和DNA聚合酶活性)的抗病毒药物将限制DNA靶序列的形成,它本身作为扩增DNA产物的下降可利用许多定量扩增测试进行测量。在一个实施例(图10B),通过以同样于HBV序列的转录方向插入在指示基因ORF中的内含子序列将反向引物(Pr)的结合位点分离成两部分。正向的引物(Pf)的引物结合位点定位于由DR2和DR1*序列侧接的病毒载体的区域内。在线性HBV载体中,Pf和Pr引物以相反的方向指导DNA合成并相互方向向外。在这种情况下,Pr引物指导上游方向的DNA的合成(朝着(ε)的5'拷贝)和Pf引物指导下游方向的DNA合成(朝着3' (ε))。引物和模板的这种安排在线性指示基因病毒载体中不构成功能性扩增单位。另外,Pr结合位点在线性未拼接载体中是不完整的,所以Pr将不与靶DNA退火。相反,Pf和Pr引物在成熟病毒粒子中存在的HBV DNA的松弛圆环形式中具有相互向内的方向,并且RNA

前基因组的拼接组装了完整的Pr引物结合位点。两个引物在rc-DNA的+链拷贝内和,在+链或一链和cccDNA二者之一中,朝着DR1的单个拷贝指导DNA的合成。这一引物和模板的安排构成了功能性扩增单位(图10C)。

在DNA序列指示物测验的可供选择的实施方案(图9D)中,测量了扩增酶(如Taq聚合酶)的5'外切核酸酶的活性而不是扩增DNA的生产(C.Heid等,1996,基因组研究6:986—994)。通过探测能够与Pf和Pr结合位点侧接的扩增DNA模板区结合的荧光标记的低聚核苷酸探针的核酸切割测量

5' 外切核酸酶的活性。这一测验的进行依赖于上游引物(Pf)的3' 末端与低聚核苷酸探针的5' 末端紧密相邻。当Pf引物被延伸时, 它替代低聚核苷酸探针的5' 末端使该聚合酶的5' 外切核酸酶活性切割了该低聚核苷酸探针。内含子的作用是使Pf结合位点与外切核酸酶探针序列的5' 末端的距离足够远, 以便基本上消除未拼接的靶模板中探针低聚核苷酸的可检测的外切消化。通过拼接除去内含子的作用是将Pf结合位点的3' 末端定位于紧接着探针5' 结合位点的上游。这一再安排能够定量检测扩增靶模板的外切活性(图1E)。

药物筛选

利用含有具有反向内含子的非功能性指示基因盒的指示基因病毒载体和包装载体进行药物筛选。在转染包装宿主细胞中, 指示基因病毒载体产生含有指示基因的可衣壳化的(ϵ +)RNA转录物。包装载体反式提供抗性测试载体不提供的但病毒DNA复制和颗粒形成所必须的结构和/或酶病毒功能。在包装宿主细胞共转染之后, 指示基因病毒载体和包装载体产生含有衣壳化的指示基因病毒载体“前基因组”RNA的HBV病毒颗粒, 由于反向内含子的拼接, 它含有功能性指示基因。

如下进行药物筛选: 利用指示基因病毒载体和包装载体DNA转染包装宿主细胞。在缺乏或存在潜在的抗病毒化合物(如候选的HBV P蛋白质逆转录酶或聚合酶抑制剂)时生长的包装宿主细胞培养物的系列中进行复制转染。在存在或缺乏候选抗病毒药物时生长包装宿主细胞几天后, 直接在包装宿主细胞的溶解物中, 或在通过收获寄主包装细胞培养基而得到的分离的HBV颗粒中评估DNA复制的抑制水平。可以将如上所述的DNA检测或指示基因活性方法用于评估潜在的抗HBV药物候选物。

实施例8

利用含有病人起源的区段和具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体的肝炎
药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体—构建方法

利用含有抗病毒药物的靶的病毒基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换启动子的非功能性指示基因的指示基因病毒载体。指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)是在亚基因组病毒载体pCS-HBV的基础上的。指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-),含有具有置换启动子的指示基因盒和所有HBV DNA复制所必须的顺式作用的调节元件(即DR1, 5' ϵ DR2, DR1*,3'pA),但缺乏提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式作用结构和酶功能的HBV基因序列(即, C, P, S, X基因)(图10B)。C, P和X和病人序列接受位点包含于包装载体pPK-CPX(如实施例7所述, 参见图8D)。S基因包含于包装载体pPK-S(如实施例7所述, 参见图8E)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)和包装载体pPK-CPX构成一个抗性测试载体系统。非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-),含有下面5' 到3' 方向的元件:

- (1) CMV IE 增强子—启动子区,
- (2) HBV基因组的5' 区和DR1和5' ϵ (删除了前一C ORF翻译起始密码子),
- (3) 组装成使启动子区定位于指示基因ORF的3', 即下游, 的非功能性指示基因盒,
- (4) 含有DR2, DR1*, 3' ϵ , 和3' HBV pA信号区(删除了前一C ORF翻译起始密码子)的HBV基因组的3' 区。

非功能性指示基因表达盒含有下面以5' 到3' 方向安排的一些或所有元件:

- (1) 内部核糖体进入位点(IRES),
- (2) 可能含有反向内含子的指示基因,
- (3) 转录多聚腺苷酸化信号序列(如HSV-1胸苷激酶基因, SV40),
- (4) 所增强子—启动子区。

在非功能性指示基因病毒载体中, 指示基因表达盒具有与HBV序列元件相反或相同的转录方向。在指示基因ORF含有内含子的情况中, 内含子具有与HBV相同的转录方向。

在第二个实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体含有具有置换启动子区的非功能性指示基因盒, 所有的HBV DNA复制所必须的顺式作用调节元件, 和一些或所有的提供HBV DNA 复制和病毒颗粒形成所必须的反式激活作用结构和酶功能的HBV基因序列(即C, P, S, X基因), pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)(图10D)。起源于该指示基因病毒载体, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+), 的抗性测试载体含有病人序列接受位点并与包装载体pPK-CSK一起使用(图8H)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体

也可以提供一些或所有包装功能。另外,在这一实施方案中,利用其它包装载体提供了不由指示基因病毒载体提供,但是HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的结构和酶活性。在这一实施方案中,非功能性指示基因病毒载体, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+),在5' -3' 方向含有下面的元件:

(1)CMV IE 增强子-启动子区,(2) HBV基因组的5' 区和DR1和5' ε(删除了前-C ORF翻译起始密码子),(3) 增强子-启动子区(置换启动子),(4) 含有病人起源的区段的P基因,(5) 指示基因ORF,(6) 内部核糖体进入位点(IRES),和(7) 含有DR2, DR1*, 3' ε和3' HBV pA信号区(删除了前-C ORF翻译起始密码子)的HBV基因组的3' 区。在非功能性指示基因病毒载体中,指示基因表达盒具有与HBV序列元件相反或相同的转录方向。在指示基因含有反向内含子的情况中,内含子具有与HBV序列元件相同的转录方向。

抗性测试载体—构建方法

利用含有实施例8所述的抗病毒靶基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体。修饰指示基因病毒载体或包装载体以便包括用于插入含有病人起源的区段(PDS)(实施例7所述,参见图8D和8F)的P基因的病人序列接受位点(PSAS)。如实施例7所述删除病人起源的S基因的表达(参见图8D)。利用提供清楚表征的S基因产物的分离的包装载体反式提供的均一的S基因的表达(图8E)。

药物敏感性和抗性测试

利用一种类型的宿主细胞或两种类型的宿主细胞,利用基于指示基因表达载体pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)的抗性测试载体,或含有指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)和包装载体pPK-CPX的抗性测试载体系统进行药物敏感性和抗性测试。利用抗性测试载体和包装载体或利用指示基因病毒载体和包装载体(即抗性测试载体系统),共转染包装宿主细胞的共转染之后,产生的HBV病毒颗粒含有具有非功能性指示基因的衣壳化的指示基因“前基因组”RNA。在转染宿主细胞内,具有置换启动子的非功能性指示基因在HBV复制过程中被转换成功能性指示基因(图10B和10C)。

如实施例7所述(上面)进行药物敏感性和抗性测试。通过测量转染或感

染宿主细胞中指示基因表达的水平可以测量病人起源的逆转录酶和/或DNA聚合酶活性对各种抗病毒药物的抗性或敏感性。或者,通过对已发生的HBV DNA复制进行定量可以测量抗性或敏感性。后者可利用定量DNA扩增测试来进行。在这一类型的测试的一个实施例中,(图9F和9G),将反向引物(Pr)的引物结合位点定位于5' ϵ 的下游区。将正向的引物(Pf)的引物结合位点定位于与DR2和DR1*序列侧接的区域内。在线性HBV载体中,Pf和Pr引物指导相反方向的DNA合成。在这一情况中,Pr引物指导上游方向的DNA合成(朝着5' ϵ),Pf引物指导下游方向的DNA的合成(朝着3' ϵ)。这一引物构型在用于转染的病毒载体的线性拷贝中不构成功能性扩增单位。相反,Pf和Pr引物在成熟病毒粒子中存在的rc-DNA中具有相向的方向。两个引物在rc-DNA的+链拷贝内引导朝向单拷贝DR1的DNA合成。引物和模板的这一安排构成了一个功能性扩增单位。

药物筛选

基本上如上面实施例7所述进行利用含有具有置换启动子的非功能性指示基因的指示基因病毒载体的药物筛选。

实施例9

利用含有病人起源区段和具有置换启动子和翻译起始位点的非功能性指示基因的抗性测试载体的肝炎药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体

利用含有抗病毒药物的靶的病毒基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换启动子和翻译起始位点的非功能性指示基因的指示基因病毒载体, pCS-HBV(NF-IG)PPTIS。指示基因病毒载体 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-)是基于亚基因组病毒载体pCS-HBV的。该指示基因病毒载体含有具有置换启动子和翻译起始区的非功能性指示基因盒和所有HBV复制所必须的顺式作用调节元件(即DR1, 5' ϵ , DR2, DR1*, 3' pA),但缺乏通过HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式作用结构和酶功能的HBV基因序列(即, C,P,S,X基因)(图11B)。C, P和X基因和病人序列

接受位点包含在包装载体pPK-CPX内(实施例7, 图8D)。S基因包含在包装载体pPK-S内(实施例7, 图8E)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-)和包装载体pPK-CPX构成一个抗性测试载体系统。非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-)含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子-启动子区, (2) 包括DR1和5' ϵ 的HBV的基因组的5' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 缺乏翻译起始位点的指示基因ORF, (4) 增强子-启动子区(置换启动子), (5) 含有DR2, 功能性前一C ORF翻译起始密码子, DR1*, 3' ϵ , 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区。非功能性指示基因盒由下面以5' 到3' 方向排列的一些或所有元件组成: (1) 不含有框架内翻译起始位点的指示基因ORF, (2) 转录多聚腺苷酸化信号序列(如HSV-1胸苷激酶基因SV40), (3) 增强子-启动子区。在非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-)中, 指示基因表达盒转录方向与HBV序列元件的相同。在指示基因ORF含有内含子的情况中, 内含子具有与HBV序列元件相同的转录方向。

在第二个实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体含有具有置换启动子和翻译起始区的非功能性指示基因盒, 所有HBV DNA复制所必须的顺式作用调节元件, 一些或所有提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式激活作用结构和酶功能的HBV基因序列(即C, P, S, X基因)(pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)) (图11D)。利用其它包装载体pPK-CSX(实施例7所述, 参见图8E)提供指示基因病毒载体不提供但是HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的结构和酶活性。C, S和X包含在包装载体pPK-CSX(实施例7所述, 参见图8H)内。在这一实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)含有下面5' 到3' 方向的元件(图11D): (1) CMV IE 增强子-启动子区, (2) 包括DR1和5' ϵ 的HBV基因组的5' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 缺乏翻译起始位点的指示基因ORF, (4) 含有病人起源的区段的P基因, (5) 增强子-启动子区(置换启动子), (6) 含有DR2, 前一C ORF翻译起始密码子, DR1*, 3' ϵ , 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区。在非功能性指示基因病毒载体内, 指示基因表达盒具有与HBV序列元件相同的转录方向。在

指示基因含有反向内含子的情况中,内含子的转录方向与HBV序列元件的相同。

抗性测试载体—构建方法

利用含有实施例7中所述的抗病毒靶基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体。修饰指示基因病毒载体和包装载体以使其包括用于含有病人起源的区段(PDS)的P基因的插入的病人序列接受位点(PSAS)(实施例7所述,参见图8D和8F)。如实施例7所述删除了病人起源的S基因的表达(参见图8D)。利用提供已清楚表征的S基因产物的分开的包装载体反式提供均一的S基因的表达(图8E)。

药物敏感性和抗性测试

通过实施例7和8所述的方法进行药物敏感性和抗性测试。在HBV复制过程中非功能性指示基因被转换成功能性指示基因(图11B和11C)。

药物筛选

基本上如实施例7和8(上面)所述进行利用含有具有置换启动子和翻译起始区的非功能性指示基因的指示基因病毒载体的药物筛选。

实施例10

利用含有病人起源的区段和具有置换编码区的
非功能性指示基因的抗性测试载体的肝炎药物
敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体—

利用含有抗病毒药物的靶的病毒基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换编码区的非功能性指示基因的指示基因病毒载体。指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS-)的基础是亚基因组病毒载体pCS-HBV。指示基因病毒载体含有具有置换编码区的非功能性指示基因盒,和所有HBV DNA复制所必须的顺式作用调节元件(即DR1, 5' ϵ , DR2, DR1*, 3' pA), 但缺乏提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式作用结构和酶功能的HBV基因序列(即C, P, S, X基因)(图12B)。C, P和X基因和病人序列接受位点包含在包装载体, pPK-CPX内, S基因是由包装

载体pPK-S提供的(实施例7所述, 参见图8D和8E)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS-)和包装载体pPK-CPX构成一个抗性测试载体系统。非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS-)含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子—启动子区, (2) 包括DR1和5' ϵ 的HBV基因组的5' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 其组装使启动子区和编码区的5' 部分定位于余下的编码区的3' 部分的3', 即下游, 的非功能性指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ϵ , 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF的翻译起始密码子)。非功能性指示基因盒是由下面以5' 到3' 方向安排的一些或全部元件组成的: (1) 终止于拼接受体序列中的内含子的3' 区, (2) 指示(报道)ORF或可选择的标记ORF的3' 区, (3) 转录多聚腺苷酸化信号序列(如HSV-1胸苷激酶基因, SV40), (4) 增强子—启动子区, (5) 指示基因ORF的5' 区, (6) 开始于拼接供体序列的内含子的5' 区。在非功能性指示基因病毒载体内, 指示基因表达盒的转录方向与HBV序列元件的相同或相反。在指示基因ORF含有内含子的情况中, 内含子的定向与HBV序列元件的相同。

在第二个实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体含有具有置换编码区的非功能性指示基因盒, 所有HBV DNA复制所必须的顺式作用的调节元件, 和一些或全部提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式激活作用结构和酶功能的HBV基因序列(即C, P, S, X基因) pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS+) (图12D)。起源于指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS+)的抗性测试载体含有病人序列接受位点(PSAS)并与包装载体pPK-CSK一起使用(实施例7所述, 参见图8H)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体也可以提供一些或所有包装功能。在这一实施方案中, 利用其它包装载体提供了指示基因病毒载体不提供, 但是HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的结构和酶活性。在这一实施方案中, 非功能性指示基因病毒载体含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子—启动子区, (2) 紧接着前一C ORF翻译起始密码子下游和DR1和5' ϵ 的HBV基因组的区, (3) 含有可能含有一些或全部C, P, S, 和X基因的HBV基因组的区域的指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ϵ , 3' HBV pA

信号区的HBV基因组的区(删除了前一C ORF起始密码子)。在非功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS+)内,指示基因表达盒具有与HBV序列元件相同或相反的转录方向。在指示基因含有反向内含子的情况中,内含子的方向与HBV序列元件相同。

抗性测试载体—构建方法

如实施例7所述,利用含有抗病毒靶基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换编码区的非功能性指示基因的抗性测试载体。修饰指示基因病毒载体或包装载体以使其包括用于含有病人起源的区段(PDS)的P基因的插入的病人序列接受位点(PSAS)(实施例7所述,参见图8D和8F)。如实施例7所述删除了病人起源的S基因的表达(参见图8D)。利用提供已清楚表征的S基因产物的分开的包装载体反式提供均一的S基因的表达(图8E)。

药物敏感性和抗性测试

通过实施例7和8所述的过程进行药物敏感性和抗性测试。在HBV复制过程中非功能性指示基因被转换成功能性指示基因(图12B和12C)。

药物筛选

基本上如实施例7和8(上面)所述进行利用含有具有置换启动子和翻译起始区的非功能性指示基因的指示基因病毒载体的药物筛选。

实施例11

利用含有病人起源的区段和功能性指示基因的 抗性测试载体的肝炎药物敏感性和抗性测试

指示基因病毒载体—构建方法

利用含有抗病毒药物靶的病毒基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有功能性指示基因的指示基因病毒载体。指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)是基于亚基因组病毒载体pCS-HBV的。指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)含有功能性指示基因盒和所有HBV DNA复制所必须的顺式作用调节元件(即DR1, 5' εDR2, DR1*, 3' pA),但缺乏提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式作用结构和酶功能的HBV基因序列(即C, P, S, X基因)(图14B)。C, P和X基因和病人序列接受位

点包含在包装载体pPK-CPX和S基因包含在包装载体pPK-S内(如下所述, 参见图8D和8E)。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体pC-HBV(F-IG)(PSAS-)和包装载体pPK-CPX构成一个抗性测试载体系统。功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子-启动子区, (2) 包括DR1和5' ϵ 的HBV基因组的5' 区(删除了前一C ORF翻译起始密码子), (3) 功能性指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ϵ , 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的3' 区(删除了前一C ORF的翻译起始密码子)。指示基因表达盒由一些或所有下面5' 到3' 方向安排的元件组成: (1) 转录增强子-启动子区, (2) 内含子, (3) 指示基因ORF或选择性标记基因ORF, (4) 转录多聚腺苷酸化信号序列(如SV40)或未定向的(HSV-1胸苷激酶基因)。指示基因表达盒具有与HBV序列元件相同或相反的转录方向。

在第二个实施方案中, 指示基因病毒载体含有功能性指示基因盒, 所有HBV DNA复制所必须的顺式作用调节元件, 提供HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的反式作用结构和酶功能的HBV基因序列(即C, P, S, X基因) pCS-HBV(F-IG)(PSAS+) (图13D)。起源于指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)的抗性测试载体含有病人序列接受位点(PSAS)并与包装载体pPK-CSK一起使用。在这一实施方案中, 指示基因病毒载体也提供一些或全部包装功能。利用其它包装载体pPK-CSX(实施例7所述, 参见图8H)提供指示基因病毒载体不提供但是HBV DNA复制和病毒颗粒形成所必须的结构和酶活性。在这一实施方案中, 功能指示基因病毒载体含有下面5' 到3' 方向的元件: (1) CMV IE增强子-启动子区, (2) 紧接着前一C ORF翻译起始密码子, 和DR1和5' ϵ 的下游的HBV基因组的区, (3) 含有一些或全部C, P, S, 和X基因的HBV基因组的区域内的功能性指示基因盒, (4) 含有DR2, DR1*, 3' ϵ 和3' HBV pA信号区的HBV基因组的区。在指示基因病毒载体内, 指示基因表达盒基因与HBV序列元件相反或相同的转录方向。

抗性测试载体一构建方法

利用含有实施例7所述的抗病毒靶基因的HBV亚基因组病毒载体设计含有具有置换启动子的非功能性指示基因的抗性测试载体。修饰指示基因

病毒载体或包装载体以使其包括用于含有病人起源的区段的P基因的插入的病人序列接受位点(PSAS)(实施例7所述, 参见图8D和8F)。如实施例7所述删除了病人起源的S基因的表达(参见图8D)。利用提供已清楚表征的S基因产物的分开的包装载体反式提供均一的S基因的表达(图8E)。

药物敏感性和抗性测试

利用功能性指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)基础上的抗性测试载体或指示基因病毒载体pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)和包装载体基础上的抗性测试载体系统进行药物敏感性和抗性测试。在转染包装宿主细胞中, 指示基因病毒载体产生含有功能性指示基因盒的可衣壳化的(ϵ +)RNA转录物。包装载体反式提供功能性指示基因病毒载体不提供但是病毒DNA复制和颗粒形成必须的结构和/或酶病毒功能。在包装宿主细胞共转染之后, 指示基因病毒载体和包装载体能够形成含有具有功能性指示基因盒的衣壳化的指示基因病毒载体“前基因组”RNA的HBV颗粒。

在这一实施例中, 指示基因病毒载体含有功能性指示基因盒, 所以能在缺乏HBV DNA的复制时在转染细胞中产生指示基因活性(图13)。在功能性指示基因的情况下, 通过收获包装宿主细胞中产生的病毒颗粒和利用该颗粒(或颗粒DNA)感染(或转染)靶宿主细胞可以评估药物对HBV DNA复制的抑制。或者, 通过利用DNA作为指示物可以在从包装宿主细胞分离的病毒颗粒中直接测量DNA复制。抑制HBV DNA复制的药物将减弱含有“成熟”rc-DNA形式的功能性指示基因病毒载体的病毒颗粒的形成。结果是, 在感染/转染过程中功能性指示基因将不能有效地转移到靶宿主细胞中, 这些细胞中指示基因病毒载体cccDNA的量和指示基因活性将减少。如实施例7所述进行了两细胞测试中靶宿主细胞中指示基因表达的检测。如实施例8所述和图9F和9G图解, 利用DNA作为指示物进行了病毒颗粒中rc-DNA的检测。

药物筛选

基本上如实施例7和8所述(上面)进行了利用含有具有置换启动子和翻译起始区的非功能性指示基因的指示基因病毒载体的药物筛选。

低聚核苷酸

- 1) 5'-AGTGAATTAGCCCTTCCACCCGGGTCGAGCTTGGCGTAATCA-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:1)
- 2) 5'-CTGTTGGGAAGGGCGATCTCTAGATGCTAGAGATTTTCCACA-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:2)
- 3) 5'-CTCCTCCTCCAAGTCTGAGCGGCCGCCTTTAGCATCTGATGCAC-3'
(44-mer) (SEQ ID NO:3)
- 4) 5'-CTCCTCCTCCAAGTCTGAGCGGCCGCCATATGGTGTTTTACTAA-3'
(44-mer) (SEQ ID NO:4)
- 5) 5'-GGTCTAACCAGAGAGACCCGGTTCATAAACGAGCT-3'
(36-mer) (SEQ ID NO:5)
- 6) 5'-GAATTCGCGGCCGCAATTCCGCCCCCTCTCCCT-3'
(32-mer) (SEQ ID NO:6)
- 7) 5'-GTTAACGCGGCCGCGATATAGTTCCTCCTTTC-3'
(32-mer) (SEQ ID NO:7)
- 8) 5'-GAATTCTCGCGACCATGGAAGACGCCAAAAAC-3'
(32-mer) (SEQ ID NO:8)
- 9) 5'-GTTAACAGATCTCTCGAGTTACAATTTGGACTTTCC-3'
(36-mer) (SEQ ID NO:9)
- 10) 5'-AGACGGGCACACACTACTTAATACGACTCACTATAGGG
TGAAGCACTCAAGGCAAG-3' (56-mer) (SEQ ID NO:10)
- 11) 5'-AAGAGTGACCTGAGGGAAGTTAACGGATACAGTTCCTTGTCT-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:11)
- 12) 5'-TCCAGCACTGACTAATTTGTGCTTGTTCATTTCTCCAAT-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:12)
- 13) 5'-TAACGCCTATTCTGCTATGCCGACACCCAATTCTGAAAATGG-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:13)
- 14) 5'-AAGGATACAGTTCCTTGTCGATCGGCTCCTGCTTCTGAGGGG-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:14)
- 15) 5'-CTAAAAATAGTACTTTCCGGATCCCAGCACTGACTAATTTAT-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:15)
- 16) 5'-TTAGCTCCTTCGGTCCTCCAATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG-3'
(42-mer) (SEQ ID NO:16)
- 17) 5'-GTCCCAGATAAGTGCCAAGGATTCGTTCACTAATCGAATGGA-3'

- (42-mer) (SEQ. ID NO:17)
- 18) 5'-GAATTCGTTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGG-3'
(33-mer) (SEQ ID NO:18)
- 19) 5'-GTTAACGTCGACTTGTTTCCTCCAAT-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:19)
- 20) 5'-GAATTCCGATCGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCCC
TCAGATCACTCTTTGG-3' (55-mer) (SEQ ID NO:20)
- 21) 5'-GTTAACGGATCCCAGCACTGACTAATTTATCTACTTGTTT
ATTTCTCCAAT-3' (52-mer) (SEQ ID NO:21)
- 22) 5'-GAATTCGTTAACTTCCCTCA (G/A) ATC (A/C) CTCTTTGG-3'
(33-mer pool) (SEQ ID NO:22)
- 23) 5'-GTTAACGTCGACTT (G/T) (T/C) TCATTTCTCTCC (A/T) AT-3'
(30-mer pool) (SEQ ID NO:23)
- 24) 5'-GAATTCCGATCGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCCC
TCA (G/A) ATC (A/C) CTCTTTGG-3' (55-mer pool) (SEQ ID
NO:24)
- 25) 5'-GTTAACGGATCCCAGCACTGACTAATTTATCTACTT (G/T)
(T/C) TCATTTCTCTCC (A/T) AT-3'
(52-mer pool) (SEQ ID NO:25)
- 26) 5'-ATCTCTTACCTGTCCTATCTAACAGGCCAGGATTAA-3'
(36-mer) (SEQ ID NO:26)
- 27) 5'-GAATTCTCGCGACCACCATGGCGCGTTCAACGCTC-3'
(35-mer) (SEQ ID NO:27)
- 28) 5'-GTTAACAGATCTTCATGGCTCGTACTCTAT-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:28)
- 29) 5'-GAATTCGCGCGCAAGCGGCCGCAACCCGGGAAAAGCTT
AAGCATGCAACCCGGAAGAATTCAATCGCGAAA-3'
(72-mer) (SEQ ID NO:29)
- 30) 5'-GTTAACGCGCGCTTCTCGAGTTGCGGCCGCTTGCTAGCTT
AGATCTTTGGGCCCTTTTCGCGATTGAATTCTT-3'
(72-mer) (SEQ ID NO:30)
- 31) 5'-GAATTCAAGCTTGGCCATTGCATACGTTGT-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:31)
- 32) 5'-GTTAACGCATGCATAAGAAGCCAA-3'
(24-mer) (SEQ ID NO:32)

- 33) 5'-GAATTCGCATGCTCCCCTGCTCCGACCCGG-3'
(30-mer) (SEQ ID NO: 33)
- 34) 5'-GTTAACGAATTCTCCTGCGGGGAGAAGCAG-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:34)
- 35) 5'-GAATTCAGATCTGCCATACCACATTTGTAG-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:35)
- 36) 5'-GTTAACGCTAGCTCCAGACATGATAAGATA-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:36)
- 37) 5'-GAATTCGCTAGCATCCCGCCCCTAACTCCG-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:37)
- 38) 5'-GTTAACGTCGACGCAAAGCCTAGGCCTCC-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:38)
- 39) 5'-GAATTCTCGCGAACAGTTGGCCCT-3'
(24-mer) (SEQ ID NO:39)
- 40) 5'-GTTAACAGATCTTTACGCGAACGCGAAGTC-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:40)
- 41) 5'-GTTAACGAATTCTTGCAAAAAGCTTTGCAAGATGGATA
AAGTTTTTAGAACTCCAGTAGGACTCC-3'
(66-mer) (SEQ ID NO:41)
- 42) 5'-GAATTCTCGCGATCTAGACGTTCTACCTTTCTCTTCTT
TTTTGGAGGAGTCCTACTGGAGTTT-3'
(63-mer) (SEQ ID NO:42)
- 43) 5'-GTTAACGAATTCCCACCATGATTGAACAAGATGGA-5'
(35-mer) (SEQ ID NO:43)
- 44) 5'-GAATTCAGATCTTCAGAAGAACTCGTCAAG-3'
(30-mer) (SEQ ID NO:44)
- 45) 5'-CCCCGTGCCAAGAGTGACTACGTAAGTACCGCCTATAGA-3'
(39-mer) (SEQ ID NO:45)
- 46) 5'-CTCTGCTTCTCCCCGCAGCTGGAGAATTCAATCGCGAAA-3'
(39-mer) (SEQ ID NO:46)
- 47) 5'-GTTAACGAATTCCCACCATGAACACGATTAACATC-5'
(35-mer) (SEQ ID NO:47)

“mer” =聚体

序列表

(1)总信息:

- (i) 申请人: Capon, Daniel J.和Christos J.Petropoulous
- (ii) 发明的题目: 确定抗病毒药物敏感性和抗性的组合物和方法
- (iii) 序列的数目: 47
- (iv) 通信地址:
 - (A) 收信人: Cooper和Dunham LLP
 - (B) 街道: 美国大道1185号
 - (C) 城市: 纽约
 - (D) 州: 纽约
 - (E) 国家: 美国
 - (F) 邮编: 10036
- (v) 计算机可读形式:
 - (A) 媒介类型: 软盘
 - (B) 计算机: IBM PC兼容机
 - (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) 软件: PatentIn Release#1.0,#1.30版
- (vi) 当前申请资料:
 - (A) 申请号:
 - (B) 递交日期:
 - (C) 分类:
- (vii) 代理人信息:
 - (A) 姓名: White,John P.
 - (B) 登记号: 28, 678
 - (C) 档案号: 50130-A-PCT/JPW/AKC
- (ix) 电信资料:
 - (A) 电话: 212-278-0400
 - (B) 传真: 212-391-0526

(2) SEQ ID NO: 1的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 42个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

AGTGAATTAG CCCTTCCACC CGGGTCGAGC TTGGCGTAAT CA
42

(2) SEQ ID NO: 2的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 44个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

CTGTTGGGAA GGGCGATCTC TAGATGCTAG AGATTTTCCA CA
42

(2) SEQ ID NO: 3的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 44个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

CTCCTCCTCC AAGTCTGAGC GGCCGCCTTT AGCATCTGAT GCAC

(2) SEQ ID NO: 4的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 44个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

CTCCTCCTCC AAGTCTGAGC GGCCGCCATA TGGTGTTTTA CTAA

44

(2) SEQ ID NO: 5的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 36个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO:5:

GGTCTAACCA GAGAGACCCG GTTCACTAAA CGAGCT

36

(2) SEQ ID NO: 6的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 32个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO:6:

GAATTCGCGG CCGCAATTCC GCCCCTCTCC CT

32

(2) SEQ ID NO: 7的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 32个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

GTTAACGCGG CCGCGATATA GTTCCTCCTT TC

32

(2) SEQ ID NO: 8的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 32个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

GAATTCTCGC GACCATGGAA GACGCCAAAA AC

32

(2) SEQ ID NO: 9的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 36个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

GTTAACAGAT CTCTCGAGTT ACAATTTGGA CTTTCC

36

(2) SEQ ID NO: 10的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 56个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

AGACGGGCAC ACACTACTTA ATACGACTCA CTATAGGGTG AAGCACTCAA
GGCAAG

56

(2) SEQ ID NO: 11的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 42个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

AAGAGTGACC TGAGGGAAGT TAACGGATAC AGTTCCTTGT
CT

42

(2) SEQ ID NO: 12的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 42个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

TCCAGCACTG ACTAATTTGT CGACTTG TTC ATTTCCTCCA AT

42

(2) SEQ ID NO: 13的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 42个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链数: 单链
- (D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

TAACGCCTAT TCTGCTATGC CGACACCCAA TTCTGAAAAT GG
42

(2) SEQ ID NO: 14的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 42个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链数: 单链
- (D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 14:

AAGGATACAG TTCCTTGTCG ATCGGCTCCT GCTTCTGAGG GG
42

(2) SEQ ID NO: 15的资料:

(I) 序列特征:

- (A) 长度: 42个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链数: 单链
- (D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 15:

CTAAAAATAG TACTTTCCGG ATCCCAGCAC TGACTAATT AT
42

(2) SEQ ID NO: 16的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 42个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 16:

TTAGCTCCTT CGGTCCTCCA ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GG
42

(2) SEQ ID NO: 17的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 42个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

GTCCCAGATA AGTGCCAAGG ATTCGTTTAC TAATCGAATG GA
42

(2) SEQ ID NO: 18的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 33个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 18

GAATTCGTTA ACTTCCCTCA GATCACTCTT TGG

33

(2) SEQ ID NO: 19的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

GTAAACGTCG ACTTGTTTCAT TTCCTCCAAT

30

(2) SEQ ID NO: 20的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 55个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

GAATTCCGAT CGACAAGGAA CTGTATCCTT TAACTTCCCT CAGATCACTC
TTTGG 55

(2) SEQ ID NO: 21的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 52个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 21:

GTTAACGGAT CCCAGCACTG ACTAATTTAT CTACTTG TTC ATTCCTCCA AT
52

(2) SEQ ID NO: 22的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 33个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 22:

GAATTCGTTA ACTTCCCTCA RATCMCTCTT TGG
33

(2) SEQ ID NO: 23的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 23:

GTTAACGTCG ACTTKYTCAT TTCCTCCWAT
30

(2) SEQ ID NO: 24的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 55个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 24:

GAATTCCGAT CGACAAGGAA CTGTATCCTT TAACTTCCCT CARATCMCTC
TTTGG 55

(2) SEQ ID NO: 25的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 52个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 25:

GTTAACGGAT CCCAGCACTG ACTAATTTAT CTACTTKYTC ATTCCTCCW AT
52

(2) SEQ ID NO: 26的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 36个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 26:

ATCTCTTACC TGTCCTATCT AACAGGCCAG GATTAA
36

(2) SEQ ID NO: 27的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 35个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 27:

GAATTCTCGC GACCACCATG GCGCGTTCAA CGCTC

(2) SEQ ID NO: 28的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 28:

GTTAACAGAT CTTTCATGGCT CGTACTCTAT

30

(2) SEQ ID NO: 29的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 72个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

GAATTCGCGC GCAAGCGGCC GCAACCCGGG AAAAGCTTAA GCATGCAACC
CGGGAAGAAT TCAATCGCGA AA 72

(2) SEQ ID NO: 30的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 72个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

GTTAACGCGC GCTTCTCGAG TTGCGGCCGC TTGCTAGCTT AGATCTTTGG
GCCCTTTCGC GATTGAATTC TT 72

(2) SEQ ID NO: 31的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

GAATTCAAGC TTGGCCATTG CATACGTTGT
30

(2) SEQ ID NO: 32的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 24个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 32:

GTTAACGCAT GCATAAGAAG CCAA
24

(2) SEQ ID NO: 33的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 33:

GAATTCGCAT GCTCCCCTGC TCCGACCCGG

30

(2) SEQ ID NO: 34的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 34:

GTTAACGAAT TCTCCTGCGG GGAGAAGCAG

30

(2) SEQ ID NO: 35的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 35:

GAATTCAGAT CTGCCATACC ACATTTGTAG

30

(2) SEQ ID NO: 36的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 36:

GTTAACGCTA GCTCCAGACA TGATAAGATA

30

(2) SEQ ID NO: 37的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 37:

GAATTCGCTA GCATCCCGCC CCTAACTCCG

30

(2) SEQ ID NO: 38的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 38:

GTTAACGTCG ACGCAAAAGC CTAGGCCTCC

30

(2) SEQ ID NO: 39的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 24个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 39:

GAATTCTCGC GAACAGTTGG CCCT

24

(2) SEQ ID NO: 40的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 40:

GTAACTGAT CTTTACGCGA ACGCGAAGTC

30

(2) SEQ ID NO: 41的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 66个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 41:

GTAAACGAAT TCTTGCAAAA AGCTTTGCAA GATGGATAAA GTTTTTAGAA
ACTCCAGTAG GACTCC 60

(2) SEQ ID NO: 42的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 63个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 42:

GAATTCTCGC GATCTAGACG TTCTACCTTT CTCTTCTTTT TTGGAGGAGT
CCTACTGGAG TTT 63

(2) SEQ ID NO: 43的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 35个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 43:

GTTAACGAAT TCCCACCATG ATTGAACAAG ATGGA
35

(2) SEQ ID NO: 44的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 30个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 44:

GAATTCAGAT CTTCAGAAGA ACTCGTCAAG
30

(2) SEQ ID NO: 45的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 39个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 45:

CCCCGTGCCA AGAGTGACTA CGTAAGTACC GCCTATAGA

39

(2) SEQ ID NO: 46的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 39个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 46:

CTCTGCTTCT CCCCGCAGCT GGAGAATTCA ATCGCGAAA

39

(2) SEQ ID NO: 47的资料:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 35个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

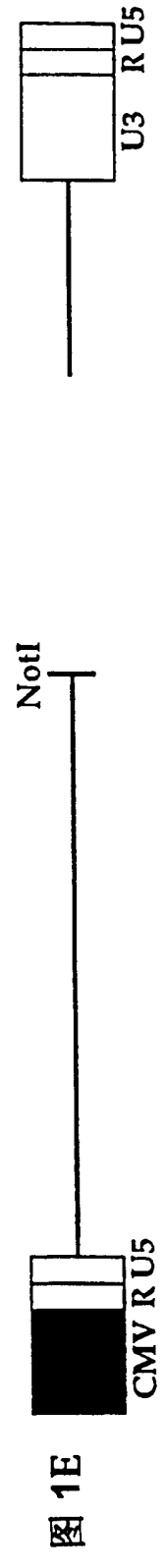
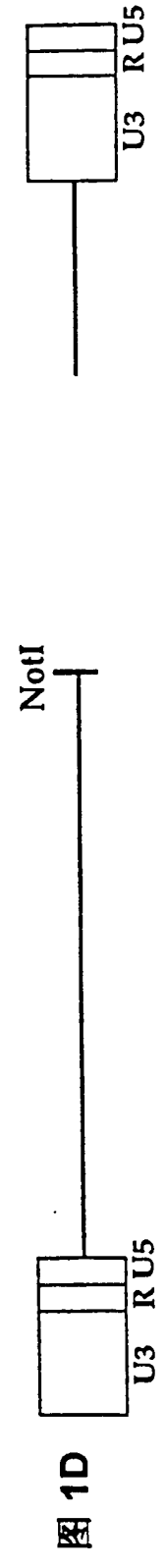
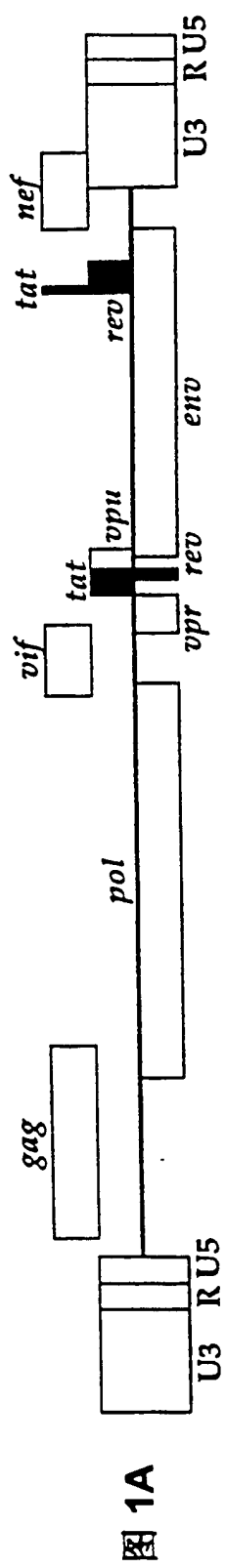
(D) 几何结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 序列描述: SEQ ID NO: 47:

GTTAACGAAT TCCCACCATG AACACGATTA ACATC

35



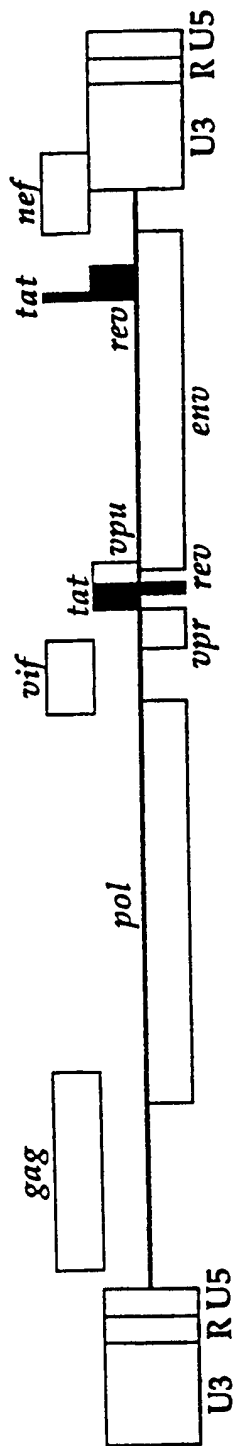


图 2A

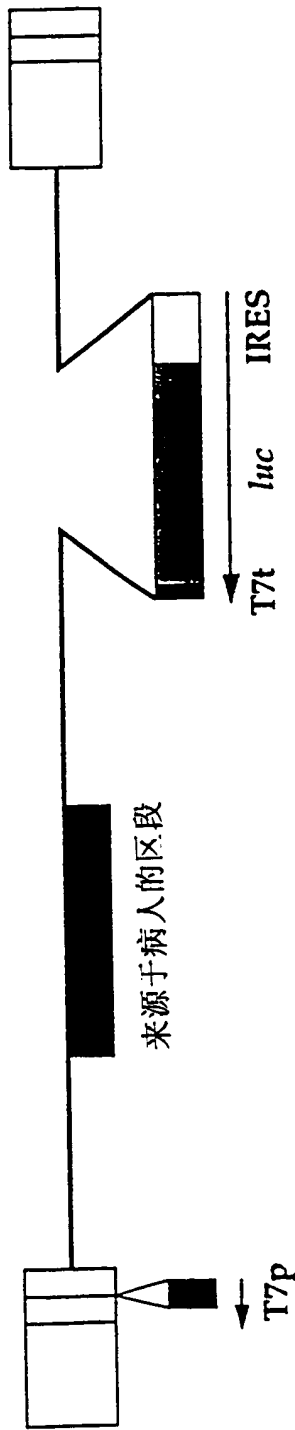


图 2B

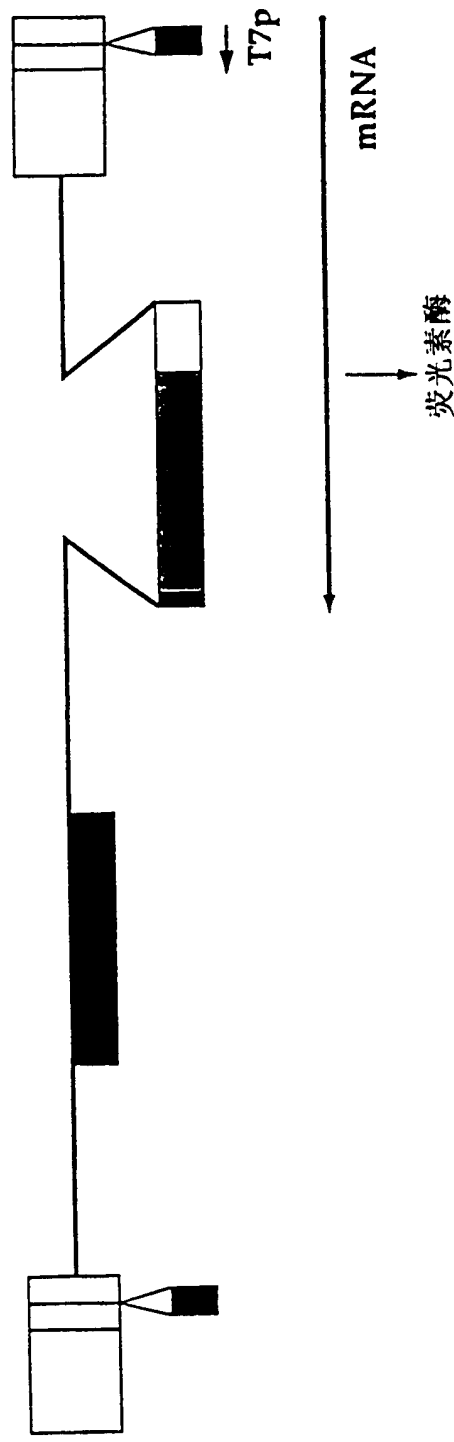
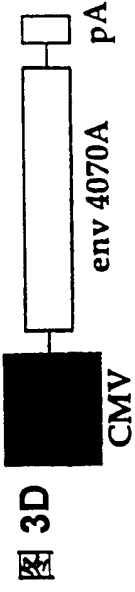
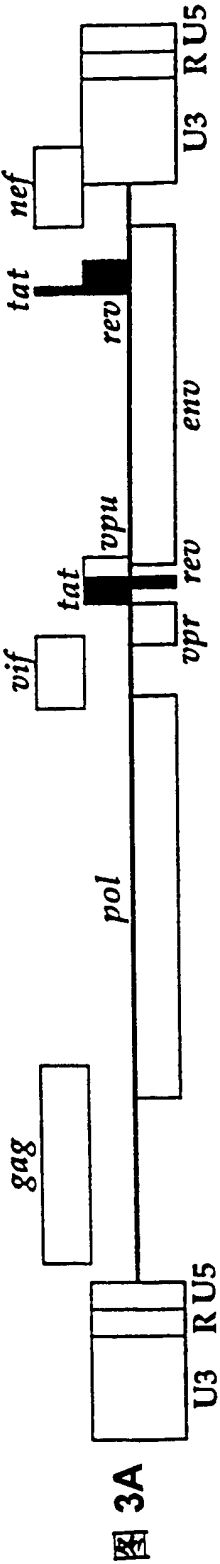
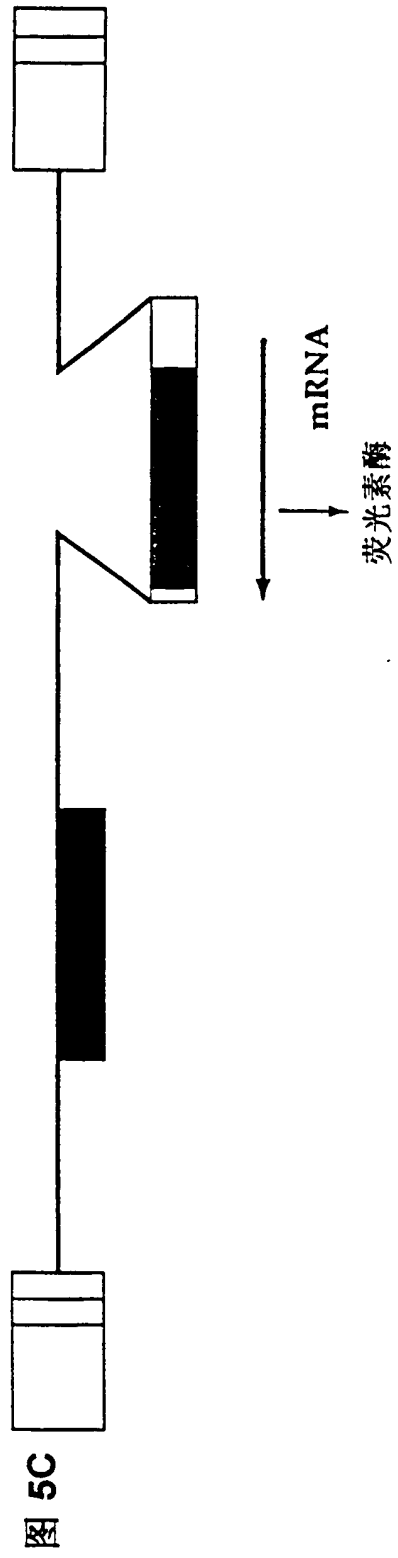
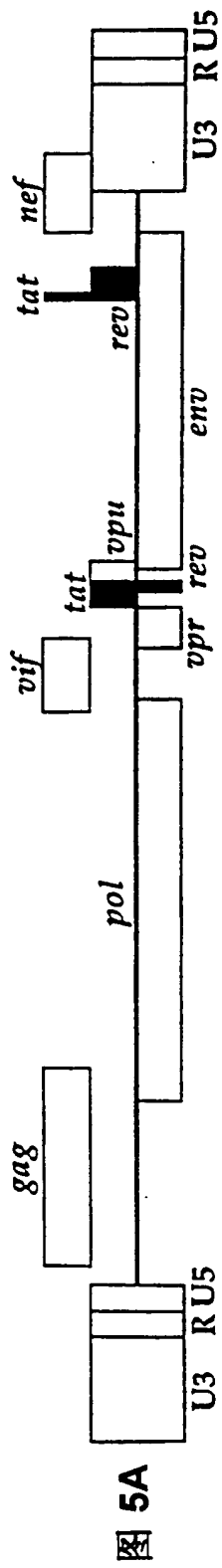
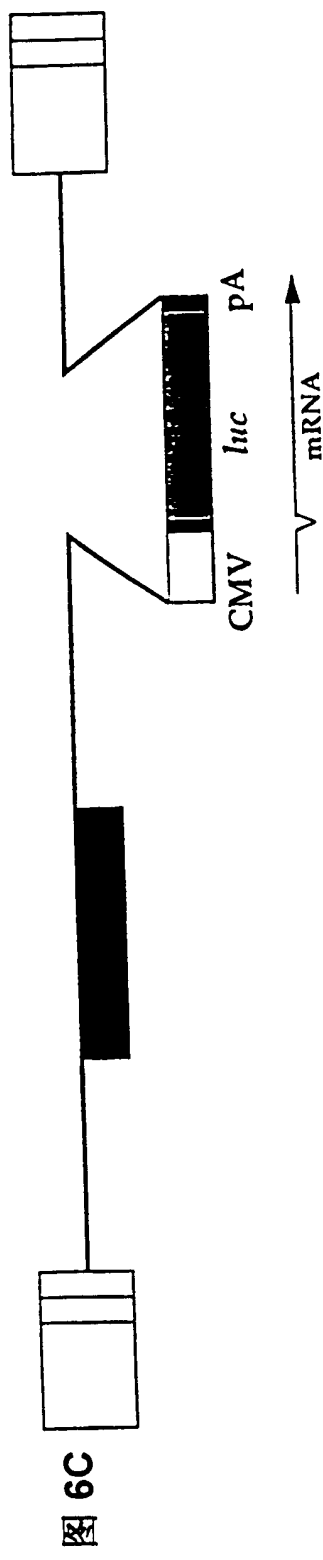
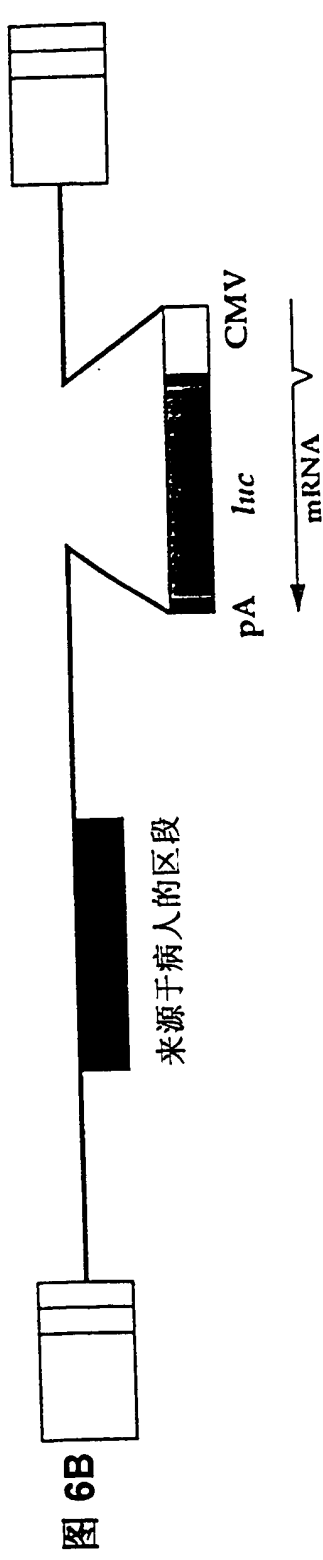
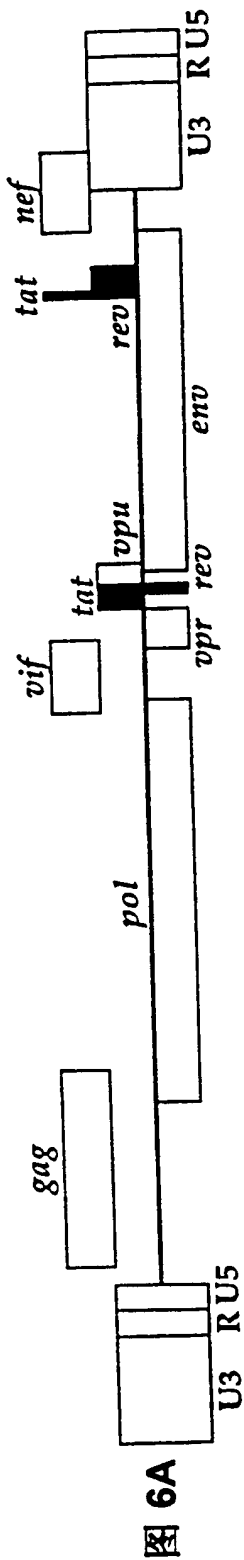
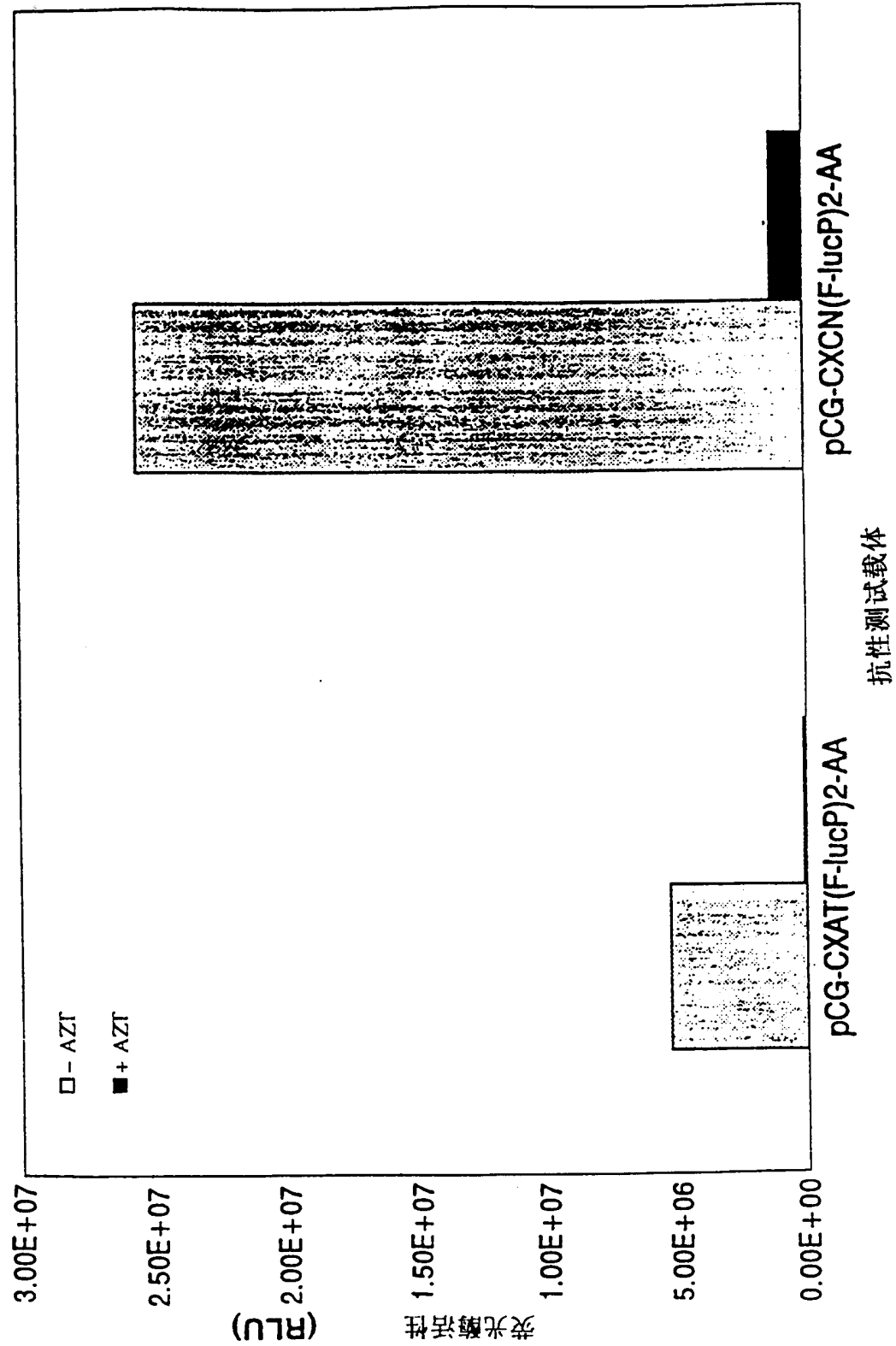


图 2C









抗性测试载体

图 7A

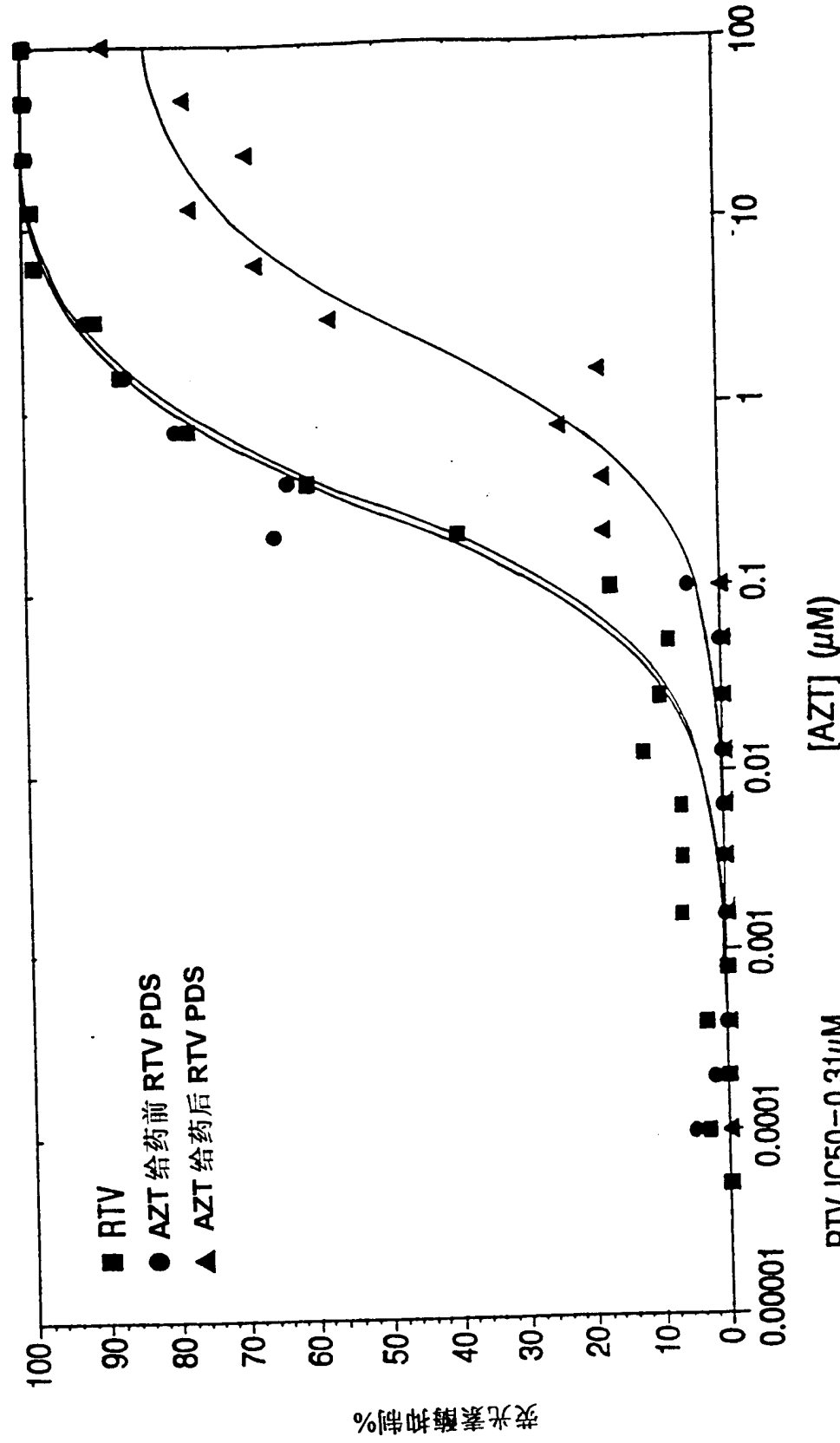


图 7B

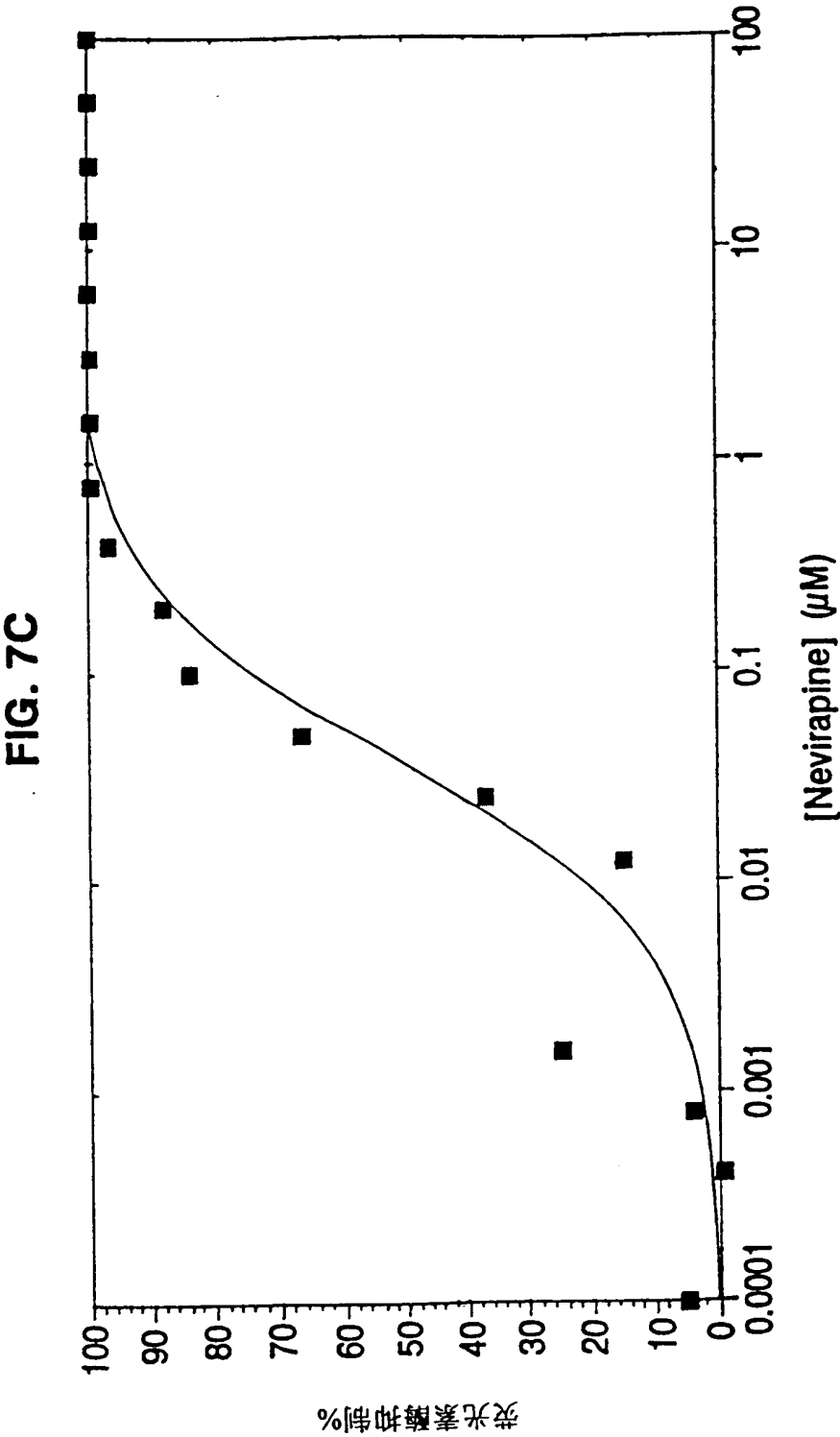


图 7C

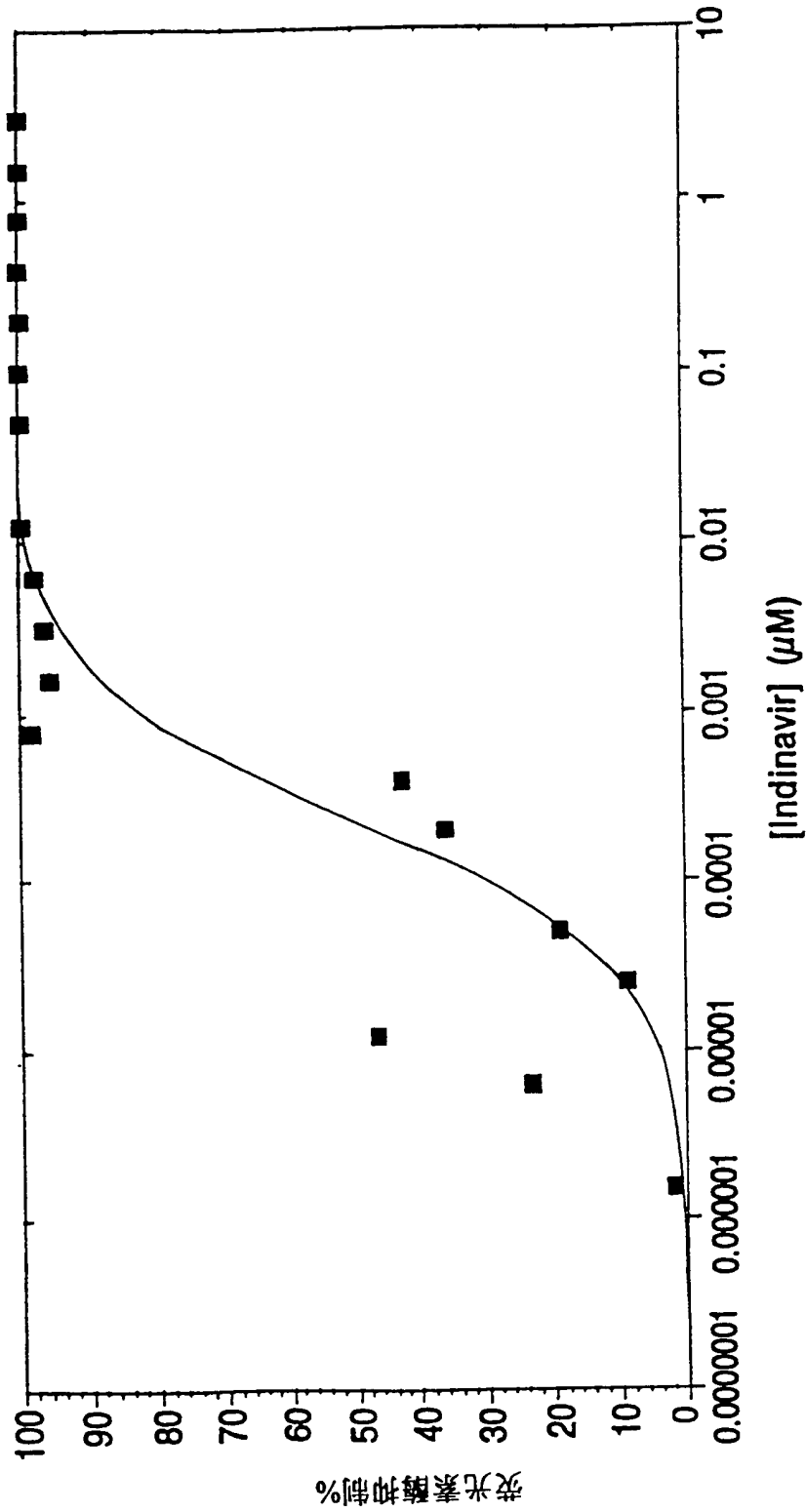


图 7D

图 8A

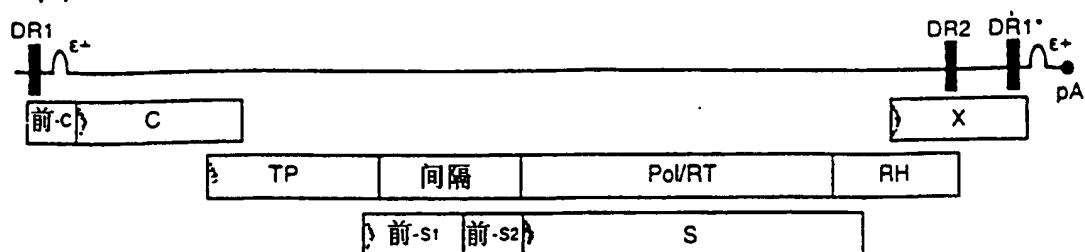


图 8B

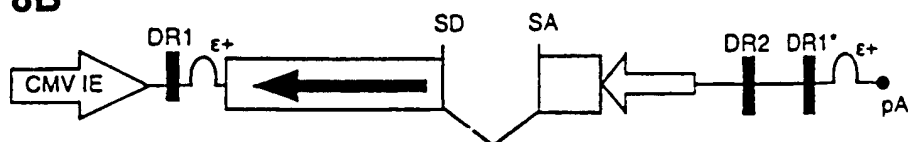


图 8C

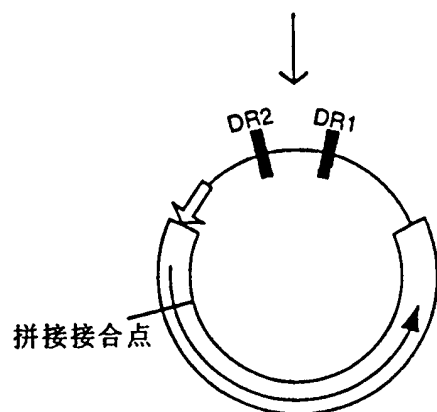


图 8D

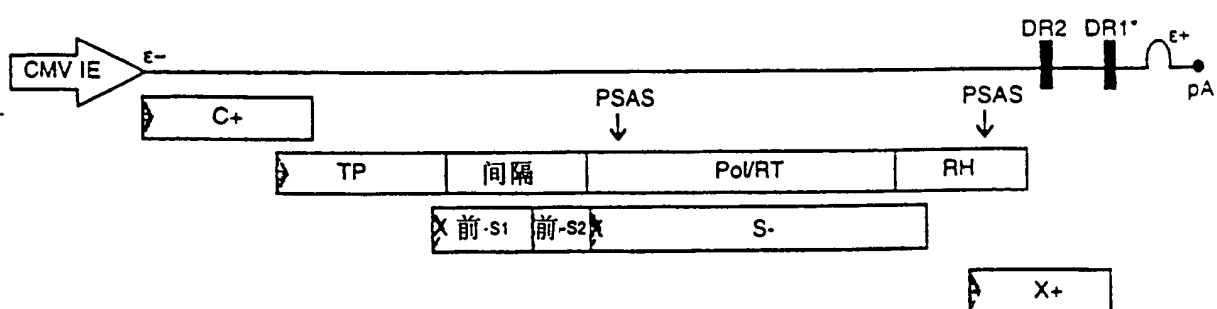
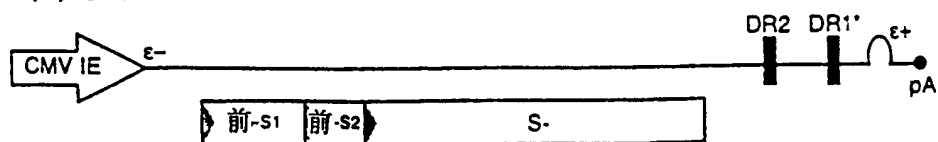
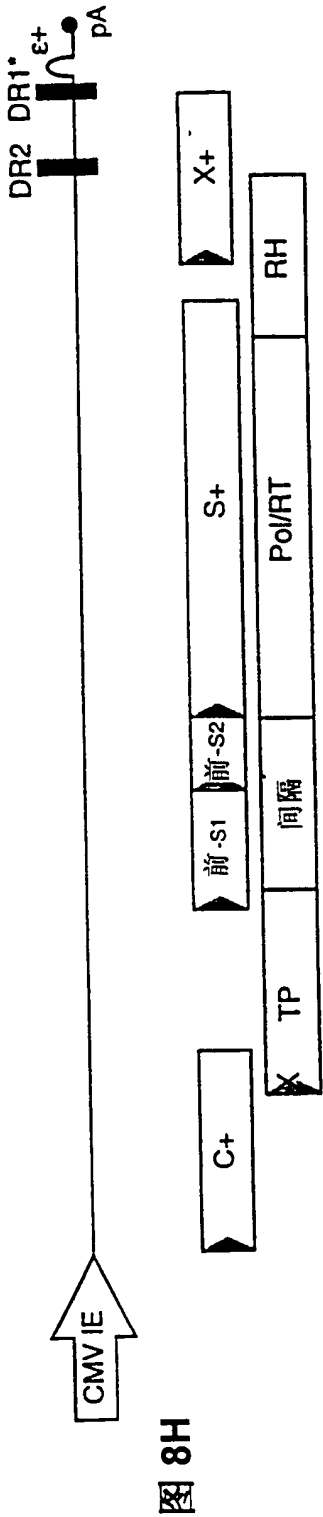
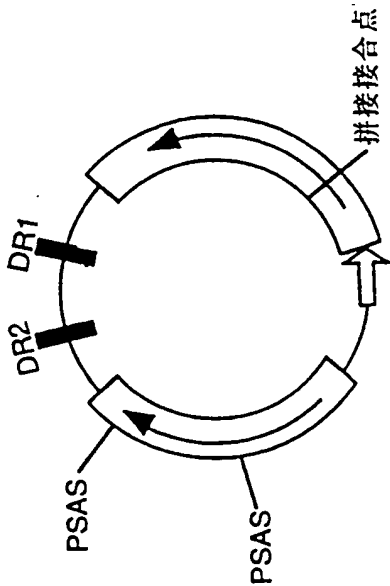
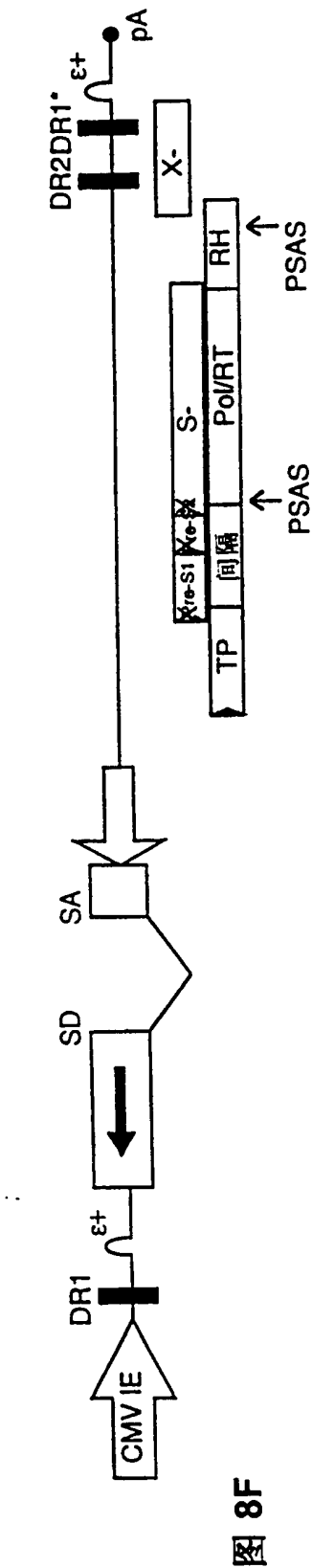
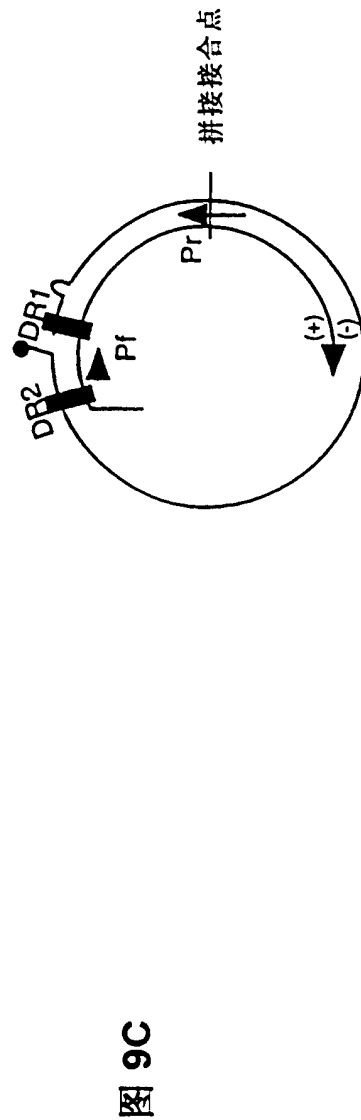
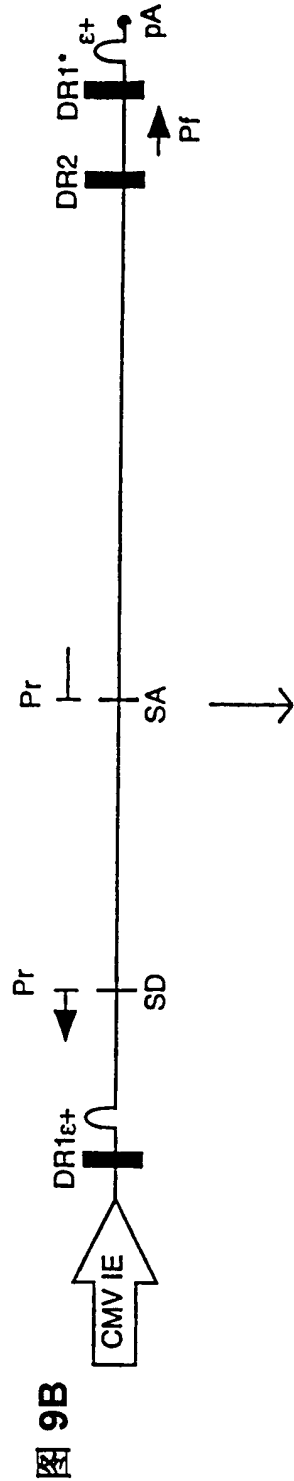
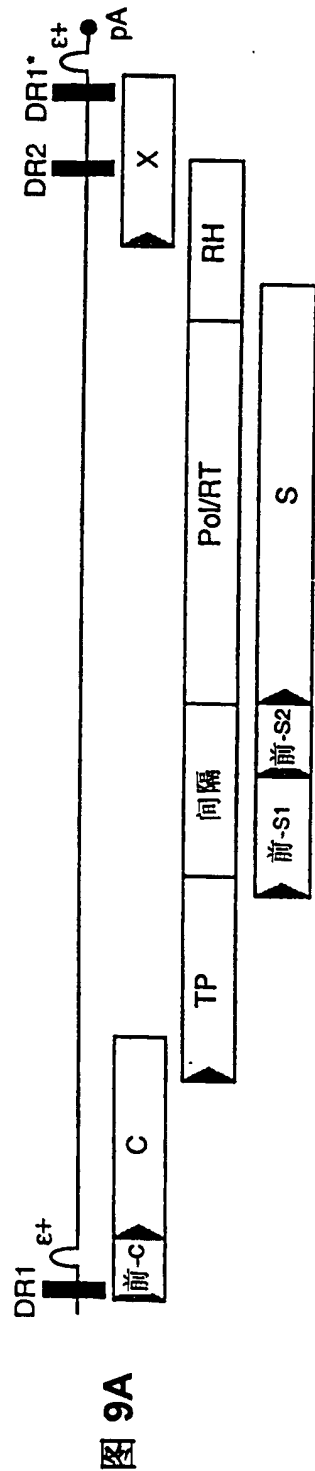


图 8E







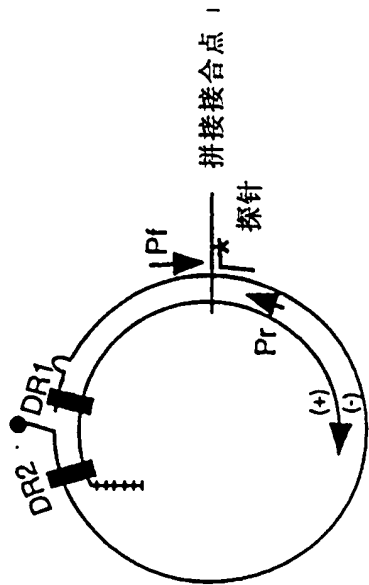
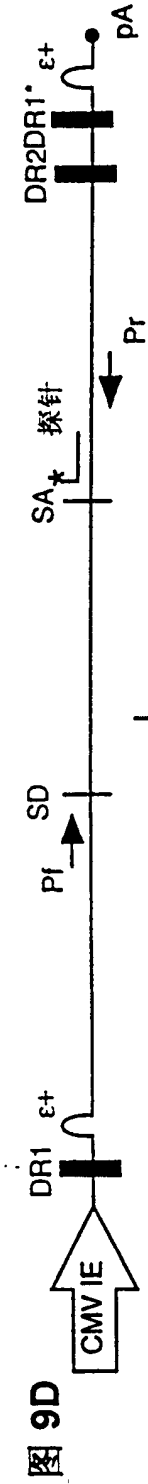


图 9E

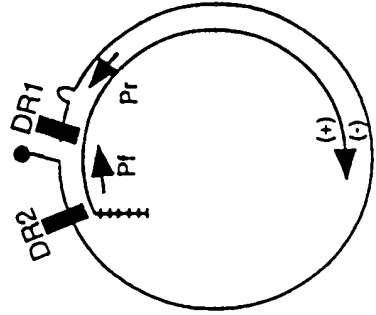
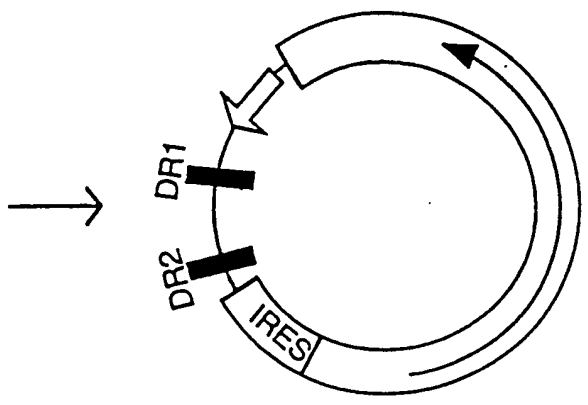
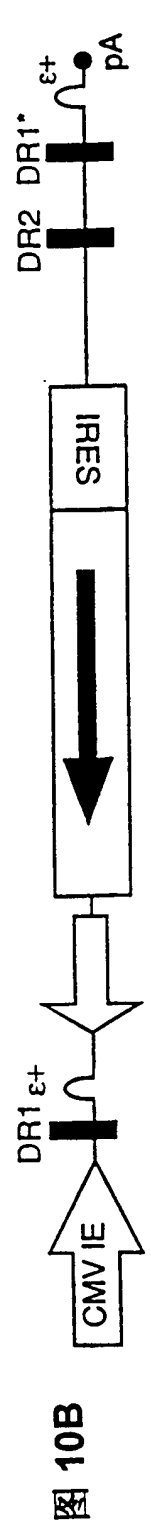
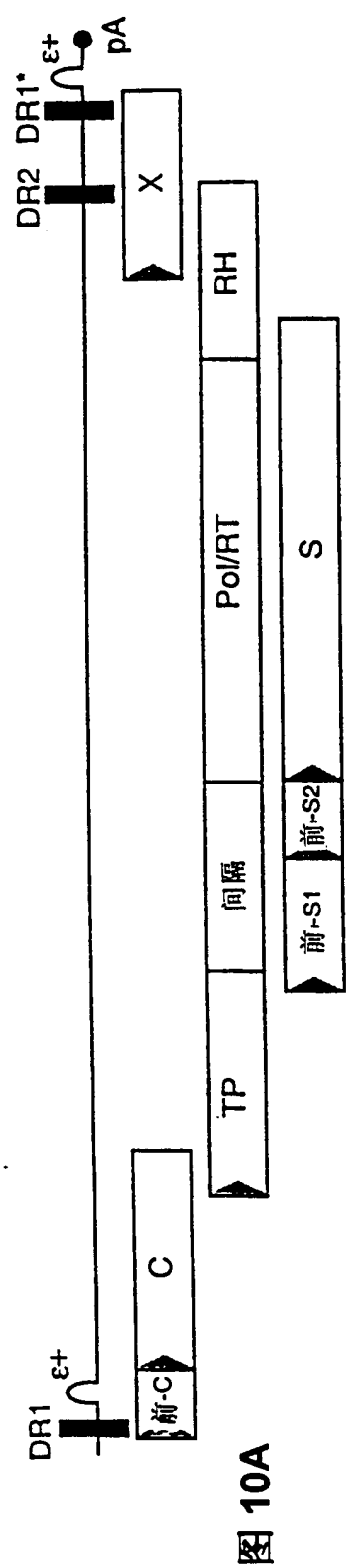
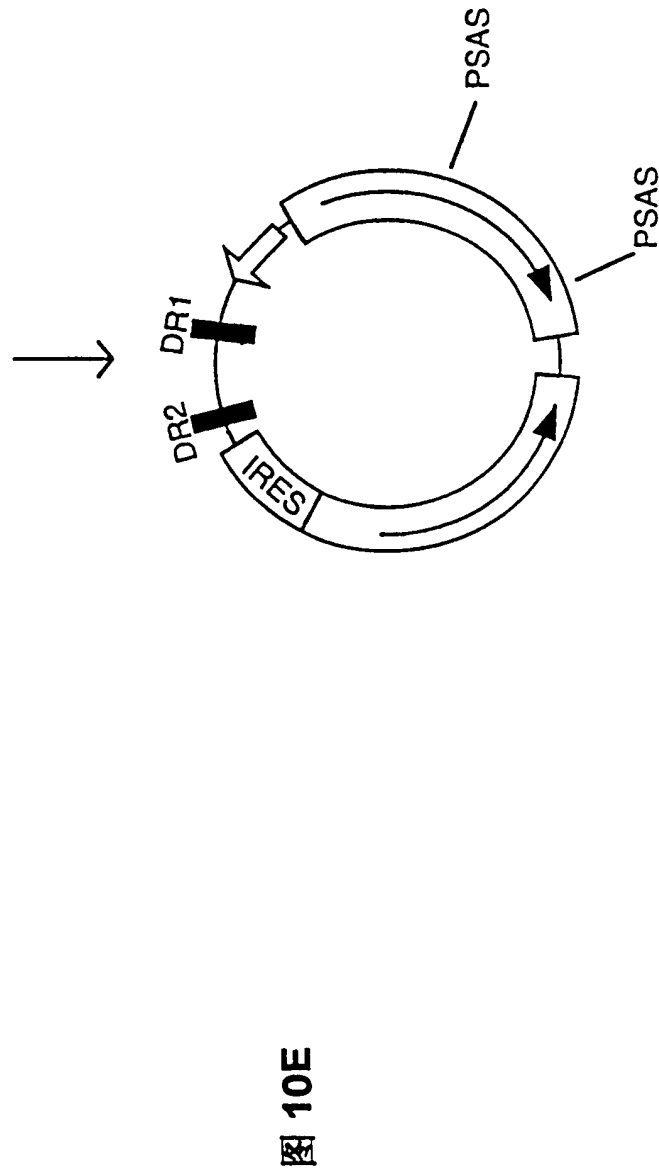
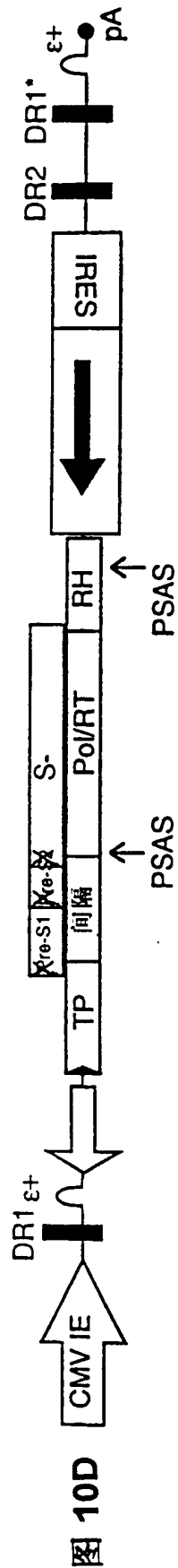
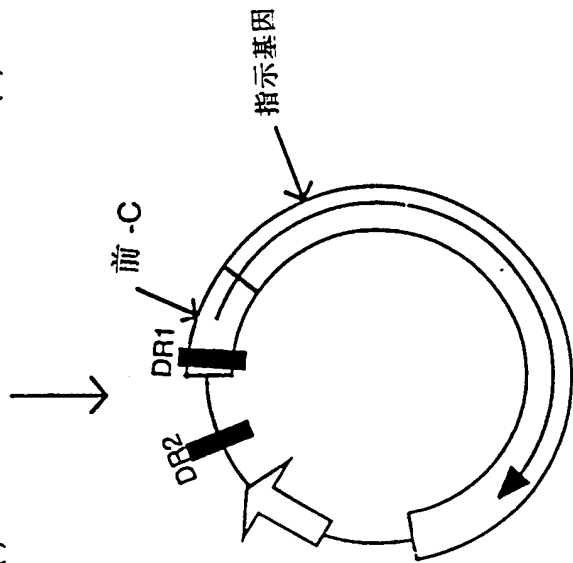
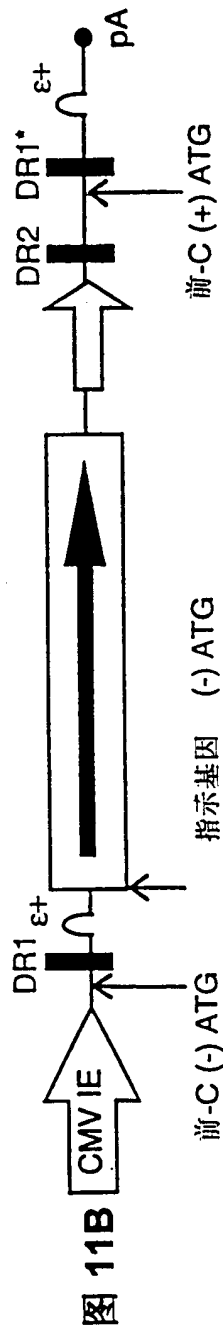
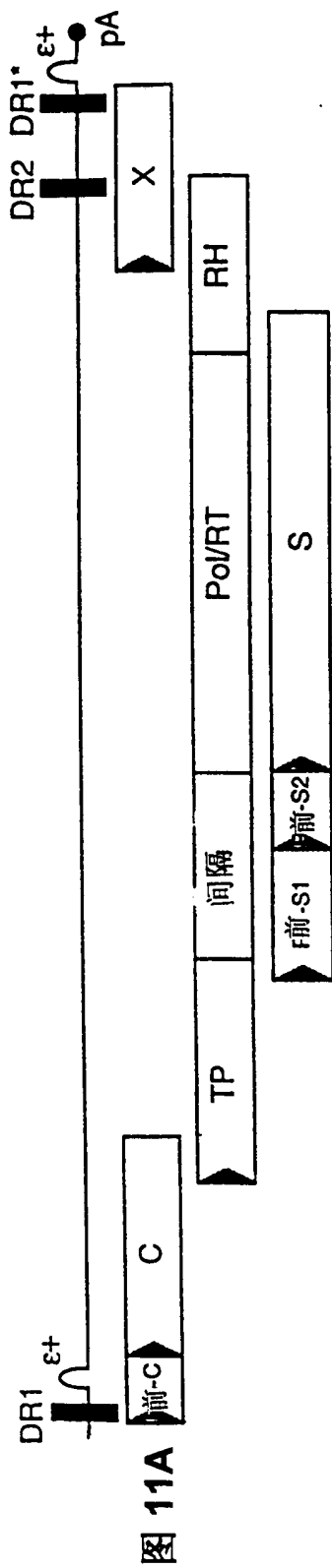
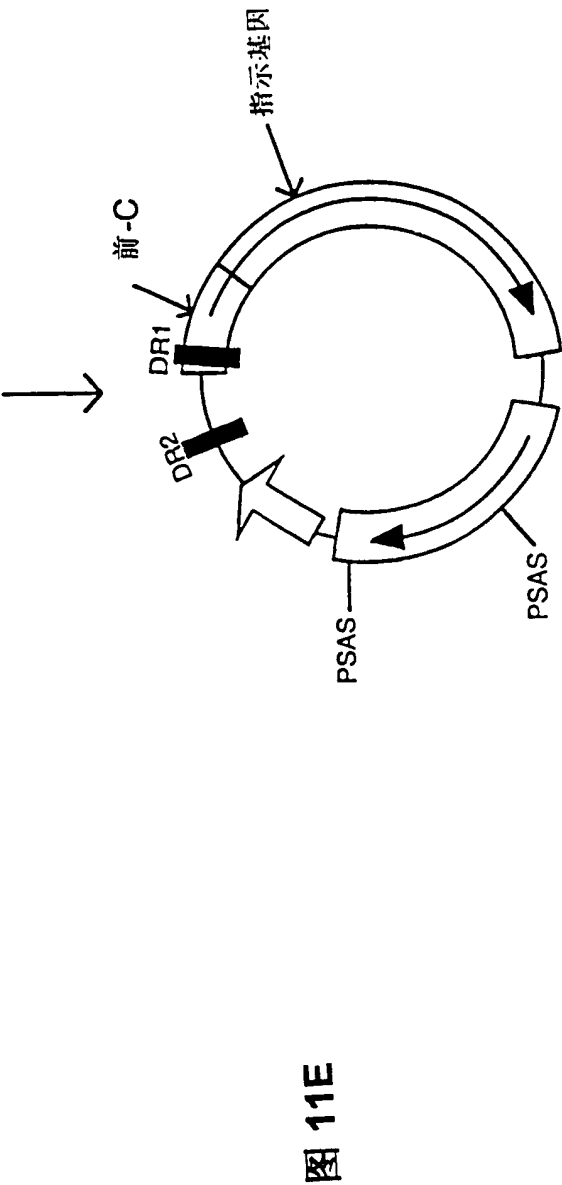
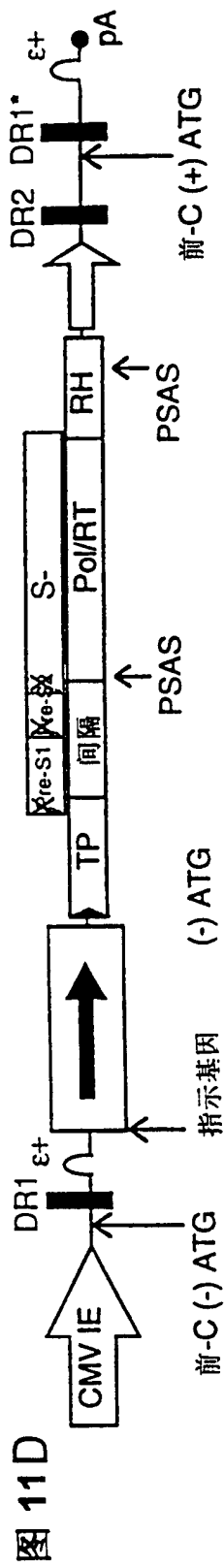


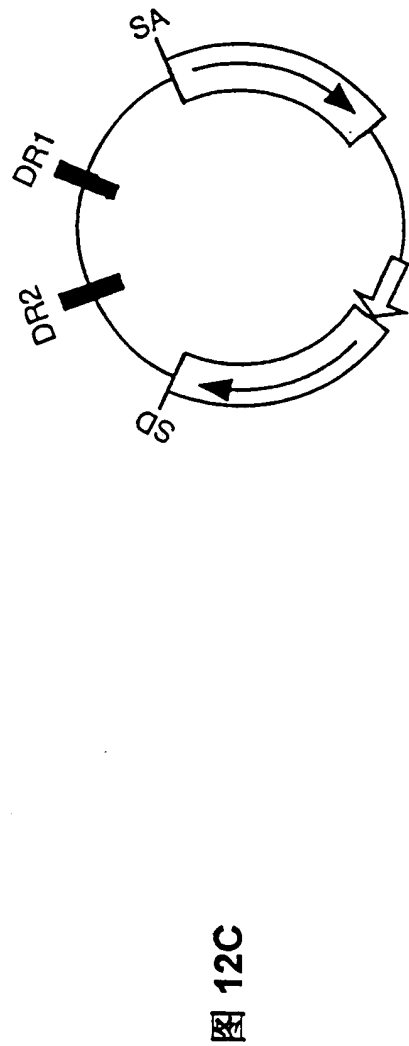
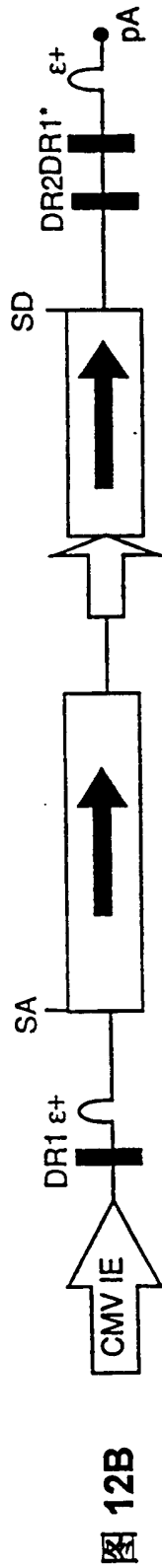
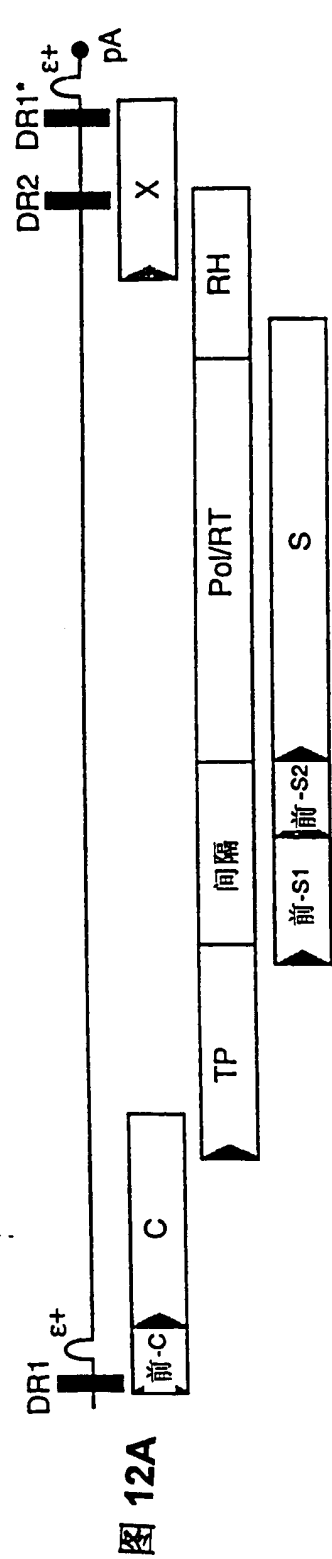
图 9G











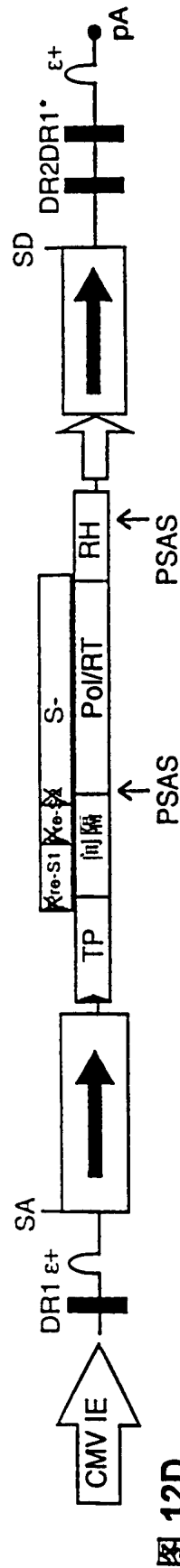


图 12D

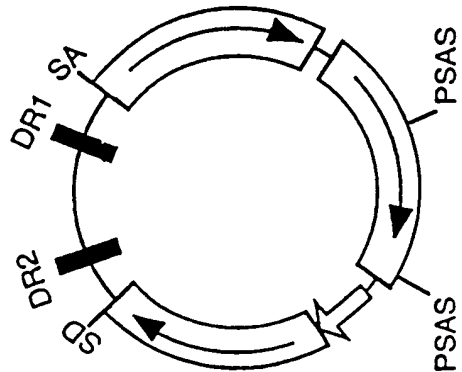


图 12E

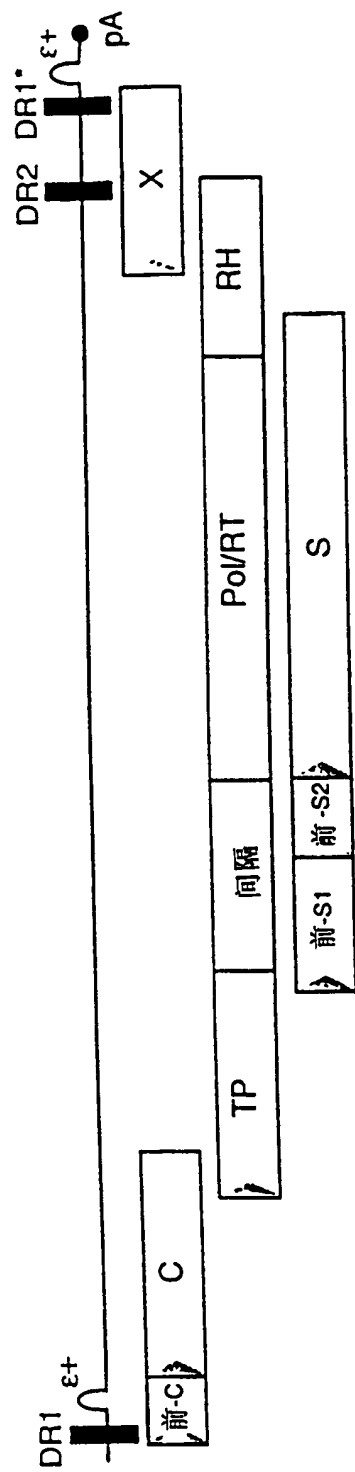


图 13A



图 13B

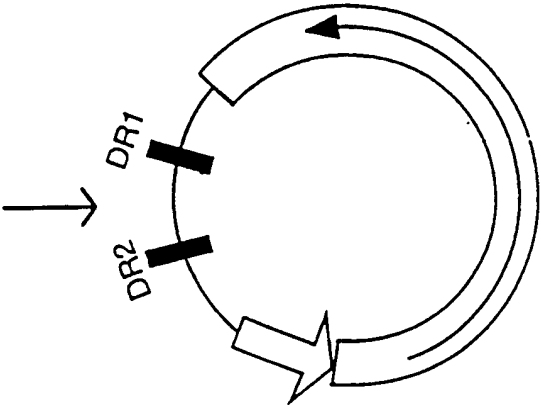


图 13C

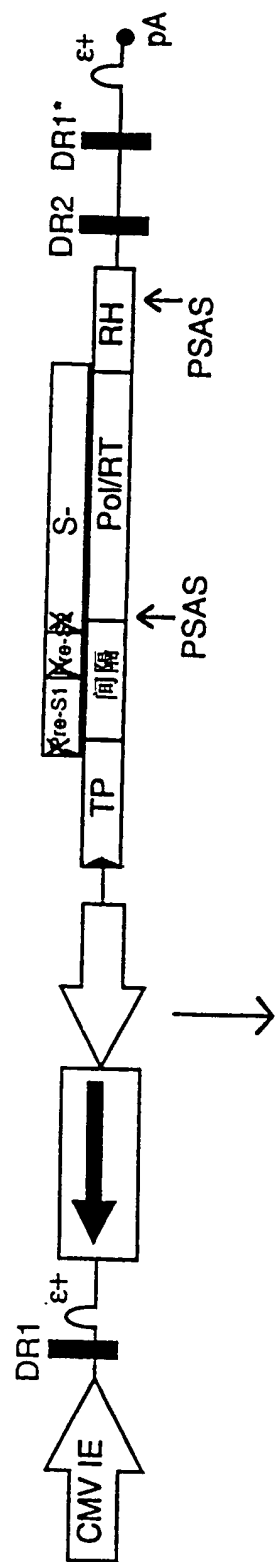


图 13D

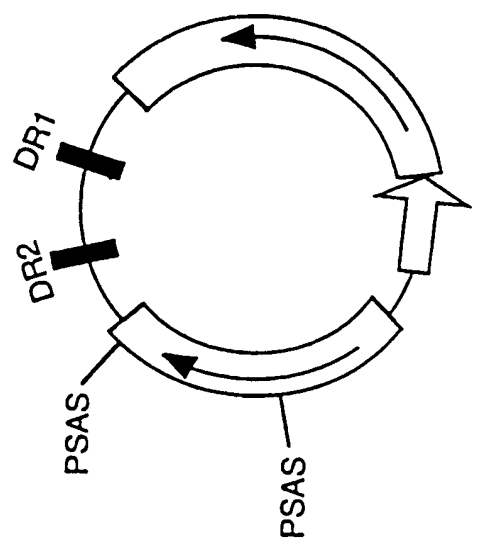


图 13E