



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년12월15일

(11) 등록번호 10-0537153

(24) 등록일자 2005년12월09일

(21) 출원번호 10-1998-0705851

(65) 공개번호 10-1999-0082129

(22) 출원일자 1998년07월29일

(43) 공개일자 1999년11월15일

심사청구일자 2002년01월29일

번역문 제출일자 1998년07월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US1997/001609

(87) 국제공개번호 WO 1997/27319

국제출원일자 1997년01월29일

국제공개일자 1997년07월31일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장

08/593,009

1996년01월29일

미국(US)

(73) 특허권자

바이럴러직, 인코퍼레이티드

미국 캘리포니아 94080 사우스 샌 프란시스코 이스트 그랜드 애비뉴 270

(72) 발명자

케이폰, 대니얼, 제이.

미국 캘리포니아 94010 힐스버로우 우드리지 로드 90

페트로폴로우스, 크리스토스, 존

미국 캘리포니아 94019 하프 문 베이 가르시아 애비뉴 415

(74) 대리인

김용인

심창섭

심사관 : 김희수

전체 청구항 수 : 총 121 항

(54) 항바이러스약품감수성및내성그리고항바이러스약물의스크리닝을결정하는방법및조성물

(57) 요약

본 발명은 항바이러스성 약품에 대한 감수성을 측정하는 새로운 테스트 방법을 제공하며, 이러한 테스트 방법은 (a)환자로부터 유도된 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 지시 유전자의 발현을 측정하는 단계와; (d) 항바이러스성 약품이 없는 상태에서 상기 (a)-(c)단계를 수행하여 측정된 지시 유전자의 발현과 상기 (c)단계의 지시 유전자의 발현을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항바이러스성 약품의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다. 또한 본 발명은 환자의 항바이러스성 약품의 내성을 측정하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 후보 항바이러스성 약물의 화합물의 생물학적 효과를 평가하는 방법을 제공한다. 환자로부터 유도된 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터 및 내성 테스트 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) 항HIV 또는 항HBV 약물의 존재하에서, 환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하고 상기 지시 유전자의 발현이 상기 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포에서 상기 지시 유전자의 발현의 양을 측정하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 측정된 상기 지시 유전자의 발현의 양을 상기 지시 유전자의 참고 양과 비교하고, 이때 상기 발현의 참고 양에 대한 단계 (b)에서 측정된 상기 지시 유전자의 발현의 양 사이의 차이는 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성과 관련이 있기 때문에 그것에 의하여 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 단계를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분절이 기능적 바이러스의 서열을 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분절이 항HIV 또는 항HBV 약물의 표적인 하나의 단백질을 코딩하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분절이 항HIV 또는 항HBV 약물의 표적인 두 개 이상의 단백질을 코딩하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분질이 레트로바이러스 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 6.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분질이 HIV 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 7.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분질이 HIV *gag-pol* 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 8.

제 1 항에 있어서,

상기 지시 유전자는 기능적 지시 유전자이고, 상기 방법은 제1항의 방법에서의 단계 (a) 전에, 상기 숙주 세포를, 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 포함하는 세포 배양의 여과된 상청액으로부터 제조된 내성 테스트 벡터 바이러스 입자로 감염시키는 단계를 더 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 9.

제 1 항에 있어서,

상기 지시 유전자는 비기능적 지시 유전자인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 10.

제 1 항에 있어서,

상기 지시 유전자가 루시페라제 유전자인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 11.

제 1 항에 있어서,

상기 지시 유전자가 lacZ 유전자인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 12.

제 1 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 인간 T 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 13.

제 1 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 인간 T 세포 백혈병 세포주로부터 유래되는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 14.

제1항에 있어서,

상기 숙주 세포가 Jurkat 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 15.

제 1 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 H9 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 16.

제 1 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 CEM 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 17.

(a) HIV-LTR U3 영역 또는 제1의 CMV IE 인핸서-프로모터;

(b) HIV-LTR R 및 U5 영역;

(c) 환자유래 분절을 포함하는 하나 이상의 HIV 유전자의 코딩 영역;

(d) 그 발현이 상기 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 지시 유전자; 및

(e) 3' HIV-LTR을 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 18.

제 17 항에 있어서,

상기 환자유래 분절이 두 개 이상의 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 19.

제 17 항에 있어서,

상기 환자유래 분절이 HIV *gag-pol* 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 20.

제 17 항에 있어서,

상기 지시 유전자가 기능적 지시 유전자인 내성 테스트 벡터.

청구항 21.

제 17 항에 있어서,

상기 지시 유전자는 루시페라제 유전자인 내성 테스트 벡터.

청구항 22.

제 17 항의 내성 테스트 벡터를 포함하는 패키지 숙주 세포.

청구항 23.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 포유류 숙주 세포인 패키지 숙주 세포.

청구항 24.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 인간 숙주 세포인 패키지 숙주 세포.

청구항 25.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 인간 배 신장 세포인 패키지 숙주 세포.

청구항 26.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 293 세포인 패키지 숙주 세포.

청구항 27.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 인간 간암 세포주로부터 유래되는 패키지 숙주 세포.

청구항 28.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 HepG2 세포인 패키지 숙주 세포.

청구항 29.

제 22 항에 있어서,

상기 패키지 숙주 세포가 Huh7인 패키지 숙주 세포.

청구항 30.

(a) 항HIV 또는 항HBV 약물의 존재하에서, 환자유래 분절과 비기능적 지시 유전자를 포함하는 상기 비기능적 지시 유전자의 발현은 상기 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포에서 상기 비기능적 지시 유전자의 발현의 양을 측정하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 측정된 상기 비기능적 지시 유전자의 발현의 양을 상기 비기능적 지시 유전자의 참고 양과 비교하여, 이 때 (c) 단계에서 측정된 참고 양에 대한 단계 (b)에서 측정된 상기 비기능적 지시 유전자의 발현의 양 사이의 차이는 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성과 관련이 있기 때문에 그것에 의하여 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 단계를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 31.

제 30 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 하나의 단백질을 코딩하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 32.

제 30 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 두 개 이상의 단백질을 코딩하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 33.

제 30 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 레트로바이러스 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 34.

제 30 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 HIV 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 35.

제 30 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 HIV *gag-pol* 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 36.

제 30 항에 있어서,

상기 비기능적 지시 유전자는 루시페라제 유전자인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 37.

제 30 항에 있어서,

상기 비기능적 지시 유전자는 치환된(permuted) 프로모터인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 38.

제 30 항에 있어서,

상기 비기능적 지시 유전자는 치환된 코딩 영역(permuted coding region)을 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 39.

제 30 항에 있어서,

상기 비기능적 지시 유전자는 역전 인트론을 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 40.

제 30 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 인간 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 41.

제 30 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 인간 T 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 42.

제 30 항에 있어서,

상기 방법이 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 포함하는 세포 배양의 여과된 상청액으로부터 제조된 내성 테스트 벡터 바이러스 입자로 상기 숙주 세포를 감염하는 단계를 더 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 43.

제 30 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 내성 테스트 벡터 숙주 세포로 배양되어지는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 44.

(a) 제 1 항의 방법에 따라 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 단계; 및

(b) 단계 (a)에서 측정된 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 상기 바이러스의 감수성의 표준 곡선과 비교하는 단계를 포함하고,

상기 표준 곡선에 관한 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성의 감소는 바이러스가 항HIV 또는 항HBV 약물에 내성이 있다는 것을 가리키고, 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성의 상기 감소의 양은 상기 바이러스가 항HIV 또는 항HBV 약물에 내성이 있는 정도를 가리키는 환자를 감염시키는 바이러스의 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 내성을 측정하는 방법.

청구항 45.

(a) 제 45 항의 방법에 따라 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 단계; 및

(b) 단계 (a)에서 측정된 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 상기 바이러스의 감수성의 표준 곡선과 비교하는 단계를 포함하고,

상기 표준 곡선에 관한 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성의 감소는 바이러스가 항HIV 또는 항HBV 약물에 내성이 있다는 것을 가리키고, 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성의 상기 감소의 양은 상기 바이러스가 항HIV 또는 항HBV 약물에 내성이 있는 정도를 가리키는 환자를 감염시키는 바이러스의 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 내성을 측정하는 방법.

청구항 46.

(a) 처음에 제1항의 방법에 따라 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 환자를 감염시키는 바이러스의 감수성을 측정하는 단계, 여기서 환자유래 분절은 이때 환자에게서 얻어진 것이며;

(b)나중 두 번째에 상기 단계 (a)에서 수행한 것처럼 항HIV 또는 항HBV 약물의 감수성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (a) 및 상기 단계 (b)에서 측정된 항HIV 또는 항HBV 약물의 감수성을 비교하는 단계를 포함하고,

처음과 비교하여 나중 두 번째의 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성의 감소는 환자를 감염시키는 바이러스에서 항HIV 또는 항HBV 약물 내성의 발달 또는 진행을 가리키는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 환자를 감염시키는 바이러스의 내성의 발달 또는 진행을 측정하는 방법.

청구항 47.

(a) 처음에 제45항의 방법에 따라 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 환자를 감염시키는 바이러스의 감수성을 측정하는 단계, 여기서 환자유래 분절은 이때 환자에게서 얻어진 것이며;

(b) 나중 두 번째에 상기 단계 (a)에서 수행한 것처럼 항HIV 또는 항HBV 약물의 감수성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (a) 및 상기 단계 (b)에서 측정된 항HIV 또는 항HBV 약물의 감수성을 비교하는 단계를 포함하고,

처음과 비교하여 나중 두 번째의 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성의 감소는 환자를 감염시키는 바이러스에서 항HIV 또는 항HBV 약물 내성의 발달 또는 진행을 가리키는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 환자를 감염시키는 바이러스의 내성의 발달 또는 진행을 측정하는 방법.

청구항 48.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 P 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 49.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 HBV 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 50.

제 1 항에 있어서,

상기 환자유래 분질은 HBV DNA 중합효소 유전자를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 51.

(a) 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 존재하에서, 환자유래 분질과 지시 유전자를 포함하고 상기 지시 유전자의 발현은 상기 환자유래 분질에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포에서 상기 지시 유전자의 발현의 양을 측정하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 측정된 상기 지시 유전자의 발현의 양을 상기 지시 유전자의 참고 양과 비교하는 단계를 포함하고,

단계 (b)에서 측정된 양에 대한 단계 (c)에서 측정된 상기 지시 유전자의 발현의 양 사이의 차이는 상기 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 유효성과 관련이 있기 때문에 그것에 의하여 상기 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 유효성을 측정하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 52.

제 51 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 상기 환자유래 분질 및 상기 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 53.

제 52 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HIV의 DNA를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 54.

제 52 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 헤파드나 바이러스의 DNA를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 55.

제 52 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HBV의 DNA를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 56.

제 52 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HIV *gag-pol*을 코딩하는 DNA를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 57.

제 52 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HBV P 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 58.

제 51 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 하나의 단백질을 코딩하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 59.

제 51 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 두 개 이상의 단백질을 코딩하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 60.

제 51 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 레트로바이러스 유전자를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 61.

제 51 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 HIV 유전자를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 62.

제 51 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 헤파드나 바이러스성 유전자를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 63.

제 51 항에 있어서,

상기 환자유래 분절은 HBV 유전자를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 64.

(a) 항HIV 또는 항HBV 약물의 존재하에서, 환자유래 분절과 지시체를 포함하고 상기 지시체의 발현은 상기 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포에서 상기 지시체의 발현의 양을 측정하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 측정된 상기 지시체의 발현의 양을 상기 지시체의 참고 양과 비교하는 단계를 포함하고,

단계 (c)에서 측정된 양에 대한 단계 (b)에서 측정된 상기 지시체의 발현의 양 사이의 차이는 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성과 관련이 있기 때문에 그것에 의하여 상기 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 65.

제 64 항에 있어서,

상기 지시체는 DNA 구조를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 66.

제 64 항에 있어서,

상기 지시체는 RNA 구조를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 67.

(a) 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 존재하에서, 환자유래 분절과 지시체를 포함하고 상기 지시체의 발현은 상기 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 숙주 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포에서 상기 지시체의 발현의 양을 측정하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 측정된 상기 지시체의 발현의 양을 상기 지시체의 참고 양과 비교하는 단계를 포함하고,

단계 (b)에서 측정된 양에 대한 단계 (c)에서 측정된 상기 지시체의 발현의 양 사이의 차이는 상기 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성과 관련이 있기 때문에 그것에 의하여 상기 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 68.

제 67 항에 있어서,

상기 지시체는 DNA 구조를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 69.

제 67 항에 있어서,

상기 지시체는 RNA 구조를 포함하는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 70.

제 1 항에 있어서,

상기 지시 유전자의 발현의 상기 참고 양은 상기 항HIV 또는 항HBV 약물이 없을 때 제1항의 방법을 수행함으로써 측정되어지는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 71.

제 1 항에 있어서,

상기 지시 유전자의 발현의 상기 참고 양은 상기 항HIV 또는 항HBV 약물이 없을 때 표준 실험용 바이러스 분절로 제1항의 방법을 수행함으로써 측정되어지는 발현의 양인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 72.

제 1 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 상기 환자유래 분절 및 상기 지시 유전자를 포함하는 내성테스트 벡터를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 73.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 게놈 바이러스 벡터의 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 74.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 서브게놈 바이러스 벡터의 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 75.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 레트로바이러스로부터 유래된 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 76.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HIV로부터 유래된 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 77.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 vif, vpr, tat, rev, vpu, nef 또는 이들의 조합을 코딩하는 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 78.

제 9 항에 있어서,

상기 방법이 상기 숙주 세포를 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 포함하는 세포배양의 여과된 상청액으로부터 제조된 내성 테스트 벡터 바이러스 입자로 감염시키는 단계를 더 포함하고 상기 단계는 제1항의 방법의 단계 (a) 전에 수행되는 항HIV또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 79.

제 9 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 내성 테스트 벡터 숙주 세포와 함께 배양되는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 80.

제 78 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포가 인간 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 81.

제 78 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포가 인간 배 신장 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 82.

제 78 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포가 293 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 83.

제 30 항에 있어서,

상기 지시 유전자의 발현의 참고 양이 상기 항HIV 또는 항HBV 약물이 없을 때 제45항의 방법의 단계 (a), 단계 (b) 및 단계 (c)를 수행함으로써 측정되는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 84.

제 30 항에 있어서,

상기 지시 유전자의 발현의 참고 양은 제45항의 방법을 표준 실험실 바이러스 분절을 가지고 상기 항HIV 또는 항HBV 약물 없이 수행함으로써 측정된 발현의 표준 양인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 85.

제 30 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 상기 환자유래 분절 및 상기 지시 유전자를 포함하는 내성테스트 벡터를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 86.

제 85 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 게놈 바이러스 벡터의 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 87.

제 85 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 서브게놈 바이러스 벡터의 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 88.

제 85 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 레트로바이러스로부터 유래된 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 89.

제 85 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HIV로부터 유래된 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 90.

제 85 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 vif, vpr, tat, rev, vpu, mef 또는 이들의 조합을 코딩하는 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 91.

제 42 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 인간 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 92.

제 42 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 인간 배 신장 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 93.

제 42 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 293 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 94.

제 42 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 인간 간암 세포주로부터 유래된 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 95.

제 42 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 HepG2 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 96.

제 42 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 Huh7 세포인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 97.

제 42 항에 있어서,

상기 숙주 세포 및 상기 내성 테스트 벡터 숙주 세포는 동일한 세포 형태인 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 98.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 헤파드나 바이러스의 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 99.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 HBV의 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 100.

제 72 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 C, P, X, 또는 이들의 조합을 코딩하는 DNA를 포함하는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 101.

제 51 항에 있어서,

상기 지시 유전자의 발현의 상기 참고 양이 상기 항HIV 또는 항HBV 화합물이 없을 때 제88항의 방법의 단계 (a), 단계 (b) 및 단계 (c)를 수행함으로써 측정되는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 102.

제 51 항에 있어서,

상기 지시 유전자의 발현의 상기 참고 양이 상기 항HIV 또는 항HBV 화합물이 없을 때 표준 실험실 바이러스 분절을 가지고 제88항의 방법을 수행함으로써 결정되는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 103.

제 52 항에 있어서,

상기 내성 테스트 벡터는 레트로바이러스로부터 유래된 DNA를 포함하는 후보항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 104.

제 64 항에 있어서,

상기 발현의 참고 양은 상기 항HIV 또는 항HBV 약물이 없을 때 제101항의 방법에 따라 측정되어지는 항HIV 또는 항HBV 약물에 대한 바이러스의 감수성을 측정하는 방법.

청구항 105.

제 67 항에 있어서,

상기 발현의 참고 양은 상기 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물이 없을 때 제104 항의 방법에 따라 측정되어지는 후보 항HIV 또는 항HBV 화합물의 생물학적 유효성을 측정하는 방법.

청구항 106.

제 17 항에 있어서,

HIV 유전자의 코딩 영역이 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu 및 nef 유전자를 코딩하는 내성 테스트 벡터.

청구항 107.

제 106 항에 있어서,

지시 유전자가 삭제된 env 유전자의 전체 또는 일부를 대신하는 내성 테스트 벡터.

청구항 108.

제 17 항에 있어서,

HIV 유전자의 코딩 영역이 HIV gag-pol 유전자를 코딩하는 내성 테스트 벡터.

청구항 109.

제 108 항에 있어서,

내성 테스트 벡터가 (1) HIV-LTR R 및 U5 영역; 및 (2) 바이러스 패키징 서열을 포함하는 HIV env 유전자로부터의 RRE 요소를 더 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 110.

제 17 항에 있어서,

지시 유전자는 지시 유전자 카세트의 일부이고 (1) 지시 유전자에 5'인 제2의 CMV 인핸서-프로모터; 및 (2) 지시 유전자에 3'인 SV 40 폴리아데닐레이션 서열을 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 111.

제 110 항에 있어서,

지시 유전자는 바이러스 LTRs 또는 제1의 CMV 인핸서-프로모터의 전사 방향과 반대로 삽입되는 내성 테스트 벡터.

청구항 112.

제 110 항에 있어서,

지시 유전자는 바이러스 LTRs 또는 제1의 CMV 인핸서-프로모터와 동일한 전사 방향으로 삽입되는 내성 테스트 벡터.

청구항 113.

(a) CMV IE 인핸서-프로모터 영역;

(b) DRI 및 5' ε을 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역;

(c) 그 발현이 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자의 활성화에 의존하는 지시유전자;

(d) 환자유래 분절; 및

(e) DR2, DRI*를 포함하는 HBV 게놈, 3' ε 및 3' HBV pA 신호 영역의 3' 영역을 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 114.

제 113 항에 있어서,

환자유래 분절이 둘 이상의 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 115.

제 113 항에 있어서,

환자유래 분절이 HBV P 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 116.

제 113 항에 있어서,

환자유래 분절이 HBV 중합효소 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터.

청구항 117.

제 113 항에 있어서,

지시 유전자가 기능적 지시 유전자인 내성 테스트 벡터.

청구항 118.

제 113 항에 있어서,

지시 유전자가 루시페라제 유전자인 내성 테스트 벡터.

청구항 119.

제 113 항에 있어서,

지시 유전자가 HBV 서열 요소에 반대인 전사 방향으로 삽입되는 내성 테스트 벡터.

청구항 120.

제 113 항에 있어서,

지시 유전자가 HBV 서열 요소와 동일한 전사 방향으로 삽입되는 내성 테스트 벡터.

청구항 121.

제 113 항에 있어서,

내성 테스트 벡터가 C, P, S 및 X 유전자의 일부 또는 전부를 포함하는 내성 테스트 벡터.

명세서

기술분야

본 발명은 바이러스 감염의 치료를 위한 효과적인 약 섭생(regimens)을 확인(identifying)하는데 이용되는 항바이러스 약물의 감수성 및 내성 테스트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 새로운 벡터, 숙주 세포 및 이들 새로운 항바이러스 약물의 감수성 및 내성 테스트를 실시하기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 후보 약물(candidate drugs) 용량이 선택된 바이러스 서열 및/또는 바이러스 단백질을 억제하기 위한 후보 약물의 스크리닝(screening)에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 환자유래 분절(patient-derived segment)과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 먼저 제작하고 나서 내성 테스트 벡터를 숙주 세포에 유입하고, 항바이러스 약물의 존재시 항바이러스 약물의 표적 숙주 세포에서 지시 유전자 산물의 발현 또는 억제를 결정하는 재조합 DNA 기술의 이용에 관한 것이다. 본 발명은 또한 기존의 항바이러스 약물과 비교할 때 뚜렷한 내성 특징을 갖는 항바이러스 약물을 확인하는 수단 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 잠재적인 치료 화합물의 생물학적인 효과의 확인 및 평가를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 다양한 바이러스 질병, 예를 들어, HIV/AIDS 및 간염(hepatitis)을 포함하는 바이러스 질병의 치료를 위한 최적의 치료 섭생을 제공하는데 유용한 약물 감수성 및 내성 테스트에 관한 것이다.

배경기술

바이러스 약물 내성

바이러스 질병의 화학요법 및 화학예방(chemoprophylaxis)을 위한 항바이러스 화합물의 사용은 50년 이상의 항박테리아 항생물질과의 경험과 비교할 때 특히 감염성의 질병 분야에서 비교적 새로운 개발이다. 항바이러스 화합물의 디자인은 바이러스가 다수의 고유의 문제점들을 나타내므로 똑바로 향하는 것이 아니다. 바이러스들은 세포내로(intracellularly) 복제됨에 틀림없고 종종 바이러스 입자의 합성을 위해 숙주 세포 효소, 고분자(macromolecules) 및 세포소기관(organelles)을 사용한다. 따라서, 안전하고 효과적인 항바이러스 화합물은 세포 기능과 바이러스-특이(virus-specific) 기능을 고도의 능률로 구별할 수 있어야 한다. 또한, 바이러스 복제의 본질로 인해, 항바이러스 화합물을 분리시키기 위한 바이러스의 인 비트로(in vitro) 민감도(sensitivity) 평가는 살아 있는 세포들(예를 들어, 조직 배양물)로 구성되는 복합 배양 시스템에서 수행되어야 한다. 그러한 평가 시스템으로부터의 결과는 사용되는 조직 배양 세포들의 유형 및 평가 조건에 따라 폭넓게 바뀐다. 이러한 복잡성에도 불구하고, 9개의 약물이 AIDS 치료법으로 승인되었다. 즉, 5개의 역전사효소(reverse transcriptase) 인히비터(inhibitors) AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC와, 한 개의 비뉴클레오시드(non-nucleoside) 역전사효소 인히비터 네비라핀(nevirapine)과, 3개의 프로테아제 인히비터 사퀴나비르(saquinavir), 리토나비르(ritonavir) 및 인디노비르(indinavir)가 AIDS 치료법으로 승인되었고, 넬피나비르(nelfinavir), 데라비리딘(delaviridine), VX-478 및 1592와 같은 몇가지의 추가 항바이러스 약물 후보가 최근 개발되었다.

바이러스 약물 내성은 높은 비율의 바이러스 복제 및 돌연변이 횟수가 제공된 실질적인 문제이다. 약물 내성 돌연변이체들은 처음에 티오세미카르바존(thiosemicarbazone)으로 이루어진 폭스바이러스(poxviruses) (Appleyard and Way (1966) Brit.J.Exptl. Pathol. 47, 144-51), 구아니딘(guanidine)으로 이루어진 폴리바이러스(polivirus) (Melnick et al. (1961) Science 134, 557), 아만타딘(amantadine)으로 이루어진 인플루엔자 A 바이러스 (Oxford et al. (1970) Nature 226, 82-83; Cochran et al. (1965) Ann. NY Acad Sci 130, 423-429), 이오도데옥시우리딘(iododeoxyuridine)으로 이루어진 헤르페스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스 (Jawetz et al. (1970) Ann. NY Acad Sci 173, 282-291)로 인식되었다. 다양한 항바이러스제(anti-viral agents)에 대한 대략 75 HIV의 약물 내성 돌연변이가 최근 확인되었다 (Mellors et al. (1995) Intl. Antiviral News, supplement and Condra, J.H. et al. (1996) J Virol. 70, 8270-8276).

바이러스의 소량의 유효한 게놈(genomes)은 분자 유전학의 집중 조사, 가장 중요한 인간 바이러스 병원균의 구조 및 복제 사이클에 도움이 되어 왔다. 결과적으로, 부위와 메카니즘은 다른 부류의 약물에 대해서보다 항바이러스 약물의 활성 및 내성에 대해 보다 정밀하게 특징을 이루었다 (Richman (1994) Trends Microbiol. 2, 401-407). 내성 돌연변이체들이 나타날 것이라는 가능성은 다음과 같은 적어도 4가지 인자의 기능이다: 1) 바이러스 돌연변이 횟수; 2) 특정의 항바이러스에 대한 바이러스 표적 부위의 고유의 변이성(mutability); 3) 항바이러스 약물의 선택적인 압력; 4) 바이러스 복제의 크기 및 비율. 첫 번째 인자와 관련하여, 게놈 복제가 교정(proofreading) 메카니즘을 결여하고 있는 단일 가닥(stranded) RNA 바이러스에 대한 돌연변이 빈도는 매 복제 사이클 당 염기 쌍 당 대략 3×10^{-5} 이다 (Holland et al. (1992) Curr. Topics

Microbiol Immunol. 176, 1-20; Mansky et al. (1995) J Virol. 69, 5087-94; Coffin (1995) Science 267, (483-489). 그리하여, 인간 면역결핍(immunodeficiency) 바이러스 (HIV)의 게놈과 같은 단일의 10 kilobase 게놈은 모든 3개의 후대 (progeny) 바이러스 게놈에 대한 평균적인 하나의 돌연변이를 포함하는 것으로 예상된다. 두 번째 인자와 관련하여, 특정 항바이러스제에 따른 바이러스 표적 부위의 고유의 변이성은 내성 돌연변이체의 가능성에 크게 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, zidovudine(AZT)는 다른 승인된 티미딘(thymidine) 아날로그 d4T (stavudine) 보다 인비트로 및 인비보(in vivo)에서 더 쉬운 HIV의 역전사효소에서 돌연변이를 선택한다.

항바이러스 약물의 작용의 한가지 필연적인 결과는 약물-내성 돌연변이체를 선택할 수 있도록 충분한 선택 압력을 바이러스 복제에 제공하는 것이다 (Herrmann et al. (1977) Ann NY Acad Sci 284, 632-7). 세 번째 인자와 관련하여, 약물 노출이 증가함에 따라 복제되는 바이러스 수에 대한 선택적인 압력이 약물 내성 돌연변이체들의 더 급속한 출현을 증대시키기 위해 증가한다. 예를 들어, 더 높은 AZT 투여량은 낮은 투여량보다 더 급속하게 약물 내성 바이러스를 선택하는 경향이 있다 (Richman et al. (199) J. AIDS. 3, 743-6). 내성 돌연변이체들의 이러한 선택적인 압력은 상당한 레벨의 바이러스 복제가 유지되는 한 그러한 돌연변이체들의 발생 가능성을 증가시킨다.

네 번째 인자인 바이러스 집단의 복제 크기 및 비율은 내성 돌연변이체들의 출현 가능성에 대한 주요한 사항이다. 많은 바이러스 감염은 바이러스 전환(turnover) 비율이 높은 바이러스 복제가 많은 것이 특징이다. 이는 특히 간염의 B형 및 C형 바이러스 뿐만 아니라 HIV를 갖는 만성 감염에 적용된다. HIV 복제의 증가하는 레벨과 연관된 CD4 림프구(lymphocyte) 카운트의 감소에 따라 AZT 내성의 출현 가능성은 HIV-감염된 환자에서 증가한다 (Ibid).

바이러스의 높은 레벨은 선제하는 돌연변이체들의 가능성을 증가시킨다. 내성 집단의 출현은 선택적인 압력의 부재시 무작위로 나타나는 기존의 서브집단의 생존 및 선택적인 급증식(proliferation)에서 기인하는 것으로 밝혀졌다. 모든 바이러스는 베이스라인 돌연변이 비율을 갖는다. HIV 감염동안 매일 발생하는 대략 10^{10} 의 새로운 비리온(virions)의 계산에 따라 (Ho et al. (1995) Nature 373, 123-126), 뉴클레오티드 마다 10^{-4} 내지 10^{-5} 의 돌연변이 비율은 HIV 감염동안 언제든지 거의 임의의 돌연변이의 선제를 보증한다. 약물 내성 돌연변이체들이 HIV 감염된 개인들의 서브집단에 실제로 존재한다는 증거가 모아지고 있다 (Najera et al. (1994) AIDS Res Hum Retroviruses 10, 1479-88; Najera et al. (1995) J Virol. 69, 23-31). 대략 10^{-5} 의 비율의 약물 내성 피코르나바이러스(picornavirus) 돌연변이체들의 선제는 또한 잘 기록되어 있다 (Ahmad et al. (1987) Antiviral Res. 8, 27039).

인간 면역결핍 바이러스 (HIV)

후천성 면역 결핍증 (AIDS)은 지금까지 인류를 해치는 매우 심각한 질병중의 하나로 일반적으로 간주되는 치명적인 인간 질병이다. 세계적으로, HIV 바이러스에 감염된 사람 및 AIDS 환자의 수는 엄청나게 증가하고 있고, 전 세계적인 유행병의 진행을 억제하려는 노력에는 한정된 효과가 있을 뿐이다. 이제 HIV의 두 가지 유형 즉, HIV-1 및 HIV-2가 인지된다. 1994년 12월 31일까지 총 1,025,073명의 에이즈 환자가 세계 보건 기구 (World Health Organization)에 기록되었다. 이는 총환자의 일부분일 뿐이며, WHO는 1994년 후반에 진단 받지 않은 경우(underdiagnosis), 보고되지 않은 경우 (underreporting) 및 보고의 지연을 감안하고 추산된 HIV 감염 수에 의거 전세계적으로 4.5백만명 이상의 점증하는 AIDS 환자가 있다고 추산한다 (Mertens et al. (1995) AIDS 9 (Suppl A), S259-S272). HIV가 북아메리카, 유럽 및 사하라남 쪽의 아프리카에서 널리 퍼지기 시작한 이래 19.5백만명의 남자, 여자 아이들이 감염되었던 것으로 추산된다 (Ibid). AIDS 유행병의 뚜렷한 특징중의 하나는 오늘날 AIDS환자를 보도하는 약 190개의 국가들로 지난 20년간 전세계적으로 퍼졌다는 것이다. WHO에 따른 세계적인 HIV 감염의 실태는 어마어마하다. 2000년까지 성인 AIDS 환자의 예측된 점증하는 총수는 거의 천만명 정도이다. 2000년까지 HIV관련 점증하는 성인 사망자 수는 현재 약 3백만명에서 8백만명 이상으로 증가할 것으로 예측된다.

HIV-1 및 HIV-2는 두 개의 동일한 RNA 분자를 갖는 2배성(diploid) 게놈으로 이루어진 레트로바이러스(retroviruses)에 속해 있다. HIV의 분자 조직은 도 1a에 도시된 바와 같이 (5') U3-R-U5-*gag-pol-env*-U3-R-U5 (3')이다. U3, R 및 U5 서열은 감염된 숙주에 바이러스 유전자의 발현을 증대하고 때때로 인근 세포 유전자의 발현을 증대하는 정규 요소인 장 말단 반복배열 (long terminal repeats) (LTR)을 형성한다. 구조 단백질: *gag* (p55, p17, p24, p7 핵단백질), *pol* (p10 프로테아제, p66 및 p51 역전사효소, p32 삽입효소(integrase)), *env* (gp120 및 gp41은 엔벨롭(envelope) 당단백질)에 대한 바이러스 RNA 코드의 내부 영역. 바이러스 프로테아제에 의해 3개 내지 4개의 구조 단백질로 나누어지는 폴리프로틴 전구체(precursor)에 대한 *gag* 코드; 역전사효소 (RT) 및 바이러스 프로테아제 및 삽입효소에 대한 *pol* 코드; 바이러스의 트랜스메μβ레인(transmembrane) 및 외부 당단백질에 대한 *env* 코드. *gag* 및 *pol* 유전자는 게놈 RNA로서 발현되고 *env* 유전자는 스플라이스드 서브게놈 (spliced subgenomic) RNA로서 발현된다. *env* 유전자에 더하여, 바이러스의 복제 및 생물학적 활동에 기여하는 스플라이스드 서브게놈 RNAs에 의해 생산된 기타 HIV 유전자들이 있다. 이러한 유전자들

은 바이러스 유전자 및 약간의 세포 유전자의 발현을 활성화시키는 단백질을 코딩하는 *tat*; 스플라이스되지 않거나 단일-스플라이스드 바이러스 mRNAs의 발현을 증대하는 단백질을 코딩하는 *rev*; 일정 조건하에서 바이러스 생산을 변조하는 것으로 나타나는 미리스티레이티드(myristylated) 단백질을 코딩하는 *nef*; 표적 세포들을 감염시키는 바이러스 입자의 능력에 영향을 미치지만 세포대세포 접촉에 의한 바이러스의 발현 또는 전염(transmission)에 영향을 미치는 것으로 나타나지 않는 단백질을 코딩하는 *vif*; 비리온-결합 단백질을 코딩하는 *vpr*; 바이러스 입자의 세포외 방출 (extracellular release)을 증대시키는 것으로 나타나는 단백질을 코딩하는 *vpu*.

바이러스 약물 내성의 문제점을 AIDS보다 더 잘 예시하는 질병은 없다. 약물 내성 HIV 분리군(isolates)은 뉴클레오시드 및 비뉴클레오시드 역전사효소 인히비터와 프로테아제 인히비터로 확인되었다. AZT 및 기타 역전사효소 인히비터만이 바이러스 복제를 약 90%정도 감소시키므로 AZT에 견디는 HIV 분리군의 출현은 놀라운일이 아니다. 약물 치료의 선택적인 압력의 경우에 바이러스 복제의 높은 비율은 약물 내성 돌연변이체들의 출현에 대한 실질적인 조건을 제공한다. 높은 레벨의 바이러스 복제를 갖는 감염 말기 단계에 있는 환자들은 AZT 치료로 감염 초기 단계에 있는 환자들보다 더 빠르게 내성 바이러스를 진전시킨다 (Richman et al. (1990) J AIDS 3, 743-6). AZT에 대한 내성의 출현에 관한 초기의 설명은 약물 감수성에서 점진적이고 완만한 감소를 확인했다 (Larder et al. (1989) Science 243, 1731-1734). 이는 감소된 감수성에 기여한 역전사효소에 대한 유전자에서 다수의 돌연변이의 인식에 의해 설명되었다 (Larder et al. (1989) Science 246, 1155-1158). 이들 돌연변이는 감소된 감수성의 표현형(phenotype)에 대하여 부가적인 효과, 심지어는 상승 (synergistic) 효과를 일으키기도 하였다 (Kellam et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 1934-1938). 그러한 돌연변이의 점증하는 획득(acquisition)은 감수성에서 점진적인 감소를 야기했다. 유사한 효과가 비뉴클레오시드 역전사효소 인히비터에서 나타났다 (Nunberg et al. (1991) J Virol 65, 4887-4892; Sardanna et al. (1992) J Biol Chem 267, 17526-17530). 프로테아제 인히비터의 연구는 감소된 약물 감수성을 갖는 HIV 주(strains)의 선택이 수주일 내에 발생한다는 것이 밝혀졌다 (Ho et al. (1994) J Virol 68, 2016-2020; Kaplan et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 5597-5601). 최근의 연구는 프로테아제 인히비터가 역전사효소 인히비터보다 더 강력함에도 불구하고 내성이 진전되었다는 것이 밝혀졌다 (Condra et al., Id. and Report 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, March 1996). 감소된 투여량, 약물 상호작용, 흡수장애(malabsorption) 또는 다른 요인으로 인한 감소된 생활성(bioavailability)에 의해 야기되든지 자가부과 약물 할러데이 (self-imposed drug holidays)에 의해 야기되든지간에 하위치료적 약물 레벨은 모두 증가한 바이러스 복제와 돌연변이 및 내성에 대한 증가한 기회를 허용한다.

약물 치료의 선택적인 압력은 선제하는 돌연변이체들의 부산물(outgrowth)을 허용한다. 완전한 억제 항바이러스 약물의 활성이 일어나지 않는 경우, 바이러스 복제가 계속됨에 따라, 다수의 돌연변이의 축적은 HIV의 프로테아제 인히비터와 AZT에 대해 설명된 바와 같이 시간에 걸쳐 발생할 수 있다. 실제로, 다른 약물에 대한 내성을 배가시키는 바이러스 돌연변이체들이 관찰되었다 (Larder et al. (1989) Science 243, 1731-1734; Larder et al. (1989) Science 246, 1155-1158; Condra et al. (1995) Nature 374, 569-71). 많은 바이러스 감염에서 내성의 필연적인 출현에 따라, 예를 들어 HIV에 따라, 내성 바이러스 집단에 항거하여 치료를 최적화하기 위한 방법이 설계되어야 한다. 약물 내성으로 인한 약물 사용의 실패를 확인하는 것은 어려운 문제인데, 이는 약물 내성을 발전시키기 쉬운 환자들이 그들을 잘못된 예후(prognosis)로 가게 하는 기타 복합적인 요인을 가지기 쉽기 때문이다 (Richman (1994) AIDS Res Hum Retroviruses 10, 901-905). 또한, 환자들은 여러 가지 감수성을 가지는 바이러스 혼합물을 가지고 있다.

B형 간염 (HBV)

HBV는 전세계의 약 2억만명의 환자에게 염습하는 급성 및 만성 간염에 대한 원인인자(causative agent)이다 (Zuckerman A.J. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene (1982) 76, 711-718). 성인 시기에 얻어진 HBV 감염은 종종 임상적으로 불명확하고, 가장 급성으로 감염된 성인들은 그 질병으로부터 완전히 회복되고 바이러스를 제거한다. 그러나, 드물게, 급성의 간질환은 너무 심각해서 환자가 급성 간염으로 죽게 될 수도 있다. 급성으로 감염된 성인의 소수, 아마도 5 내지 10%가 바이러스에 의해 영구적으로 감염된 상태로 있게 되고 다양하고 심각함을 달리하는 만성 간염을 진행시킨다. 그러나, 선천적으로 전염된 HBV 감염은 드물게 제거되고, 그러한 아이들의 90%이상이 만성적으로 감염된 상태가 된다. HBV는 보통 아프리카 및 아시아의 인구밀도가 높은 지역에서 태어난 아이의 감염된 어머니로부터 퍼지므로, 전세계에 걸쳐 수백만명의 사람들이 그들의 대부분의 일생동안 HBV에 의해 영구적으로 감염되어 있고, 다양한 만성 간질환을 앓게 되고, 이러한 만성 간질환은 간경화증 및 간세포 암종 (hepatocellular carcinoma, HCC)으로 진전될 위험을 크게 증가시킨다. 실제로, HCC의 위험은 만성 간염을 가지고 있는 환자들에서 100배 증가되고, 태어나면서 감염된 남성들에서 HCC에 대한 생명의 위험은 40%에 근접한다 (Beasley RP et al., Lancet (1981) 2, 1129-1133). 따라서, 전세계 인구의 다수가 HBV 감염의 이러한 말기 합병증으로 고통을 받고 죽게 된다. 항HBV 약물의 개발이 오랫동안 기다려졌지만 HBV의 극도로 좁은 숙주 범위에 의해 방해받았다. HBV는 주로 인간 및 침팬지의 간에 주로 복제되고 실험용 동물 또는 배양 세포에서는 복제되지 않는다 (Tiollais, P et al. Nature (London) (1985) 317, 489-495).

B형 간염 바이러스는 치밀한 게놈(compact genomic) 구조를 갖는 DNA 바이러스로서, 조그맣고 원형인 3200개의 염기쌍에도 불구하고, HBV DNA는 4 세트의 바이러스 산물을 코딩하고 복잡한 다입자 구조를 갖는다. HBV는 4개의 오버랩 유전자 S, C, P, X로부터 단백질을 코딩하는 효율적인 방법에 의존하여 게놈 조직을 얻는다. HBV는 일군의 동물 바이러스인 헤파드나바이러스(hepadnaviruses) 중의 하나이고, 헤파드나바이러스 형 1로서 분류된다. 유사한 바이러스들은 우드척(woodchucks), 지상 및 나무의 다람쥐, 그리고 페킨 오리(Pekin ducks)의 일정 종을 감염시킨다. HBV를 포함하는 모든 헤파드나바이러스는 다음과 같은 특징을 공유한다: 1) 세 가지의 뚜렷한 형태학적인 형태가 존재한다, 2) 모든 구성원은 HBV의 외피 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 항원에 대한 기능적이고 구조적인 대응부인 단백질을 갖는다, 3) 헤파드나바이러스는 간 내에서 복제하지만 간 이외의 부위에도 존재할 수 있다, 4) 헤파드나바이러스는 RNA 및 DNA 의존성 DNA 중합효소(polymerase) 활성을 갖는 내인성의 DNA 중합효소를 포함한다, 5) 헤파드나바이러스의 게놈은 부분적으로 가닥 원형의 DNA 분자들의 두배이다, 6) 헤파드나바이러스는 급성 및 만성 감염과 간세포 암종과 관련된다, 7) 헤파드나바이러스의 게놈의 복제는 레트로바이러스에 나타나는 것과 유사한 방식으로 바이러스의 내인성(endogenous) RNA-의존성 DNA 중합효소 활성을 이용하여 DNA로 역전사되는 RNA 중간물질을 통과한다. 감염된 간 세포의 핵에서 부분적으로 두배의 가닥 DNA는 DNA-의존성 DNA 중합효소에 의해 전자쌍 공유적으로 밀접되어 있는 원형(covalently closed circular) 이중가닥 DNA(cccDNA)로 변환된다. 바이러스성 DNA의 전사는 숙주 RNA 중합효소에 의해 수반되고 그들의 개시 부위에서는 다르지만 보통의 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 신호에서 모두 종결되는 몇 가지의 RNA 전사체를 발생시킨다. 이들 RNAs 중에서 가장 긴 것은 바이러스성 단백질중의 일부에 대한 메시지(message) 뿐만 아니라 바이러스에 대한 프리게놈(pregenome)으로서 작용한다. 바이러스성 단백질은 프리게놈 RNAs로부터 번역되고, 단백질 및 RNA 프리게놈은 비리온으로 포장되어 간세포(hepatocyte)로부터 숨겨진다. HBV가 시험관 내에서 배양하기는 어렵지만, 몇몇 세포들은 HBV DNA로 성공적으로 트랜스펙션되어 HBV 입자의 인비트로 산물을 야기했다.

HBV의 세 개의 미립자 형태가 있다: 즉, 구형 또는 긴 실모양으로 나타나는 비전명성 22nm 입자와 온전한 전염성 B형 간염 비리온을 나타내는 42nm의 이중 겹질의 구형 입자. 엔벨롭 단백질인, HBsAg는 HBV의 S 유전자의 산물이고 비리온의 외부 표면 및 적은 구형의 tubular 구조 상에서 발견된다. S 유전자 오픈 해독 틀(open reading frame)의 상부에는 중합된(polymerized) 인간 혈청 알부민에 대한 HBV 표면 및 간세포 수용체들에 대한 부착 부위 상의 수용체들을 포함하여 pre-S 유전자 오픈 해독 틀, 즉 pre-S 유전자 산물을 코딩하는 pre-S1 및 pre-S2 오픈이 있다. 있는 그대로의 42nm 비리온이 약한 세정제에 의해 분열될 수 있고 27nm 뉴클레오캡시드 핵 입자가 분리되었다. 핵은 C 유전자에 의해 코딩된 두 개의 뉴클레오캡시드 단백질로 구성된다. C 유전자는 핵 및 프리코아 영역을 정의하는 두 개의 개시 코돈을 갖는다. 뉴클레오캡시드 핵의 표면에 발현된 주요한 항원은 핵 영역에 의해 코딩되고 B형 간염 핵 항원(HBcAg)으로 언급된다. B형 간염 e 항원(HBeAg)은 프리코아 ATG에서의 개시에 의해 동일한 C 유전자로부터 생성된다.

또한, 뉴클레오캡시드 핵내에서 포장된 것은 HBV DNA의 복제 및 회복을 주관하는 DNA 중합효소이다. DNA 중합효소는 HBV 유전자들의 세 번째이고 가장 큰 유전자인 P 유전자에 의해 코딩된다. 효소는 DNA-의존성 DNA 중합효소 및 RNA-의존성 역전사효소 활성 둘 다를 포함하며, 프리게놈 RNA의 효율적인 인캡시테이션(encapsidation)을 위해 요구된다. 네 번째 유전자 X는 바이러스성 유전자 및 세포 유전자의 전사를 트랜스작용(transacting)할 수 있는 것으로 나타난 소량의 비입자 조합 단백질을 코딩한다.

비록 HBV(Hepatitis B Virus) 복제가 매우 잘 이해된다고 하더라도, HBV 감염의 초기 단계는 명확히 정의되어 있지 않다. 비리온(virions)의 흡착 부위(attachment sites)또는 세포 수체(cellular receptor)는 적절한 조직 배양 분석없이 연구가 불가능하다. 이 문제를 다루기 위한 노력에서, 어떤 세포주(cell line)이 개발되었는데, 이것은 항 HBV 약물의 평가를 위한 인간의 헤파토플라스토마(hepatoblastoma) 세포 Huh (HB 611)(Ueda, K. et al., Virology (1989) 169, 213-216)와 HepG2 세포(Galle, P.R. 그리고 Theilmann, L. Arzneim-Forsch. Drug Res. (1990) 40, 1380-1382)이다.

최근, HBV의 분자적 이형(molecular variants)에 관심이 모아지고 있다. 이형은 HBV 게놈 전체에 걸쳐 발생하고, 바이러스 단백질을 발현시키지 않는 HBV의 임상분리군(clinical isolates)은 각각의 또는 다수의 유전자 위치(gene location)에서의 돌연변이에 대한 원인이 되어 왔다. 예를 들어, 이형은 핵산캡시드(nucleocapsid) 단백질을 결핍하고 있거나, 엔벨롭 단백질을 결핍하고 있거나, 또는 이 둘 모두에 해당하는 것으로 기술되어 왔다. 2개의 돌연변이체가 주의를 끌고 있다. 하나는 심각한 만성 HBV에 감염된 몇몇 환자에서 발견된다. 이들 환자는 바이러스로 하여금 HBeAg를 코딩하지 못하도록 하는 프리코아 영역(precore region)에서의 변화를 포함하는 HBV 돌연변이에 감염된 것이 밝혀졌다. 그러한 환자에서 가장 흔히 발생하는 돌연변이체는 G에서 A로의 단일 베이스 치환(single base substitution)으로, 이것은 뉴클레오티드 1896에서 C 이전 유전자(pre-C gene)의 마지막 코돈의 두 번째 위치에서 발생한다. 이 치환은 TGG 트립토판 코돈을 종결 코돈(stop codon)(TAG)으로 치환하는 것이며, 이는 HBeAg의 번역을 방해하게 된다. HBeAg를 분비할 수 없는 이러한 프리코아 돌연변이체를 가지는 환자는, 간경변증으로 빠르게 진행되고 항바이러스 치료에 즉시 반응하지 않는 심각한 간질환에 걸리기 쉽다.

HBV 돌연변이체의 두 번째 범주는 야생회기(escape) 돌연변이체로 이루어졌는데, HBsAg 의 모든 아류형에 공통적인 면역역지배적 결정인자(immunodominant a determinant)의 위치 145에서, 글리신에서 아르기닌으로의 단일 아미노산 치환(single amino acid substitution)이 발생한다. 상기 HBsAg 의 변화는 심각한 상태 변화를 일으켜, 항 HBs 항체에 의한 중화 활성(neutralizing activity)의 손실을 낳는다.

현재 가능한 바이러스 내성 분석

바이러스제 감수성은 일반적으로 바이러스 복제의 소정 비율이 억제되는 항바이러스제의 농도로 이해된다(예, 항바이러스제에 대한 IC50 은 바이러스 복제의 50% 가 억제되는 농도이다). 그러므로, 바이러스제 감수성의 감소는 항바이러스 물질이 항바이러스약제에 내성이 있는 돌연변이체 바이러스에 대해 선택한 특징(hallmark)이다. 바이러스 내성은 일반적으로 시간에 걸친 대상 환자의 바이러스제 감수성의 감소로 정의될 수 있다. 임상적인 상황에서, 바이러스제 내성은 덜 효과적이거나 환자에게 더 이상 임상적으로 효과가 없는 항바이러스약제에 의해 입증된다.

현재, 연구자와 임상가가 항바이러스제 및 내성을 평가하기 위해 이용할 수 있는 도구는 불충분하다. HIV 의 항바이러스제에 대한 감수성 및 내성을 결정하는 기존의 테스트는 복잡하고, 시간 소모적이며, 비용이 많이 들고, 각각의 그리고 모든 환자에게서 병원성 바이러스의 배양을 필요로 한다는 점에서 위험하다고 하겠다(Barre-Sinoussi et al (1983) Science 220, 868-871; Popovic et al. (1984) Science 224, 497-500). 이 절차에서, 환자의 말초 혈액 단분자 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)가 먼저 배양되어 알려진 다수 감염(multiplicity of infection, moi) 의 바이러스 군체(viral stock) 를 만들어 내고, 그렇게 해서 생긴 바이러스 군체는 표적 지시 세포주(target indicator cell line)을 감염시키는데 이용된다. 그다음 세포 배양조직에서의 바이러스 항원의 생성량을 결정함으로써 일반적으로 바이러스 복제의 돌발이 항바이러스제가 있을 때와 없을 때 측정된다. 그러한 테스트는 전문 연구자의 손으로만 믿을 만하게 수행될 수 있고, 또 각 테스트 약제에 대한 환자 한 사람당 수천 달러 비용과 함께 2-3 개월이 소요될 수 있다. 게다가, 몇몇 환자의 PMBC 로부터 충분한 moi 의 바이러스 군체가 만들어지지 않을 수 있기 때문에, HIV 내성에 대한 기존의 테스트는 HIV 에 감염된 모든 개인들에게 수행될 수 없다. 보다 중요한 것은, 배양물내 바이러스의 경과에 의해 바이러스 군체를 발생시키는 과정에서, 바이러스 자체의 특징이 변할 수 있고 따라서 환자의 바이러스 본래 특성을 알기 어려워질 수 있다. 그러므로, 기존 방법의 응용은 임상 시험에서의 방향에 관한 정보를 수집하는데 제한되어 왔고 또 대상 환자에 대해 항바이러스 치료를 특별히 변경하는데 이용될 수 있는 예기 분석에는 이용될 수 없었다. 이러한 제한에도 불구하고, 기존의 테스트는 두가지 중요한 특성이 있다: 평가되는 약제에 대해 특이(specific)적이라는 것이고, 환자 자신의 바이러스 표현형(phenotype)에 관한 정보, 즉, 바이러스 복제의 50% 를 억제하는 약물의 농도(IC50)를 제공한다는 것이다.

기존의 테스트에서의 개선을 이루고자 하는 많은 노력이 있어왔지만 심각한 결점을 가진다. 첫 번째 테스트 유형은 환자 자신의 바이러스 특징은 전혀 결정하지 않고, 그보다는 감염의 진행을 독립적으로 측정한다는 점에서 비특이(nonspecific)적인 것으로 기술될 수 있다. 이들 테스트 중에서, 환자의 CD4+ T 세포 카운트(count), HIV 질병의 진행의 특징(hallmark)(Goedert et al. (1987) JAMA 257, 331-334)을 측정하는 것, 바이러스 항원 레벨을 측정하는 것(예, p24 core 항원(Allain et al. (1987) N. Engl. J. Med. 317, 1114-1121)), 그리고 바이러스 RNA 및 DNA 레벨을 측정하는 것(예, 양적 중합효소 연쇄 반응(quantitative polymerase chain reaction) 및 분기 DNA 분석(branched DNA assay) (Piatak et al. (1993) Science 259, 1749-1754; Urdea (1993) Clin. Chem. 39, 725-726))이 있다. 그러한 비특이적 테스트의 주된 문제점은 이들 테스트가 바이러스약제 자체에 대한 정보를 전혀 제공하지 않고 오히려 환자 질병의 명백한 진행에서부터 이 정보를 알아내고자 한다는 것이다. 게다가, 바이러스제 내성 이외의 많은 요인들이 고려중인 변수의 레벨에 영향을 줄 수 있다. 다시 말해서, CD4+ T 세포 카운트, p24 항원 레벨 그리고 HIV 바이러스 RNA 레벨이 질병의 진행되는 동안 약물 내성 이외의 이유로 해서 변할 수 있다.

또다른 기존의 개량된 테스트는 항바이러스제의 표적이 되는 바이러스 유전자를 증대시킨다. 이 테스트에서 소정 환자로의 바이러스 유전자는 증대되어 HIV 의 생물학적으로 활발한 프로바이러스 클론(proviral clone)으로 재조합된다. 이 프로바이러스 클론은 인간 세포로 트랜스펙션되어 표적 지시 세포주(target indicator cell line)를 감염시키는데 이용될 수 있는 알려진 moi 의 바이러스 군체를 발생시킨다. 기존 테스트의 방법으로, 항바이러스제가 있을 때 또는 없을 때 바이러스 항원의 발생을 결정할 수 있다. 켈람과 란더(Kellam and Larder) (1994) 항미생물제와 케모(Antimicrobial Agents and Chemo.) 38, 23-30 에 의해 기술된 그러한 분석 하나는, 환자유래의 역전사효소 코딩 서열(reverse transcriptase coding sequence)의 PCR 증대를 수반하고, 이것은 상동 재조합(homologous recombination)에 의해서 프로바이러스 DNA 클론으로 도입되어 삭제되었던 역전사효소 유전자를 포함하는 완전한 바이러스 게놈을 복원하게 된다. 다음, 그러한 클론에서 만들어진 재조합 바이러스가 T-세포주에서 배양되고, 약물 민감성이 HeLa CD4+ 혈소판 감소 분석(plaque

reduction assay) 이 테스트된다. 그러나, 이 종류의 테스트는 약물 내성을 결정하기 위해 바이러스의 배양을 필요로 하며, 따라서 까다롭고, 장황하고, 비용이 많이 드는 테스트가 되며, 또 위험한 바이러스 배양물을 다루기 위한 실험실 연구자가 필요하다. 게다가, 배양 처리 동안 바이러스 자체의 부수적인 변이가 있으면, 그 결과는 부정확하게 된다.

유전자형 정보를 바이러스의 약물 내성 표현형에 관련시키려는 궁극적인 목표가 있는 제 2 종류의 테스트는 환자의 HIV 유전자형에 대한 특정(specific) 정보를 제공하고자 한다. 역전사효소 및 프로테아제(protease)유전자와 같은 바이러스 유전자 내에 특정한(specific) 아미노산 치환이 역전사효소와 프로테아제 인히비터(inhibitors)에 대한 바이러스 내성의 특정 레벨에 각각 해당하도록 나타나게 된다(Larder et al. (1994) J. Gen Virol. 75, 951-957). 그러한 분석에서 주된 단점은, 그 분석이 간접적이라는 것과, 제 1 돌연변이의 효과에 더해지거나 반대되도록 나타난 제 2 돌연변이에 의해 분석이 혼란스러워질 수 있다는 것이다. 소정의 유전자 폴리펩티드 내의 모든 아미노산 잔기(residue)의 복잡한 상호작용(interplay)이 인히비터가 있을 때와 없을 때 유전자 산물의 활동을 궁극적으로 결정한다. 그러므로, HIV 게놈에서의 잠재적인 아미노산 변화들의 소정의 수가 주어진다면, 소정의 유전자형의 민감성 또는 약물 내성의 상태를 해석하는데 광대하고 비실용적인 규모의 데이터베이스가 필요할 것이다.

제 3 종류의 테스트는 최근에 개발된 박테리아에 기본적인 분석으로서, 박테리아 발현 벡터내로 삽입된, 분자적으로 복제된 바이러스 유전자(구체적으로, 역전사효소 유전자)를 이용한다. 박테리아 중합효소 I 가 모자라는 E. coli 의 특정 변종(strain)으로 변형되면, 클로닝된 역전사효소 유전자는 선택된 성장환경하에서 박테리아의 성장을 보호할 수(rescue)있다. 그들의 성장에 대하여 역전사효소에 의존하는 E. coli 를 만듦으로 인하여, 바이러스 유전자의 활동에 대한 어떤 역전사효소 인히비터의 효능을 알아낼 수 있다(PCT Application No. WO 95/22622). 그러나, 이 접근방법의 주된 결점은, 인히비터가 세포막을 가로질러 이동되고 인간의 세포에 의한 것과는 다르게 박테리아에 의해서 물질대사될 수 있고, 결과적으로 역전사효소의 본래 신진대사 인히비터의 농도는 관련된 인간의 감염 세포 표적(target)에서보다는 박테리아에서 크게 달라질 수 있거나, 또는 진정한 인히비터가 아주 결여될 수 있다. 뉴클레오시드 물질대사는 인간 세포와 박테리아 세포에서 현저하게 다른 것으로 알려졌다. 이 접근방법의 또다른 중요한 결점으로는, 분석이 역전사효소의 RNA 의존성 DNA 중합효소, 가닥 전이(strand transfer), 또는 역전사효소의 RNase H 활동이 아니라 역전사효소의 DNA 의존성 DNA 중합효소 활동을 측정한다는 것이다. 그러므로, 이러한 다른 활동에 적어도 부분적으로는 영향을 끼치는 항바이러스 화합물은 이 분석에서 완전한 저해 활동을 하지 않게 나타난다. 또, 이 접근방법의 또다른 어려움은 이 방법이 성장에 기초한 테스트라는 것이다; 그러므로 만약 저해물(예, 뉴클레오시드 유사체)이 또한 역전사효소에 대한 영향이 아닌 다른 이유로 해서 박테리아 성장을 방해한다면, 이 시스템에서 충분한 테스트가 이루어질 수 없다.

박테리아 벡터

박테리아 벡터 그리고 특히 레트로바이러스 벡터는 포유류 세포를 변화시키는데 이용되어 왔는데, 이것은 높은 효율로 레트로바이러스 벡터가 표적 세포를 감염시키고 표적 세포 게놈에 일체가 되기 때문이다. 포유류 세포의 게놈으로 들어가는 그 능력 때문에 유전자 치료 용도를 위한 레트로바이러스 벡터에 많은 관심이 모아지고 있다. 레트로바이러스와 그 이용에 관한 세부사항이 유럽 특허 출원 EPA 0 178 220, U.S. 특허 4,405, 712, PCT 출원 WO 92/07943, U.S. 특허 4,980,289, U.S. 특허 5,439,809 그리고 PCT 출원 WO 89/11539 를 포함하여 환자에게서 그리고 환자 공표(patient publication)에서 발견될 수 있다.

레트로바이러스 벡터 기술에 대한 강조의 한 결과로 패키지 세포주(packaging cell line)의 발전이 있다. 레트로바이러스의 이용에서 중요한 문제점 한가지는 복제능력이 있는(replication-competent) 레트로바이러스의 확산 가능성이다. 따라서 비리온내로 처리될 수 없는 헬퍼 벡터(helper vector)를 만들어 낼 필요가 있다. 결과적으로 패키지 결손 벡터(packaging defective vector) 및 패키지 세포주가 개발되었다. 패키지 결손 벡터 및 패키지 세포주에 대해 자세한 사항은, U.S. 특허 5,124,263, 유럽 특허 출원 공개 번호 0386 882, PCT 출원 No. WO 91/19798, PCT 출원 No. WO 88/08454, PCT 출원 No. WO 93/03143, U.S. 특허 No. 4,650,764, U.S. 특허 4,861,719 그리고 U.S. 특허 5,278,056 을 포함하여, 환자와 환자 공표에서 알 수 있고, 위 특허의 개시가 참조를 위해 본 명세서에 삽입되었다.

본 발명의 목적은 환자의 바이러스 집단(population)이 소정이 처방 약물에 내성이 있는지를 보여줄 수 있는 약물 감수성 및 내성 테스트를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 이전의 치료 과정을 통해 소정의 약물에 내성이 생기는 환자에 대한 치료법에서 의사가 하나 이상의 약물을 교체하도록 하는 테스트를 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 목적은 바이러스 감염의 치료에 대한 효과적인 약물 요법의 선택을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 목적은 임상 및 연구의 응용을 위한 안전하고, 표준화되고, 비용이 적당하고, 신속하고, 정확하고, 그리고 믿을 수 있는 분석을 제공하는 것이다. 본 발명의 또다른 목적은 특히 바이러스 약물 내성 및 크로스 내성(cross resistance)에 관하여 특정 바이러스 유전자 및/또는 바이

러스 단백질에 영향을 주는 후보 약물 화합물의 화학적 효과를 평가하는 방법과 테스트를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 바이러스제 내성 및 감수성을 평가하는 수단과 구성(composition)을 제공하는 것이다. 본 발명의 이들 목적은 명세서 전체에서 분명해질 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명의 목적은 항바이러스 약물에 대한 감수성을 측정하는 새로운 테스트 방법을 달성하는 데에 있으며, 이러한 테스트 방법은 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 지시 유전자의 발현을 측정하는 단계와; (d) 항바이러스 약물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c)단계를 수행하여 측정된 지시 유전자의 발현과 상기 (c)단계의 지시 유전자의 발현을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항바이러스 약물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

또한 본 발명은 환자의 항바이러스 약물의 내성을 측정하는 방법을 제공하는데 있으며, 이러한 방법은 (a)항바이러스 약물에 대한 약물 감수성의 표준 곡선을 전개하는 단계와; (b)상술한 감수성 테스트를 이용하여 환자의 항바이러스 약물의 감수성을 측정하는 단계와; (c)상기 (b)단계의 항바이러스 약물의 감수성과 상기 (a)단계에서 결정된 표준 곡선과를 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항바이러스 약물 감수성의 감소는 환자의 항바이러스 약물에 대한 감수성의 발달을 의미한다.

더 나아가 본 발명은 환자의 항바이러스 약물 내성을 측정하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 (a)먼저 상술한 방법에 의하여 환자의 항바이러스 약물 감수성을 측정하는 단계와, 여기서 환자유래 분절은 이때 환자에게서 얻어진 것이며; (b)나중에 동일한 환자의 항바이러스 약물 감수성을 측정하는 단계와; (c) 상기 (a)단계 및 상기 (b)단계에서 측정된 항바이러스 약물 감수성을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 처음과 비교하여 나중의 항바이러스 약물 감수성이 감소하는 것은 환자에게서 항바이러스 약물 내성의 발달 또는 진행을 의미한다.

본 발명에 따른 평가법에 따르면 의사는 각각이 항바이러스제의 표적이 될수 있는 바이러스성 단백질 또는 기능적 바이러스 서열을 코딩하는 바이러스성 유전자가 약물의 기능이 감소하도록 변이하는지를 평가할 수 있다. 보다 상세하게는, 본 발명의 새로운 평가법에 따르면 의사는 바이러스가 특정 항바이러스 약물에 내성을 갖게 되는 지를 결정할 수 있다.

더 나아가, 본 발명은 의사가 약물 감수성과 복합치료의 내성을 평가하는 것을 가능하게 해준다. 또한 이러한 평가법은 특정 약물(들) 또는 약물의 조합을 테스트하고 이들 약물 단독 또는 조합이 하나 이상의 바이러스성 유전자(들) 및/또는 바이러스성 단백질들을 억제하는지를 측정함으로써 의사가 장래 가능하도록 치료학적 선택법을 바꾸는 것을 가능하게 해준다.

본 발명은 의사가 치료를 최적화할 수 있도록 특정한 항바이러스 약물(들) 또는 이들의 조합의 치료학적 효능을 평가하는 더 안전하고 더 싸고 더 신뢰성 있고 더 빠르고 더 효과적인 약물 감수성 및 내성 평가법을 제공함으로써 현재 적용가능한 평가법에 비하여 중요한 장점을 제공한다.

본 발명에 따른 평가법은 약물의 진행의 모든 단계, 즉 1)후보 화합물의 임상전 평가동안; 2)새로운 약물의 임상평가동안; 3)약물 내성을 극복하기 위한 효과적인 치료학적 선택법의 연구를 가능하게 하는 환자 치료동안; 및 4)입증된 실험 약물의 사용중의 내성의 진전을 평가하는 전염성 감독의 부분으로서 내성 및 감수성 평가를 가능하게 하는 중요한 장점을 가진다.

본 발명은 약물 감수성 및 내성을 평가하는 조성물 및 방법들에 관한 것으로서, a)항바이러스 약물에 대해 환자유래 분절의 감수성 및 내성을 측정하는 평가방법; b)환자유래 분절 및 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 포함하는 조성물들; c)내성 테스트 벡터들을 포함하는 숙주 세포들을 포함한다.

더 나아가 본 발명은 본 발명의 약물 감수성 및 내성 평가에 사용되는 벡터 및 숙주 세포를 제작하는 방법들 및 조성물들에 관계된다.

본 발명의 일 관점에 따르면, 본 발명은 항HIV 약물에 대한 감수성을 측정하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는

단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 지시 유전자의 발현을 측정하는 단계와; (d) 항HIV 약물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c) 단계를 수행하여 측정된 지시 유전자의 발현과 상기 (c)단계의 지시 유전자의 발현을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항HIV 약물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

본 발명의 일 관점에 따르면, 본 발명은 항HIV 약물에 대한 감수성을 측정하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 DNA 또는 RNA 구조인 지시체를 측정하는 단계와; (d) 항HIV 약물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c)단계를 수행했을 때의 지시체의 측정량과 상기 (c)단계의 지시체의 측정량을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항HIV 약물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

본 발명의 일 관점에 따르면, 본 발명은 항HBV 약물에 대한 감수성을 측정하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 지시 유전자의 발현을 측정하는 단계와; (d) 항HBV 약물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c) 단계를 수행하여 측정된 지시 유전자의 발현과 상기 (c)단계의 지시 유전자의 발현을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항HBV 약물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

본 발명의 일 관점에 따르면, 본 발명은 항HBV 약물에 대한 감수성을 측정하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 DNA 또는 RNA 구조인 지시체를 측정하는 단계와; (d) 항HBV 약물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c)단계를 수행했을 때의 지시체의 측정량과 상기 (c)단계의 지시체의 측정량을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항HBV 약물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

또한 본 발명은 환자의 항HIV 약물 내성을 측정하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)항HIV 약물에 대한 약물 감수성의 표준 곡선을 전개하는 단계와; (b)상술한 감수성 테스트를 이용하여 환자의 항HIV 약물의 감수성을 측정하는 단계와; (c)상기 (b)단계의 항HIV 약물의 감수성과 상기 (a)단계에서 결정된 표준 곡선과를 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항HIV 감수성의 감소는 환자의 항HIV 약물에 대한 감수성의 발달을 의미한다.

또한 본 발명은 환자의 항HBV 약물 내성을 측정하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)항HBV 약물에 대한 약물 감수성의 표준 곡선을 전개하는 단계와; (b)상술한 감수성 테스트를 이용하여 환자의 항HBV 약물의 감수성을 측정하는 단계와; (c)상기 (b)단계의 항HBV 약물의 감수성과 상기 (a)단계에서 결정된 표준 곡선과를 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 항HBV 감수성의 감소는 환자의 항HBV 약물에 대한 감수성의 발달을 의미한다.

또한 본 발명은 후보 항바이러스성 약물 화합물의 생물학적 효능을 평가하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 지시 유전자의 발현을 측정하는 단계와; (d) 후보 항바이러스성 약물 화합물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c)단계를 수행하여 측정된 지시 유전자의 발현과 상기 (c)단계의 지시 유전자의 발현을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 후보 항바이러스 약물 화합물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

또한 본 발명은 후보 항바이러스 약물 화합물의 생물학적 효능을 평가하는 방법을 제공하는 데, 이는 (a)환자유래 분절과 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 단계와; (b) 상기 (a)단계의 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포에서 DNA 또는 RNA 구조인 지시체를 측정하는 단계와; (d) 후보 항바이러스 약물 화합물이 없는 상태에서 상기 (a)-(c)단계를 수행했을 때의 지시체의 측정량과 상기 (c)단계의 지시체의 측정량을 비교하는 단계로 이루어지며, 여기서 후보 항바이러스 약물 화합물의 테스트 농도는 상기 (a)-(c)단계; 상기 (b)-(c)단계 또는 (c)단계에 존재한다.

환자에서 유도된 바이러스 분절(HIV, HBV 등)을 포함하는 내성 테스트 벡터와 지시유전자는 환자에서 유도되지 않은 하나 이상의 분절을 포함하기도 한다. 한 실시예에서 상기 내성테스트 벡터는 하나 이상의 유전자에서의 삭제부분을 포함하는 게놈 바이러스 벡터로부터 제작된다. 그 예로서, HIV의 경우에는 env가 내성 테스트 벡터에서 제거되는 바, 그렇지 않을 경우에 상기 내성 테스트 벡터는 완전한 바이러스의 특징인 mRNA의 발현과 진행을 유지하게 된다. 이와 달리, 상기 내성 테스트 벡터는 보통 항바이러스 약물의 표적이 되는 하나 또는 단지 몇 개의 바이러스 유전자를 포함하는 서브게놈 바이러스 벡터로부터 만들어진다. 예를 들어 HBV의 경우에, HBV DNA 복제와 바이러스 입자의 형성을 위해 필요한 특정한

구조와 효소기능을 코딩하는 하나 이상의 HBV는 내성 테스트 벡터에서 제거되는 바, 그렇지 않을 경우에 상기 내성 테스트 벡터는 완전한 바이러스의 특징인 mRNA의 발현과 진행을 유지하게 된다. 상기 내성 테스트 벡터는 입자 바이러스의 천연 인핸서/프로모터 또는 항바이러스 표적 유전자의 발현을 위한 외래 인핸서/프로모터를 더욱 포함하게 된다.

표적세포에 있는 내성 테스트 벡터의 지시유전자 발현은 궁극적으로 환자유래 분절 서열의 작용에 따라 결정된다. 여기서, 상기 지시유전자는 기능적이거나, 비기능적이다. 비기능적 지시유전자인 경우에, 상기 지시유전자는 하나 이상의 환자유래 분절 생성물의 작용에 의해 기능적 지시유전자로 전환될 때까지 내성 테스트 벡터에 의해 트랜스펙션된 숙주세포 내에서 효과적으로 발현되지 않는다. 한 실시예에서, 상기 지시유전자는 치환된 프로모터를 사용함으로써 비기능적으로 되는 바, 상기 프로모터는 지시유전자와 전사방향이 같다고는 해도 지시유전자의 코딩 서열을 앞지르지 않고 그 뒤를 따르게 된다. 더욱이, 비기능적 지시유전자의 방향은 바이러스 프로모터나 LTR의 방향에 대해 반대로 된다. 따라서, 비기능적 지시유전자의 코딩서열은 치환된 프로모터나 바이러스 프로모터에 의해 전사되지 않는다. HIV의 경우에 지시유전자가 역전사작용의 결과에 따라 재배열됨으로써 치환된 프로모터가 지시유전자 서열을 앞지르게 되는 바, 상기 지시유전자는 이러한 결과로 인해 기능적으로 발현된다. HBV의 경우에, 지시유전자는 HBV 복제 기간동안에 발생하는 게놈 순환의 결과로 인해 재배열된다. 두 번째 실시예에서, 지시유전자는 치환된 코딩영역의 사용을 통해 비기능적으로 되는 바, 상기 치환된 코딩영역은 코딩영역의 5' 부분이 코딩영역의 3' 부분을 앞지르지 않고 뒤따르게 되는 지시유전자 코딩영역이다. 이러한 구성에서는 기능적 지시유전자 생성물을 만드는 mRNA가 발현되지 않는다. HIV의 경우에, 상기 지시유전자가 역전사작용의 결과로 재배열되어 지시유전자의 5'코딩영역이 3'코딩영역을 앞지르게 되고, 결과적으로 지시유전자는 기능적으로 발현될 수 있게 된다. HBV의 경우, 상기 지시유전자는 HBV 복제 기간동안의 게놈 순환의 결과로 인해 재배열된다. 세 번째 실시예에서, 상기 지시유전자는 역전 인트론의 사용을 통해 비기능적으로 되는 바, 상기 인트론은 지시유전자와 반대의 전사방향을 가진 지시유전자의 코딩서열에 삽입된 것이다. 더욱이, 상기 지시유전자는 자체적으로 바이러스 프로모터에 반대로 방향된 완전 전사유닛과 함께 기능적 프로모터를 포함하게 된다. 따라서, 잘못 방향된 비기능적 지시유전자는 HIV 또는 HBV 인핸서-프로모터의 경우에 바이러스 LTRs에 의해 전사되며, 역전 인트론이 스플라이싱에 의해 적절히 제거되지 않기 때문에, 자체 프로모터에 의해 기능적으로 전사되지 않는다. 그러나, 레트로바이러스와 헤파드나바이러스 및 특히 HIV, HBV에 있어서, 스플라이싱에 의해 발생하는 역전 인트론이 제거되는 경우, 바이러스 프로모터에 의한 전사작용은 mRNA를 형성하게 된다. 레트로바이러스에 있어서, 스플라이싱된 트랜스크립트의 역전사작용과 숙주세포 크로모솜으로의 프로바이러스 인티그레이션에 의해 지시유전자는 자체 프로모터에 의해 기능적으로 전사된다. HBV에서는 스플라이싱된 트랜스크립트의 역전사작용과 숙주세포에서의 게놈 DNA 순환에 의한 결과로서, 지시유전자가 자체 프로모터에 의해 기능적으로 전사 가능하게 된다.

비기능적 지시유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터는 입자-기초 또는 비입자-기초 어세이에서 내성테스트를 실시하기 위해 사용할 수 있게 된다. 상기 입자 기초 어세이는 내성 테스트 벡터 바이러스 입자에 기초를 두게 되는 바, 상기 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 복제가 잘되지 않으며, 내성 테스트 벡터 숙주세포에 의해 만들어진다. 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 생산을 위해 필요한 트랜스액팅인자는 패키지 발현 벡터에 의해 제공되는 바, 상기 패키지 발현 벡터는 패키지 숙주세포로 트랜스펙션된 것이다. 반면에, 비입자기초 내성테스트는 패키지 발현 벡터가 없는 경우에 내성 테스트 벡터에 의해 단일 숙주세포가 트랜스펙션됨으로써 실행된다.

기능적 지시유전자의 경우에, 상기 기능적 지시유전자는 내성 테스트 벡터에 의해 트랜스펙션된 첫 번째 숙주세포(내성 테스트 벡터 숙주세포를 말한다.)에서 효과적으로 발현된다. 따라서, 내성 테스트 벡터 숙주세포에서 지시유전자의 기능은 환자유래 분절에 의해 결정되지 않는다. 그러나, 두 번째 숙주세포에서 발현되는 지시유전자의 용량은 내성 테스트 벡터 숙주세포에서 생산되는 기능적 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 양에 따라 결정된다. 그러므로, 표적 숙주세포에서의 지시유전자의 활동성은 환자유래 분절의 활동성에 따라 결정된다.

본 발명은 HIV/AIDS 또는 HBV를 위한 항바이러스 약물 감수성 및 내성테스트에 대한 것이기도 하다. 내성 테스트 벡터 숙주세포 뿐만 아니라, HIV/AIDS 항바이러스 약물 감수성 및 내성테스트에 사용되는 본 발명의 특정한 내성테스트 벡터 역시 분석된다. 반면에 또 다른 측면에서 볼 때 본 발명은 헤파티티스를 위한 항바이러스 약물 감수성 및 내성테스트에 대한 것이기도 하다. 이와 유사하게 HBV의 경우에는 내성 테스트 벡터 숙주세포 뿐만 아니라, HBV 항바이러스 약물 감수성 및 내성테스트에 사용되는 본 발명의 특정 내성 테스트 벡터 역시 확인된다.

한편으로 본 발명은 바이러스 질병에 대해 잠재적 치료능력이 있는 항바이러스 혼합물의 생물학적인 효과를 분석 및 측정하는 것이다. 본 발명의 다른 측면은 약물의 감수성을 측정하기 위해 하나 이상의 벡터에 의해 트랜스펙션된 숙주세포에 대한 것이다. 또 다른 측면에서 본 발명은 환자로부터 유도된 바이러스 유전자와 지시유전자를 포함한 신규 내성 테스트 벡터에 대한 것이라고 볼 수 있다.

실시예

기술된 본 발명이 보다 잘 이해되어질 수 있도록, 아래와 같이 설명한다.

본 발명은: (a) 환자유래 분절과 지시 유전자를 구비한 내성 시험 벡터를 숙주 세포에 삽입하는 단계와; (b) (a) 단계에서 나온 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 표적 숙주 세포내에서의 지시 유전자 발현을 측정하는 단계와; (d) 단계(C)로부터의 지시 유전자의 발현을 단계 (a)-(c)가 항바이러스 약물이 없이 수행되었을 때와, 항바이러스 약물의 테스트 농도가 단계 (a)-(c); 단계 (b)-(c); 또는 단계 (c)에 존재할 때를 비교하는 단계를 구비한 신규한 약물의 감수성 및 내성 분석을 제공한다.

본 발명의 일 실시 양태는 (a) 환자유래 분절과 지시 유전자를 구비한 내성 시험 벡터를 숙주 세포에 삽입하는 단계와; (b) (a) 단계에서 나온 숙주 세포를 배양하는 단계와; (c) 상기 지시체가 DNA 또는 RNA 구조인 표적 숙주 세포내의 지시체를 측정하는 단계와; (d) 단계(C)로부터의 지시체 측정치를, 단계 (a)-(c)가 항바이러스 약물이 없이 수행될 때와, 항바이러스 약물의 테스트 농도가 단계 (a)-(c); 단계 (b)-(c); 또는 단계 (c)에 존재하게 될 때에 있어서와 비교하는 단계를 구비한 항바이러스 약물의 감수성을 결정하는 방법이 제공한다.

본 발명은: (a) 항바이러스 약물의 약물 감수성 표준 커브를 나타내는 단계와; (b) 상기한 감수성 테스트중 어느 하나를 사용하여 환자의 항바이러스 약물 감수성을 결정하는 단계와; (c) 단계 (b)의 항바이러스 약물 감수성을 단계 (a)에서 결정된 표준 커브와 비교하고, 이때에 항바이러스 감수성 감소는 환자의 항바이러스 약물의 내성을 증가를 나타내게 되는 단계를 구비한 환자의 항바이러스 약물 내성을 결정하는 방법을 또한 제공한다.

본 발명은: (a) 상기 방법의 어느 하나에 따라 처음에 환자의 항바이러스 약물 감수성 결정하고, 상기 환자유래 분절은 상기 약물 감수성 결정시에 환자로부터 얻는 단계와; (b) 나중에 상기 동일한 환자의 항바이러스 약물의 감수성을 결정하는 단계와; (c) 상기 단계 (a)와 (b)에서 결정된 항바이러스 약물의 감수성을 비교하여, 항바이러스 약물의 감수성이 처음과 비교하여 나중에 감소하는 것이 환자의 항바이러스 약물 내성의 발현 또는 진행을 나타내게 되는 단계를 구비한 환자의 항바이러스 약물 내성을 결정하는 방법을 또한 제공한다.

본 발명의 분석은 항바이러스 약물 감수성 및 내성이 중요한 경우 즉 예를들면, HIV, 포진 단순 바이러스(herpes simplex virus), 세포 확대 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 그외의 인간 포진(HIV) 바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 호흡기성 신시티얼(syncytial) 바이러스, 간염 A, B 및 C 바이러스, 코감기 바이러스 및 인간 유두종 바이러스를 포함하는 바이러스 병에 대해 사용될 수 있다. 상기한 부분은 현재 입수 가능한 항바이러스 화학 요법용의 특정한 바이러스를 대표하는 것이고, 바이러스에 속하는 리트로바이러스(retroviridae), 헤르페스바이러스(herpesviridae), 오소미소바이러스(orthomyxoviridae), 뉴우모바이러스(pneumovirus) 및 헤파드나바이러스(hepadnaviridae)를 나타낸다. 본 발명의 분석은 이러한 바이러스 가족군에 속하는 다른 바이러스에 기인한 감염으로부터 야기된 다른 바이러스 감염 및 다른 바이러스 가족군에 속하는 바이러스로부터 얻어진 바이러스 감염에 사용되어질 수 있다. 또한, 본 발명의 약물 감수성 및 내성 테스트는 현재 다른 치료법이 없는 바이러스 병을 치료하는 화합물을 선별하는데 유효하다.

본 발명의 약물 감수성 및 저항 테스트에서 테스트 될수 있는 바이러스의 구조, 라이프 사이클(life cycle) 및 유전적인 요소는 본 기술 분야의 기술자에게 공지되어 있다. 본 발명의 실시는 예를 들면 RNA 종양 바이러스(retrovirus)의 라이프 사이클 및 RNA 종양 바이러스(retrovirus) 보호 및 감염에 필요한 바이러스 유전자를 이해하는데 유용하다. RNA 종양 바이러스에 의해(retrovirally) 감염된 세포에서 2배수의 RNA 게놈을 포함하는 멤브레인 바이러스(a membrane virus)가 떨어져 나온다. (숙주의 감염 범위를 결정하는 역할을 하는) 엔벨롭(envelope) 당단백질이 존재하는 바이러스는 감염될 세포의 플라스마(plasma) 멤브레인의 세포 수용체에 부착한다. 수용체 결합후에, 바이러스는 숙주세포의 세포질을 통과하면서 삽입되어 코팅된다. 세포핵으로 가는중 또는 세포핵내에서, 바이러스 코어(the viral core)내의 역전사 효소 분자의 레지던트는 이중가닥 DNA 프로바이러스(the double-stranded DNA provirus)의 합성을 촉진하고, 이 합성물은 tRNA 분자를 게놈 바이러스 RNA에 결합함으로써 생장 촉진된다(be primed). 이중가닥 DNA 프로바이러스는 나중에 숙주 세포의 게놈에 삽입되고, 여기서 이중가닥 DNA 프로바이러스는 바이러스 단백질과 비리온 게놈 RNA 모두 코딩하는 mRNA에 대한 전사 주형(鑄型)(a transcriptional template)의 역할을 하고, 이는 나중에 바이러스 코어 입자에 패키징화 된다. 코어 입자가 감염된 세포의 밖으로 나갈때, 코어 입자는 세포질을 통해 이동하고, 새롭게 감염된 세포의 프라스마 멤브레인의 내부에 부착되며, 바이러스로 코딩된 엔벨롭 당단백질 유전자 산물을 포함하는 멤브레인 조각(tracts)을 코어 입자에 같이 묻혀나가면서, 성장한다. 감염-역전사. 전사, 번역, 비리온 어셈블리, 생장의 사이클은 감염이 확대됨에 따라 계속적으로 반복된다.

그 결과로, 바이러스 RNA와 프로바이러스 DNA는 바이러스의 생명주기(lifecycle)의 성공적인 완료에 중요한 수개의 시스템-액팅 요소를 코딩한다. 비리온 RNA는 그것의 3' 말단에서 바이러스 프로모터를 운반한다. 게놈이 역전사되기 때문에

복제 기술(replicative acrobatics)은 프로바이러스 게놈의 5' 말단에서 바이러스 프로모터를 배치한다. 단지 3'에서 5' 레트로바이러스 LTR은 바이러스 패키지 부위에 놓여있다. 레트로바이러스 생명주기는 바이러스로 코딩된 (virally encoded) 트랜스작용 인자의 존재를 요구한다. 바이러스-RNA-의존성 DNA 중합효소 (*pol*)-역전사 효소는 또한 바이러스 코어내에 포함되고 게놈 RNA가 통합 중간 프로바이러스 DNA(integrative intermediate proviral DNA)로 전환을 초래한다는 점에서 바이러스 생명주기에 중요하다. 바이러스 외막 당단백질, *env*는 비감염된 세포로의 바이러스 부착과 바이러스 스프레드(viral spread)에 필요하게 된다. 또한 소위 트랜스액티베이터(transactivators)라는 전사적인 트랜스-작용 인자가 있고, 이것은 통합된 모체 프로바이러스의 전사의 레벨을 조절할 수 있다. 통상적으로, 복제능이 있는 (결합 없는) 바이러스는 이것들이 이러한 모든 트랜스-작용 인자를 코딩한다는 점에서 그것만으로 완비(self-contained)된다. 이들의 결합있는 대응부(counterparts)는 그것만으로 완비되지 않는다.

헤파드나바이러스(hepadnavirus) 등의 DNA 바이러스의 경우에는, 감염에 필요한 생명 주기 및 바이러스 유전자를 파악하는 것이 본 발명의 실행에 유용하다. HBV 엔트리의 공정은 잘 정의되어 있지 않았다. HBV의 복제는 RNA 중간체 주형을 이용한다. 감염된 세포에서 복제의 제 1 단계는 비대칭 리엑스 원형 DNA(rc-DNA)이 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(ccc-DNA)로 전환하는 것이다. 감염된 간 세포의 핵내에서 발생하는 이러한 공정은 DNA 포지티브-가닥 합성의 완료 및 DNA 말단의 연결 공정을 포함한다. 제 2 단계에서, cccDNA는 숙주 RNA 중합효소에 의해 전사되어 3.5kB RNA 주형 (프리게놈)을 생성한다. 이러한 프리게놈은 바이러스 코어의 단백질과 함께 합성된다. 제 3 단계는 바이러스로 코딩된 P 단백질 역전사 효소를 이용하여 프리게놈의 RNA를 복사(copy)함으로써 제 1 네가티브-센스 DNA 가닥의 합성 공정을 포함한다. P 단백질은 또한 마이너스 가닥 DNA 프리머로 기능한다. 마지막으로, 제 2 포지티브-센스 DNA 가닥의 합성은 P 단백질 DNA 중합효소 활성화와 프리머로서 바이러스 RNA의 올리고머를 이용하여 제 1 DNA 가닥의 복사(copy)에 의해 발생한다. 프리게놈은 또한 주요 구조 코어 단백질에 대한 mRNA를 전사한다.

다음 프로차트는 본 발명에 사용가능한 각종 벡터와 숙주 세포중 몇 개를 보여준다. 이것은 모든 것을 포함하도록 의도한 것은 아니다.

벡터

지시 유전자 카세트 + 바이러스성 벡터

(기능적/비기능적 지시 유전자) (게놈 또는 서브게놈의)

↓

지시 유전자 바이러스성 벡터

(기능적/비기능적 지시 유전자)

| + 환자 서열 수용체 부위

| + 환자에서 유도된 분절

↓

내성 테스트 벡터

(환자유래 분절 + 지시 유전자)

숙주 세포

패키지 숙주 세포 - 패키지 발현 벡터로 트랜스펙션 됨

내성 테스트 벡터 숙주 세포 - 내성 시험 벡터로 트랜스펙션된 패티징 숙주 세포

표적 숙주 세포 - 내성 테스트 벡터 숙주 세포에 의해 생산된 내성 테스트 벡터 바이러스 입자에 의해 감염되는 숙주 세포

내성 테스트 벡터

"내성 테스트 벡터"는 모두 합쳐서 환자유래 분절과 지시 유전자를 포함한 DNA 또는 RNA를 함유하는 하나 또는 그 이상의 벡터를 의미한다. 내성 테스트 벡터가 하나보다 많은 벡터를 포함하는 경우에 환자유래 분절은 하나의 벡터 그리고 다른 벡터내의 지시 유전자에 포함될 수 있다. 그렇게 하나의 벡터 보다 많은 벡터를 포함하는 내성 테스트 벡터는 명확히 하기 위해 여기서 내성 테스트 벡터 시스템으로 불리지만, 그럼에도 불구하고, 내성 테스트 벡터로 이해되어야 한다. 따라서 내성 테스트 벡터의 DNA 또는 RNA는 하나 이상의 DNA 또는 RNA 분자에 포함될 수 있다. 일 실시예에서, 내성 테스트 벡터는 환자유래 분절이 지시 유전자 바이러스 벡터내로 삽입됨으로써 만들어진다. 다른 실시예에서, 내성 테스트 벡터는 환자유래 분절이 패키징 벡터내로 삽입됨으로써 만들어지고, 지시 유전자는 지시 유전자 바이러스성 벡터 등의 제 2 벡터에 포함된다. 본 명세서에 사용된 것처럼, "환자유래 분절"은 각종 수단을 사용하여 환자에서 직접 얻은 하나 이상의 바이러스 분절을 가리킨다. 상기 각종 수단은 감염된 환자의 세포(예를 들면, 말초 혈액 단핵 세포, PBMC), 혈청 또는 다른 체액에 존재하는, 바이러스 RNA에서 제조된 바이러스 DNA 또는 상보 DNA(cDNA)를 사용한 환자유래 분절 집단의 분자 클로닝(molecular cloning) 또는 증합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭 등이다. 바이러스 분절이 환자에서 "직접 얻어지는" 경우에, 바이러스는 배양을 통과하지 않거나, 또는 바이러스가 배양된다면, 배양시에 돌연변이의 선택을 필수적으로 제거하도록 통과를 최소로 함으로써 얻어진다. 용어 "바이러스 분절"은 기능적 바이러스 서열 또는 항 바이러스 약물의 표적인 유전자 산물(단백질 등)을 코딩하는 바이러스 유전자를 말한다. 본 명세서에 사용된 용어 "기능적 바이러스 서열"은 인핸서 프로모터, 폴리아데닐레이션 부위, *tar*과 RRE와 같은 트랜스-작용 인자의 작용 부위, 패키징 서열, 통합 서열, 또는 스플라이싱 서열 등의 기능적 활성을 가진 핵산 서열(DNA 또는 RNA)을 말한다. 만약 약물이 하나 보다 많은 기능적 바이러스 서열 또는 바이러스 유전자 산물을 표적으로 삼는 경우에, 각각의 상기 바이러스 유전자에 해당하는 환자유래 분절은 내성 테스트 벡터내에 삽입될 것이다. 두 개의 상이한 기능적 바이러스 서열 또는 바이러스 유전자 산물을 표적으로 삼는 두 개 이상의 항바이러스가 평가되는 복합 치료의 경우에, 각각의 기능적 바이러스 서열 또는 바이러스 유전자 산물에 해당하는 환자유래 분절은 내성 테스트 벡터내에 삽입될 것이다. 환자유래 분절은 지시 유전자 바이러스 벡터 또는 예를 들면, 본 명세서에 설명된 것처럼 사용된 특정 제작에 의존하는 패키징 벡터에서 환자 서열 수용체 부위로 불리는 고유의 제한 부위 또는 특이적 위치내로 삽입된다.

본 명세서에서 사용된, "환자유래 분절"은 인간과 각종 동물종에서 유도된 분절을 포함한다. 그러한 종으로는 침팬지, 말, 소(cattles), 고양이 그리고 개가 포함되지만, 그것으로 한정되지는 않는다.

환자유래 분절은 또한 몇가지 다른 클로닝 기술을 이용하여 내성 테스트 벡터내로 통합될 수 있다. 예를 들면, 부류 II 제한 부위를 플라스미드 백본과 환자유래 분절내로의 도입을 거치는 클로닝 또는 우라실 DNA 글리코실라제 프리머 클로닝(참조)이다.

환자유래 분절은 분자 클로닝, 유전자 증폭, 혹은 이들의 변형 중 어느 한 방법에 의해 얻을 수 있으며, 후술된 바와 같이 환자 서열 수용체 부위를 도입함으로써 그 선단에서 내성테스트 벡터로 도입된다. 예를 들면, PCR과 같은 유전자 증폭방법에서 환자 서열 수용체 부위에 해당하는 제한부위는 PCR반응에 사용되는 프라이머의 선단에 연결된다. 이와 유사하게, cDNA 클로닝과 같은 분자 클로닝방법에서 상기 제한부위는 제1 또는 제2 가닥 cDNA 합성에 사용되는 프라이머의 선단에 연결되거나, DNA의 프라이머-리페어(primer-repair)와 같은 방법에서 클로닝된 DNA든지 클로닝되지 않은 DNA든지 상관없이 상기 제한부위는 리페어 반응에 사용되는 프라이머에 결합될 수 있다. 상기 환자 서열 수용체 부위와 프라이머는 환자유래 분절(patient-derived segment)의 리프리젠테이션(representation)을 향상시키기 위한 것이다. 제한부위의 조합에는 하나의 내성 테스트 벡터에서 홀로 리프리젠티 상태에 있게 되는 환자유래 분절의 리프리젠티(representation of patient-derived segment)를 제공하는 계획된 환자 서열 수용체 부위가 구비된다.

내성 테스트 벡터는 환자 서열 수용체 부위를 도입하고, 환자유래 분절을 증폭 또는 클로닝하고, 상기 증폭 또는 클로닝된 서열을 환자 서열 수용체 부위에서 정확히 지시유전자 바이러스 벡터에 주입함으로써 개조되는 지시유전자 바이러스 벡터에 의해 만들어진다. 상기 내성 테스트 벡터는 게놈 바이러스 벡터(genomic viral vectors) 또는 보조게놈 바이러스 벡터(subgenomic viral vectors)와 지시유전자 카세트(indicator gene cassette)에서 차례로 추출된 지시유전자 바이러스 벡터로부터 만들어진다. 그리고, 내성 테스트 벡터는 숙주세포로 도입된다. 이와는 다르게, 내성 테스트 벡터(역시 내성 테스트 벡터 시스템에 관한 것임)는 패키징 벡터(packaging vector)로 환자 서열 수용체 부위를 도입하거나, 환자유래 분절을 증폭또는 클로닝한 다음 증폭 또는 클로닝된 시퀀트를 환자 서열 수용체 부위에서 패키징 벡터에 삽입하고 상기 패키징 벡터를 지시유전자 바이러스 벡터와 공동 트랜스펙션함으로써 만들어진다.

본 발명의 실시예에서, 상기 내성 테스트 벡터는 후술된 바와 같이 패키징 발현 벡터와 함께 패키징 숙주세포로 도입됨으로써, 내성 테스트 벡터 바이러스 입자를 생산하게 되는 바, 상기 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 "입자-기초 실험

(particle-base test)"에 관련된 약물 내성 및 감수성 실험에 사용된다. 본 발명의 또 다른 실시예에서 상기 내성실험 벡터는 패키지 발현 벡터가 없는 경우에 숙주세포로 도입됨으로써 "비입자 기초 실험"이라고 볼 수 있는 약물 내성 및 감수성 실험을 실행하게 된다. 여기서, 사용된 패키지 발현 벡터는 패키지 단백질(코어 와 엔베로프 폴리펩타이드와 같은 구조 단백질), 작용인자, 또는 복제되지 않는 레트로바이러스나 헤파드나바이러스에 필요한 인자들을 제공한다. 이러한 상황에서 복제 가능 바이러스 계통은 스스로를 복제할 수 없게 됨으로써 약해진다. 이것은 패키지 발현 벡터가 약해진 계통을 가지고 있는 세포에서 나타나는 불완전 바이러스 계통을 살리기 위해 필요한 트랜스액팅이나 소실된 유전자를 생산할 수 있다고 하더라도, 약해진 계통이 자기자신은 살릴 수 없다는 것을 의미한다.

지시체 또는 지시유전자

"지시체 또는 지시유전자"라 함은 아래와 같은 특성을 갖는 단백질이나, DNA 또는 RNA 구조를 코딩하는 핵산을 의미한다. 상기 지칭한 단백질이나 DNA 또는 RNA 구조는 직접적으로, 혹은 반응을 통하여 측정 가능하거나 관찰가능한 면을 발생시키는데, 예를 들어, 측정 가능한 파장의 빛이나 색깔, 혹은 지시체로서 DNA나 RNA가 사용되었을 경우에는 특이한 DNA나 RNA구조를 생성하거나 상기구조로서의 변화를 발생시키게 된다.

지시유전자로서는 베타-갈락토시데스(beta-galactosidase)를 코딩하는 이 콜리 락 포토니스 피칼리스(E. coli lacZ, Photonis pyralis)(the firefly) 나 레닐라 레니포미스(Renilla reniformis)(the sea pansy)로부터 루시페라제 luc 유전자(luciferase luc gene)를 코딩하는 luc 유전자, 알칼리성 포스페타제(alkaline phosphatase)를 코딩하는 이 콜리 포 에이(E. coli phoA) 유전자, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase)를 코딩하는 녹색형광 단백질(green fluorescent protein)과 박테리아성 CAT 유전자(bacterial CAT gene)을 예로 들 수 있다. 또 다른 지시유전자의 예로서는 방사선 면역측정법(RIA) 이나, 성장인자, 사이토킨(cytokines)과 세포 표면 항원(성장 호르몬, IL-2 또는 CD4)를 포함한 형광작용 세포 분류(fluorescent activated cell sorting)(FACS)과 같이 어세이(assay)단위로 쉽게 측정되는 분비 단백질(secreted protein)이나 세포표면 단백질을 들 수 있다. "지시유전자" 역시 선택할 수 있는 마커(marker)라고 할 수 있는 선택유전자를 포함하는 것으로 알려져 있다. 포유류의 세포에 적합한 마커(marker)로는 디하이드로폴레이트 리덕타제(dihydrofolate reductase)(DHFR), 티미딘 키나제(thymidine kinase), 하이그로미신(hygromycin), 네오미신(neomycin), 제오신(zeocin) 또는 E. coli gpt를 예로 들 수 있다. 앞에서 예로 든 지시유전자에 있어서, 상기 지시유전자와 환자유래 분절은 분리된 별개의 유전자이다. 어떤 경우에는 환자유래 분절이 지시유전자로 사용되기도 한다. 환자유래 분절이 항바이러스의 표적이 되기는 하나 이상의 바이러스 유전자에 연결되는 경우에는 상기 바이러스 유전자가 지시유전자로서의 역할을 하기도 한다. 예를 들어, 바이러스 프로테아제 유전자(viral protease gene)는 지시유전자로서의 역할도 하게 되는 바, 이것은 색소생성 기질(chromogenic substrate)을 분할하거나, 순차적으로 크로모제닉 불활성기질(chromogenic substrateinactive)을 분할하는 효소원(zymogen)을 활성화시키고, 색채반응을 일으키는 상기 바이러스 프로테아제 유전자의 기능 덕분이다. 앞서 기술된 모든 예에서와 같이 지시유전자는 "기능적"이거나 "비기능적"이지만, 각 예에서 나타난 표적세포안의 지시유전자는 전적으로 환자유래 분절에 의해 결정된다.

기능적 지시유전자

"기능적 지시유전자"의 경우에 지시유전자는 아래에 기술된 바와 같이 환자유래 분절에서 독립된 "패키지 숙주세포/내성 테스트 벡터 숙주세포"로 나타나지만, 기능적 내성 테스트 벡터 입자와 이에 속한 표적세포가 효율적으로 감염되지 않으면, 기능적 지시유전자는 표적 숙주세포로 나타날 수 없다. 기능적 지시유전자에 대한 한 실시예에서는 조절요소(control indicator)와 지시단백질을 코딩하는 유전자를 포함한 지시유전자 카세트가 바이러스 벡터의 천연의 또는 외래의 인핸서/promoter(enhaner/promoter)로서 같거나 반대의 전사방향(transcription orientation)을 가진 지시유전자 바이러스 벡터로 삽입된다.

HIV나 HBV와 같은 경우에 기능적 지시유전자 중의 하나는 지시유전자와 그 프로모터가 HIV-LTR나 HBV 인핸서-프로모터와 각각 같거나 반대되는, 또는 바이러스 벡터와 관련된 CMV IE 인핸서/프로모터와 같거나 반대되는 전사오리엔테이션을 갖도록 한다.

비기능적 지시유전자

이와 달리 상기 지시유전자는 "비기능적" 이 될 수 있는 바, 그것은 상기 지시유전자가 내성 테스트 벡터에 의해 트랜스펙션되는 숙주세포에 의해 효과적으로 발현되지 않기 때문이다. 여기서, 상기 내성테스트 벡터는 한 개이상의 환자유래 분절 생성물의 작용에 의해 기능적 지시유전자로 될 때 까지 내성테스트 벡터 숙주세포라고 할 수 있다. 지시유전자는 본 발명에 따른 유전자 조작을 통해 비기능적으로 된다.

1. 치환된 프로모터(permuted promoter)

본 발명의 첫 번째 실시예에서는 프로모터의 위치 때문에 비기능적으로 되며, 여기서, 프로모터는 지시유전자와 같은 전사 방향이 되더라도 지시유전자 코딩 시퀀트를 앞지르지 않고 뒤따르게 된다. 이와 같이 잘못위치된 프로모터를 "치환된 프로모터"라고 한다. 상기 치환된 프로모터에 덧붙여 비기능적 지시유전자의 방향은 바이러스 벡터의 천연 또는 외래 프로모터/인핸서의 것과 반대로 된다. 따라서, 비기능적 지시유전자의 코딩 시퀀트는 치환된 프로모터나 바이러스 프로모터에 의해 전사되지 않는다. 상기 비기능적 지시유전자와 그에 따른 치환된 프로모터는 하나 이상의 바이러스 단백질의 작용에 의해 기능적으로 된다. HIV의 경우에 치환된 프로모터를 가진 비기능적 지시자는 T7 파지(phage) RNA 중합효소(polymerase) 프로모터(이하 T7 프로모터 라고 함)를 지시유전자 처럼 같은 전사방향의 5' LTR에 위치시킨다. 상기 지시유전자는 지시유전자 카세트가 T7 프로모터의 상방에 위치되기 때문에 상기 T7 프로모터에 의해 전사되지 않는다. 내성 테스트 벡터의 비기능적 지시유전자는 표적세포의 감염에 대한 역치환제(reverse transcriptase)에 의해 기능적 지시유전자로 바뀌는 바, 이는 지시유전자 코딩영역 비례하여 5' LTR에서 3' LTR로 복사되어 T7 프로모터의 위치가 달라짐으로써 이루어진다. 회복된 지시유전자의 인티그레이션(integration)이 HIV 인티그라제(integrase)에 의해 표적세포 크로모솜(표적세포 chromosome)으로 인티그레이션 되는 것에 이어서, 표적세포에 의해 나타난 핵 T7 RNA 중합효소는 지시유전자를 전사한다. HBV의 경우에는 치환된 프로모터를 가진 비기능적 지시유전자 중의 하나가 인핸서-프로모터를 지시유전자의 하방이나 3'에 위치시켜 동일한 전사방향을 같게 한다. 상기 지시유전자는 지시유전자 카세트가 상방에 위치됨으로써 인핸서-프로모터에 의해 전사되지 않는다. 내성 테스트 벡터의 비기능적 지시유전자는 역전사와 지시유전자 코딩 영역에 비해 인핸서-프로모터의 위치가 상방향으로 재조정되어 발생하는 HBV 지시유전자 바이러스 벡터의 계산에 의해 기능적 지시유전자로 바뀐다.

치환된 프로모터는 표적 숙주세포에서 전사되는 유카리오틱(eukaryotic)이나 프로카리오틱(prokaryotic)이 될 수 있다. 바람직한 것은 상기 프로모터가 크기가 작아 바이러스 복제를 억제하지 않고 바이러스 게놈으로 삽입되는 것이다. 보다 바람직한 것은 크기가 작고, 박테리오파지(bacteriophage) 프로모터 처럼 단일서브유닛(single subunit) RNA에 의해 전사될 수 있는 프로모터를 사용하는 것이다. 이러한 박테리오파지 프로모터와 그 동족 RNA 중합효소는 파지 T7, T3, Sp6를 포함한다. 핵 위치설정 시퀀트(NLS)은 회복된 지시유전자를 전사할 필요가 있을 경우에는 RNA 중합효소에 부착되어 RNA 중합효소의 발현을 상기 핵에서 이루어지게 한다. 이러한 NLS는 SV40 T 안티젠(antigen)과 같은 핵 이전 단백질(nuclear-transported protein)으로부터 얻을 수 있다. 파지 RNA 중합효소가 적용될 경우에는 EMC 바이러스 5' 비이전 영역(UTR)과 같은 인터널 리보솜 엔트리 위치(internal ribosome entry site)(IRES)가 지시유전자의 앞부분에 추가되어 일반적으로 드러난 복제물이 이전된다. HIV의 경우에는 치환된 프로모터 자체가 5' LTR 내의 위치로 도입됨으로써 LTR 기능이 억제받지 않는 한도 내에서 역전사되는 동안에 3' LTR로 복제되는 바, 이러한 범위는 LTR의 U5와 R의 부분에서 내에서 특히, 기능적으로 중요하고 잘 보존된 U5와 R의 영역에서 이루어짐이 바람직하다. HBV의 경우에는 상기 치환된 프로모터는 HBV DNA 복제를 위해 필요한시스 작용요소(cis action element)를 억제하지 않는 어떤 부위이나 위치될 수 있다. 트랜스펙션 물질(transfection artifact)(DNA 연결)에 의해 비기능적 지시유전자의 부적절한 발현이 발생하면 블로킹 서열(blocking sequence)가 내성테스트 벡터(resistance test vector)의 끝에 추가될 수 있다. 위에서 예로든 치환된 T7 프로모터의 HIV에 있어서, 이러한 블로킹 서열은 T7 전사종결인자로 이루어지고 DNA 연결로부터 유발된 블록 리드스로우 전사(block readthrough transcription)에 위치되지만, 역전사되는 동안에 치환된 T7 프로모터의 위치가 5' LTR에서 3'LTR로 재조정됨으로써 전사가 유발되지는 않는다.

2. 치환된 코딩영역(permuted coding region)

본 발명의 두 번째 실시예에서는 지시유전자의 5'와 3' 코딩영역의 상대적인 위치 때문에 지시유전자가 비기능적으로 된다. 즉, 3' 코딩영역 이 5' 코딩영역을 뒤따르지 않고 앞지르게 된다. 이와 같이 잘못놓여진 코딩영역을 "치환된 코딩영역"이라고 한다. 비기능적 지시유전자의 방향은 바이러스 벡터의 천연 또는 외래의 프로모터/인핸서의 방향과 같거나 반대로 되는 바, 이것은 기능적 지시유전자에 대한 mRNA 코딩이 방향 중 하나의 이벤트에서 만들어지기 때문이다. 비기능적 지시유전자와 그 치환된 코딩영역은 한 개 내지 그 이상의 환자유래 분절 생성물에 의해 기능적으로 된다. HIV에 있어서, 치환된 코딩영역을 가진 비기능적 유전자의 두 번째 예는 3' LTR U3 영역과 3' 지시유전자 코딩 영역의 프로모터와 연결된 5' 지시유전자 코딩영역에 위치되는 바, 이러한 영역은 바이러스 LTRs와 같은 전사방향을 가진 각 코딩영역과 함께 HIV 게놈의 상부에 위치된다. 상기 두 예에서 5'과 3' 코딩영역은 스플라이스 도너(splice donor)와 수용체 시퀀스(acceptor sequence)에 각각 연결되는 바, 상기 스플라이스 도너와 수용체 시퀀스는 이형(heterologous) 또는 인공적인 스플라이싱 신호(artificial splicing signal)가 될 수 있다. 상기 지시유전자는 치환된 코딩영역이 기능적으로 스플라이싱된 전사의 형성을 억제하기 때문에 연결된 프로모터나 바이러스 프로모터에 의해 기능적으로 전사되지 않는다. 내성테스트 벡터의 비기능적 지시유전자는 표적세포의 감염에 따른 역전사제(reverse transcriptase)에 의해 기능적 지시유전자로 변화되는 바, 이러한 현상은 3' LTR이 5' LTR로 복사됨에 따라 5' 과 3' 지시유전자 코딩영역 서로간의 상대적인 위치가 재조정됨으

로써 발생한다. 5' 코딩영역과 연결된 프로모터에 의한 전사에 이어서, RNA splicing에 의해 5'와 3' 코딩영역이 결합됨으로써 기능적 지시유전자 생성물이 만들어진다. 치환된 코딩영역을 가진 비기능적 지시유전자 중의 하나는 HBV의 경우에 3' 지시유전자 코딩영역은 상방 또는 인헨서-프로모터의 5'와 지시유전자의 5' 코딩영역에 위치된다. 지시유전자 5'과 3' 코딩영역의 전사방향은 서로 동일하고, 지시유전자의 바이러스 벡터로서 동일하다. 그러나, 지시유전자 5'과 3' 코딩영역이 내성테스트 벡터(즉, 5' 코딩영역이 3' coding region의 아래에 위치된다.)에서 치환됨으로써 스플라이스되어 기능적 지시유전자 코딩영역을 만드는 mRNA가 전사되지 않는다. 지시유전자 바이러스 벡터의 역전사와 순환(circularization)에 이어서, 지시유전자 3' 코딩영역이 아래 즉, 인헨서-프로모터와 5' 코딩영역에 대한 3'에 위치되며, 이에 따라 5' 코딩영역은 스플라이스됨으로써 기능적 지시유전자 코딩영역을 생산하는 mRNA의 전사작용을 이루게 된다.

3. 역전 인트론(inverted intron)

본 발명의 세 번째 실시예에서는 지시유전자는 "역전 인트론"을 사용하여 비기능적으로 되는 바, 상기 역전 인트론은 지시유전자와 반대되는 전사방향을 가진 지시유전자의 코딩 서열에 삽입된 것이다. 프로모터에 연결된 지시유전자 카세트의 모든 전사방향은 자신의 것을 포함하여 바이러스 조절요인의 것과 대항하는 반면, 인공 인트론의 방향은 바이러스 조절요인과 동일하다. 자체적으로 프로모터에 연결된 지시유전자의 전사작용은 역전 인트론이 이러한 방향에서 스플라이스될 수 없기 때문에 기능적인 전사작용을 일으키지 않게 된다. 그러나, 결과적이 트랜스크립이 안티센스 방향(antisense orientation)을 포함하기 때문에 지시유전자가 여전히 기능적으로 발현됨에도 불구하고 지시유전자의 전사작용은 바이러스 조절요인이 RNA의 스플라이싱에 의해 역전 인트론을 제거하게 된다. 이어서, 상기 트랜스크립의 역전사작용(reverse transcription)과 그 결과로 발생하는 레트로바이러스 DNA의 인티그레이션 또는 헤파드나바이러스(hepadnavirus) DNA의 순환(circularization), 지시유전자는 역전 인트론이 이미 제거되었기 때문에 연결된 프로모터를 이용하여 기능적으로 전사될 수 있다. 이 경우에, 상기 지시유전자는 자체적으로 바이러스 조절요인에 대해 반대 방향으로된 완전한 트랜스크립션 유닛과 함께 자체적인 기능적 프로모터를 포함하기도 한다. 따라서, 비기능적 지시유전자는 바이러스 조절요소에 의해 전사되는 잘못된 방향을 갖게 되고, 역전 인트론이 스플라이싱에 의해 적절히 삭제되지 않아 자체의 프로모터에 의해 기능적으로 전사되지 않는다. 그러나, 레트로바이러스(retrovirus)와 HIV와 헤파나바이러스, 그리고 특히 HBV 및 바이러스 프로모터(HIV LTR 또는 HBV 인헨서-프로모터)에 의한 전사에 의해 스플라이싱에 따른 역전 인트론이 제거되는 결과가 초래된다. 결과적으로 발생하는 스플라이스된 트랜스크립의 역전사와 숙주세포 크로모솜, 또는 HBV 벡터의 순환으로 인티그레이션되는 프로바이러스에 따라 지시유전자는 자체의 프로모터에 의해 기능적으로 전사될 수 있게 된다. 스플라이스 도너와 수용체 위치로 구성되어 상기 인트론을 제거하는 역전 인트론은 지시유전자의 이송을 억제하기 위해 지시유전자의 코딩영역에 위치되는 것이 바람직하다. 상기 스플라이스 도너와 수용체는 어떤 것이라도 가능하다. 바람직한 스플라이스 도너-리셉터(splice doner-receptor)는 CMV IE 스플라이스 도너와 인간의 알파글로빈 유전자(human alpha globin gene)(인트론 A)의 2차 엑손(exon)의 스플라이스 수용체인 것이 바람직하다.

지시유전자 바이러스 벡터-제조

여기에 사용된 벡터로서의 "지시유전자 바이러스 벡터"는 지시유전자와 그에 따른 조절요소 및 하나 이상의 바이러스 유전자를 포함한다. 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 다음에서 정의된 지시유전자 카세트와 "바이러스 벡터"로 이루어진다. 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 인헨서, 스플라이싱 신호 폴리아데니레이션 서열(splicing signal, polyadenylation sequences), 전사종결인자 및 다른 정상 서열(regulatory sequence)을 더욱 포함할 수도 있다. 덧붙여서 말하자면, 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 기능적으로 되거나 비기능적으로 된다. 항바이러스 약물의 표적인 상기 바이러스 분절이 지시유전자 바이러스 벡터에 포함되지 않는 경우에, 상기 바이러스 분절은 2차 벡터에 제공된다. "지시유전자 카세트"는 지시유전자와 조절요소를 포함한다. "바이러스 벡터"는 다음과 같은 것들의 일부 또는 모두를 포함하는 벡터라고 할 수 있다. 다음: 유전자 생성물을 코딩하는 바이러스 유전자, 조절 서열(control sequences), 바이러스 패키지 서열, 레트로바이러스에 대한 인티그레이션 서열. 상기 바이러스 벡터는 항바이러스 약물의 표적이 되는 한 개 또는 그 이상의 바이러스 분절을 추가로 포함할 수 있다. 바이러스 유전자를 포함하는 바이러스 벡터 중의 두가지는 "게놈 바이러스 벡터"와 "서브게놈 바이러스 벡터"이다. "게놈 바이러스 벡터"는 한 개 또는 그 이상의 바이러스 유전자를 제거하는 과정을 포함하여 바이러스 복제를 부적합하도록 함과 동시에 mRNA 발현과 완전한 바이러스의 프로세싱 특성(processing characteristics)을 보존한다. HIV 약물 허용가능성 및 내성테스트에 대한 한 실시예에서, 상기 게놈 바이러스 벡터는 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, nef genes(대부분의 env가 제거될 수도 있음)을 포함한다. "서브게놈 바이러스 벡터"는 단백질을 코딩할 수도 있는 한 개 또는 그 이상의 코딩영역을 포함하는 바, 상기 단백질은 항바이러스 약물의 표적이다. HIV에 대한 바람직한 실시예는 HBV P 유전자를 포함하는 서브게놈 바이러스 벡터이다. HIV의 경우에 바이러스 벡터 제조에 사용되는 두가지 예는 HXB2 (Fisher et al., (1986) Nature, 320, 367-371)과 NL4-3(Adachi et al., (1986) J. Virol., 59, 284-291)이다. HBV의 경우에는 많은 수의 완전한 길이의 게놈 서열(full length genomic sequences)가 특징화(characterize)되고, GenBank Nos. M54923, M38636, J02203, X59795와 같은 HBV의 제조에 사용된다. 상기 바이러스 코딩 유전자는 천연의 인헨서/프로모터 또는 외래 바이러스 또는 세포 인헨서/프로모터의 조종을 받게 된다. 본 발명의 바람직한 실시예에 따

른 HIV 약물 허용가능성 및 내성테스트에서는 게놈 또는 서브게놈 바이러스 코딩영역이 HIV-LTR의 천연의 인핸서/프로모터나 CMV 초기(immediate-early) (IE) 인핸서/프로모터의 조종을 받게 된다. 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 HBV 약물 허용가능성 및 내성테스트에서는 게놈 또는 서브게놈 바이러스 코딩영역이 CMV 초기 (IE) 인핸서/프로모터 코딩영역의 조종을 받게 된다. 표적 또는 항바이러스 약물의 표적인 한 개 또는 그 이상의 지시유전자 바이러스 벡터의 경우에 있어서, 상기 벡터는 환자 서열 수용체 부위를 포함한다. 상기 환자유래 분절은 지시유전자 바이러스 벡터에 있는 환자 서열 수용체에 삽입되는 바, 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 상술한 바와 같이 내성 테스트 벡터 이다.

"환자 서열 수용체 부위"는 환자유래 분절의 삽입을 위한 위치이며, 상기 위치들은 1) 위치-직결 돌연변이 유도물 (mutagenesis)에 의해 벡터로 도입되는 고유제한 부위(unique restriction site); 2) 벡터에서의 자연발생적 고유 제한 부위; 또는 3) 양자택일 클로닝 방법 (e.g. UDG 클로닝)과 같은 방법에 의해 선택된 위치, 로 이루어진다. 한 실시예에서 상기 환자 서열 수용체 부위는 지시유전자 바이러스 벡터로 도입된다. 환자 서열 수용체 부위는 항바이러스 약물의 표적인 바이러스 단백질의 코딩영역의 내부나 그 근처에 위치된다. 환자 서열 수용체 부위의 도입을 위해 사용되는 바이러스 서열은 그 위치에서 발견되는 아미노산 코딩 서열에서 체인지(change) 또는 컨저버티브 체인지(conservative change)될 수 있는 것으로 선택됨이 바람직하다. 상기 환자 서열 수용체 부위는 비교적 잘 보존된 바이러스 게놈 영역의 내부에 위치되어 환자유래 분절의 도입을 촉진토록 하는 것이 바람직하다. 이와 달리, 상기 환자 서열 수용체 부위는 기능적으로 중요한 유전자들 사이나, 정상 서열들 사이에 위치되기도 한다. 환자 서열 수용체 부위는 바이러스 게놈의 영역이나 그 근처에 위치되는 바, 상기 바이러스 게놈은 대응하는 저항위치를 환자유래 분절로 도입하기 위해 사용되는 프라이머에 의해 프라이밍 되도록 비교적 잘 보존된다. 환자유래 분절의 리프리젠테이션을 더욱 향상시키기 위해서 디제네레이트 풀(degenerate pools)이 바이러스 서열 헤테로제니티(heterogeneity)를 적용하도록 구성되거나, 데옥시이노신(deoxyinosine)(I)과 같은 잔유물이 되기도 하는 바, 상기 데옥시이노신은 다중 베이스 페어링 능력(multiple base-pairing capabilities)을 가진다. 동일하거나 겹치는 저항 위치 간격을 정의하는 환자 서열 수용체 부위를 갖는 내성테스트 벡터 세트는 약물 저항 및 수용 가능성 실험에 함께 사용되어 환자유래 분절의 리프리젠테이션을 제공하게 되는 바, 상기 환자유래 분절은 주어진 환자 서열 수용체 부위와 동일한 내부 저항위치를 포함하며, 따라서, 홀로 내성테스트 벡터에서 리프리젠테이션 상태에 있게 된다.

숙주세포

내성테스트 벡터는 숙주세포로 도입된다. 숙주세포로서 적당한 것은 포유동물의 세포이다. 숙주세포는 바이러스 감염의 중요한 표적이 되는 인간 근육조직과 세포로 하는 것이 바람직하다. HIV의 경우에는 인간 T 세포, 단핵세포(monocytes), 마크로파지 (macrophage), 수지상 세포 (dendritic cells), 랑게르한스 세포(Langerhans cells), 조혈모세포 (hematopoietic stem cells), 선구 세포(precursor cell) 및 그 밖의 다른 세포와 같은 인간세포가 포함된다. HBV의 경우에는 간암 세포주(hepatoma cell lines)(HepG2, Huh 7), 기본 인간 간세포(primary human hepatocytes), 포유동물 세포와 같이 슈도타입(pseudotyped)의 HBV 및 그 밖의 다른 세포에 의해 감염될 수 있는 것들이 포함된다. 인간 유래 숙주세포에 의해 항바이러스 약물이 세포로 확실히 들어가게 되며, 세포효소장치에 의해 항바이러스 억제제의 신진대사 릴리먼트 (relevant)로 전환된다. 본 명세서에서 숙주세포는 "패키지 숙주세포", "내성 테스트 벡터 숙주세포" 또는 "표적 숙주세포" 로 나타내어 진다. "패키지 숙주세포"는 본 명세서에서 사용되는 내성 테스트 벡터와 같은 복제능력 결여 바이러스 벡터에 의해 요구되는 이송작용인자(trans-acting factor)와 바이러스 패키지 단백질을 제공하여 내성 테스트 벡터 바이러스 입자를 생성하는 숙주세포이다. 상기 패키지 단백질은 내성 테스트 벡터 자체나 패키지 발현 벡터, 또는 두가지 모두에 포함된 바이러스 유전자의 발현에 의해 제공되기도 한다. 패키지 숙주세포는 한 개 또는 그 이상의 패키지 발현 벡터에 의해 트랜스펙션되는 숙주세포이며, 내성 테스트 벡터에 의해 트랜스펙션된 경우에는 "내성 테스트 벡터 숙주세포"라고 할 수 있으며, 때로는 패키지 숙주세포/ 내성 테스트 벡터 숙주세포가 된다. 패키지 숙주세포로서 사용에 적합한 숙주세포는 HIV에 대해서는 293 인간의 배 신장세포 (293, Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36: 59, 1977), BOSC23 (Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 8392, 1993), tsa54와 tsa201 cell lines (Heinzel et al., J. Virol. 62, 3738, 1988)이고, HBV에 대해서는 HepG2 (Galle and Theilmann, L. Arzheim.-Forsch. 약물 Res. (1990) 40, 1380-1382). (Huh, Ueda, K et al. Virology 1989)169, 213-216) 이다. "표적 숙주세포"은 지시유전자의 발현이나 저항이 발생하는 경우에 내성 테스트 벡터 숙주세포에 의해 만들어지는 내성 테스트 벡터 바이러스 입자에 의해 감염된다. 표적 숙주세포로 사용하기에 적합한 숙주세포는 인간 T 세포 루키미아 세포라인 (human T cell leukemia cell lines)을 포함하는 바, 여기에는 Jurkat (ATCC T1B-152), H9(ATCC HTB-176), CEM (ATCC CCL-119), HUT78(ATCC T1B-161) 및 그 파생물들이 포함된다.

약물 감수성 및 내성테스트

본 발명에 따른 약물 감수성과 내성테스트는 한 개 또는 그 이상의 숙주세포에서 실행된다. 바이러스 약물 감수성은 지시유전자 발현의 주어진 비율 (지시유전자 발현의 50 전사방향이 저해되는 때의 항바이러스 약제에 대한 IC_{50} 이 농도가 된다.) 이 저해되는 때의 항바이러스 약제의 농도에 따라 결정된다. 정해진 항바이러스 약물의 약물 감수성에 대한 기준곡선은 본 발명에 따른 방법을 사용하는 표준 실험 바이러스 분절나 순수약물 환자(아무런 항바이러스 약물도 섭취하지 않은 환자)에서 추출된 바이러스 분절에 의해 발달하기도 한다.

이에 대응하여, 바이러스 약물 저항은 주어진 환자에 대해 주어진 기준과 약물 감수성을 비교하고, 동일한 환자에 시간이 초과된 시퀀셜 측정을 실시함으로써 바이러스 약물 감수성이 감소되는 바, 이는 지시유전자 발현 억제가 증가함(지시유전자 발현 감소)에 따라 결정된다.

첫 번째 형태의 약물 감수성 및 내성테스트에서, 상기 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 첫 번째 숙주세포(내성 테스트 벡터 숙주세포)에 의해 만들어지는 바, 상기 첫 번째 숙주세포는 내성 테스트 벡터와 패키지 발현 벡터를 이용하여 패키지 숙주세포를 트랜스펙팅하여 만들게 된다.

다음에, 상기 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 지시유전자의 발현이 측정되는 경우에 2차 숙주세포(표적 숙주세포)를 감염시키기 위해 사용된다. 내성 테스트 벡터에 의해 트랜스펙션되는 패키지 숙주세포를 포함하는 두 개의 세포 시스템은 내성 테스트 벡터 숙주세포로서, 표적세포와 함께 지시유전자가 기능적이거나 비기능적이거나 일 경우에 사용된다. 기능적 지시유전자는 패키지 숙주세포의 트랜스펙션에 따라 효과적으로 발현되며, 본 발명에 따른 실험을 시행하기 위한 내성 테스트 벡터 숙주세포 상청액에 의한 표적 숙주세포의 감염을 필요로 하게 된다. 치환된 프로모터, 치환된 코딩영역 또는 역전 인트론을 가진 비기능적 지시유전자는 패키지 숙주세포의 트랜스펙션에 따라 효과적으로 발현되지 않으며, 이에 따라, 표적 숙주세포의 감염은 내성 테스트 벡터 숙주세포 및 표적 숙주세포에 의한 보조배양을 통해서, 또는 내성 테스트 벡터 숙주세포 상청액을 통해서 이루어진다. 약물 감수성 및 내성테스트의 두 번째 형태에 있어서, 단일 숙주세포(내성 테스트 벡터 숙주세포) 역시 표적 숙주세포로서 작용하게 된다. 패키지 숙주세포는 트랜스펙션되어 내성 테스트 벡터 바이러스 입자와 상기 내성 테스트 벡터 입자에 의해 감염의 표적이 되는 약간의 패키지 숙주세포를 생산하게 된다. 단일 숙주세포 형태가 적용된 약물 감수성과 내성테스트는 바이러스 내성 테스트 벡터와 함께, 치환된 프로모터, 치환된 코딩영역 또는 역전 인트론을 가진 비기능적 지시유전자를 포함할 수 있다. 이러한 지시유전자는 1차 세포의 트랜스펙션에 따라서 효과적으로 발현되지 않고, 단지 2차세포의 감염에 의해서만 효과적으로 발현 되므로, 측정되는 동안 항바이러스 약제의 효과를 측정하는 기회를 제공한다. 기능적 지시유전자를 포함한 내성 테스트 벡터를 사용하는 약물 감수성과 내성테스트의 경우에 보조배양 과정과 단일 세포 형태를 사용하는 저항 및 감수성 실험 모두 표적세포의 감염을 위해 사용되지는 않는다. 기능적 지시유전자를 포함하는 표적 숙주세포를 감염시키기 위해 내성 테스트 벡터는 내성 테스트 벡터에서 얻어진 여과된 상청액을 사용하는 두 개의 세포 시스템을 필요로 한다.

본 발명의 실시예에 따른 HIV에서 입자-기초 내성테스트는 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 및 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA와 같이 게놈 바이러스 벡터에서 추출된 내성 테스트 벡터에 의해 실행되는 바, 이들은 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A (pCXAS-4070Aenv)에 의해 공동트랜스펙션된다. 이와 달리, 입자-기초 내성테스트는 pLS-lucPP-HS, pCS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-luc-PP-PB, pLS-lucPC-HS, pCS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-luc-PC-PB, pLS-lucII-HS, pLS-lucII-HS, pLS-lucII-PB, pCS-luc-II-PB와 같은 서브게놈 바이러스 벡터로부터 추출된 내성 테스트 벡터에 의해 실행되는 바, 이들은 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A 및 pLTR-HIV3'과 pCMV-HIV3'중 어느 하나에 의해 보조감염된다. 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 HIV에서 비입자-기초 내성테스트는 패키지 발현 벡터가 없는 경우에 선정된 숙주세포의 트랜스펙션을 통해 상술된 각 내성 테스트 벡터를 사용함으로써 실행된다.

입자-기초 감수성 및 내성테스트의 경우에, 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 첫 번째 숙주세포(내성 테스트 벡터 숙주세포)에 의해 만들어지는 바, 상기 숙주세포는 내성 테스트 벡터와 패키지 발현 벡터를 이용하여 패키지 숙주를 트랜스펙팅 함으로써 만들어진다. 그런다음, 상기 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 지시유전자의 발현이 측정된 상태에서의 두 번째 숙주세포(표적 숙주세포)를 감염시키기 위해 사용된다. 입자-기초 감수성 및 내성테스트의 두 번째 형태에서, 단일 숙주세포 형태(내성 테스트 벡터 숙주세포)은 두가지 목적을 위한 것인 바, 그 하나는 주어진 환경에서의 패키지 숙주세포의 일부가 트랜스펙션되어 내성 테스트 벡터 바이러스 입자를 만드는 것이며, 다른 하나는 같은 환경에서의 숙주세포의 일부가 내성 테스트 벡터입자에 의해 감염의 표적이 되어 만들어지도록 하는 것이다. 단일 숙주세포를 사용한 내성테스트는 내성테스트 벡터를 사용함으로써 가능해지는 바, 이는 허용된 숙주세포의 감염에 따라 지시유전자가 효과적으로 발현되기 때문이며, 상기 내성테스트 벡터에는 치환된 프로모터를 포함한 비기능적 지시유전자가 포함된다. 그러나, 동일한

형태의 숙주세포의 트랜스펙션에 따라 효과적으로 발현되지 않기 때문에 측정하는 동안 항바이러스 약제의 효과를 측정할 수 있는 기회를 제공한다. 이와 유사한 이유로 인해, 두가지의 세포 형태가 적용된 내성테스트가 상기 두가지 세포 형태를 보조 배양하는 것에 의해 실행되는 바, 이는 첫 번째 세포 형태의 상청액으로부터 얻어지는 바이러스 입자로 두 번째 세포 형태를 감염시키는 하는 것의 대안이다.

비입자-기초 감수성 및 내성테스트에 있어서, 내성테스트는 패키지 발현 벡터가 없는 경우에 내성 테스트 벡터에 의해 단일 숙주세포를 트랜스펙션함으로써 이루어진다. 비입자 기초 내성테스트는 비기능적 지시유전자를 포함한 내성 테스트 벡터를 사용하여 실행되는 바, 상기 비기능적 지시유전자에는 치환된 프로모터, 치환된 코딩영역 중의 어느 하나 또는 역전 인트론이 포함된다. 이러한 비입자 기초 내성테스트는 패키지 발현 벡터가 없는 경우에 각 내성 테스트 벡터에 의한 단일 숙주세포 형태의 트랜스펙션에 의해 이루어진다. 이러한 내성 테스트 벡터에 함유된 비기능적 지시유전자가 숙주세포의 트랜스펙션에 의해 효과적으로 발현되지 않는다고 하더라도, 항바이러스 입자-기초 역 전사에 따른 지시유전자 발현을 감지할 수 있게 된다. 역전사 및 가닥 이송으로 인해 치환된, 비기능적 지시유전자가 비치환된 기능적 지시유전자로 변화되는 결과가 발생한다. 역전사는 완전히 각 내성 테스트 벡터에 함유된 폴 유전자(pol gene)의 발현에 의해 결정되기 때문에, 항바이러스 약제는 내성 테스트 벡터에 함유된 환자유래 분절에 의해 코딩된 폴 유전자를 억제하는 능력에 대한 평가를 받게 된다. HIV의 경우에는 역전사 및 가닥 이송에 의해 비기능적 지시유전자가 기능적 지시유전자로 전환되는 결과가 발생한다. 역전사는 완전히 각 내성 테스트 벡터에 함유된 환자유래 분절의 발현에 의해 결정되기 때문에, 항바이러스 약제는 내성 테스트 벡터에 함유된 환자유래 분절에 의해 코딩된 유전자 생성물을 억제하는 능력에 대한 평가를 받게 된다.

패키지 숙주세포는 내성 테스트 벡터와 적절한 패키지 발현 벡터에 의해 트랜스펙션됨으로써 내성 테스트 벡터 숙주세포를 만들게 된다. 각 항바이러스 약제는 트랜스펙션 되는 때에 적절한 농도범위 내에서 패키지 숙주세포의 각 플레이트에 추가되는 바, 상기 각 항바이러스 약제에는 자체적인 조합 뿐만 아니라, 역전사 저해제 AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, 프로타제 인히비터 사퀴나비르(protease inhibitors saquinavir), 리토나비르(ritonavir), 인디나비르(indinavir) 또한 포함된다. 트랜스펙션 이후 24-48시간에 이르는 동안, 표적 숙주세포는 내성 테스트 벡터 숙주세포이나 내성 테스트 벡터 숙주세포의 여과된 상청액으로부터 얻어진 내성 테스트 벡터 바이러스 입자에 따른 보조배양으로 감염된다. 그에 따른 각 항바이러스 약제나 조합은 감염되는 시기에 또는 이에 앞서서 표적 숙주세포로 추가되어 주어진 약제나 약제의 최종 농도를 얻게 되며, 트랜스펙션 동안에 나타난다.

보조배양이나 여과된 바이러스 상청액에 의해 감염된 표적 숙주세포에서의 지시유전자의 발현 이나 억제는 지시유전자 발현의 어세이(assay)에 의해 결정되고, 지시유전자가 개뿔벌레(firefly) luc 유전자인 경우에는 루시페라제 작용(luciferase activity)를 측정함으로써 이루어진다. 주어진 항바이러스 약제나 약제가 있는 경우에는 주어진 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 조제에 의해 감염된 표적 숙주세포에서 나타나는 루시페라제 작용의 감소는 항바이러스 약제가 없는 대조 실행(control run)에 비해, 일반적으로 시그모이달(sigmoidal) 곡선으로서의 항바이러스 농도의 로그 약제에 연결된다. 이러한 억제곡선(inhibition curve)은 내성 테스트 벡터에서 나타나는 환자유래 분절에 의해 코딩된 바이러스 표적 생성을 위해, 약제나 조합된 약제의 분명한 억제농도(IC)을 계산하기 위하여 사용된다.

단일세포 감수성 및 내성테스트의 경우에, 숙주세포는 내성 테스트 벡터와 적당한 적당한 패키지 발현 벡터에 의해 트랜스펙션되어 내성 테스트 벡터 숙주세포를 만들게 된다. 개인별 항바이러스 약제나 그에 따른 조합은 트랜스펙션이 되는 시기에 적당한 농도범위 내에서 트랜스펙션된 세포의 개인별 플레이트에 추가된다. 트랜스펙션이 끝난 다음 24-72시간 후에 세포는 개뿔벌레 루시페라제 활동(firefly luciferase activity)을 위해 수집 조합된다. 환경에서의 트랜스펙션된 세포는 지시유전자를 효율적으로 발현 하지 않기 때문에 환경에서의 트랜스펙션된 세포는 환경에서의 초과감염된 세포를 포함하여 지시유전자 발현을 위한 표적 숙주세포로서 작용하게 된다. 주어진 항바이러스 약제나 항바이러스 약제가 없는 경우의 대조 실행(control run)에 비교되는 약제에 직면하여 트랜스펙션된 세포에 대하여 관찰되는 루시페라제 작용의 감소는 일반적으로 시그모아달 곡선으로서의 항바이러스 약제 농도의 로그에 관련된 것이다. 이러한 억제곡선은 내성 테스트 벡터에서 나타나는 환자유래 분절에 의해 코딩된 바이러스 표적 달성을 위해, 약제나 약제 조합의 분명한 억제농도(IC)를 계산하기 위하여 사용된다.

항바이러스성 약물/약물 후보

평가 시스템에 추가되는 항바이러스 약물은 항바이러스 약물의 표적에 따른 횟수만큼 추가된다. 예를 들어 사퀴나비르(saquinavir), 리토나비르(ritonavir), 인디나비르(indinavir), 넬피나비르(nelfinavir)를 포함한 HIV 프로타제 억제제(protease inhibitor)는 내성 테스트 벡터에 의해 트랜스펙션 되는 시기에, 적당한 농도범위 만큼 패키지 숙주세포의 개인별 플레이트에 추가된다. HIV 프로타제 억제제 역시 감염되는 때에 표적 숙주세포에 추가되어 트랜스펙션 되는 동안에 추가된 동일한 최종 농도를 얻게 된다. AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, 네바리핀(nevaripine)을 포함하는 HIV 역전사제 억제제는 평가 농도에서 내성 테스트 벡터 바이러스 입자가 감염되는 때에 표적 숙주세포의 개인별 플레이트에 추가된다. 이와

달리, 항바이러스 약물은 상기 어세이를 통해 나타나기도 한다. 실험농도는 일반적으로 대략 0.1nM부터 100nM 사이의 범위에서 결정되나, 이와 다르게 결정되는 약물의 종류와 그 범위는 다음과 같다. AZT (대략 1nM에서 5nM 사이), ddI(대략 1nM에서 25nM 사이), 3TC (대략 1nM에서 50nM 사이), d4T (대략 1nM에서 25nM 사이), 네바리핀(nevaripine) (대략 1nM에서 100nM사이).

본 발명의 또 다른 실시예에서 후보 항바이러스 화합물(compound)에 대한 실험은 약물 감수성 및 내성테스트에서 이루어진다. 상기 후보 항바이러스 화합물은 적절한 농도일 때 후보 항바이러스의 단백질 표적에 따라 결정되는 횟수만큼 평가 시스템에 추가된다. 이와 달리, 상기 후보 항바이러스 화합물은 한 개 또는 그 이상이 평가되거나, AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, 사퀴나비르와 같은 인증된 항바이러스 약물이나, 리토나비르와 같은 임상실험에서 진행되는 컴파운드나, 인디노비르에 의해 조합에서 평가된다. 후보 항바이러스의 효과는 지시유전자의 발현이나 억제상태를 측정함으로써 평가된다. 본 실시예의 또 다른 측면으로써 상기 약물 감수성 및 내성테스트는 바이러스 돌연변이에 대한 스크린(screen)을 위해 사용되기도 한다. 기존의 항바이러스나 후보 항바이러스에 대한 저항 돌연변이(resistant mutant)의 확인에 이어서 상기 저항 돌연변이의 분리와, DNA의 분석이 이루어진다. 따라서, 바이러스 저항 돌연변이의 라이브러리(library)는 독자적으로 또는 조합상태에서 조합되어 후보 항바이러스의 스크린을 가능케 한다. 이에 따라, 당업자는 효과적인 항바이러스를 구분하고, 효과적인 치료 섭생(therapeutic regimens)을 짤 수 있게 된다.

일반적인 물질과 방법

백터를 제조하고, 세포를 트랜스펙션 및 감염시키는 대부분의 기술은 해당분야에서 보편화된 것이며, 대부분은 당업자들은 특정 조건과 과정을 나타내는 표준 원료에 대해 잘 알고 있다. 그러나, 가이드라인으로서 다음과 같은 기준들이 제시되기도 한다.

"플라즈미드"와 "백터"는 글자 및/또는 숫자가 첨부된 로우 케이스(lower case) p에 의해 나타내어진다. 이러한 초기 플라즈미드는 제한없이 상업적/공개적으로 이용 가능하고, 공개된 과정에 따라 이용 가능한 플라즈미드로부터 추출될 수 있는 것이다. 덧붙여서 상술한 바와 유사한 종래의 플라즈미드는 본 발명이 속한 기술분야의 당업자들에게는 잘 알려진 것임을 밝혀두는 바이다.

본 발명에 따른 백터의 제조에는 해당기술분야에서 잘 알려진 표준 리티게이션 및 저항 기술(standard ligation and restriction technique)이 적용된다. (Ausubel et al., (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley - Interscience or Maniatis et al., (1992) in Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y 참조). 격리된 플라즈미드, DNA 서열, 또는 합성된 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)는 적합한 형태로 절단(cleave), 맞춤(tailor), 분류(relegate)된다. 합성 DNA를 포함한 모든 DNA 생성물의 서열은 DNA 서열 분석에 의해 결정된다.(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467).

DNA의 "소화(Digestion)"는 저항효소를 이용한 DNA의 촉매분열(catalytic cleavage)에 대한 것인 바, 상기 저항효소는 DNA 내에서 단지 특정한 서열, 저항위치로 작용하는 것이다. 여기에 사용되는 여러 가지 저항효소는 상업적으로 이용 가능하며, 상기 저항효소의 반응조건 및 보조인자를 비롯한 다른 조건들은 당업자들에게 알려진 것이다. 분석을 위해 대략 20(1 버퍼(buffer) 용액에서 효소의 2 유닛과 함께 보통 플라즈미드 1(g 또는 DNA 프래그먼트(fragment)가 사용된다.

이와 달리, 저항효소의 발현은 DNA 기질의 확실한 소화(digestion)를 위해 사용된다. 약간의 변화가 허용되지만 배양시간(incubation time)은 37℃에서 약 한 시간 내지 두 시간 사이에서 이루어지는 것이 바람직하다. 각 배양 후에 단백질은 페놀/클로로포름(phenol/chloroform)에 의해 추출됨으로써 제거되며, 이어서 에테르가 추출되고, 에탄올에 의한 침전작용으로 발생한 수분에 의해 핵산이 회수된다.

필요한 경우에는 분할된 프래그먼트의 크기분류는 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)이나 표준기술을 사용한 아가로스 젤 일렉트로포로시스(agarose gel electrophoresis)에 의해 실행된다. 크기구분에 대한 일반적인 내용은 Method of Enzymology 65: 499-560(1980)에 나타나 있다.

제한 분절 단편은 디옥시뉴클레오타이드 트리포스파테즈(deoxynucleotide triphosphates)(dNTPs)의 앞에서 이 콜리(E. coli) DNA 중합효소 I (Klenow)의 큰 단편을 이용해 처리함으로써 무디게 마무리되는 바, 상기 디옥시뉴클레오타이드 트리포스파테즈(deoxynucleotide triphosphates)는 50mM Tris(ph7.6), 50mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 6mM DTT, 5-10 mM dNTPs에서 20℃의 온도로 15내지 25분 동안 배양된다. 상기 Klenow 단편은 5' 점착성 선단에서 필인(fills in)되나, 네 개의 dNTPs가 나타나더라도 돌출 3' 단일 가닥을 씹(chew back)한다. 필요한 경우에는 점착성 선단의 특질에 의해 덕테

이트(dictate) 된 한도 내에서 dNTPs 중의 하나를 공급하거나, 선택된 dNTPs를 이용하여 선택적 회복이 실행되도록 할 수 있다. Klenow를 이용한 처리가 끝난 후에는 혼합물이 페놀/클로로폼과 침전된 에탄올과 함께 추출된다. S1 뉴클레아제(nuclease)나 Bal-31을 이용한 적절한 조건에서의 처리로 인해 단일-가닥된 어떤 부분의 가수분해 효소가 생성된다.

라이게이션(Ligation)은 다음의 표준조건과 온도하에서 15-5-(1부피로 수행된다: 20 mM 트리스-Cl pH 7.5, 10mM DTT, 33mg/ml BSA, 10mM-50mM NaCl, 그리고 0℃에서 40mM ATP, 0.01-0.02(Weiss)단위 T4 DNA 리가제(ligase)("점착성말단" 라이게이션을 위한)과 14℃에서 0.3-0.6(Weiss)단위 T4 DNA 리가제("블런트말단" 라이게이션을 위한) 중의 어느 하나). 분자간 "점착성 말단"의 리티게이션은 일반적으로 33-100(g/ml 총 DNA 농도(5-100mM 최종 농도)에서 실행된다. 분자간 무단 선단 라이게이션(inter-molecular blunt ends ligation)(대개 10 - 30 fold molar excess of linker를 사용)은 1mM 총 합계 농도에서 실행된다.

"순간발현"은 하루 내지 2주 동안 이루어지는 트랜스펙션의 비증폭(unamplified) 발현이라고 볼 수 있다. 특수목적에 사용되는 이형(heterologous) 단백질의 순간발현을 위한 최적의 시기는 여러 가지 요인에 의해 달라질 수 있는 바, 이러한 요인에는 이송제어 기구와 숙주세포에 적용된 처리인자(transacting factor)가 포함된다. 순간발현은 트랜스펙션된 특수 플라스미드가 작용할 때, 즉 전사 및 이송될 때 이루어진다. 그 동안 세포로 주입된 플라스미드 DNA는 핵(nucleus)으로 이송된다. 상기 DNA는 비인티그레이션 상태에 있게 되며, 핵 내에서 자유롭게 된다. 세포에 의해 테이크 업되는 플라스미드의 전사작용은 이 기간동안에 이루어진다. 트랜스펙션에 이어서 플라스미드 DNA는 세포 분할에 의해 감성(degrade)되거나 희석된다. 그리고, 세포 크로마틴(chromatin)에서 무작위 인티그레이션이 발생한다.

일반적으로, 프로모터와, 숙주세포와 대립하지 않는 종(species)에서 추출된 조절 서열을 포함하는 벡터는 특정한 숙주세포와 함께 사용된다. 프로카리오틱 숙주(prokaryotic host)와 함께 사용할 수 있는 프로모터에는 tac 프로모터 와 같은 베타 락타마제(beta-lactamase)와 락토즈 프로모터 시스템(lactose promoter system), 알칼리성 포스파타제 (alkaline phosphatase), 트립토판 (tryptophan)(trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터가 확실히 포함된다. 하지만, 이와 다른 기능적 박테리아성 프로모터도 적용될 수 있다. 프로카리오틱외에도 이스트 배양균(yeast culture)과 같은 유카리오틱 미생물(eukaryotic microbes) 역시 사용 가능하다. 다른 종류의 많은 균주(strain)도 일반적으로 사용 가능하지만, 사카로미시스 세라비지에(saccharomyces cerevisiae) 또는 일반적인 제빵 이스트가 가장 널리 사용되는 유카리오틱 미생물이다. 포유동물 숙주세포의 벡터에서 유발되는 전사작용을 조절하는 프로모터는 여러 원료에서 얻을 수 있는 바, 상기 원료의 예로는 폴리마(polyoma), 시미안 바이러스(simian virus) 40(SV40), 아데노바이러스(adenovirus), 레트로바이러스, 헤파티티스 비 바이러스(hepatitis B virus) 및 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)와 같은 바이러스의 게놈을 들 수 있다. 또한 상기 프로모터는 헤테롤러거스 포유류 프로모터 즉, 비-액틴(b-actin) 프로모터로 부터도 얻을 수 있다. SV 40 바이러스의 초기와 후기 프로모터는 복제의 SV40 바이러스 원인을 포함한 SV40 저항조각의 형태로 쉽게 얻을 수 있다. 인체 사이토메갈로바이러스의 당면한 초기 프로모터는 힌드 이 제한 단편(HindIII E. restriction fragment)의 형태로 쉽게 얻을 수 있다. 숙주세포나 관련 종에서 추출된 프로모터 역시 사용 가능함은 물론이다.

여기에서 사용된 벡터는 선택유전자를 포함하며, 선택적 마커(marker)로 지칭된다. 선택유전자는 벡터와 같이 변형되며 숙주세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 포유류세포에 대한 선택적 마커로서 적합한 몇가지는 디하이드로폴리트 리덕타제 유전자(dihydrofolate reductase gene)(DHFR), 오르니신 디카복실라제 유전자(ornithine decarboxylase gene), 다중-약물 저항 유전자(mdr), 아데노신 디미나제 유전자(adenosine deaminase gene), 글루타민 신타제 유전자(glutamine synthase gene)를 포함한다. 이러한 선택적 마커가 성공적으로 포유류 숙주세포로 전이되는 경우에, 상기 변형된 포유류 숙주세포는 정해진 압력하게 있게 되면 생존하게 된다. 광범위하게 사용되는 선택적 레짐(regime)의 두 가지 카테고리가 있다. 이 중 첫 번째 카테고리는 세포의 신진대사와 보충미디어(supplemented media)의 독립성을 높이기에는 그 능력이 부족한 돌연변이 세포주의 사용에 기초를 두고 있다. 두 번째 카테고리는 어떤 세포 형태에나 사용되고 돌연변이 세포라인의 사용을 필요로 하지 않는 선택계획이라고 할 수 있는 우선적 선택에 대한 것이다. 이러한 계획은 일반적으로 숙주세포의 성장이 멈추도록 하기 위해 약물을 사용한다. 신규한 유전자를 가지고 있는 이러한 세포는 단백질 이동 약물 저항현상을 나타내며, 그 선택을 유지한다. 이러한 우선적 선택은 네오미신(neomycin)(Southern and Berg (1982) J. Molec. Appl. Genet. 1, 327), mycophenolic acid(Mulligan and Berg (1980) Science 209, 1422) 또는 hygromycin (Sugden et al. (1985) Mol. 세포. Biol. 5, 410-413)과 같은 약물을 사용한다. 상술된 바와 같은 세가지의 예는 유카리오틱 제어하에서 세균성 유전자를 사용함으로써 저항현상을 적절한 약물 네오미신(G418 또는 genticin), xgpt (mycophenolic) 또는 하이그로미신(hygromycin)에 각각 전달하게 된다.

"트랜스펙션"은 기능적이든 아니든 간에 DNA가 발현 되도록 DNA를 숙주세포로 도입하는 작용을 한다. 상기 DNA는 초염색체 요소(extrachromosomal element)로서, 또는 염색체 인티그레이션(chromosomal integration)에 의해 복제되기도 한다. 숙주세포의 변형을 위해 사용되는 방법으로는 Graham and van der Eb (1973)의 칼슘 인산염 공동 침전법이 있

다. 트랜스펙션을 위한 또 다른 방법으로는 일렉트로포레이션(electroporation), DEAE-덱스트란법(DEAE-dextran method), 리포펙션 및 바이오리스틱(lipofection and biolistics (Kriegler (1990) 유전자 전이 및 발현): A Laboratory Manual, Stockton Press)가 있다.

숙주세포 은 본 발명에 따른 발현 벡터에 의해 트랜스펙션되고 유도 프로모터에 대해 적절하게 됨으로써 일반적인 영양 미디어 (nutrient media) 에서 배양된다. 숙주세포는 항생물질이 없고, 글루타민이 추가된 F12:DMEM (Gibco) 50:50에서 배양된다. 온도나 pH 등의 배양조건은 발현을 위해 선택된 숙주세포에 사용된 것 들인 바, 당업자들은 잘 알고 있는 것들이다.

다음의 예들은 본 발명의 실시를 위한 최적의 형태를 설명한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

실시예 1

환자유래 분절 그리고 치환된 프로모터가 있는 비기능적 지시를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용한 HIV 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스 벡터-제작

치환된 프로모터가 있는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터가 항바이러스 약물의 표적이 되는 바이러스 유전자를 포함하는 HIV 게놈 및 서브게놈(subgenomic) 바이러스를 모두 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pLG-lucPP 및 pCG-lucPP 는 게놈 바이러스 벡터 pLG 및 pCG 에 기초한다; 각각은 HIV *env* 유전자에서 삭제부분을 갖는다. 게놈 지시 유전자 바이러스 벡터, pLG-lucPP 및 pCG-lucPP 에서 유도된 내성 테스트 벡터는 환자유래 분절의 삽입을 위한 환자 서열 수용체 부위(patient sequence acceptor site)를 포함하며 암포트로픽(amphotrophic) MLV 4070A *env* 유전자 산물을 코딩하는 패키지 발현 벡터와 관련하여 이용될 수 있다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pLS-lucPP 및 pCS-lucPP 는 서브게놈 바이러스 벡터 pLS 및 pCS 에 기초한다; 각각은 HIV *gag-pol* 유전자만을 코딩한다. 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 pLS-lucPP 및 pCS-lucPP 에서 유도된 내성 테스트 벡터는 환자유래 분절의 삽입을 위한 서열 수용체 부위를 포함하고, HIV *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, 그리고 *nef* 유전자를 코딩하는 제 1 패키지 발현 벡터와 암포트로픽 MLV 4070A *env* 유전자 산물을 코딩하는 제 2 패키지 벡터의 연결에 이용된다.

HIV 바이러스 벡터-게놈 및 서브게놈

생물학적으로 활성인 프로바이러스 클론, HXB2 의 서열을 이용하여 HIV 바이러스 벡터가 디자인되었다(Fisher et. al (1986) *Nature* **320**, 367-371). 바이러스 벡터의 두가지 유형이 디자인되었다: 완전한 바이러스의 mRNA 발현 및 처리 특징을 보유하기도 하지만 *env* 와 같은 단일 유전자에서 삭제부분을 가진 게놈 바이러스 벡터, 그리고 *gag-pol* 처럼, 일반적으로 감수성 및 내성 테스트의 특정 표적이 되는 하나 또는 몇 개의 유전자만을 포함하거나 또는 바이러스 유전자가 아주 없을 수도 있는 서브게놈 바이러스 벡터. 2가지 벡터 유형은 지시 유전자 카세트의 삽입을 위해 바이러스 게놈 내 고유 제한 부위(unique restriction site)을 갖고, 또 환자에서 유도된 HIV 서열의 삽입을 가능케 하기 위해 항바이러스 표적 유전자 (예. *pol*)의 근처 또는 안에 부가적인 고유 제한 부위인 환자 서열 수용체 부위(patient sequence acceptor sites)를 갖는다. 게다가, 2가지 벡터 유형이 HIV-LTR U3 영역의 천연의 인핸서-프로모터(native enhancer-promotor), 또는 CMV 직접-초기(immediate-early, IE) 영역으로부터의 외래 인핸서-프로모터를 합하도록 디자인되었다. 표준 방법이 플라스미드 DNAs 의 제작에 이용된다(Ausubel et al. (1987) *Current Protocol in Molecular Biology*, Wiley-Interscience). 합성(synthetic) DNA 를 통합하는 모든 DNA 구성(constructs)의 서열이 DNA 서열 분석에 의해 확인된다(Sanger et al. (1977) *Proc. natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467).

HIV 서열은 p블루스크립트(pBluescript) KS (+) 플라스미드 클로닝 벡터의 폴리링커(polylinker) 내로 삽입된 Hpa I 에서 Xba I 까지의 제한 단편 (fragment)에 관한 HXB2 프로바이러스 DNA 서열을 포함하는 플라스미드 pBS-HIV(Page et al. (1990) *J. Virol.* **64**, 5270-5276)로부터 얻어진다(Stratagene, San Diego, CA). 이 프로바이러스 클론이, 프로바이러스 집성(integration) 부위로부터의 특정화되지 않은 측면(flanking) 인간 DNA 를 포함하기 때문에, 부위특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)의 두 단계가 플라스미드 pBS-HIV 를 주형(template)으로 이용하여 그러한 서열들을 제거하는데 이용된다. 단계 1 에서, 5' LTR 에 인접한 인간의 서열은 5' 에서 3' 방향으로 다음 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 1 을 이용하여 제거된다: 1) 왼쪽 U3 영역 내에서, 통합된 프로바이러스의 첫 18 뉴클레오티드에 상보적인 서열, 2) 6 뉴클레오티드 Sma I 부위, 그리고 3) 폴리링커 및 파지(phage) T3 프로모터 바로 지나서 p블루스크립트 KS (+) 의 영역에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열. 단계 2 에서, 5' LTR 에 인접한 인간의 서열은 다음의 서열 (5' 에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오티드 2 를 이용하여 제거된다: 1) LacZ 유전자 내에서, Pvu I 부위 바로 지나서 p

블루스크립트 KS (+) 의 영역에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열, 2) 6 뉴클레오티드 Xba I 부위, 그리고 3) 오른쪽 U5 영역 내에서, 통합된 프로바이러스의 마지막 18 뉴클레오티드에 상보적인 서열. 결과로 나타난 플라스미드는 pBS-HXB2 라 부른다.

항바이러스 표적 유전자(도 1)의 발현을 위해 HIV-LTR U3 영역을 인핸서-프로모터로 이용하는 게놈 및 서브게놈 바이러스 벡터는 각각 부위특이적 돌연변이의 단일 단계에 의해 플라스미드 pBS-HXB2 에서 유도된다. *env* 유전자에서 삭제된 게놈 바이러스 벡터 pLG 는 다음의 서열(5' 에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오티드 3 을 이용하여 제조된다: 1) *env* 유전자 내 HXB2 의 위치 7626 에서 7643 까지 상보적인 18 뉴클레오티드 서열(HXB2 에 대한 모든 코오디네이트(coordinates)는 GenBank 를 참조, 접근번호 K03455), 2) 8 뉴클레오티드 Not I 부위, 3) *env* 유전자 내 HXB2의 위치 6384 에서 6401 에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열. *env*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, 그리고 *vpu* 유전자에 대해서 삭제되었던 서브게놈 바이러스 벡터 pLS 가 다음의 서열(5' 에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오티드 4 를 이용하여 제조된다: 1) *env* 유전자 내 HXB2의 위치 7626 에서 7643 에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열, 2) 8 뉴클레오티드 Not I 부위, 그리고 3) *vif* 유전자 내 HXB2의 위치 5109 에서 5126 에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열.

항바이러스 표적 유전자의 발현을 위해 CMV IE 영역을 인핸서-프로모터로 이용하는 게놈 및 서브게놈 바이러스 벡터는 플라스미드 pLG 및 pLS 에서 유도되고 각각을 pCG 및 pCS 로 부른다(도 1). 게놈 바이러스 벡터 pCG 는 두 단계로 제조된다. 단계 1 에서, 중간(intermediate) 플라스미드가 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG 를 Sm I 로 소화시키고 벡터를 알칼리 포스페타제(phosphatase)로 처리하는 것에서부터 제조되는 11.2 kB 의 벡터 단편, 그리고 2) Sm I 로 플라스미드 pVL-1 을 소화시키므로써 (아래에 기술) 제조되는 CMV IE 인핸서-프로모터를 포함하는 0.9 kB 의 DNA 단편. 바이러스 LTRs 와 동일한 전사 방향(orientation)으로 CMV IE 영역을 포함하는 플라스미드는 제한 맵핑(mapping)에 의해 확인된다. 단계 2 에서, 플라스미드 pCG 는 부위특이적 돌연변이에 의해 이 중간 플라스미드로부터 제조되어서 전사 개시가 R 영역 처음에 발생하도록 하는 것을 허용하는 위치에서 CMV IE 인핸서-프로모터를 5'-LTR R 영역으로 결합시키는데, 다음의 서열(5' 에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오티드 5 를 이용한다: 1) R 영역의 처음에서 HXB2 의 위치 455 에서 472 에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열, 그리고 2) CMV IE 인핸서-프로모터의 위치 -18 에서 -1 에 상보적인 18 뉴클레오티드 서열(코오디네이트는 Boshart et al. (1985) *Cell* **41**, 521-530 참조). 서브게놈 바이러스 벡터 pCS 는 플라스미드 pCG 로부터 유도되고 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLS 를 Sm I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조된 9.1 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 pCG 를 Sm I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조된 1.3 kB 의 DNA 단편.

게놈 지시 유전자 바이러스 벡터-치환된 프로모터

지시 유전자 바이러스 벡터 pLG-lucPP 및 pCG-lucPP, 그리고 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터는 5' 에서 3' 방향의 다음 요소를 포함한다(도 2B): HIV-LTR U3 영역 (pLG-lucPP) 또는 CMV IE 인핸서-프로모터 (pCG-lucPP), 2) HIV-LTR R 영역, 3) LTRs 의 전사 방향과 반대방향으로 삽입된 T7 프로모터를 포함하는 HIV-LTR U5 영역, 4) HIV *gag-pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, 삭제된 *env*, 그리고 *nef* 유전자의 코딩 영역, 5) 삭제된 *env* 유전자 내로 삽입된 지시 유전자 카세트, 그리고 6) 3' HIV-LTR. 동일한 지시 유전자 카세트 가 pLG-lucPP 및 pCG-lucPP 내로 삽입되며 다음의 요소를 포함한다: 1) 내부 리보솜 엔트리(internal ribosome entry)를 허용하는 EMC 5'-UTR 영역, 2) 루시페라제(luciferase, luc) 유전자의 완전한 코딩 영역, 그리고 3) T7 전사 종결 인자. 지시 유전자는 HIV-LTR 또는 CMV IE 인핸서-프로모터와 반대되는 전사 방향을 가지므로 이들 요소에 의해서 기능적으로 전사될 수 없다. 또한, 지시 유전자 카세트가 T7 프로모터의 상류(upstream) 위치하므로 T7 프로모터에 의해 전사될 수 없다. 역 전사 및 가닥(strand) 전이 다음에, T7 프로모터가 5' LTR 에서부터 3'LTR 까지 복사되고, T7 RNA 중합효소에 의해 새로이 만들어진 T7 프로모터로부터 지시 유전자의 기능적인 전사를 허용한다(도 2C).

지시 유전자 카세트를 포함하는 플라스미드 plucPP 는 세 단계로 제조된다. 단계 1 에서, EMC 5'-UTR 요소와 T7 전사 종결 인자를 포함하는 고유 Not I 부위에 의해 측면에 위치한 카세트를 포함하는 플라스미드 pVL-EMC/T7 은 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pVL(아래에 설명)을 Not I 로 소화시키므로써 그리고 벡터를 알칼리 포스페타제로 처리함으로써 제조된 3.0 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 이후 Not I 로 소화되는 올리고뉴클레오티드 6 과 7 을 프라이머로, 플라스미드 pTM1 (Moss et al. (1990) *Nature* **348**, 91-92)을 주형으로 사용하여 PCR 에 의해 제조되는 T7 종결인자와 EMC 5' UTR 을 포함하는 0.8 kB 의 DNA 단편. 올리고뉴클레오티드 6 및 7 각각은 Not I 제한 부위를 통합한다. 단계 2 에서, 포유류 발현 벡터 pVL-1(아래에 기술) 내로 삽입된 개뿔벌레 루시페라제 유전자의 코딩 영역을 포함하는 플라스미드 pVL-luc 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pVL-1 를 Nru I 및 Bgl II 로 소화시키므로써 제조된 4.1 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 pGEM-luc (Promega, Madison, WI)를 주형으로, 후에 Nru I 및 Bgl I 로 소화되는 올리고뉴클레오티드 8 및 9를 프라이머로 사용하여 PCR 에 의해 제조되는, 완전한 루시페라제의 코딩 영역을 포함하는 1.7 kB 의 DNA 단편. 올리고뉴클레오티드 8, 9는 Nru I 와 Nco I , 그리고 Bgl II와 Xho I 의 제한

부위를 각각 통합한다. 단계 3 에서, EMC 5'-UTR 요소와 T7 전사 종결 인자 사이에 삽입된 플라스미드 plucPP는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조될 수 있다: 1) 플라스미드 pVL-EMC/T7 를 Nco I 및 Sal I 로 소화시키므로써 제조된 3.8 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 완전한 루시페라제 코딩 영역을 포함하고, 플라스미드 pVL-luc를 Nco I 및 Xho I 로 소화시키므로써 제조된 1.7 kB 의 DNA 단편.

플라스미드 pLG-lucPP 는 두 단계로 제조된다. 단계 1 에서, 플라스미드 pLG-T7은 다음의 서열(5'에서 3')를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 10 을 이용하여 부위특이적 돌연변이에 의해 파지 T7 프로모터를 플라스미드 pLG 의 HIV-LTR U5 영역 상류로(upstream) 삽입함으로써 제조된다: 1) U5 영역 내 HXB2 의 위치 552-569 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) T7 프로모터에 상보적인 20 뉴클레오타이드 서열, 그리고 3) U5 영역 내 HXB2 의 위치 534-551 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 단계 2 에서, 플라스미드 pLG-lucPP 가 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG-T7 을 Not I 로 소화시키고 벡터를 알칼리 포스페타제로 처리함으로써 제조되는 11.2 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Not I 로 플라스미드 plucPP 을 소화시키므로써 제조되는 루시페라제 지시 유전자 카세트를 포함하는 2.5 kB 의 DNA 단편. 바이러스 LTRs 와 반대되는 전사 방향으로 바이러스 벡터 내에 삽입된 지시 유전자 카세트를 포함하는 pLG-lucPP 에 해당하는 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다.

플라스미드 pCG-lucPP는 두 단계로 제조된다. 단계 1 에서, 플라스미드 pLG-T7은 올리고뉴클레오타이드 10 을 이용하여 부위특이적 돌연변이에 의해 파지 T7 프로모터를 플라스미드 pCG 의 HIV-LTR U5 영역 상류로(upstream) 삽입함으로써 제조된다. 단계 2 에서, 플라스미드 pCG-lucPP 가 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pCG-T7 를 Not I 로 소화시키고 벡터를 알칼리 포스페타제로 처리함으로써 제조되는 11.7 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 plucPP 를 Not I 로 소화시키므로써 제조된 루시페라제 지시 유전자 카세트를 포함하는 2.5 kB 의 DNA 단편. 바이러스 LTRs 및 CME IE 인핸서-프로모터와 반대되는 전사 방향으로 바이러스 벡터 내에 삽입된 지시 유전자 카세트를 포함하는 pCG-lucPP 에 해당하는 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다.

서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터-치환된 프로모터

지시 유전자 바이러스 벡터 pLS-lucPP 및 pCS-lucPP, 그리고 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터는 5'에서 3' 방향의 다음 요소를 포함한다(도 2B): 1) HIV-LTR U3 영역 (pLS-lucPP) 또는 CMV IE 인핸서-프로모터 (pCS-lucPP), 2) HIV-LTR R 영역, 3) LTRs 의 전사 방향과 반대방향으로 삽입된 T7 프로모터를 포함하는 HIV-LTR U5 영역, 4) HIV *gag-pol* 유전자의 코딩 영역, 5) 지시 유전자 카세트, 6) 바이러스 패키지 서열을 포함하는 HIV *env* 유전자로부터의 PRE 요소, 그리고 7) 3' HIV-LTR. pLS-lucPP 및 pCS-lucPP 의 지시 유전자 카세트는 pLG-lucPP 및 pCG-lucPP 에서와 동일하다.

후자의 벡터에 관해서는, 역 전사 및 가닥 전이가 5'LTR 에서 3'LTR 까지 T7 프로모터를 복사할 때까지 pLS-lucPP 및 pCS-lucPP 의 지시 유전자는 기능적으로 전사될 수 없다(도 2C).

플라스미드 pLS-lucPP 가 두 단계로 제조된다. 단계 1 에서, 플라스미드 pLS의 HIV-LTR U5 영역 상류에 삽입된 파지 T7 프로모터를 포함하는 pLS-T7은 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLS 를 Sma I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 9.1 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 삽입된 T7 프로모터를 포함하는 R5 영역이 있는 HIV-LTR 을 포함하고, 플라스미드 pLG-T7 을 Sma I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 0.8의 DNA 단편. 단계 2 에서, 플라스미드 pLG-lucPP 가 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLS-T7 을 Not I 로 소화시키고 벡터를 알칼리 포스페타제로 처리함으로써 제조되는 9.9 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Not I 로 플라스미드 plucPP 을 소화시키므로써 제조되는 루시페라제 지시 유전자 카세트를 포함하는 2.5 kB 의 DNA 단편. 바이러스 LTRs 와 반대되는 전사 방향으로 바이러스 벡터 내에 삽입된 지시 유전자 카세트를 포함하는 pLS-lucPP 에 해당하는 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다.

플라스미드 pCS-lucPP 가 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLS-lucPP 을 Sma I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 11.6 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) 삽입된 T7 프로모터가 있는 R5 영역에 융합된(fused) CMV IE 프로모터를 포함하고, 플라스미드 pCG-T7 을 Sma I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 1.3의 DNA 단편.

내성 테스트 벡터-제작

내성 테스트 벡터는 1) *pol* 유전자 안에 또는 근처에 환자 서열 수용체 부위라 불리는 고유 제한 부위를 도입함으로써 지시 유전자 바이러스 벡터 pLG-lucPP, pCG-lucPP, pLS-lucPP, 그리고, pCS-lucPP 을 변형하고, 2) 감염된 환자의 혈청 또는 세포에 있는 바이러스 RNA 또는 DNA 로부터 제조된 상보적인 DNA(cDNA)를 이용하는 PCR 에 의해서 HIV 프로테아제 및 역전사효소 코딩 영역에 해당하는, 환자유래 분절을 증대하고, 그리고 3) 증대된 서열을 정확하게 환자 서열 수용체

부위의 지시 유전자 바이러스 벡터 내로 삽입함으로써 제조될 수 있다(도 2B). 환자 서열 수용체 부위의 두 세트가 부위특이적 돌연변이에 의해 4 개의 지시 유전자 바이러스 벡터 각각으로 도입된다. 환자 서열 수용체 부위의 제 1 세트는 전체 프로테아제 코딩 영역 및 역전사효소 코딩 영역의 대부분을 포함하는 간격(interval)을 정의하는 Hpa I 부위 및 Sal I 부위로 이루어지고, 플라스미드 pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS, 그리고 pCS-lucPP-HS 를 야기한다. 환자 서열 수용체 부위의 제 2 세트는 상기 간격을 정의하는 Pvu I 부위 및 BamH I 부위로 이루어지고, 각각 플라스미드 pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB, 그리고 pCS-lucPP-PB 를 야기한다. 상기의 제한 부위 간격(예, pLG-lucPP-HS 그리고 pLG-lucPP-PB 에서 유도된 것) 을 정의하는 내성 테스트 벡터의 동종 쌍(cognate pair)이 몇몇 내성 테스트에서 함께 이용되어 소정의 환자 서열 수용체 부위와 동일한 내부 제한 부위(internal restriction sites)를 포함하는 환자유래 분절의 표시(representation)를 향상시키고, 따라서 내성 테스트 벡터에서만 불충분하게 표시(underrepresented)될 것이다.

플라스미드 pLG-lucPP-HS 는 플라스미드 pLG-lucPP를 주형으로 이용하여 부위특이적 돌연변이의 연속적인 3 단계로 제조된다. 처음 두 단계는 두 개의 새로운 제한 부위를 도입하기 위함인데, 그 중 하나(Hpa I)는 고유한 것이고, 또 하나(Sal I)는 이미 각 지시 유전자 바이러스 벡터 내에 있는 것이다. 세 번째 단계는 도입된 Sal I 부위를 유일하게 하기 위해 각 벡터에 이미 존재하는 Sal I 부위를 제거하는 것이 목적이다. 단계 1 에서, Hpa I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 위치 2243 에서 HIV 프로테아제의 성숙한(mature) 코딩 영역의 상류에 즉시 도입된다: 1) HXB2 의 위치 2249-2266 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 하기의 위치에 *gag* 단백질 서열을 변경되지 않게 남겨두고 보존적(conservative) 아미노산 변화(Phe 에서 Val)를 *pol* 전구체 서열로 도입하는 6 뉴클레오타이드 Hpa I 부위, 그리고 3) HXB2 의 위치 2225-2242 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 단계 2 에서, Sal I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 12 를 이용하여 위치 4190 에서 역전사효소의 HIV 의 카복시기-말단(carboxy-terminal) 코딩 영역에 도입된다: 1) HXB2 의 위치 4196-4213 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 하기의 위치에 역전사효소 단백질 서열을 변경되지 않게 남겨두는 6 뉴클레오타이드 Sal I 부위, 그리고 3) HXB2 의 위치 4172-4189 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 단계 3 에서, HXB2 의 위치 5785 에서 *vpr* 코딩 영역 내에 이미 존재하는 Sal I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 13 을 이용하여 삭제된다: 1) HXB2 의 위치 5791-5808 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 변경되지 않은 하기 위치에서 Sal I 부위를 제거하지만 *vpr* 단백질 서열을 남겨두는 6 뉴클레오타이드 서열 GCCGAC, 그리고 3) HXB2 의 위치 5767-5784 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열.

플라스미드 pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS, 그리고 pCS-lucPP-HS 는 다음과 같이 pLG-lucPP-HS 로부터 유도된다. 플라스미드 pCG-lucPP-HS 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG-lucPP-HS 를 Sm I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 12.9 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Sm I 및 Cla I 로 플라스미드 pCG-lucPP 을 소화시키므로써 제조되는 1.3 kB 의 DNA 단편. 플라스미드 pLS-lucPP-HS 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG-lucPP-HS 를 Nde I 및 Xho I 로 소화시키므로써 제조되는 11.1 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Nde I 및 Xho I 로 플라스미드 pLS-lucPP 을 소화시키므로써 제조되는 1.3 kB 의 DNA 단편. 플라스미드 pCS-lucPP-HS 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLS-lucPP-HS 를 Sm I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 11.6 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Sm I 및 Cla I 로 플라스미드 pCS-lucPP 을 소화시키므로써 제조되는 1.3 kB 의 DNA 단편.

플라스미드 pCG-lucPP-PB 는 플라스미드 pLG-lucPP 를 주형으로 이용하여 부위특이적 돌연변이의 4 개의 연속적인 단계로 제조된다. 처음 두 단계는 새로운 제한 부위(Pvu I 및 BamH I)를 도입하기 위함인데, 각각은 각 지시 유전자 바이러스 벡터 내에 존재하는 것이다. 세 번째와 네 번째 단계는 새로이 도입된 부위를 유일하게 하기 위해 각 벡터의 이미 존재하는 Pvu I 및 BamH I 부위를 제거하는 것이 목적이다. 단계 1 에서, Pvu I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 14 를 이용하여 위치 2221 에서 HIV 프로테아제의 성숙한 코딩 영역의 상류에 즉시 도입된다: 1) HXB2 의 위치 2227-2244 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 하기의 위치에 *gag* 및 *pol* 전구체 단백질 서열을 변경되지 않게 남겨두는 6 뉴클레오타이드 Pvu I 부위, 그리고 3) HXB2 의 위치 2203-2220 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 단계 2 에서, BamH I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 15 를 이용하여 위치 4212 에서 HIV 역전사효소의 카복시기-말단 코딩 영역에 도입된다: 1) HXB2 의 위치 4218-4235 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 하기의 위치에 역전사효소 단백질 서열을 변경되지 않게 남겨두는 6 뉴클레오타이드 BamH I 부위, 그리고 3) HXB2 의 위치 4194-4211 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 단계 3 에서, 위치 2413(GenBank 참조 코오디네이트, 이용번호 X52331)에서 b-락타마제(lactamase) 코딩 영역 내에 이미 존재하는 Pvu I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 16 을 이용하여 삭제된다: 1) p블루스크립트 KS (+) 의 위치 2395-2412 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 하기 위치에서 Pvu I 부위를 제거하지만 b-락타마제 단백질 서열을 변경되지 않게 남겨두는 6 뉴클레오타이드 서열 GAATCG, 그리고 3) p블루스크립트 KS (+) 의 위치 2419-2436 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 단계 4 에서, HXB2 의 위치 8474 에서 HIV *rev* 코딩 영역 내에 이미 존재하는 BamH I 부위는 다음의 서열(5'에서 3')을 포함

하는 올리고뉴클레오타이드 17 을 이용하여 삭제된다: 1) HXB2 의 위치 8480-8497 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 2) 하기의 위치에서 BamH I 부위를 제거하지만 HIV *rev* 단백질 서열을 변경되지 않게 남겨두는 6 뉴클레오타이드 서열 GAATCG, 그리고 3) HXB2 의 위치 8456-8473 에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열.

플라스미드 pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB, 그리고 pCS-lucPP-PB 는 다음과 같이 pLG-lucPP-PB 로부터 유도된다. 플라스미드 pCG-lucPP-PB 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG-lucPP-PB 를 Sm I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 12.9 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Sm I 및 Cla I 로 플라스미드 pCG-lucPP 을 소화시키므로써 제조되는 1.3 kB 의 DNA 단편. 플라스미드 pLS-lucPP-PB 는 세 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG-lucPP-PB 를 Nde I 및 Xho I 로 소화시키므로써 제조되는 11.1 kB 의 벡터 DNA, 2) Nde I 및 HindIII 로 플라스미드 pLS-lucPP 을 소화시키므로써 제조되는 0.5 kB 의 DNA 단편, 그리고 3) HindIII 및 Xho I 로 플라스미드 pLG-lucPP-PB 을 소화시키므로써 제조되는 0.8 kB 의 DNA 단편. 플라스미드 pCS-lucPP-PB 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLS-lucPP-PB 를 Sm I 및 Cla I 로 소화시키므로써 제조되는 11.6 kB 의 벡터 DNA, 그리고 2) Sm I 및 Cla I 로 플라스미드 pCS-lucPP 을 소화시키므로써 제조되는 1.3 kB 의 DNA 단편.

HIV 프로테아제 및 역전사효소 코딩 영역에 해당하는 환자유래 분절은, HIV에 감염된 환자의 혈청으로부터 분리된 바이러스 RNA 을 이용하여, 역 전사-중합효소 연쇄 반응 방법(RT-PCR)에 의해 증대된다. 두 개의 RT-PCR 프로토콜은 하기와 같이 이용된다. 첫 번째 방법(Piatlak et al. (1993) *Science* **259**, 1749-1754)에서, 독립된 효소(separate enzyme), 쥐백혈병바이러스(Moloney murine leukemia virus) 역전사효소(BRL, Bethesda, MD) 및 *Taq* DNA 중합효소(Roche Molecular Diagnostics, Ontario, Canada) 가 각각 cDNA 의 제조와 PCR 반응에 이용된다. 두 번째 방법(Mulder et al. (1994) *J. Clin. Microbiol.* **32**, 292-300)에서, 단일 효소 테르무스 테르모필루스 (*Thermus thermophilus*(*Tth*)) DNA 중합효소가 cDNA 의 합성과 PCR 반응을 수행하는데 이용된다. 올리고뉴클레오타이드 18, 19 그리고 올리고뉴클레오타이드 20, 21 로 이루어진 프라이머 두 쌍은 각각, Hpa I /Sal I 및 Pvu I /BamH I 환자 수용체 부위를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터내로 정확하게 삽입될 수 있는 환자유래 분절을 증대시키는데 이용된다.

제 1 프라이머 쌍을 포함하는 4 개의 내성 테스트 벡터 제 1 세트는 다음 두 개의 DNA 제조로부터 제작된다: 1) Hpa I 및 Sal I 로 소화된 플라스미드 pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS, 또는 pCS-lucPP-HS 로부터 제조된 벡터 DNA, 그리고 2) HIV 에 감염된 개인의 혈청에서 분리한 바이러스 RNA 를 주형으로 이용하고 또 Hpa I 및 Sal I 로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 18, 19 를 프라이머로 이용하는 RT-PCR 에 의해 제조된 2.0 kB 의 증대된 DNA 산물. 제 2 프라이머 쌍을 포함하는 4 개의 내성 테스트 벡터 제 2 세트는 다음 두 개의 DNA 제조로부터 제작된다: 1) Pvu I 및 BamH I 로 소화된 플라스미드 pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB, 또는 pCS-lucPP-PB 로부터 제조된 벡터 DNA, 그리고 2) HIV 에 감염된 개인의 혈청에서 분리한 바이러스 RNA 를 주형으로 이용하고 또 Pvu I 및 BamH I 로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 18, 19 를 프라이머로 이용하는 RT-PCR 에 의해 제조된 2.0 kB 의 증대된 DNA 산물. 올리고뉴클레오타이드 18, 19, 20, 21 은 각각 Hpa I , Sal I , Pvu I , BamH I 제한 부위를 통합한다. 각각의 여덟 개 내성 테스트 벡터에 해당하는 플라스미드 DNA 가 대상 환자 혈청에 있는 HIV 바이러스 유사종(quasi-species) 의 대표 샘플을 포함하도록 확실히 하기 위해, 소정의 내성 테스트 벡터의 제작에서 얻어진 적어도 100 개의 독립된 E. coli 형질전환체(transformant)가 플라스미드 DNA 의 제조에 이용된다.

환자유래 분절의 표시를 개선하기 위해, 내성 테스트 벡터의 제 3, 4 세트가 올리고뉴클레오타이드 22, 23, 24, 25 라 불리는 부분적으로 변질한 PCR 프라이머 풀(pool)을 이용하여 제조되는데, 이들은 각각 올리고뉴클레오타이드 18, 19, 20, 21 의 서열에 기초한다. 각 프라이머 풀은, 로스 알라모스(Los Alamos) HIV 서열 데이터베이스에 분류된 상이한 환자 격리 집단 사이에 서열 변화를 표시하는 모체프라이머(parent primer)의 3' 말단에 자리잡은 각각의 18 뉴클레오타이드 위치에 있는 하나 이상의 뉴클레오타이드 베이스(G, A, T, 또는 C)를 통합하는 방식으로 합성된다(Mayers et al. (1993) *Human Retroviruses and ADIS* 1993, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM). 네 개의 내성 테스트 벡터의 제 3 세트는 플라스미드 pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLS-lucPP-HS, 또는 pCS-lucPP-HS 로부터 제조된 벡터를 이용하여 제작되는데, 올리고뉴클레오타이드 22, 23 으로 제조된 증대된 환자 서열이 있다; 네 개의 내성 테스트 벡터의 제 4 세트는 플라스미드 pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-PB, 또는 pCS-lucPP-PB 로부터 제조된 벡터를 이용하여 제작되는데, 올리고뉴클레오타이드 24, 25 로 제조된 증대된 환자 서열이 있다. 올리고뉴클레오타이드 22, 23, 24, 25 는 각각 Hpa I , Sal I , Pvu I , BamH I 제한 부위를 통합한다.

숙주 세포-제조

패키지 숙주 세포 및 내성 테스트 벡터 숙주 세포

내성 테스트 벡터가 바이러스 패키지 단백질을 발현시키는 패키지 숙주 세포로부터 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 제조하는데 이용된다. 패키지 단백질은 내성 테스트 벡터 자체, 패키지 발현 벡터, 또는 이 둘 모두에 포함된 바이러스 유전자의 발현에 의해서 제공될 수 있다. 패키지 숙주 세포의 순간적인 또는 안정적인 트랜스펙션은 패키지 단백질을 만들어 내는데 이용될 수 있다. 암포트로픽 MLV *env* 유전자 산물을 코딩하는 패키지 발현 벡터는 인간 표적 세포를 효과적으로 감염시킬 수 있는 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 내성 테스트 벡터 숙주 세포의 제작을 가능하게 한다. 플라스미드 pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS, 그리고 pCG-lucPP-PB로부터 유도된 내성 테스트 벡터는 *env*를 제외한 모든 HIV 유전자를 코딩하고, 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 만드는데 이용된다. 암포트로픽 MLV 4070A *env* 유전자를 코딩하는 pLV-*env*4070A 패키지 발현 벡터는 전술한 계능 기초의 내성 테스트 벡터와 함께 이용되어 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 내성 테스트 벡터 숙주 세포에서의 제작을 가능하게 한다. 플라스미드 pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS, 그리고 pCS-lucPP-PB로부터 유도된 내성 테스트 벡터는 HIV *gag-pol* 유전자 산물만을 코딩하고, 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 만드는데 이용된다. *env*를 제공하는 pVL-*env*4070A, 그리고 pLTR-HIV3' 또는 pCMV-HIV3'의 패키지 발현 벡터에서 각각은 HIV *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *net* 유전자를 제공하고, 전술한 서브계능 기초의 내성 테스트 벡터와 함께 이용하여 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 내성 테스트 벡터 바이러스 숙주 세포의 제작을 가능하게 한다.

플라스미드 pLTR-HIV3' 및 pCMV-HIV3'은 각각 계능 바이러스 벡터 pLG 및 pCG로부터 *gag-pol* 코딩 영역을 대부분 제거함으로써 유도된다. 플라스미드 pLTR-HIV3'(도 3)은 다음의 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 26으로써 플라스미드 pLG를 주형으로 이용하여 부위특이적 돌연변이에 의해 제조된다: 1) *pol* 유전자 내 HXB2의 위치 4712-4729에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열, 그리고 2) *gag* 유전자 내 HXB2의 위치 925-942에 상보적인 18 뉴클레오타이드 서열. 플라스미드 pCMV-HIV3'(도 3C)은 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLTR-HIV3'을 Sma I 및 Cla I로 소화시키므로써 제조되는 6.8 kB의 벡터 단편, 그리고 2) 플라스미드 pCG를 Sma I 및 Cla I로 소화시키므로써 제조되는 1.3의 DNA 단편.

플라스미드 pVL-*env*4070A(도 3D)는 두 개의 DNA 단편으로부터 제작된다: 1) pLV-2 포유류 발현 벡터를 Nru I 및 Bgl II로 소화시키므로써 제조된 4.3 kB의 벡터 단편, 그리고 2) 플라스미드 pCRIPam*gag*-2 (Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 6460)를 주형으로 이용하고 Nru I 및 Bgl II로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 27, 28을 프라이머로 이용하는 PCR에 의해 제조된 MLV4070A *env* 유전자 산물(뉴클레오타이드 37-2001, GenBank에 주어진 코오디네이트, 이용번호 M33469, Ott et al. (1990) *J. Virol.* **64**, 757-766)의 완전한 코딩 영역을 포함하는 2.0kB의 DNA 단편. 올리고뉴클레오타이드 27은 포유류 번역 개시에 대해 공통서열(consensus sequence)이 뒤에 오는 공유 Nru I 부위를 통합하고(예, Kozak (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19867-19870), 반면 올리고뉴클레오타이드 28은 공유 Bgl II를 통합한다.

포유류 발현 벡터 (pLV-2)는 5'에서 3' 방향으로 다음의 요소를 포함한다: CMV IE 프로모터/인핸서, CMV IE 제 1 엑손 스플라이스 공여체(exon splice donor), 인간 (1 글로블린 제 2 엑손 스플라이스 수용체, 복제 부위 폴리링커, SV40 T항원 유전자의 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 부위, 그리고 복제의 SV40 기점(origin). 플라스미드 pLV-2는 다음과 같이 4 단계로 제작된다. 단계 1에서, 플라스미드 pVL는 플라스미드 p블루스크립트 II KS(+)의 파지 T7 및 T3 프로모터와 클로닝 부위 폴리링커를 BssHII, Not I, Sma I, HindIII, Sph I, Sma I, EcoR I, Nru I, Apa I, BglII, Nhe I, Not I, Xho I, 그리고 BssHII 제한 부위를 포함하는 클로닝 부위 폴리링커로 대체함으로써 제조된다. pVL은 두 개의 DNA 단편으로부터 제작된다: 1) 플라스미드 p블루스크립트 II KS(+)를 BssHII로 절단하고 상기 벡터를 알칼리 포스페타제로 처리함으로써 제조되는 3.0 kB의 벡터 단편, 그리고 2) 오버랩하는 올리고뉴클레오타이드 29, 30을 어닐링하고, 클레노우(Klenow) DNA 중합효소로 연장하고, 또 BssHII로 소화시키므로써 제조되는 DNA 단편. p블루스크립트 II KS(+) 플라스미드 맵 (GenBak 이용번호 X52327)에 비례하는 5'-3' 순서로 HindIII-Xho I 부위를 포함하는 플라스미드는 제한 맵핑 분석에 의해 확인된다. 단계 2에서, 중간 플라스미드(intermediate plasmid)가 CMV IE 인핸서-프로모터 및 제 1 엑손 스플라이스 공여체, 그리고 인간 (1 글로빈 제 2 엑손 스플라이스 수용체를 삽입함으로써 플라스미드 pLV로부터 제조된다. 이 중간 플라스미드는 3 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드를 pVL를 HindIII 및 EcoR I로 소화시키므로써 제조된 3.0 kB의 벡터 단편, 2) HCMV 주 AD169(Boshart et al., Ibid)로부터의 Pst I m-단편을 포함하는 플라스미드 pCM5027을 주형으로 이용하고 이후에 HindIII 및 Sph I로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 31, 32를 프라이머로 이용하는 PCR에 의해 제조되고, 제 1 엑손 스플라이스 공여체 (-674에서 -19까지의 뉴클레오타이드, Boshart et al. (1985) *Cell* **41**, 521-530에서 코오디네이트 참조) 및 CMV IE 프로모터-인핸서를 포함하는 0.9 kB의 DNA 단편, 그리고 3) 플라스미드 ppSVaHP(Treisman et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 7428-7432)를 주형으로 이용하고 이후 Sph I 및 EcoR I로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 33, 34를 프라이머로 이용하는 PCR에 의해 제조된 인간 (1 글로빈 제 2 엑손 스플라이스 수용체 (뉴클레오타이드 6808-6916, Genbak 코오디네이트 참조, 이용번호 J00153)를 포함하는 0.1 kB의 DNA 단편. 올리고뉴클레오타이드 31, 32, 33, 34는 각각의 말단에 있는 HindIII, Sph I, Sph I, EcoR I 제한 부

위를 통합한다. 단계 3 에서, 플라스미드 pVL-1 은 SV40 T 항원 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 부위를 중간 플라스미드 내로 삽입함으로써 제조된다. 플라스미드 pVL-1 은 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 중간 플라스미드를 BglII 및 Nhe I 로 절단함으로써 제조되는 4.0 kB 의 벡터 단편, 그리고 2) 플라스미드 pSV2 (Southern and Berg (1982) *J. Mol. Appl. Gen.* **1**, 327-341) 을 주형으로 이용하고 이후 BglII 및 Nhe I 로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 35, 36 를 프라이머로 이용하는 PCR 에 의해 제조되고, SV40 T 항원 폴리아데닐레이션 부위(SV40 의 뉴클레오타이드 2770-2533, 참조 코오디네이트는 Reddy et al. (1978) *Science* **200**, 494-502)를 포함하는 0.2 kB 의 DNA 단편. 올리고뉴클레오타이드 35, 36 은 각각의 말단에 있는 BglII 및 Nhe I 제한 부위를 통합한다. 단계 4 에서, 플라스미드 pVL-2 는 복제의 SV40 기점을 플라스미드 pVL-1 내로 삽입함으로써 제조된다. 플라스미드 pVL-2 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) Nhe I 및 Xho I 로 플라스미드 pVL-1 를 소화시키므로써 제조되는 4.2 kB 의 벡터 단편, 그리고 2) 플라스미드 pSV2 을 주형으로 이용하고 후에 Nhe I 및 Sal I 로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 37, 38 를 프라이머로 이용하는 PCR 에 의해 제조되는 복제의 SV40 기점(SV40의 뉴클레오타이드 5725-5578, Ibid)을 포함하는 DNA 단편. 올리고뉴클레오타이드 37, 38 은 각각의 말단에 있는 고유 Nhe I 및 Sal I 제한 부위를 통합한다.

표적 숙주 세포

플라스미드 pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS, 또는 pCS-lucPP-PB 로부터 유도된 내성 테스트 벡터로 수행되는 내성 테스트에 이용되는 표적 숙주 세포는 인간의 배 신장 세포주(embryonic kidney cell line) 293 및 주르카트(Jurkat) 백혈병 T 세포주(American type collection, Rockville, MD)로부터 제조된다. 각 세포주는 변형된 파지 T7 RNA 중합효소를 코딩하는 발현 벡터로 안정적으로 트랜스펙션된다. 이 변형은 T7 RNA 중합효소의 N-종점(N-terminus)에 짜임새 있게(in frame) 융합된 SV40 T 항원 핵 국지 시그널 (nuclear localization signal, NLS)을 포함하고, 세포 핵 내로의 그 이동을 허용하고, 그리고 세포 핵 내의 기능을 허용한다(Lieber et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 8485-8493). 내성 테스트 벡터의 비기능적 지시 유전자는 표적 세포의 감염시 역전사효소에 의해 기능적 지시 유전자로 전환되고, 이는 지시 유전자 코딩 영역에 대한 T7 프로모터의 재배치에 기인한다. HIV 삽입효소 (integrase) 에 의해 복구된 지시 유전자가 표적 세포 염색체내로 통합하고, 표적 세포에 의해 발현된 핵 T7 RNA 중합효소는 기능적으로 지시 유전자를 전사할 수 있다.

인간 그리고 다른 포유류 세포 및 세포주에서, 플라스미드 pVL-T7RNAP-NLS 는 NLS 에 연결된 변형 T7 RNA 중합효소의 발현을 지시하는데 이용된다. pVL-T7RNAP-NLS 는 3 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) EcoRI 및 BglII 로 플라스미드 pVL-2 를 소화시키므로써 제조된 4.3 kB 의 벡터 단편, 2) 플라스미드 pT7-G1 (Den et al. (1994) *Gen.* **143**, 245-249) 을 주형으로 이용하고 후에 Nru I 및 BglII 로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 39, 40 을 프라이머로 이용하는 PCR 에 의해 제조된 T7 RNA 중합효소 아미노산 잔기(residues) 34-883 (뉴클레오타이드 267-2817, GenBak 참조 코오디네이트, 이용번호 M8308, Grachev and Pletnev (1984) *Bioorg. Khim.* **10**, 824-843) 을 코딩하는 2.6 kB 의 DNA 단편, 그리고 3) 오버랩하는 올리고뉴클레오타이드 41, 42 를 어닐링하고 클레노우 DNA 중합효소로 연장하고 또 EcoRI 및 Nru I 로 소화시키므로써 제조되며, NLS (Lieber et al., Ibid)를 포함하는 SV40 거대(large) T 항원의 아미노산 118-133 이 뒤따라 오는 SV40 T 항원의 처음 세 개의 아미노산을 코딩하는 합성 DNA 단편. 올리고뉴클레오타이드 39, 40, 41, 42 는 각각 Nru I, BglII, EcoRI, Nru I 제한 부위를 통합한다.

플라스미드 pVL-Neo 는 공동 트랜스펙션에 의해 인간 또는 다른 포유류 세포 및 세포라인의 안정된 트랜스펙션체의 정착에 선택된 표지기(marker)로 이용된다. pVL-Neo 는 네오마이신 인 전이효소(phosphotransferase)의 발현을 지시하고 내성을 항생물질 G48 로 전달한다. 플라스미드 pVL-Neo 는 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) EcoRI 및 BglII 로 플라스미드 pVL-2 를 소화시키므로써 제조된 4.3 kB 의 벡터 단편, 그리고 2) 플라스미드 pSVneo (Southern and Berg (1982) *J. Mol. Appl. Gen.* **1**, 327-341) 을 주형으로 이용하고 이후에 Nru I 및 BglII 로 소화되는 올리고뉴클레오타이드 43, 44 을 프라이머로 이용하는 PCR 에 의해 제조된 Noe 코딩 영역(Th5 트랜스포손 서열의 뉴클레오타이드 1551-2345, GenBak 이용번호 U00004 참조, Beck et al. (1982) *Gene* **19**, 327-336) 을 포함하는 0.8 kB 의 DNA 단편. 올리고뉴클레오타이드 43 은 포유류 번역 개시를 위한 공통 서열이 다음에 오는 고유 EcoRI 부위를 통합하고, 올리고뉴클레오타이드 44 는 고유 BglII를 통합한다.

pVL-T7RNAP 는 칼슘 포스페타제 동시침전(coprecipitation) 방법(Wigler et al. (1979) *Cell* **16**, 777)에 의해서 안정된 트랜스펙션에 의한 293 세포 내로의 도입, 그리고 일렉트로포레이션(electroporation)(Irving et al. (1991) *Cell* **64**, 891-901)에 의한 주르카트 세포 내로의 도입이 이루어진다. 293 세포는 1 g/L 포도당, 10% 공여체 송아지 혈청(donor calf serum)(Tissue Culture Biologics)로 보충된 DMEM 배양기(JRH Biosciences) 내에 유지된다. 주르카트 세포는 10% 태아단계의 소(fetal bovine) 혈청(Irvin Scientific), 글루타민, 페니실린, 그리고 스트렙토마이신(streptomycin)으로 보충된 RPMI 1640 배양기 내에 유지된다. 293 세포 및 주르카트 세포에 대한 트랜스펙션 각테일(cocktail)은 각각 10:1 대 20:1 의 중량비로 pVL-T7RNAP 10 마이크로그램 그리고 선택할 수 있는 표지기 pVL-Neo의 혼합물을 포함한다.

다. 트랜스펙션 이후 24-48 동안, 세포들은 항생물질 G418 를 포함하는 동일한 배양기 내에 재배양된다(GIBCO, Grand Island, N.Y.). G418 에 내성이 있는 독립된 293 세포 클론은 2주일 후에 정선 플레이트(plate)로부터 직접 선택되어 분석을 위해 확대된다. G418 에 내성이 있는 독립된 주르카트 세포 클론은 약물 정선 2-3주 후에 희석을 제한함으로써 얻어지고 분석을 위해 확대된다.

G418 에 내성이 있는 293 및 주르카트 세포 클론은, 노던 블롯 혼합 방법(Northern blot hybridization method)을 이용하여 세포에 의해 합성된 정상 상태의 (steady-state) 중합효소-특이 mRNA 의 레벨을 결정함으로써 T7 RNA 중합효소의 발현 레벨을 위해 스크린된다(Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley-Interscience). 다음, T7 RNA 중합효소의 최적 레벨을 발현하는 293 및 주르카트 세포 클론은, 루시페라제 유전자의 전사가 T7 프로모터에 의해서 지시되는 플라스미드 pEMCLucbgAn (Deng et al. (1991) *Gene* **109**, 193,201)로 T7 RNA 중합효소-특이 전사를 일시적인 트랜스펙션으로 유지할 수 있는 능력을 결정함으로써 확인된다. 루시페라제 유전자 발현의 최고 레벨을 유지하는 293 및 주르카트 세포 클론은 또다른 이용을 위해 선택된다; 이들은 각각 293/T7RNAP-NLS 세포 및 주르카트/T7RNAP-NLS 세포로 불린다.

약물 감수성 및 내성 테스트

내성 테스트는, 두 유형의 숙주 세포 또는 한가지 유형의 숙주 세포를 이용하여, 지시 유전자 바이러스 벡터 pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS, 또는 pCS-lucPP-PB 에 기초한 내성 테스트 벡터로 수행된다. 내성 테스트 제 1 유형에서, 내성 테스트 바이러스 입자는, 내성 테스트 벡터 및 패키지 발현 벡터로 패키지 숙주 세포를 트랜스펙션함으로써 제조되는 제 1 숙주 세포 (내성 테스트 벡터 숙주 세포)에 의해 만들어진다. 다음, 내성 테스트 벡터 바이러스 입자는 지시 유전자의 발현이 측정되는 제 2 숙주 세포(표적 숙주 세포)를 감염시키는데 이용된다. 내성 테스트 제 2 유형에서, 단일 숙주 세포 유형(내성 테스트 벡터 숙주 세포)이 두가지 목적을 위해 이용된다: 소정 배양액 내의 몇몇 패키지 숙주 세포는 트랜스펙션되어 내성 테스트 벡터 바이러스 입자를 만들어내고 동일한 배양액 내의 몇몇 숙주 세포는 그렇게 만들어진 내성 테스트 벡터 입자에 의한 감염의 표적이 된다. 단일 숙주 세포 유형을 이용하는 내성 테스트 유형은 치환된 프로모터가 있는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터에 가능한 것이다: 그러한 지시 유전자는 복제를 허용하는 숙주 세포의 감염에 의해서 효과적으로 발현되는 반면, 동일한 숙주 세포 유형의 형질전환에 의해서는 효과적으로 바뀔되지 않으며, 따라서 평가중인 항바이러스제의 효과를 측정할 수 있는 기회를 제공해 준다. 비슷한 이유로 해서, 두가지 세포 유형을 이용하는 내성 테스트가, 제 1 세포 유형의 상청액(supernants)로부터 얻어진 바이러스 입자로 제 2 세포 유형을 감염시키는 대안으로 두가지 세포 유형을 공동 배양(co-cultivating) 함으로써 수행될 수 있다.

감수성 및 내성 테스트-두개의 세포

내성 테스트 벡터 숙주 세포는 293 세포주, tsa54 또는 tsa201 세포주(Heinzel et al. (1988) *J. Virol.* **62**, 3738), 또는 BOSC 23 세포주(Pear et al. (1993) *proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8392)을 패키지 숙주 세포로 이용하는 적정 패키지 발현 벡터 및 내성 테스트 벡터의 동시트랜스펙션(cotransfection)에 의해 제조된다. 환자유래 분절을 pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-PB 내로 삽입함으로써 제작된 내성 테스트 벡터는 패키지 발현 벡터 pLV-env4070A 로 동시트랜스펙션되고, 반면 환자유래 분절을 pLS-lucPP-HS, pCS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-PB 내로 삽입함으로써 제조된 내성 테스트 벡터는 패키지 발현 벡터 pLV-env4070A, 그리고 pLTR-HIV3' 또는 pCMV-HIV3' 으로 동시트랜스펙션된다. 주르카트/T7RNA-NLS 세포는 표적 숙주 세포로 이용된다.

패키지 숙주 세포는 DMEM 배양기, 1 g/L 글루코스, 10% 공여체 송아지 혈청에서 성장하고 그리고 3일 마다 1:10 으로 희석 처리된다. 세포는 트랜스펙션되기 48 시간 전에 10 cm 플레이트당 1×10^6 세포로 배양된다. 세포는 5-10 mg 의 각 내성 테스트 벡터와 적정 패키지 발현 벡터를 이용하는 칼슘 포스페타제 동시침전(coprecipitation)법에 의해 트랜스펙션되어 내성 벡터 숙주 세포를 만들어 낸다. 역전사효소 억제제 AZT, ddI, ddC, d4T, 그리고 3TC, 그리고 프로테아제 억제제 사퀴나비르(saquinavir), 리토나비르(ritonavir), 그리고 인디나비르(indinavir), 그리고 그 조합을 포함하는 각 항바이러스제는 트랜스펙션이 되는 시기에 트랜스펙션되는 세포의 각 플레이트에 적절한 농도 범위에서 첨가된다. 트랜스펙션 24-48 시간 후, 표적 숙주 세포는 내성 테스트 벡터 숙주 세포와의 동시배양에 의해서 또는 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 여과한 상청액에서 얻어진 바이러스 입자로 감염된다. 트랜스펙션 중에 있는, 각각의 항바이러스제 또는 그 조합은 감염이 되는 시기에 표적 숙주 세포에 첨가되어 소정의 약, 약제의 동일한 최종 농도를 달성하게 된다.

동시배양에 의한 감염에서, 배양기는 24-48 시간 전에 트랜스펙션에 의해 제조된 내성 테스트 벡터 숙주 세포의 10 cm 플레이트로부터 제거되고, 0.5 내지 10×10^6 주르카트/T7RNAP-NLS 표적 세포가 적정 농도의 항바이러스제를 포함하고

있는 주르카트 세포 배양기의 플레이트로 첨가된다. 표적 세포는 24 시간 동안 내성 테스트 벡터 숙주 세포와 동시배양되고, 그다음 제거되었다가 적정 농도의 항바이러스제를 포함하는 주르카트 세포 배양기 내에서의 제 2 동시 배양을 위해 새로 제조된 내성 테스트 벡터 숙주 세포로 첨가된다. 24 시간 후에, 표적 숙주 세포는 제 2 동시배양에서 걷어들이고, 원심분리에 의해 수집되어, 차갑게 포스페타제로 완충처리한 염류(phosphatase-buffered saline, PBS)로 세 번 세척하고, 루시페라제 활동에 대한 분석이 행해진다. 여과된 상청액으로 감염시키는 것에서, 배양기는 24-48 시간 전에 트랜스펙션에 의해 제조된 내성 테스트 벡터 숙주 세포의 10 cm 플레이트로부터 제거된다. 배양기는 걷어들이는 시기에 0.45 mm 필터를 통해 여과되어, -70°C 에서 얼리고, 형질도입(transduction) 전에 녹인다. 주르카트/T7RNAP-NLS 세포 (0.5×10^6) 가 여과된 상청액 및 주르카트 세포 배양기의 균등한 혼합물 5 ml 에 첨가되고, 8mg/ml 의 폴리브렌(polybrene)(Sigma, St. Louis, MI) 그리고 적정 농도의 항바이러스제로 만들어진다. 감염 후 24-48 시간, 표적 숙주 세포는 원심분리에 의해 수집되고, 차갑게 포스페타제로 완충처리한 염류로 세 번 세척하며, 지시 유전자 발현에 대한 분석이 행해진다. 동시 배양에 의해서 또는 여과된 바이러스 상청액으로 감염된 표적 숙주 세포는 기술된 바와 같이 개뿔벌레 루시페라제 활동에 대한 분석이 행해진다(Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley-Interscience). 소정의 항바이러스제 또는 약제가 있을 때 내성 테스트 벡터 바이러스 입자의 소정의 제조로 감염된 표적 숙주 세포에서 관찰된 루시페라제 활동의 감소는, 항바이러스제가 없을 때의 대조 실행(control run)과 비교했을 때, 일반적으로 항바이러스제 농도 로그(log)에 S자 곡선(sigmoidal curve)으로 관련되어 있다. 이 억제 곡선은, 내성 테스트 벡터에 있는 환자유래 분절에 의해 코딩된 바이러스 표적 산물에 대하여, 약제 및 그 조합에서의 명백한 억제 농도(inhibitory concentration)를 계산하는데 이용된다.

감수성(Susceptibility) 및 내성(Resistance) 테스트- 하나의 세포

내성 테스트 벡터 숙주 세포는 패키지 숙주 세포로서 293/T7RNAP-NLS 세포 또는 Jurkat/T7RNAP-NLS 세포 중 하나를 이용하는 적당한 패키지 발현 벡터(들) 및 내성 테스트 벡터에 의해 공동 트랜스펙션(cotransfection)에 의해 제조된다. 환자유래 분절이 pLG-lucPP-HS, pCG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB 및 pCG-lucPP-PB내에 삽입됨에 따라 제작된 내성 테스트 벡터는 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A와 공동 트랜스펙션되고, 환자유래 분절이 pLS-lucPP-HS, pCS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB 및 pCS-lucPP-PB내에 삽입됨에 따라 마련된 내성 테스트 벡터는 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A 및 pLTR-HIV3' 또는 pCMV-HIV3'로 공동 트랜스펙션된다.

내성 테스트 벡터와 적당한 패키지 발현 벡터를 각각 5 내지 10 mg을 사용하여 내성 테스트 벡터 숙주 세포를 생산하도록 세포를 트랜스펙션시킨다. 293/T7RNAP-NLS 세포는 칼슘 인산염 공동침전 방법에 의해 트랜스펙션되고 Jurkat/T7RNAP-NLS 세포는 전기영동에 의해 트랜스펙션된다. 개개의 항바이러스제, 또는 그들의 조합은 그들이 트랜스펙션될 때에, 적당한 범위의 농도로, 개개의 트랜스펙션된 세포의 플레이트에 첨가된다. 트랜스펙션된지 24 내지 72시간 후에, 세포는 원심분리에 의해 모아지고, 얼음같이 찬 인산염-완충용 식염수(phosphate-buffered saline)로 세 번 세척되고, 설명된 것과 같은 개뿔벌레 루시페라제 활성(firefly luciferase activity)에 대해서 분석된다. 배양내의 트랜스펙션된 세포가 지시 유전자를 효율적으로 발현시키지 않기 때문에, 배양내의 트랜스펙션된 세포, 또한 배양내의 중복감염된 세포(superinfected cells)도 지시 유전자 발현을 위해 표적 숙주 세포로 작용할 수 있다. 항바이러스제의 부재하에서 대조 실행(control run)과 비교해서 제공된 항바이러스제, 또는 항바이러스제들의 존재하에서 트랜스펙션된 세포에 대해 관찰된 루시페라제 활성 감소는, 일반적으로 S자곡선(a sigmoidal curve) 항바이러스제의 농도의 로그와 관련이 있다. 이러한 억제 곡선은 내성 테스트 벡터에 존재하는 환자유래 분절에 의해 코딩된 바이러스성 표적 산물에 대해 그러한 약제(agent), 또는 약제의 조합의 걸보기 억제 농도(IC)를 계산하는데 사용된다.

실시예 2

환자유래 분절 및 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용하는 HIV 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스성 벡터 - 제작

환자의 서열 수용체 부위를 갖는 게놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, 그리고 거기에서 유도된 내성 테스트 벡터 각각은 5' 에서 3' 방향으로 다음 요소들을 포함한다 (도 4B): 1) HIV-LTR U3 영역 (pLG-lucPC-HS 및 pLG-lucPC-PB) 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터 (pCG-lucPC-HS 및 pCG-lucPC-PB), 2) HIV-LTR R 및 U5 영역, 3) HIV *gag-pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, 삭제된 *env*, 그리고 *nef* 유전자의 코딩 영역, 4) 삭제된 *env* 유전자내에 삽입된, 루시페라제 유전자의 5' 코딩 영역을 포함하는 제 1 지시 유전자, 5) 삭제된 3' HIV-LTR U3 영역내에 삽입된, 루시페라제 유전자의 3' 코딩 영역을 포함하는 제 2 지시 유전자 카세트, 그리고 6) 3' HIV-LTR R 및 U5 영역. pLG-lucPC-HS 및 pCG-lucPC-HS는, 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2243과 4190에서 공유의 Hpa I 와 Sal I 환자 서열

수용체 부위를 포함하고; pLG-lucPC-PB 및 pCG-lucPC-PB는, 각각, HXB2의 뉴클레오티드 2221과 4212에서 Pvu I 와 BamH I 환자 서열 수용체 부위를 포함한다(세부사항에 대해서는 실시예 1을 참조). 제 1 지시 유전자 카세트는 1) 제 2 CMV 인핸서-프로모터, 2) 루시페라제 유전자의 5' 코딩 영역(아미노산 1 내지 446개), 그리고 3) CMV IE 스플라이스 공여체(splice donor)를 포함한다. 제 2 지시 유전자 카세트는 1) α -글로빈 유전자 제 2 엑손 스플라이스 수용체(an α -globin gene second exon splice acceptor), 2) 루시페라제 유전자의 3' 코딩 영역(아미노산 447 내지 550개), 그리고 3) SV40 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 부위를 포함한다. 루시페라제 5' 및 3' 코딩 영역의 전사의 방향은 서로 동일하고, 제 1 CMV 인핸서-프로모터 및 바이러스의 LTR의 것과는 반대이다. 하지만, 루시페라제 5' 및 3' 코딩 영역이 내성 테스트 벡터내에서 순열로 배치되기 때문에(즉, 5' 코딩 영역은 3' 코딩 영역의 하류이다), 기능적 루시페라제 코딩 영역을 발생시키기 위해서 스플라이싱될 수 있는 mRNA는 전사되지 않는다. 역전사 및 가닥 전이(strand transfer)에 이어, 루시페라제 3' 코딩 영역은 3' LTR에서 5' LTR까지 복사되고, 이는 스플라이싱될 수 있는 mRNA의 전사가 기능적 루시페라제 코딩 영역을 생성할 수 있도록 허용한다(도 4C).

환자 서열 수용체 부위를 가지는 서브게놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, pLS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS 및 pCS-lucPC-PB, 및 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터 각각은 5' 에서 3' 방향으로 다음 요소들을 포함한다(도 4B): 1) HIV-LTR U3 영역(pLS-lucPC-HS 및 pLS-lucPC-PB) 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터(pCS-lucPC-HS 및 pCS-lucPC-PB), 2) HIV-LTR R 및 U5 영역, 3) HIV *gag-pol* 유전자의 코딩 영역, 4) 루시페라제 유전자의 5' 코딩 영역을 포함하는 제 1 지시 유전자, 5) 바이러스 패키징 서열을 포함하는 HIV *env* 유전자의 RRE 요소, 6) 삭제된 3' HIV-LTR U3 영역내에 삽입된, 루시페라제 유전자의 3' 코딩 영역을 포함하는 제 2 지시 유전자 카세트, 그리고 7) 3' HIV-LTR R 및 U5 영역. pLS-lucPC-HS 및 pCS-lucPC-HS는, 각각, HXB2의 뉴클레오티드 2243과 4190에서 공유의 Hpa I 와 Sal I 환자 서열 수용체 부위를 포함하고; pLS-lucPC-PB 및 pCS-lucPC-PB는, 각각, HXB2의 뉴클레오티드 2221과 4212에서 Pvu I 와 BamH I 환자 서열 수용체 부위를 포함한다. 제 1 지시 유전자 카세트는 1) 제 2 CMV 인핸서-프로모터, 2) 루시페라제 유전자의 5' 코딩 영역(아미노산 1 내지 446개), 그리고 3) CMV IE 스플라이스 공여체(splice donor)를 포함한다. 제 2 지시 유전자 카세트는 1) (-글로빈 유전자 제 2 엑손 스플라이스 수용체, 2) 루시페라제 유전자의 3' 코딩 영역(아미노산 447 내지 550개), 그리고 3) SV40 폴리아데닐레이션 부위를 포함한다. 루시페라제 5' 및 3' 코딩 영역이 내성 테스트 벡터내에서 순열로 배치되기 때문에, 순열로 배치되지 않은 루시페라제 5' 및 3' 코딩 영역을 생성하기 위해 역전사 및 가닥 전이가 일어나야 하고, 이는 스플라이싱될 수 있는 mRNA의 전사가 기능적 루시페라제 코딩 영역을 생성하도록 허용한다(도 4C).

제 1 지시 유전자 카세트를 포함하는 플라스미드 pVL-luc5'는 삼단계로 제조된다. 처음 두 단계에서, CMV IE 스플라이스 공여체와 (-글로빈 유전자 스플라이스 수용체로 이루어진 pVL-1에 포함된 인공 인트론은 부위-특이적 돌연변이가 행해져서 소화시에 DNA 단편을 초래하는 제한 부위를 만들어내고, 단편의 5' 및 3' 말단은 인공 인트론의 시작과 끝에 정확히 해당한다. 일단계에서, 부위 특이적 돌연변이는 다음 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오티드 45를 사용하여 pVL-1로 수행된다: 1) CMV IE 스플라이스 공여체를 선행하는 18 뉴클레오티드 서열, 2) SnaB I 제한 부위의 처음 절반에 해당하는 TAC 트리뉴클레오티드 서열, 그리고 3) 인공 인트론의 처음 부분에서의 18 뉴클레오티드 서열. 인트론의 처음 세 개의 뉴클레오티드의 서열이 GTA이므로, 그결과 플라스미드 pVL-SnaB I 은 소화시에 블런트 DNA 말단(a blunt DNA end)으로서 인트론의 5' 서열을 푸는 SnaB I 제한 부위를 포함한다. 이단계에서, 부위 특이적 돌연변이는 다음 서열(5'에서 3')을 포함하는 올리고뉴클레오티드 46을 사용하여 pVL-SnaB I 로 수행된다: 1) 인공 인트론의 말단에서 18 뉴클레오티드 서열, 2) PvuII 제한 부위의 마지막 절반에 해당하는 CTG 트리뉴클레오티드 서열, 그리고 3) α -글로빈 스플라이스 수용체 다음에 오는 18 뉴클레오티드 서열. 인트론의 마지막 세 개의 뉴클레오티드의 서열이 CAG이므로, 그결과 플라스미드 pVL-SnaB I /PvuII는 소화시에 블런트 DNA 말단으로서 인트론의 3' 서열을 푸는 PvuII 제한 부위를 포함한다. 삼단계에서, 플라스미드 pVL-luc5'는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pVL-luc를 EcoRV와 Nhe I 로 소화하고, 그리고 그결과 벡터를 클레노우 DNA 중합효소와 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 5.3 kB의 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 pVL-SnaB I /PvuII를 SnaB I 와 Sma I 로 소화함으로써 제조된, DMV IE 스플라이스 공여체를 포함하는 0.1 kB의 DNA 단편. pVL-luc5'에 해당하며, 올바른 방향으로 루시페라제 코딩 영역내에 삽입된 CMV IE 스플라이스 공여체를 포함하는 클론은 제한 맵핑(mapping)에 의해 확인(identified)된다.

제 2 지시 유전자 카세트를 포함하는 플라스미드 pVL-luc3'는 세단계로 제조된다. 일단계에서, pBS-HXB2의 3'LTR이 서브클론된 플라스미드 pBS-LTR은 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pBluescript II KS (+)를 Xho I 와 Xba I 로 소화함으로써 제조된 3.0 kB의 벡터 DNA, 그리고 2) pBS-HXB2를 Xho I 와 Xba I 로 소화함으로써 제조된, 3'LTR을 포함하는 0.8 kB의 DNA 단편. 이단계에서, 루시페라제의 3' 코딩 영역 다음에 SV40 폴리아데닐레이션 부위를 포함하고, 삭제된 3'LTR내에 삽입된 플라스미드 pBS-LTR-luc3'는 다음 두 개의 단편으로부터 제조된다: 1) pBS-LTR을 EcoRV로 소화하고, 그리고 그결과 벡터를 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 3.5 kB의 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 pVL-luc를 EcoRV와 Nhe I 로 소화한 다음, 그결과 단편을 클레노우 DNA 중합효소로 처리함으로써 제조된, 3' 루시페라제 코딩 영역과 SV40 폴리A 부위를 포함하는 0.5 kB의 DNA 단편. 올바른 방향(즉,

3'LTR에 전사의 방향과 반대)으로 삽입된 3' 루시페라제 코딩 영역을 가지는 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다. 삼단계에서, 플라스미드 pVL-luc3'는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pBS-LTR-luc3'을 EcoRV로 소화한 다음, 그결과의 벡터를 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 4.0 kB의 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 pVL-SnaB I /PvuII를 PvuII와 Sma I 로 소화함으로써 제조된, (-글로빈 유전자 제 2 엑손 스플라이스 수용체를 포함하는 0.1 kB의 DNA 단편. pVL-luc3'에 해당하며, 올바른 방향으로 루시페라제 코딩 영역내에 삽입된 (-글로빈 제 2 엑손 스플라이스 수용체를 포함하는 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다.

플라스미드 pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pLS-lucPC-HS 및 pLS-lucPC-PB는 똑같은 삼단계 과정을 거쳐 제조된다. 일단계에서, 플라스미드 pLG-lucDP-HS, pLG-lucDP-PB, pLS-lucDP-HS 및 pLS-lucDP-PB는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 각각, 플라스미드 pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS 및 pLS-lucPP-PB를 Sma I 과 Cla I 로 소화함으로써 제조된 벡터 DNA, 2) 플라스미드 pLG를 Sma I 과 Cla I 로 소화함으로써 제조된 0.8 kB의 DNA 단편. 이단계에서, 플라스미드 pLG-luc5'-HS, pLG-luc5'-PB, pLS-luc5'-HS 및 pLS-luc5'-PB는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 플라스미드 pLG-lucDP-HS, pLG-lucDP-PB, pLS-lucDP-HS 및 pLS-lucDP-PB, 각각을 소화하고, 그리고 그결과의 벡터를 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 벡터 DNA, 그리고 2) pVL-luc5'를 Not I 로 소화함으로써 제조된 제 1 지시 유전자 카세트를 포함하는 2.5 kB의 DNA 단편. 바이러스 LTR의 것과 반대인 전사 방향으로 바이러스성 벡터내에 삽입된 제 1 지시 유전자 카세트를 포함한 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다. 삼단계에서, 플라스미드 pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pLS-lucPC-HS 및 pLS-lucPC-PB는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 각각, 플라스미드 pLG-luc5'-HS, pLG-luc5'-PB, pLS-luc5'-HS 및 pLS-luc5'-PB를 Xho I 와 Xba I 로 소화함으로써 제조된 벡터 DNA, 및 2) 플라스미드 pVL-luc3'를 Xho I 와 Xba I 로 소화함으로써 제조된, 제 2 지시 유전자 카세트를 포함하는 1.1 kB의 DNA 단편.

플라스미드 pCG-lucPC-HS, pCG-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS 및 pCS-lucPC-PB는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 각각, pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pLS-lucPC-HS 및 pLS-lucPC-PB를 Sma I 와 Cla I 로 소화함으로써 제조된 벡터 DNA, 그리고 2) 플라스미드 pCG를 Sma I 와 Cla I 로 소화함으로써 제조된 1.3 kB의 DNA 단편.

내성 테스트 벡터 - 제작

치환된(permuted) 코딩 영역을 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터는 실시예 1에 설명된 항바이러스 표적 유전자를 포함하는 HIV 계통 및 서브계통의 바이러스성 벡터를 사용하여 디자인되었다.

내성 테스트 벡터는, 실시예 1에 설명된 과정에 따라, 플라스미드 pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-HS, pCG-lucPC-PB, pLS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS 및 pCS-lucPC-PB로부터 제조된다 (도 4B). 내성 테스트 벡터는 올리고뉴클레오타이드 18 및 19로, 그리고 올리고뉴클레오타이드 22 및 23으로 제조된 증대된 환자 서열(amplified patient sequences)을 이용하여 플라스미드 pLG-lucPC-HS, pCG-lucPC-HS, pLS-lucPC-HS, 또는 pCS-lucPC-HS로부터 제조된 벡터로 제작된다. 내성 테스트 벡터는 올리고뉴클레오타이드 20 및 21로, 그리고 올리고뉴클레오타이드 24 및 25로 제조된 증대된 환자 서열을 이용하여 플라스미드 pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-PB, pLS-lucPC-PB, 또는 pCS-lucPC-PB로부터 제조된 벡터로 제작된다.

약물 감수성 및 내성 테스트

내성 테스트는 하기와 같이 실시예 1에 설명된 과정에 따라 수행된다. 플라스미드 pLG-lucPC-HS, pLG-lucPC-PB, pCG-lucPC-HS 및 pCG-lucPC-PB로부터 제조된 내성 테스트 벡터는 기능적 HIV *env* 유전자가 결여되고, 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A와 함께 사용된다. 플라스미드 pLS-lucPC-HS, pLS-lucPC-PB, pCS-lucPC-HS 및 pCS-lucPC-PB로부터 제조된 내성 테스트 벡터는 HIV *gag-pol* 유전자 산물만을 코딩하고, pVL-env4070A, 그리고 pLTR-HIV3'나 pCMV-HIV3' 패키지 발현 벡터와 함께 사용된다. 두가지 숙주 세포 형태를 사용하여 수행된 내성 테스트에서, 293 세포주, tsa54 세포주, tsa201 세포주, 또는 BOSC 23 세포주는 패키지 숙주세포로서 사용되고, 변형되지 않은 Jurkat 세포는 표적 세포로서 사용된다. 이들 내성 테스트 벡터내에 포함된 치환된 코딩 영역을 가진 비기능적 지시 유전자가 패키지 숙주 세포의 트랜스펙션시에 효율적으로 발현되지 않기 때문에, 표적 숙주 세포의 감염은 패키지 숙주 세포와의 공생 배양(co-cultivation)이나, 패키지 숙주 세포 상청액(supernatant)으로부터의 바이러스를 이용함으로써 수행된다. 비슷한 이유로, 이들 내성 테스트 벡터로 수행된 내성 테스트는 한가지 숙주 세포 형태를 사용할 수도 있다. 한가지 숙주 세포 형태를 이용하는 내성 테스트는 293, tsa54, tsa201, BOSC 23 또는 Jurkat 세포 중 어느 하나를 이용하여 수행된다.

실시예 3

환자유래 분절(들) 및 역전 인트론을 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용한 HIV 약물 감수성 및 내성 테스트

역전 인트론을 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터는 실시예 1에 설명된 항바이러스 표적 유전자를 포함한 HIV 계놈 및 서브계놈의 바이러스성 벡터를 이용하여 디자인되었다.

지시 유전자 바이러스성 벡터 - 역전 인트론

환자 서열 수용체 부위를 가진 계놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, pLG-luc II-HS, pLG-luc II-PB, pCG-luc II-HS 및 pCG-luc II-PB, 그리고 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터, 각각은 5'에서 3' 방향으로 다음 요소를 포함한다 (도 5B): 1) HIV-LTR U3 영역(pLG-luc II-HS 및 pLG-luc II-PB) 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터(pCG-luc II-HS 및 pCG-luc II-PB), 2) HIV-LTR R 및 U5 영역, 3) HIV *gag-pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, 삭제된 *env*, 및 *nef* 유전자의 코딩 영역, 4) 삭제된 *env* 유전자내에 삽입된 지시 유전자 카세트, 그리고 5) 3' HIV-LTR. pLG-luc II-HS 및 pCG-luc II-HS는, 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2243 및 4190에서 고유의 Hpa I 과 Sal I 환자 서열 수용체 부위를 포함하고; pLG-luc II-PB 및 pCG-luc II-PB는, 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2221 및 4212에서 고유의 Pvu I 과 BamH I 환자 서열 수용체 부위를 포함한다 (세부 사항에 대해서는 실시예 1을 참조). 지시 유전자 카세트는 1) 제 2 CMV 인핸서-프로모터, 2) 역전 인공 인트론에 의해 가로막힌 루시페라제 유전자의 코딩 영역, 그리고 3) SV40 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다. 지시 유전자 카세트의 전체 전사 방향은 제 1 CMV 인핸서-프로모터 그리고 바이러스 LTR의 것과 반대이고, 인공 인트론의 방향은 후자의 요소들과 동일하다. 역전 인트론이 이러한 방향으로 스플라이싱될 수 없으므로 제 2 CMV 인핸서-프로모터에 의한 지시 유전자의 전사는 기능적 전사체가 생산되도록 하지 않는다. 하지만, 5' 바이러스 LTR 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터에 의한 지시 유전자의 전사는, 비록 지시 유전자가 여전히 그결과의 전사체가 안티센스 방향을 가지기 때문에 기능적으로 발현되지는 않지만, RNA 스플라이싱에 의해 전사된 인트론이 제거되도록 한다. 이러한 전사체의 역전사 그리고 결과적인 프로바이러스성 DNA의 통합후에, 지시 유전자는 역전 인트론이 앞서 제거되었기 때문에 제 2 CMV 인핸서-프로모터에 의해 기능적으로 전사된다 (도 5C).

환자 서열 수용체 부위를 가진 서브계놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, pLS-luc II-HS, pLS-luc II-PB, pCS-luc II-HS 및 pCS-luc II-PB, 그리고 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터, 각각은 5'에서 3' 방향으로 다음 요소를 포함한다 (도 5B): 1) HIV-LTR U3 영역(pLS-luc II-HS 및 pLS-luc II-PB) 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터(pCS-luc II-HS 및 pCS-luc II-PB), 2) HIV-LTR R 및 U5 영역, 3) HIV *gag-pol* 유전자의 코딩 영역, 4) 지시 유전자 카세트, 5) 바이러스 패키지 서열을 포함한 HIV *env* 유전자로부터의 RRE 요소, 그리고 6) 3' HIV-LTR. pLS-luc II-HS 및 pCS-luc II-HS는, 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2243 및 4190에서 고유의 Hpa I 과 Sal I 환자 서열 수용체 부위를 포함하고; pLS-luc II-PB 및 pCS-luc II-PB는, 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2221 및 4212에서 고유의 Pvu I 과 BamH I 환자 서열 수용체 부위를 포함한다. 지시 유전자 카세트는 1) 제 2 CMV 인핸서-프로모터, 2) 역전 인공 인트론에 의해 가로막힌 루시페라제 유전자의 코딩 영역, 그리고 3) SV40 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다. pLG-luc II 및 pCG-luc II 계놈의 바이러스성 벡터의 경우지만, pLS-luc II 및 pCS-luc II의 지시 유전자는 역전 인트론이 제거되고 역전사 및 프로바이러스성 통합이 발생된 후에야 기능적으로 전사될 수 있다(도 5C).

pVL-SnaB I /PvuII로부터의 인공 인트론이 역방향으로 루시페라제 코딩 영역으로 삽입되어 있는, 지시 유전자 카세트를 포함한 플라스미드 pVL-luc II는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) pVL-luc를 EcoRV로 소화하고, 그리고 그결과 벡터를 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 5.8 kbp의 벡터 단편, 그리고 2) pVL-SnaB I /PvuII를 Sna I 와 PvuII로 소화함으로써 제조된 인공 인트론 서열에 정확히 해당하는 0.2 kbp의 DNA 단편. pVL-luc II'에 해당하며, 역방향으로 루시페라제 코딩 영역내에 삽입된 인공 인트론을 포함하는 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다.

플라스미드 pLG-luc II-HS, pLG-luc II-PB, pLS-luc II-HS 및 pLS-luc II-PB는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제조된다: 1) 각각, 플라스미드 pLG-lucDP-HS, pLG-lucDP-PB, pLS-lucDP-HS 및 pLS-lucDP-PB를 소화하고, 그리고 그결과의 벡터를 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 벡터 DNA, 2) pVL-luc II를 Not I 로 소화함으로써 제조된 루시페라제 지시 유전자 카세트를 포함하는 3.2 kbp의 DNA 단편. 바이러스 LTR의 것과 반대인 전사 방향에 따라 바이러스성 벡터내에 삽입된 올바른 pluc II 지시 유전자 카세트를 포함한 클론은 제한 맵핑에 의해 확인되고 내성 테스트 벡터의 제조용으로 사용된다.

플라스미드 pCG-luc II-HS, pCG-luc II-PB, pCS-luc II-HS 및 pCS-luc II-PB는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 각각 제조된다: 1) 각각, 플라스미드 pLG-luc II-HS, pLG-luc II-PB, pLS-luc II-HS 및 pLS-luc II-PB를 Sma I 과 Cla I 로 소화함으로써 제조된 벡터 DNA, 2) 플라스미드 pCG를 Sma I 과 Cla I 로 소화함으로써 제조된 1.3 kbp의 DNA 단편.

내성 테스트 벡터 - 제작

내성 테스트 벡터는, 실시예 1에 설명된 과정에 따라, 플라스미드 pLG-luc II-HS, pLG-luc II-PB, pCG-luc II-HS, pCG-luc II-PB, pLS-luc II-HS, pLS-luc II-PB, pCS-luc II-HS 및 pCS-luc II-PB로부터 제조된다 (도 5B). 내성 테스트 벡터는 올리고뉴클레오타이드 18 및 19로, 그리고 올리고뉴클레오타이드 22 및 23으로 제조된 증대된 환자 서열을 이용하여 플라스미드 pLG-luc II-HS, pCG-luc II-HS, pLS-luc II-HS, 또는 pCS-luc II-HS로부터 제조된 벡터로 제작된다. 내성 테스트 벡터는 올리고뉴클레오타이드 20 및 21로, 그리고 올리고뉴클레오타이드 24 및 25로 제조된 증대된 환자 서열을 이용하여 플라스미드 pLG-luc II-PB, pCG-luc II-PB, pLS-luc II-PB, 또는 pCS-luc II-PB로부터 제조된 벡터로 제작된다.

약물 감수성 및 내성 테스트

내성 테스트는 하기와 같이 실시예 1에 설명된 과정에 따라 수행된다. 플라스미드 pLG-luc II-HS, pLG-luc II-PB, pCG-luc II-HS 및 pCG-luc II-PB로부터 제조된 내성 테스트 벡터는 기능적 HIV *env* 유전자가 결여되고, 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A와 함께 사용된다. 플라스미드 pLS-luc II-HS, pLS-luc II-PB, pCS-luc II-HS 및 pCS-luc II-PB로부터 제조된 내성 테스트 벡터는 HIV *gag-pol* 유전자 산물만을 코딩하고, pVL-env4070A, 그리고 pLTR-HIV3' 또는 pCMV-HIV3' 패키지 발현 벡터와 함께 사용된다. 두가지 숙주 세포 형태를 사용하여 수행된 내성 테스트에서, 293 세포주, tsa54 세포주, tsa201 세포주, 또는 BOSC 23 세포주는 패키지 숙주세포로서 사용되고, 변형되지 않은 Jurkat 세포는 표적 세포로서 사용된다. 이들 내성 테스트 벡터내에 포함된 역전 인트론을 가진 비기능적 지시 유전자가 패키지 숙주 세포의 트랜스팩션시에 효율적으로 발현되지 않기 때문에, 표적 숙주 세포의 감염은 패키지 숙주 세포와의 공동 배양이나, 패키지 숙주 세포 상청액으로부터의 바이러스를 이용함으로써 수행된다. 비슷한 이유로, 이들 내성 테스트 벡터로 수행된 내성 테스트는 한가지 숙주 세포 형태를 사용할 수도 있다. 한가지 숙주 세포 형태를 이용하는 내성 테스트는 293, tsa54, tsa201, BOSC 23 또는 Jurkat 세포 중 어떤 하나를 이용하여 수행된다.

실시예 4

환자유래 분절(들) 및 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용한 비입자에 기초한 HIV 약물 감수성 및 내성 테스트

약물 감수성 및 내성 테스트

실시예 1, 2, 3에 설명된, 비입자에 기초한 내성 테스트는 치환된 프로모터, 치환된 코딩 영역 또는 역전 인트론 중 어느 하나를 가진 비기능적 지시 유전자를 포함한 내성 테스트 벡터를 이용하여 수행된다. 패키지 발현 벡터의 부재하에서 이들 비입자에 기초한 내성 테스트는 각 내성 테스트 벡터로 한가지 숙주 세포 형태를 트랜스팩션함으로써 시행된다. 비록 이들 내성 테스트 벡터내에 포함된 비기능적 지시 유전자가 숙주 세포의 트랜스팩션시에 효율적으로 발현되지 않는다고 해도, 비바이러스 입자에 기초한 역전사로부터 일어나는 지시 유전자 발현을 감지할 수 있다. 역전사 및 가닥 전이는 치환된, 비기능적 지시 유전자를 비치환된, 기능적 지시 유전자로 전환시킨다. 역전사가 완전히 각 내성 테스트 벡터내에 포함된 *pol* 유전자의 발현에 의존하기 때문에, 항바이러스제는 내성 테스트 벡터내에 포함된 환자유래 분절에 의해 코딩된 *pol* 유전자 산물을 억제하는 능력에 대해서 테스트될 수 있다. 비입자에 기초한 내성 테스트는 하기와 같은 변성에 따라 실시예 1에서 설명된 일반 절차를 거쳐 수행된다: 1) 내성 테스트 벡터는 적당한 숙주 세포내로 형질감염되고, 2) 항바이러스제, 또는 그들의 조합은 적당한 농도로 형질감염된 후 즉시 형질감염된 숙주 세포의 개별적인 배양에 첨가되고, 3) 숙주 세포는 형질감염에 이어서 24 내지 72 시간 수확되어 루시페라제 활성에 대해 분석된다. 항바이러스제(들)의 부재하의 대조 실행과 비교해서, 제공된 항바이러스제(들)의 존재하에서 내성 테스트 벡터로 트랜스팩션된 숙주 세포에 대해서 관찰된 루시페라제 활성 감소는, 내성 테스트 벡터내에 존재하는 환자유래 분절이 코딩하는 바이러스 표적 유전자 산물에 대한 상기 항바이러스제, 또는 그것의 조합의 길보기 억제 상수(Ki)를 계산하는데 사용된다.

내성 테스트 벡터 - 제작

치환된 프로모터를 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 가지고 하는 비입자에 기초한 내성 테스트를 위해서, 내성 테스트 벡터는 실시예 1에 설명된 바와 같이, 플라스미드 pLG-lucPP-HS, pLG-lucPP-PB, pCG-lucPP-HS, pCG-lucPP-PB, pLS-lucPP-HS, pLS-lucPP-PB, pCS-lucPP-HS 또는 pCS-lucPP-PB를 이용하여 제조된다. 각 내성 테스트 벡터는 세포질의 T7 RNA 중합효소를 발현시키는 숙주 세포(예를 들면, 293/T7RNAP 세포 또는 Jurkat/T7RNAP 세포)내로 트랜스팩션된다. 이러한 숙주 세포는 실시예 1에 설명된 바와 같이, 인간과, 다른 포유류 세포

및 세포주의 세포질의 파지 T7 RNA 중합효소의 발현을 지시하는 플라스미드 pVL-T7RNAP를 이용하여, 293 세포 및 Jurkat 세포의 안정된 트랜스펙션에 의해 제조된다. pVL-T7RNAP는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 제작된다: 1) 포유류 발현 벡터 pVL-2를 EcoR I 과 Bgl II 로 소화함으로써 제조된 4.3 kB의 벡터 단편, 그리고 2) 프라이머(primers)로서 올리고뉴클레오타이드 47 및 40을 가진 주형(template)으로서 플라스미드 pT7-G1을 이용하는 PCR에 이어서, EcoR I 와 Bgl II 로 소화됨으로써 제조된 T7 RNA 중합효소의 완전한 코딩 영역을 포함하는 2.6 kB의 DNA 단편(뉴클레오타이드 166 내지 2815, GenBank 이용 번호 M38308에 주어진 코오디네이트, Grachev and Pletnev(1984) *Bioorg. Khim.* 10, 824-843). 올리고뉴클레오타이드 47은 고유의 EcoR I 부위 다음에 진핵세포의 번역 시작에 대한 컨센서스 서열을 통합시키고 (예를 들면, Kozak(1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19867-19870), 올리고뉴클레오타이드 40은 고유의 Bgl II 부위를 통합시킨다.

치환된 코딩 영역 또는 역전 인트론을 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 가지고 하는 비입자에 기초한 내성 테스트를 위해, 내성 테스트 벡터는 실시예 1에서 설명된 바와 같이 플라스미드 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-luc II -HS, pLG-luc II -PB, pCG-luc II -HS, pCG-luc II -PB, pLS-luc II -HS, pLS-luc II -PB, pCS-luc II -HS 또는 pCS-luc II -PB를 이용하여 제조된다. 각 내성 테스트 벡터는 293, tsa54, tsa201, BOSC 23 또는 Jurkat 세포 중 어느 하나대로 트랜스펙션된다.

실시예 5

환자유래 분절(들) 및 기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용한 HIV 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스성 벡터 - 기능적 지시 유전자

환자 서열 수용체 부위, 플라스미드 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 및 pCG-luc-PB-2를 가지는 계놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, 그리고 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터 각각은 5'에서 3' 방향으로 다음 요소를 포함한다 (도 6): 1) HIV-LTR U3 영역 (pLG-luc-HS-1, pLG-luc-HS-2, pLG-luc-PB-1 및 pLG-luc-PB-2) 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터 (pCG-luc-HS-1, pCG-luc-HS-2, pCG-luc-PB-1 및 pCG-luc-PB-2), 2) HIV-LTR R 및 U5 영역, 3) HIV *gag-pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, 삭제된 *env*, 및 *nef* 유전자의 코딩 영역, 4) 삭제된 *env* 유전자내에 삽입된 지시 유전자 카세트, 그리고 5) 3' HIV-LR. pLG-luc-HS-1, pLG-luc-HS-2, pCG-luc-HS-1 및 pCG-luc-HS-2는 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2243 및 4190에서 고유의 Hpa I 와 Sal I 환자 서열 수용체 부위를 포함하고; pLG-luc-PB-1, pLG-luc-PB-2, pCG-luc-PB-1 및 pCG-luc-PB-2는 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2221 및 4212에서 고유의 Pvu I 와 BamH I 환자 서열 수용체 부위를 포함한다 (세부 사항에 대해서는 실시예 1 참조). 각 플라스미드의 지시 유전자 카세트는 1) 제 2 CMV 인핸서-프로모터, 2) 루시페라제 유전자의 코딩 영역, 그리고 3) SV40 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다. pLG-luc-HS-1, pLG-luc-PB-1, pCG-luc-HS-1 및 pCG-luc-PB-1의 지시 유전자 카세트는 바이러스 LTR 또는 제 1 CMV 인핸서-프로모터에 반대인 전사의 방향을 따라 벡터내로 삽입되고 (도 6B). pLG-luc-HS-2, pLG-luc-PB-2, pCG-luc-HS-2 및 pCG-luc-PB-2의 지시 유전자 카세트는 동일한 방향을 따라 벡터내로 삽입된다(도 6C).

환자 서열 수용체 부위, 플라스미드 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 및 pCS-luc-PB-2를 가지는 서브계놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, 그리고 그로부터 유도된 내성 테스트 벡터 각각은 5'에서 3' 방향으로 다음 요소를 포함한다 (도 6): 1) HIV-LTR U3 영역 (pLS-luc-HS-1, pLS-luc-HS-2, pLS-luc-PB-1 및 pLS-luc-PB-2) 또는 제 1 CMV IE 인핸서-프로모터 (pCS-luc-HS-1, pCS-luc-HS-2, pCS-luc-PB-1 및 pCS-luc-PB-2), 2) HIV-LTR R 및 U5 영역, 3) HIV *gag-pol* 유전자의 코딩 영역, 4) 지시 유전자 카세트, 5) 바이러스 패키지 서열을 포함하는 HIV *env* 유전자로부터의 RRE 요소, 그리고 6) 3' HIV-LR. pLS-luc-HS-1, pLS-luc-HS-2, pCS-luc-HS-1 및 pCS-luc-HS-2는 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2243 및 4190에서 고유의 Hpa I 와 Sal I 환자 서열 수용체 부위를 포함하고; pLS-luc-PB-1, pLS-luc-PB-2, pCS-luc-PB-1 및 pCS-luc-PB-2는 각각, HXB2의 뉴클레오타이드 2221 및 4212에서 고유의 Pvu I 와 BamH I 환자 서열 수용체 부위를 포함한다. 각 플라스미드의 지시 유전자 카세트는 1) 제 2 CMV 인핸서-프로모터, 2) 루시페라제 유전자의 완전한 코딩 영역, 그리고 3) SV40 폴리아데닐레이션 서열을 포함한다. pLS-luc-HS-1, pLS-luc-PB-1, pCS-luc-HS-1 및 pCS-luc-PB-1의 지시 유전자 카세트는 바이러스 LTR 또는 제 1 CMV 인핸서-프로모터에 반대인 전사의 방향을 따라 벡터내로 삽입되고 (도 6B). pLS-luc-HS-2, pLS-luc-PB-2, pCS-luc-HS-2 및 pCS-luc-PB-2의 지시 유전자 카세트는 동일한 방향을 따라 벡터내로 삽입된다(도 6C).

플라스미드 pLG-luc-HS-1 및 pLG-luc-HS-2, pLG-luc-PB-1 및 pLG-luc-PB-2, pCG-luc-HS-1 및 pCG-luc-HS-2, pCG-luc-PB-1 및 pCG-luc-PB-2, pLS-luc-HS-1 및 pLS-luc-HS-2, pLS-luc-PB-1 및 pLS-luc-PB-2, pCS-luc-HS-1 및 pCS-luc-HS-2, pCS-luc-PB-1 및 pCS-luc-PB-2는 다음 두 개의 DNA 단편으로부터 각각 제조된다: 1) 각각, pLG-luc II -HS, pLG-luc II -PB, pCG-luc II -HS, pCG-luc II -PB, pLS-luc-HS, pLS-luc II -PB, pCS-luc II -HS 및 pCS-luc II -PB를 Not I 로 소화하고, 그리고 그결과의 벡터를 알칼린 포스페타제로 처리함으로써 제조된 벡터 DNA, 2) pVL-luc를 Not I 로 소화함으로써 제조된 루시페라제 지시 유전자 카세트를 포함하는 3.0 kbp의 DNA 단편. 바이러스 LTR에 관하여 양쪽 모두의 전사 방향으로 주어진 바이러스성 벡터내에 삽입된 지시 유전자 카세트를 포함한 클론은 제한 맵핑에 의해 확인된다(예를 들면, pLG-luc-HS-1 및 pLG-luc-HS-2).

내성 테스트 벡터 - 제작

기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터는 실시예 1에 설명된 항바이러스성 표적 유전자를 포함하는 HIV 게놈 및 서브게놈의 바이러스성 벡터를 사용하여 디자인되었다.

내성 테스트 벡터는, 실시예 1에 설명된 과정에 따라, 상기 플라스미드로부터 제조된다 (도 6). 내성 테스트 벡터는 올리고뉴클레오타이드 18 및 19로, 그리고 올리고뉴클레오타이드 22 및 23으로 제조된 증대된 환자 서열을 이용하여 플라스미드 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 또는 pCS-luc-HS-1로부터 제조된 벡터로 제작된다. 내성 테스트 벡터는 올리고뉴클레오타이드 20 및 21로, 그리고 올리고뉴클레오타이드 24 및 25로 제조된 증대된 환자 서열을 이용하여 플라스미드 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 또는 pCS-luc-PB-1로부터 제조된 벡터로 제작된다.

약물 감수성 및 내성 테스트

내성 테스트는 하기와 같이 실시예 1에 설명된 과정에 따라 수행된다. 플라스미드 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, 그리고 pCG-luc-PB-2로부터 제조된 내성 테스트 벡터는 기능적 HIV *env* 유전자가 결여되고, 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A와 함께 사용된다. 플라스미드 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 그리고 pCS-luc-PB-2로부터 제조된 내성 테스트 벡터는 HIV *gag-pol* 유전자 산물만을 코딩하고, pVL-env4070A, 그리고 pLTR-HIV3'나 pCMV-HIV3' 패키지 발현 벡터와 함께 사용된다. 내성 테스트는 두가지 숙주 세포 형태를 사용하여 수행되고, 이는 293 세포주, tsa54 세포주, tsa201 세포주, 또는 BOSC 23 세포주를 패키지 숙주세포로서 사용하고, 변형되지 않은 Jurkat 세포를 표적 세포로서 사용한다. 표적 세포가 기능적 지시 유전자를 포함하는 이들 또는 다른 내성 테스트 벡터로 감염되는 것은 실시예 1에 설명된 바와 같이, 내성 테스트 벡터 지시 숙주 세포로부터 얻은 여과된 상청액의 내성 테스트 벡터 바이러스 입자로 감염되는 과정을 이용하여 수행된다. 치환된 프로모터 또는 역전 인트론을 가진 비기능적 지시 유전자 바이러스성 벡터를 포함하는 내성 테스트 벡터와 반대로, 기능적 지시 유전자를 포함하는 것들은 통상적으로 트랜스팩션된 패키지 숙주 세포에서 그들의 지시 유전자를 발현시킬 수 있다. 따라서 트랜스팩션된 패키지 숙주 세포 그리고 감염된 표적 숙주 세포내의 지시 유전자 발현 사이에 구별이 어려울 것이기 때문에, 공동 배양 과정이나, 한가지 세포 형태를 사용하는 내성 테스트는 기능적 지시 유전자를 가진 내성 테스트 벡터를 사용하여 표적 세포를 감염시키는 것에 용이하게 적응시킬 수 없다.

본 명세서내에 언급된 모든 간행물과 특허 출원은 참고로 삽입되기 위해 각각의 개별적인 간행물 또는 특허 출원을 상세하고 개별적으로 나타낸 것처럼 여기에 참고로 삽입된다.

본 발명이 속한 기술의 당업자에게는 자명할 것이므로, 본 발명은 본 발명의 취지나 본질적인 특성에 벗어남이 없이, 다른 바이러스에 대한 약물 감수성 및 내성 테스트를 수행하는 것 등 위에서 상세하게 개시된 것 이외의 형태로 실시할 수 있다. 따라서, 위에서 설명한 본 발명의 특정 실시예는 제한적이 아닌 예시적인 것으로 간주되어야 한다. 본 발명의 범위는 이진 설명에 포함된 실시예에 제한되기 보다는 첨부된 특허청구범위에 적힌 것이다.

실시예 6

환자유래 분절(들) 및 기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용한 HIV 약물 감수성 및 내성 테스트

약물 감수성 및 내성 테스트

내성 테스트는 두 개의 숙주 세포 형태를 이용하여, 실시예 5에 설명된 pCG-luc-2와 비슷한 지시 유전자 바이러스성 벡터 pCG-CXCN(F-lucP)2, 그리고 pCG-CXAT(F-lucP)2에 기초한 내성 테스트 벡터로 수행되었다. pCG-CXCN(F-lucP)2의 경우에, 지시 유전자 바이러스성 벡터는 인트론 A (위에서 설명된 CMV/ α -글로빈 인트론)가 결여된 지시 유전자 카세트가 폴리아데닐레이션 신호를 포함하지 않는다는 점에서 변형되었고, 하류의 3' U5 서열은 제작에서 제외되었다. 하류의 U5는 SV40 폴리 A 신호 및 복제 기점 영역으로 대체되었다. 지시 유전자 바이러스성 벡터 pCG-CXAT(F-lucP)2는 CMV 인핸서-프로모터의 하류의 인공 인트론 그리고 TK 폴리아데닐레이션 신호 영역을 포함한 지시 유전자 카세트라는 점에서 pCG-CXCN(F-lucP)와 다르다. 내성 테스트 벡터 바이러스성 입자는 패키지 숙주 세포가 내성 테스트 벡터와 패키지 발현 벡터로 트랜스펙션됨으로써 제조된 제 1 숙주 세포(내성 테스트 벡터 숙주 세포)에 의해 생산되었다. 이어서 내성 테스트 벡터 바이러스성 입자는 지시 유전자의 발현이 측정되는 제 2 숙주 세포(표적 숙주 세포)를 감염시키는데 사용되었다.

AZT 약물 감수성/내성 테스트

기능적 루시페라제 유전자 카세트를 포함하는 내성 테스트 벡터 pCG-luc-2가 제작되었고 숙주 세포는 내성 테스트 벡터 DNA로 형질감염되었다. 내성 테스트 벡터는 뉴클레오시드 역전사 효소 억제제, AZT (Sigma)에 영향을 받기 쉽거나 내성이 있는 "테스트용(test)" 환자유래 역전사 효소 서열을 포함한다. 숙주 세포내로 내성 테스트 벡터 DNA를 형질감염시킴으로써 생산된 내성 테스트 벡터 바이러스성 입자는 AZT의 부재 또는 약물의 농도 증가(대략 0.0001 μ M에서 1000 μ M의 범위)의 존재하에서 표적 숙주 세포를 감염시키는데 사용되었다. 약물 존재시 감염된 표적 숙주 세포에 생산된 루시페라제 활성의 총계는 약물 부재시 감염된 표적 숙주 세포에 생산된 루시페라제의 총계와 비교되었다. 약물 내성은 약물 부재시 검출된 50% 루시페라제 활성까지 억제(억제 농도 50%, IC₅₀)하는데 필요한 약물의 양으로 측정되었다. IC₅₀ 값은 약물 억제 퍼센트 대 log₁₀ 약물 농도를 플롯팅(plotting)함으로써 결정되었다.

숙주 세포(293)는 10-cm-직경의 접시에 시딩되었고(seeded), 내성 테스트 벡터 플라스미드 DNA와 엔벨롭(envelope) 발현 벡터 pCXAS(4070A-*env*)로 입힌(plating) 후 수 일 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션은 칼슘-포스페이트 침전 과정을 이용하여 시행되었다. DNA 침전을 포함하는 세포 배양 배지는 트랜스펙션후에, 한 시간 내지 24 시간, 신선한 배지로 대체되었다. 내성 테스트 벡터 바이러스성 입자를 포함하는 세포 배양 배지는 트랜스펙션된 후에 하루 내지 나흘간 수확되었고, -80°C에서 저장되기 전에 0.45-mm 필터를 통과했다. 수확된 세포 배양 배지내의 HIV 캡시드 단백질(p24) 레벨은 제조자(SIAC; Frederick, MD)에 의해 설명된 바와 같은 EIA 방법에 의해 결정되었다. 감염 6 내지 48시간 전에, 표적 세포(293과 293/T)는 AZT를 포함하지 않거나 100 μ M에서 시작하여 0.00005 μ M에서 끝나는 AZT의 연속적인 두 배 희석물을 포함하는 세포 배양 배지에 입혀졌다. AZT 농도는 감염 전체에 걸쳐 유지되었다. 표적 숙주 세포는 90 μ l의 트랜스펙션된 내성 테스트 벡터 숙주 세포 상청액으로 접종되었다. 대조구 감염(control infections)은 엔벨롭 발현 플라스미드 DNA (pCXAS(4070A-*env*)) 없이 내성 테스트 벡터 플라스미드 DNA세포를 포함하는 트랜스펙션 또는 거짓의(mock) 트랜스펙션(DNA 없음)으로부터의 배양 배지를 이용하여 시행되었다. 접종 후 한시간 내지 24 시간, 신선한 배지는 각 웰(well)에 첨가되었다. 12 내지 36 시간 뒤에 배지는 완전히 신선한 배지로 대체되었다. 감염 후에 하루 내지 사흘 이상 배지는 제거되었고 세포 용해 완충액(cell lysis buffer(Promega))은 각 웰에 첨가되었다. 세포 여액(lysates)은 용해 완충액에서 100배 희석되었고 각 희석된 세포 여액은 루시페라제 활성에 대해 분석되었다(도 7A). AZT의 억제 효과는 다음 공식을 이용하여 측정되었다:

$$\% \text{ 루시페라제 억제} = 1 - (\text{RLU}_{\text{luc}}[\text{AZT}] \div \text{RLU}_{\text{luc}})$$

여기서 RLU_{luc}[AZT]는 AZT의 존재시 감염된 세포에서의 루시페라제 활성의 상대 광 유니트(Relative Light Unit)이고, RLU_{luc}는 AZT 부재시 감염된 세포 내에서의 루시페라제 활성의 상대 광 유니트이다. IC₅₀ 값은 루시페라제 활성의 억제 퍼센트 대 log₁₀ 약물 농도를 플롯팅한 것에 의한 데이터로 이루어진 S자곡선으로부터 얻어졌다. AZT 억제 곡선은 도 7B에 도시된다.

네비라핀(nevirapine) 약물 감수성/내성 테스트

지시 유전자 바이러스성 벡터 pCG-CXCN(F-lucP)2에 기초한, 내성 테스트 벡터는 비-뉴클레오시드 역전사 효소 억제제, 네비라핀(BI-RG-587, Boehringer Ingelheim)에 영향을 받기 쉬운, 생물학적 활성 프로바이러스성 클론, pNL4-3으로부터 유도된 역전사 효소 서열을 포함한다. 숙주 패키지 세포의 트랜스펙션 및 숙주 표적 세포의 감염은 위에서 설명한

대로 AZT 약물 감수성/내성 테스트에 대해 설명한 것처럼 실행되었다. 네비라핀 감수성/내성은 0.0001 μ M 내지 100 μ M 범위의 네비라핀 농도를 이용하여 평가되었다. 네비라핀 억제 곡선은 AZT에 대해 상기 설명한 것처럼 측정되었고 도 7C에 도시된다.

인디나비르(Indinavir) 약물 감수성/내성 테스트

지시 유전자 바이러스성 벡터 pCG-CXCN(F-lucP)2에 기초한, 내성 테스트 벡터는 프로테아제 인히비터인, 인디나비르(MK-639, Merck)에 영향을 받기 쉬운, 생물학적 활성 프로바이러스성 클론, pNL4-3으로부터 유도된 프로테아제 서열을 포함한다. 숙주 패키지 세포의 트랜스펙션 및 숙주 표적 세포의 감염은, 프로테아제 인히비터인, 인디나비르가 감염된 표적 숙주 세포 배양물 뿐만 아니라 트랜스펙션된 패키지 숙주 세포 배양물에 존재했다는 것을 제외하고는 위에서 설명한 대로, AZT 약물 감수성/내성 테스트에 대해 설명한 것처럼 실행되었다. 인디나비르 감수성/내성은 1.5 pM 내지 3 μ M 범위의 인디나비르 농도를 이용하여 평가되었다. 인디나비르 억제 곡선은 AZT에 대해 상기 설명한 것처럼 측정되었고 도 7D에 도시된다.

실시예 7

환자유래 분절(들)과, 역전 인트론을 포함하는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용한 간염 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스성 벡터 - 제작

역전 인트론을 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스성 벡터는 항바이러스 약물의 표적(들)이 되는 바이러스 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스성 벡터를 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)는 서브게놈의 바이러스성 벡터 pCS-HBV에 기초한다. 지시 유전자 바이러스 벡터는 역전 인트론 그리고 HBV DNA 복제 (즉, DR1, 5'ε DR2, DR1*, 3'pA)를 위해 필요한 모든 시스-작용 조절 요소(cis-acting regulatory elements)를 포함하는 비기능적 지시 유전자 카세트를 포함하지만, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 트랜스-작용(trans-acting) 구조적 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열(즉, C, P, S, X 유전자)가 결합된다 (도 8B). C, P, S 및 X 그리고 환자 서열 수용체 부위는 패키지 벡터 pPK-CPX (아래에 설명, 도 8D) 그리고 pPK-S (아래에 설명, 도 8E)내에 포함된다. 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스성 벡터 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)와 패키지 벡터 pPK-CPX는 내성 테스트 벡터시스템을 구성한다. 비기능적 지시 유전자 바이러스성 벡터 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)는 5'에서 3' 방향으로 다음의 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 인캡시테이션 신호 영역(ε)의 5' 복사(copy)의 5' 영역 (프리(pre)-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨), (3) 지시 유전자 ORF가 역전 인트론을 포함하는 비기능적 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε 그리고 3' HBV 폴리아데닐레이션(pA) 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 영역. 비기능적 지시 유전자 발현 카세트는 5'에서 3' 방향으로 배열된 다음의 요소 중 일부 또는 모두로 이루어진다: (1) 전사 인핸서-프로모터 영역, (2) 인트론, (3) 역전 인트론을 포함하는 지시 유전자, (4) 전사 폴리아데닐레이션 신호 서열 (예를 들어, SV40), (HSV-1 티미딘 키나제 유전자). 지시 유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 반대인 전사 방향을 갖는다(도 8B). 하지만, 지시 유전자 ORF내의 인트론은 HBV 서열 요소와 동일한 전사 방향을 갖는다.

제 2 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스성 벡터, pCS-HBV(NF-IG)II(PSAS+)는 역전 인트론과, HBV DNA 복제를 위해 필요한 모든 시스-작용 조절 요소, 그리고 HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 일부 또는 모든 트랜스-작용 구조적 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열(즉, C, P, S, X 유전자)을 포함하는 비기능적 지시 유전자 카세트를 포함한다 (도 8F). 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)에서 유도된 내성 테스트 벡터들은 환자 서열 수용체 부위를 포함하고 패키지 벡터 pPK-CSK와 함께 사용된다 (도 8H). 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터는 또한 P와 같은 패키지 기능의 일부 또는 모두를 제공할 수도 있다.

본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터에 의해 제공되지 않지만 HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 구조적 및 효소적 활성은 추가의 패키지 벡터(들) pPK-CSX를 사용하여 제공된다(아래에 설명, 도 8H). 본 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)는 5'에서 3' 방향으로 다음 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 5'ε의 5' 영역 (프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨), (3) 역전 인트론을 포함하며, 환자에서 유도된 P 유전자 분절 뿐만 아니라 일부 또는 모든 C, P, S 및 X 유전자를 포함할 수 있는 HBV 게놈의 영역내에 위치한 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε 및 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의

영역. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)내에서 지시 유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 반대인 전사 방향을 갖는다. 하지만, 지시 유전자가 ORF내의 인트론은 HBV 서열 요소와 동일한 전사 방향을 갖는다.

형질감염된 세포에서 패키지 벡터(도 8D, 8E 및 8H)는, 트랜스로, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요하지만, 내성 테스트 벡터 또는 지시 유전자 바이러스성 벡터에 의해서 제공되지 않는 구조적 및 효소적 기능을 제공한다. pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-) 등의 지시 유전자 바이러스성 벡터는 패키지 벡터로 공동 트랜스펙션되는 실시예에서, 이들 벡터의 조합은 내성 테스트 벡터 시스템을 구성하고, 상기 패키지 벡터는 환자에서 유도된 P 유전자 분절의 삽입을 위한 환자 서열 수용체 부위를 포함한다(위에서 설명). 패키지 벡터 pPK-CPX는 5'에서 3' 방향으로 다음 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) C ORF 번역 개시 코돈에서 3' pA 신호까지 걸쳐있고 C, P, S 및 X 유전자를 포함하는 HBV 게놈의 영역. 패키지 벡터의 C 유전자는 프리-C ORF 서열을 포함 및/또는 발현하지 않고, S 단백질을 발현하지 않도록 변형된다(아래에 설명).

HBV에서, C 및/또는 P 단백질을 코딩하는 RNA는 우선적으로 패키지되고, 결과적으로 비기능적 지시 유전자 또는 C 및 P 단백질을 코딩하지 않는 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 RNA를 포함하는 내성 테스트 벡터의 효율적인 패키지와 간섭할 수 있다. 패키지 벡터로부터 생성된 RNA의 인캡시데이션을 방지하고 내성 테스트 벡터 또는 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 RNA의 인캡시데이션 효율을 향상시키기 위해 두가지 조치가 취해진다. 먼저, 패키지 벡터에 의해 생성된 RNA는 5' 인캡시데이션 신호 영역(ϵ)을 포함하지 않는다(도 8D, 8E 및 8H). 둘째, C 유전자 및/또는 P 유전자 패키지 기능이 내성 테스트 벡터 또는 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터에 의해 제공될 경우, pPK-S 또는 pPK-CSK와 같이 C 및/또는 P 유전자 산물을 발현하지 않는 패키지 벡터들이 사용된다(도 8E 및 8H).

내성 테스트 벡터 - 제작

1) P 유전자 영역에 환자 서열 수용체 부위(PSAS)라 일컫는 고유의 제한 부위를 유입하여 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)를 변형하고, 2) 감염된 환자의 혈청 또는 세포에 나타나는 바이러스성 DNA의 증대에 의해, HBV 약물 표적, 즉, 역전사효소 또는 DNA 중합효소에 해당하는 환자유래 분절을 증대시키고, 3) 증대된 서열을 환자의 서열 수용체 부위에 있는 지시 유전자 바이러스 벡터에 정밀하게 삽입함으로써 내성 테스트 벡터들이 제조된다(도 8F). 또는, 1) P 유전자에 환자 서열 수용체 부위를 유입하여 패키지 벡터 pPK-CPX를 변형하고, 2) 감염된 환자의 혈청 또는 세포에 나타나는 바이러스성 DNA를 이용하는 증대에 의해, HBV 약물 표적, 즉, 역전사효소 또는 DNA 중합효소에 해당하는 환자유래 분절을 증대시키고, 3) 증대된 서열을 환자의 서열 수용체 부위에 있는 패키지 벡터에 정밀하게 삽입함으로써 내성 테스트 벡터 시스템이 제조된다(도 8D). 일실시예에서, 5'PSAS는 스페이스의 경계면 및 P 단백질의 RT 도메인 근처(직접적으로 S 단백질 번역 개시 부위의 하부)에 위치되고, 3'PSAS는 P 단백질의 RNase H 도메인의 C-터미널 끝단 근처에 위치된다. 환자 서열 수용체 부위로 환자로부터 유도된 P 유전자 분절의 삽입은 키메라 P 유전자 서열의 형성을 야기하는데, 키메라 P 유전자 서열에서는 TP 및 스페이스 도메인이 벡터 P 유전자 서열에 의해 코딩되고 역전사효소/중합효소 및 RNase H 도메인이 환자유래 분절에 의해 코딩된다(도 8D 및 8F).

HBV에서, 전체 S 유전자 ORF는 P 유전자 ORF를 오버랩하지만 다른 해독 틀을 이용하여 발현된다(Nassal, M. and Schaller, H. (1993) Trends in Microbiology 1, 221-228). 그리하여, 환자들로부터 얻어진 HBV P 유전자 서열(역전사효소 및 RNase H 도메인들)은 또한 해당 환자 S 유전자 서열을 포함한다. 3가지의 S 유전자 ORF(pre-S1, pre-S2, S) 번역 개시 부위를 제거하고/제거하거나 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+) 또는 pPK-CPK 벡터들에 인-프레임 종결 코돈을 유입함으로써 오버랩되는 S 유전자 ORF에서의 환자유래 유도된 S 유전자 영역의 발현이 방지된다(도 8F 및 8D). S 유전자 발현은 양호한 특징의 S 유전자 산물을 제공하는 별도의 패키지 벡터를 이용하여 인트랜스(in trans) 제공된다(도 8E 및 8H). S 유전자 발현을 제거하는 변형은 터미널 단백질(TP) 또는 P 유전자의 스페이스 도메인에 의해 코딩되는 오버랩되는 아미노산 서열의 변화가 없이 수행된다.

약물 감수성 및 내성 테스트

약물 감수성 및 내성 테스트가 한가지 유형의 숙주 세포 또는 두가지 유형의 숙주 세포를 이용하여 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)에 기초한 내성 테스트 벡터 또는 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)와 패키지 벡터 pPK-CPX에 기초한 내성 테스트 벡터 시스템으로 실시된다. pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)와 같은 내성 테스트 벡터 및 패키지 벡터 pPK-CPX나 pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)와 같은 지시 유전자 바이러스 벡터 및 pPK-CSX와 같은 환자유래 분절을 포함하는 패키지 벡터(즉, 내성 테스트 벡터 시스템)로 숙주 세포를 패키징하는 공동 트랜스펙션은 역전 인트론의 스플라이싱의 결과로서 기능적 지시 유전자를 포함하는 인캡시데이트된 지시 유전자 "프리게놈" RNA를 포함하는 HBV 바이러스 입자를 생성한다(도 8B 및 도 8C).

복제의 트랜스팩션은 항바이러스 약물의 부재시에 또는 항 HBV 약물(예를 들어, HBV P 단백질 역전사효소 또는 중합효소 인히비터)의 농도를 증가시키는데 유지된 일련의 패키지 숙주 세포 배양물에서 수행된다. 항 HBV 약물의 존재 또는 부재시에 패키지 숙주 세포를 7일동안 유지한 후, 약물 감수성 또는 내성의 레벨은 숙주 패키지 세포 여액에서 직접적으로 또는 숙주 패키지 세포 배양 배지를 수확함으로써 얻어진 격리된 HBV 입자에서 평가될 수 있다. 또다른 접근이 세포 여액 및 분리된 HBV 입자에서 약물 감수성 및 내성을 평가하기 위해 이용될 수 있다.

하나의 세포 평가로서 언급된 일실시예에서, 약물 감수성 또는 내성은 항바이러스 약물의 존재 또는 부재시에 트랜스팩션된 패키지 숙주 세포에서 지시 유전자 발현 예를 들어 루시페라제 활성을 측정함으로써 평가된다. 일정한 항바이러스제의 존재로 트랜스팩션된 세포에 대해 관찰된 루시페라제 활성에서의 감소 또는 항바이러스제의 부재시의 대조 실행과 비교하여 약제의 조합은 일반적으로 S자형 곡선과 같은 항바이러스제의 농도의 로그에 관한 것이다.

두 개의 세포 평가로서 언급된 제 2 실시예에서, 약물 감수성 또는 내성은 HBV 입자 또는 HBV 입자 DNA 각각과의 감염 또는 트랜스팩션에 이어 표적 숙주 세포에서 지시 유전자 발현 예를 들어 루시페라제 활성을 측정함으로써 평가된다. 패키지 숙주 세포로부터 얻어진 HBV 바이러스 입자는 표적 숙주 세포를 감염시키는데 사용되거나 이들 입자들로부터의 DNA는 표적 숙주 세포들을 트랜스팩션하는데 사용된다. 감염 또는 트랜스팩션의 시점에 항바이러스 약물의 적절한 농도가 세포 배양물에 첨가된다. 감염 또는 트랜스팩션에 따라 수일까지, 표적 숙주 세포들이 용해되고 지시 유전자 발현이 측정된다. 지시 유전자 발현의 감소는 예를 들어 약물의 부재시의 대조 실행과 비교하여 HBV P 단백질의 역전사효소(- 가닥 DNA) 또는 DNA 중합효소(+ 가닥 DNA) 활성을 억제함으로써 HBV 복제를 억제하는 약물의 존재시에 트랜스팩션되거나 감염된 세포에 대해 관찰되게 된다.

DNA 구조 지시 평가로서 언급된 제 3 실시예에서, 약물 감수성 또는 내성은 트랜스팩션된 패키지 숙주 세포 또는 패키지 숙주 세포에 의해 생성된 바이러스 입자 내에서 발생된 HBV DNA 복제의 레벨을 측정함으로써 평가된다. 트랜스팩션된 숙주 세포에서 HBV 서브게놈 바이러스 백터는 전사되고 RNA 전사체는 "프리게놈" RNA로서 패키징된다. 바이러스의 성숙동안 프리게놈 RNA는 완전한 마이너스 가닥 및 부분적인 플러스 가닥 DNA 복제물로 구성되는 게놈 DNA (rc-DNA)의 풀린 원형 형태로 변환된다. 이어서, rc-DNA는 전자쌍 공유적으로 밀접되어 있는 원형 DNA 형태(cccDNA)로 변환된다. HBV DNA 복제를 측정하기 위해, 증대 프라이머는 프리게놈 RNA의 스플라이싱 및 이러한 스플라이스 RNA를 rc-DNA 및 cccDNA 형태로의 변환에 의해 형성되는 HBV DNA 구조를 증대하도록 디자인된다.

HBV 입자 내에서 정확한 증대 표적 구조의 형성은 rc-DNA 및 cccDNA의 형성을 초래하도록 HBV DNA 복제의 성공적인 완성을 필요로 한다. HBV DNA 복제(역전사 및 DNA 중합효소 활성)를 억제하는 항바이러스 약물은 다수의 양적인 증대 평가를 이용하여 증대된 DNA 산물의 감소로서 차례로 측정될 수 있는 DNA 표적 서열의 형성을 제한할 것이다. 일실시예(도 10B)에서, 역 프라이머(Pr)의 결합 부위는 HBV 서열과 동일한 전사 오리엔테이션에서 지시 유전자 ORF로 삽입되는 인트론 서열에 의해 두 개의 부분으로 분리된다. 정방향 프라이머(Pf)의 프라이머 결합 부위는 DR2 및 DR1* 서열에 의해 측면에 있는(flanked) 바이러스 백터의 영역 내에 위치된다. 선형의 HBV 백터에서 Pf 및 Pr 프라이머는 반대 방향으로 DNA 합성을 지시하고 서로에 대해 외부로 방향지워진다. 이 경우, Pr 프라이머는 상부 방향에서((ε)의 5'복제를 향해) DNA 합성을 지시하고 Pf 프라이머는 하부 방향에서(3'(ε)를 향해) DNA 합성을 지시한다. 프라이머 및 주형의 이러한 배열은 선형 지시 유전자 바이러스 백터에서 기능적인 증대 유닛을 구성하지 않는다. 또한, Pr 결합 부위는 선형 스플라이스되지 않은 백터에서 온전하지 않으며 따라서 Pr은 표적 DNA로 열처리되지 않게 된다. 대조적으로, Pf 및 Pr 프라이머는 성숙 비리온에서 발견된 HBV DNA의 풀린 원형에서 서로에 대해 내부방향 오리엔테이션을 추정한다. 이들 두 프라이머는 rc-DNA의 플러스 가닥 복제물 내에서 그리고 플러스 또는 마이너스 가닥 또는 cccDNA에서 DR1의 단일 복제물을 향해 DNA 합성을 지시한다. 프라이머 및 형판의 이러한 배열은 기능적인 증대 유닛을 구성한다(도 10C).

DNA 서열 지시 평가의 또다른 실시예에서(도 9D), 증대 효소(예를 들어 Taq 중합효소)의 5' 엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성은 증대된 DNA의 제작보다는 측정된다(C. Heid et al., 1996. Genome Research 6:986-994). 5' 엑소뉴클레아제 활성은 Pf 및 Pr 결합 부위에 의해 측면에 있는 증대된 DNA 주형 영역에 결합할 수 있는 형광 꼬리표가 달린 올리고뉴클레오타이드 탐침의 핵분해적 개열(nucleolytic cleavage)을 모니터함으로써 측정된다. 이러한 평가의 수행은 상부 프라이머(Pf)의 3' 말단이 올리고뉴클레오타이드 탐침의 5' 말단으로의 긴밀한 근접에 의존한다. Pf 프라이머가 연장될 때, 중합효소의 5' 엑소뉴클레아제 활성이 올리고뉴클레오타이드 탐침을 개열하도록 올리고뉴클레오타이드 탐침의 5' 말단을 배치시킨다. 인트론의 목적은 Pf 결합 부위를 엑소뉴클레아제 탐침 서열의 5' 말단으로부터 충분히 멀리 떨어지게 사이를 두어서 스플라이스되지 않은 표적 주형에서 탐침 올리고뉴클레오타이드의 탐지가능한 엑소뉴클레아제 소화를 필수적으로 제거할 수 있도록 하는 것이다. 스플라이싱에 의한 인트론의 제거는 Pf 결합 부위의 3'말단을 직접적으로 probe 5' 결합 부위의 상부에 위치하는 역할을 한다. 후자의 재배열은 증대된 표적 주형의 엑소뉴클레아제 활성의 양적인 탐지를 가능하게 한다(도 1E).

약물 스크리닝

약물 스크리닝은 역전 인트론 및 패키징 벡터를 갖는 비기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터를 이용하여 수행된다. 트랜스팩션된 패키징 숙주 세포에서, 지시 유전자 바이러스 벡터는 지시 유전자를 포함하는 인캡시데이션이 충분한 (e+) RNA 전사를 생성한다. 패키징 벡터는 내성 테스트 벡터에 의해 제공되지는 않지만 바이러스 DNA 복제 및 입자 형성을 위해 필요한 구조적 및/또는 효소적 바이러스 기능을 인트랜스 제공한다. 패키징 숙주 세포의 공동 트랜스팩션에 따라, 지시 유전자 바이러스 벡터 및 패키징 벡터는 인캡시데이트된(encapsidated) 지시 유전자 바이러스 벡터 "프리게놈" RNA를 포함하는 HBV 바이러스 입자를 발생하며, 인캡시데이트된 지시 유전자 바이러스 벡터 "프리게놈" RNA는 기능적 지시 유전자를 포함한다.

약물 스크리닝은 다음과 같이 수행된다: 지시 유전자 바이러스 벡터 및 패키징 벡터 DNA는 패키징 숙주 세포들을 트랜스팩션하는데 사용된다. 복제의 트랜스팩션은 잠재적인 항바이러스 화합물 (예를 들어, 후보 HBV P 단백질 역전사효소 또는 중합효소 인히비터)의 부재 또는 존재시에 유지된 일련의 패키징 숙주 세포 배양물에 대해 수행된다. 후보 항바이러스 약물의 존재 또는 부재시에 패키징 숙주 세포를 7일동안 유지시킨 후, DNA 복제의 억제 레벨은 직접적으로 패키징 숙주 세포 여액 또는 숙주 패키징 세포 배양 배지를 수확함으로써 얻어진 분리된 HBV 입자에서 평가된다. DNA 탐지 또는 지시 유전자 활성 방법은 잠재적인 상기한 바와 같이 잠재적인 항-HBV 약물 후보를 평가하는데 사용될 수 있다.

실시예 8

환자유래 분절과, 치환된 프로모터를 함유하는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용하는 간염 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스 벡터 - 제작

치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터가 항바이러스 약물의 표적이 되는 바이러스 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)는 서브게놈 바이러스 벡터 pCS-HBV에 기초한다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)는 치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자 카세트와, HBV DNA 복제 (즉, DR1, 5'ε DR2, DR1*, 3'pA)를 위해 필요한 모든 시스 액팅 조절 요소를 포함하지만, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 트랜스작용 구조적 기능 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열(즉, C, P, S, X 유전자)은 결여되어 있다 (도 10B). C, P, X 및 환자 서열 수용체 부위는 패키징 벡터 pPK-CPX내에 포함된다 (실시예 7에서 설명, 도 8D 참조). 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)는 5'에서 3' 오리엔테이션에서 다음의 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 5'ε의 5' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된), (3) 프로모터 영역이 지시 유전자 ORF의 3, 즉, 하부에 위치되도록 조립된 비기능적 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된). 비기능적 지시 유전자 발현 카세트는 5'에서 3' 오리엔테이션에 배열된 다음의 요소중 일부 또는 모두를 포함한다: (1) 내부 리보솜 엔트리 부위 (IRES), (2) 역전 인트론을 포함할 수 있는 지시 유전자, (3) 전사 폴리아데닐레이션 신호 서열 (예를 들어, HSV-1 티미딘키나제 유전자, SV40) (4) 인핸서 프로모터 영역. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터내에서 지시 유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 반대이거나 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다. 지시 유전자 ORF가 인트론을 함유하는 경우, 인트론은 HBV 서열 요소와 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다.

제 2 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터는 치환된 프로모터 영역을 포함하는 비기능적 지시 유전자 카세트와, HBV DNA 복제를 위해 필요한 모든 시스 액팅 조절 요소와, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)을 위해 필요한 트랜스작용 구조적 기능 및 효소적 기능을 제공하는 모든 HBV 유전자 서열 (즉, C, P, S, X 유전자)중 일부를 포함한다 (도 10D). 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)에서 유래한 내성 테스트 벡터들은 환자 서열 수용체 부위를 포함하고 패키징 벡터 pPK-CSK와 연계하여 사용된다 (도 8H). 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터는 또한 패키징 기능의 일부 또는 모두를 제공할 수 있다. 또한, 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터에 의해 제공되지 않지만 DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 구조적, 효소적 활성은 추가의 패키징 벡터를 사용하여 제공된다. 본 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)는 5'에서 3' 오리엔테이션에서 다음 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 5'ε의 5' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된), (3) 인핸서 프로모터 영역 (치환된 프로모터), (4) 환자유래 분절을 포함하는 P 유전자, (5) 지시 유전자 ORF, (6) 내부 리보솜 엔트리 부위, (7) DR2, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV

게놈의 3' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된). 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터내에서 지시 유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소에 대해 역방향 또는 정방향에서 전사 오리엔테이션을 갖는다. 지시 유전자가 역전 인트론을 하는 경우, 인트론은 HBV 서열 요소와 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다.

내성 테스트 벡터 - 제작

치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터가 실시예 8에서 설명된 바와 같이 항바이러스 표적 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 또는 패키지 벡터는 환자유래 분절 (PDS)을 포함하는 P 유전자의 삽입을 위해 환자 서열 수용체 부위 (PSAS)를 포함하도록 변형된다 (실시예 7에 설명, 도 8D 및 도 8F 참조). 환자로부터 유도된 S 유전자의 발현이 실시예 7에서 설명된 바와 같이 제거된다 (도 8D 참조). 균일한 S 유전자 발현이 양호한 특징을 이루는 S 유전자 산물을 제공하는 별도의 패키지 벡터를 이용하여 인트랜스 제공된다 (도 8E).

약물 감수성 및 내성 테스트

약물 감수성 및 내성 테스트가 한가지 유형의 숙주 세포 또는 두가지 유형의 숙주 세포를 이용하여, 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)에 기초한 내성 테스트 벡터, 또는 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-) 및 패키지 벡터 pPK-CPX를 포함하는 내성 테스트 벡터 시스템으로 실시된다. 패키지 숙주 세포의 공동 트랜스펙션에 따라, 내성 테스트 벡터 및 패키지 벡터 또는 지시 유전자 바이러스 벡터 및 패키지 벡터 (즉, 내성 테스트 벡터 시스템)를 가지고, 비기능적 지시 유전자를 포함하는 인캡시데이트된 지시 유전자 "프리게놈" RNA를 포함하는 HBV 바이러스 입자가 생성된다. 트랜스펙션된 숙주 세포 내에서, 치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자가 HBV DNA 복제 과정동안 기능적 지시 유전자로 변환된다 (도 10B 및 도 10C).

약물 감수성 및 내성 테스트는 상기 실시예 7에 설명된 바와 같이 수행된다. 항바이러스 약물을 다양화하기 위해 환자로부터 유도된 역전사효소 및/또는 DNA 중합효소 활성의 내성 또는 감수성은 트랜스펙션된 또는 감염된 숙주 세포의 지시 유전자 발현 레벨을 측정함으로써 측정될 수 있다. 또한, 내성 또는 감수성이 발생된 HBV DNA 복제 양을 측정함으로써 측정될 수 있다. 후자는 양의 DNA 증대 평가를 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 유형의 평가의 일 예로, (도 9F 및 9G) d역 프라이머 (Pr)의 프라이머 결합 부위는 5'ε의 하부 영역에 위치된다. 정방향 프라이머 (Pf)의 프라이머 결합 부위는 DR2 및 DR1* 서열에 의해 측면 영역 내에 위치된다. 선형 HBV 벡터에서, Pf 및 Pr 프라이머는 반대방향으로 DNA 합성을 지시한다. 이 경우, Pr 프라이머는 상부 방향에서 (5'ε를 향하여) DNA 합성을 지시하고, Pf 프라이머는 하부 방향에서 (3'ε를 향해) DNA 합성을 지시한다. 이러한 프라이머 구성은 트랜스펙션을 위해 사용되는 바이러스 벡터의 선형 복제물에서 기능적인 증대 유닛을 구성하지 않는다. 대조적으로, Pf 및 Pr 프라이머는 성숙 비리온에서 발견된 rc-DNA 형태에서 서로에 대해 오리엔테이션을 추정한다. 이들 두 프라이머는 rc-DNA의 플러스 가닥 복제물 내에서 DR1의 단일 복제물을 향해 DNA 합성을 지시한다. 프라이머 및 주형의 이러한 배열은 기능적인 증대 유닛을 구성한다.

약물 스크리닝

약물 스크리닝은 치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터를 이용하여 상기 실시예 7에 필연적으로 설명된 바와 같이 수행된다.

실시예 9

환자유래 분절과, 치환된 프로모터와 번역 개시 부위를 포함하는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용하는 간염 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스 벡터

치환된 프로모터 및 번역 개시 부위를 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터, 즉 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS가 항바이러스 약물의 표적이 되는 바이러스 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-)는 서브게놈 바이러스 벡터 pCS-HBV에 기초한다. 지시 유전자 바이러스 벡터는 치환된 프로모터 및 번역 개시 영역을 갖는 비기능적 지시 유전자 카세트와, HBV DNA 복제 (즉, DR1, 5'ε DR2, DR1*, 3'pA)를 위해 필요한 모든 시스 액팅 조절 요소를 포함하지만, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 트랜스작용 구조적 기능 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열(즉, C, P, S, X 유전자)은 결여되어 있다 (도 11B). C, P, X 유전자 및 환자 서열 수용체 부위는 패키지 벡터 pPK-CPX 내에 포함된다 (실

시예 7, 도 8D). S 유전자는 패키지 벡터 pPK-S에 포함된다 (실시예 7, 도 8E). 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-) 및 패키지 벡터 pPK-CPX는 내성 테스트 벡터 시스템을 구성한다. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-)는 5'에서 3' 오리엔테이션에서 다음의 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) DR1 및 5'ε를 포함하여 HBV 게놈의 5' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된), (3) 번역 개시 부위가 결여된 지시 유전자 ORF, (4) 인핸서 프로모터 영역 (치환된 프로모터), (5) DR2, 기능적인 pre-C ORF 번역 개시 코돈, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역. 비기능적 지시 유전자 카세트는 5'에서 3' 오리엔테이션에 배열된 다음의 요소중 일부 또는 모두를 포함한다: (1) 인프레임(in-frame) 번역 개시 부위를 포함하지 않는 지시 유전자 ORF, (2) 전사 폴리아데닐레이션 신호 서열 (예를 들어, HSV-1 티미딘키나제 유전자, SV40) (3) 인핸서 프로모터 영역. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS-) 내에서 지시 유전자 발현 카세트 전사 오리엔테이션은 HBV 서열 요소와 동일하다. 지시 유전자 ORF가 인트론을 포함하는 경우, 인트론은 HBV 서열 요소와 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다.

제 2 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터는 치환된 프로모터 영역 및 번역 개시 영역을 포함하는 비기능적 지시 유전자 카세트와, HBV DNA 복제를 위해 필요한 모든 시스 액팅 조절 요소와, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)을 위해 필요한 트랜스작용 구조적 기능 및 효소적 기능을 제공하는 모든 HBV 유전자 서열 (즉, C, P, S, X 유전자) 또는 그 일부를 포함한다 (도 11D). 지시 유전자 바이러스 벡터에 의해 제공되지 않지만 DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 구조적, 효소적 활성은 추가의 패키지 벡터 pPK-CSX를 사용하여 제공된다 (실시예 7, 도 8E). C, S 및 X는 패키지 벡터 pPK-CSX 내에 포함된다 (실시예 7, 도 8H). 본 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)는 5'에서 3' 오리엔테이션에서 다음 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) DR1 및 5'ε를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된), (3) 번역 개시 부위가 결여된 지시 유전자 ORF, (4) 환자유래 분절을 포함하는 P 유전자, (5) 인핸서 프로모터 영역 (치환된 프로모터), (6) DR2, pre-C ORF 번역 개시 코돈, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터내에서 지시 유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다. 지시 유전자가 역전 인트론을 포함하는 경우, 인트론은 HBV 서열 요소와 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다.

내성 테스트 벡터 - 제작

치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터가 실시예 7에서 설명된 바와 같이 항바이러스 표적 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 또는 패키지 벡터는 환자유래 분절 (PDS)을 포함하는 P 유전자의 삽입을 위해 환자 서열 수용체 부위 (PSAS)를 포함하도록 변형된다 (실시예 7에 설명, 도 8D 및 도 8F 참조). 환자로부터 유도된 S 유전자의 발현이 실시예 7에서 설명된 바와 같이 제거된다 (도 8D 참조). 균일한 S 유전자 발현이 양호한 특징을 이루는 S 유전자 산물을 제공하는 별도의 패키지 벡터를 이용하여 인트랜스 제공된다 (도 8E).

약물 감수성 및 내성 테스트

약물 감수성 및 내성 테스트가 실시예 7 및 8에서 설명된 절차에 의해 실시된다. 비기능적 지시 유전자가 HBV 복제동안 기능적 지시 유전자로 변환된다 (도 11B 및 도 11C).

약물 스크리닝

약물 스크리닝은 치환된 프로모터와 번역 개시 영역을 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터를 이용하여 상기 실시예 7 및 8에 필연적으로 설명된 바와 같이 수행된다.

실시예 10

환자유래 분절과, 치환된 코딩 영역을 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 이용하는 간염 약물 감수성 및 내성 테스트

지시 유전자 바이러스 벡터

치환된 코딩 영역을 갖는 비기능적 지시 유전자를 포함하는 지시 유전자 바이러스 벡터가 항바이러스 약물의 표적이 되는 바이러스 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 이용하여 디자인되었다. 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS-)는 서브게놈 바이러스 벡터 pCS-HBV에 기초한다. 지시 유전자 바이러스 벡터는 치환된 코

딩 영역을 갖는 비기능적 지시 유전자 카세트와, HHBV DNA 복제 (즉, DR1, 5'ε DR2, DR1*, 3'pA)를 위해 필요한 모든 시스 액팅 조절 요소를 포함하지만, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 트랜스작용 구조적 기능 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열(즉, C, P, S, X 유전자)은 결합되어 있다 (도 12B). C, P, X 유전자 및 환자 서열 수용체 부위는 패키지 벡터 pPK-CPX내에 포함되고, S 유전자는 패키지 벡터 pPK-S에 의해 제공된다 (실시예 7에서 설명, 도 8D, 8E 참조). 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS-)와 패키지 벡터 pPK-CPX는 내성 테스트 벡터 시스템을 구성한다. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS-)는 5'에서 3' 오리엔테이션에서 다음의 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) DR1 및 5'ε를 포함하여 HBV 게놈의 5' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된), (3) 프로모터 영역 및 코딩 영역의 5' 부분이 3', 즉, 코딩 영역의 남아있는 3' 부분의 하부에 위치되도록 조립된 비기능적 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역 (pre-C ORF 번역 개시 코돈이 제거된). 비기능적 지시 유전자 카세트는 5'에서 3' 오리엔테이션에 배열된 다음의 요소중 일부 또는 모두를 포함한다: (1) 스플라이스 수용체 서열에서 인트론 엔딩(ending)의 3' 영역, (2) 지시 (리포터) ORF 또는 선택가능한 마커(marker) ORF의 3' 영역, (3) 전사 폴리아데닐레이션 신호 서열 (예를 들어, HSV-1 티미딘키나제 유전자, SV40), (4) 인핸서 프로모터 영역, (5) 지시 유전자 ORF의 5' 영역, (6) 스플라이스 공역체 서열에서 인트론 개시의 5' 영역. 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터내에서 지시 유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 반대이거나 동일한 전사 오리엔테이션을 갖는다. 지시 유전자 ORF가 인트론을 포함하는 경우, 인트론은 HBV 서열 요소에 대해 동일한 오리엔테이션으로 오리엔티드된다.

제 2 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터는 치환된 코딩 영역을 포함하는 비기능적 지시 유전자 카세트와, HBV DNA 복제를 위해 필요한 모든 시스 액팅 조절 요소와, HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성, pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)을 위해 필요한 트랜스 작용 구조적 기능 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열 (즉, C, P, S, X 유전자)중 일부 또는 모두를 포함한다 (도 12D). 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS+)에서 유래된 내성 테스트 벡터들은 환자 서열 수용체 부위 (PSAS)를 포함하고 패키지 벡터 pPK-CSK와 연계하여 사용된다 (실시예 7, 도 8H). 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터는 또한 패키지 기능의 일부 또는 모두를 제공할 수 있다. 또한, 본 실시예에서, 지시 유전자 바이러스 벡터에 의해 제공되지 않지만 HBV DNA 복제 및 바이러스 입자 형성을 위해 필요한 구조적, 효소적 활성은 추가의 패키지 벡터를 사용하여 제공된다. 본 실시예에서, 비기능적 지시 유전자 바이러스 벡터는 5'에서 3' 오리엔테이션에서 다음 요소를 포함한다: (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) 직접적으로 pre-C ORF 번역 개시 코돈, DR1 및 5'ε의 하부에 있는 HBV 게놈의 영역, (3) C, P, S, X 유전자의 일부 또는 모두를 포함할 수 있는 HBV 게놈의 영역을 포함하는 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 영역 (pre-C ORF 개시 코돈이 제거됨).

비기능적 지시유전자 바이러스 벡터 내에서 pCS-HBV(NF-IG)PCR(PSAS+) 지시유전자 발현 카세트는 HBV에 대해 동일하거나 반대의 전사방향을 가진다. 지시유전자가 역전 인트론을 포함하는 경우에는 HBV 서열과 동일한 방향을 갖게 된다.

내성 테스트 벡터-제조

치환된 코딩 영역이 구비된 비기능적 지시유전자를 포함한 내성 테스트 벡터는 실시예 7에 나타난 항바이러스 표적 유전자를 포함한 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 사용하여 만들어진다. 상기 지시유전자 바이러스 벡터나 패키지 벡터는 환자 유래 분절(PDS)(실시예 7에 나타남, 도 8D와 8F 참조)를 포함한 P 유전자의 삽입을 위해 환자 서열 수용체 부위(PSAS)를 포함하도록 개조된다.

약물 감수성 및 내성테스트

약물 감수성 및 내성테스트는 실시예 7과 8에서 기술된 바와 같은 과정으로 실행된다. 상기 비기능적 지시유전자는 HBV 복제기간동안 기능적 지시유전자로 전환된다(도 12B와 12C 참조).

치환된 프로모터와 변환초기영역을 가진 비기능적 지시유전자를 포함하는 지시유전자 바이러스 벡터를 사용한 약물 스크리닝은 본질적으로 실시예 7와 8에 나타난 것과 같이 실행된다.

실시예 11

환자유래 분절과 기능적 지시유전자를 포함한 내성테스트 벡터를 사용한 헤파티티스 약물 감수성 및 내성테스트

지시유전자 바이러스 벡터 - 제작

기능적 지시유전자를 포함하는 지시유전자 바이러스 벡터는 항바이러스 약물의 표적인 바이러스 유전자를 포함하는 HBV 서브게놈 바이러스 벡터를 이용하도록 만들어진다. 상기 지시유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)는 서브게놈 바이러스 벡터 pCS-HBV에 기초를 두고 있다. 지시유전자 바이러스 벡터인 pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)는 기능적 지시유전자 카세트와, HBV DNA 복제에 필요한 시스-액팅(cis-acting) 조절요소들(즉, DR1, 5'ε DR2, DR1*, 3'pA)의 모두를 포함하고 있으나, HBV DNA 복제와 바이러스 입자의 형성에 필수적인 트랜스-액팅(trans-acting) 구조적 및 효소적 기능을 제공하는 HBV 유전자 서열(즉, C, P, S, X 유전자)은 결여되어 있다.(도 14B 참조) 상기 C, P, X 유전자와 환자 서열 수용체 부위는 패키지 벡터 pPK-CPX 내에 포함되고, S 유전자는 패키지 벡터 pPK-S 내에 포함된다(도 8D와 8E 참조). 기능적 지시유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)는 5'부터 3'까지의 방향에서 다음과 같은 요소들을 포함한다. (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'ε를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역(pre-C ORF 변환 초기 코돈은 제거됨.), (3) 기능적 지시유전자 카세트, (4) DR2, DR1* 3', 3'ε, 3' HBV pA 신호영역(pre-C ORF 변환영역 코돈(codon)은 제거됨.)을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역. 지시유전자 발현 카세트는 5'부터 3'까지의 방향에서 다음과 같은 구성요소의 일부 또는 전부로 이루어진다. (1) 전사 인핸서-프로모터 영역, (2) 인트론, (3) 지시유전자 ORF 또는 선택할 수 있는 마커 유전자 ORF, (4) 전사 폴리머레이제이션 신호 서열(SV40) 또는 일측방향(HSV-1 thymidine kinase 유전자). 상기 지시유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 같거나 반대인 전사방향을 갖는다.

두 번째 실시예에서, 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 기능적 지시유전자 카세트와, 시스액팅(cis-acting) 표준 요소와, 일부 또는 전부의 HBV 유전자 서열(C, P, S, X 유전자)을 포함하는 바, 상기 시스액팅 표준 요소는 HBV 복제를 위해 필요한 것이며, 상기 HBV 유전자 서열은 HBV DNA 복제와 바이러스 입자형성 pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)(도 13D 참조)에 필요한 처리구조와 효소작용을 제공한다. 지시유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)에서 추출된 내성테스트 벡터는 환자 서열 수용체 부위(PSAS)를 포함하고, 패키지 벡터 pPK-CSK와 연계 사용된다. 본 실시예에서 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 일부 또는 전부의 패키지 기능 역시 제공한다. 지시유전자 바이러스 벡터에 의해 제공되고, HBV DNA 복제와 바이러스 입자형성에 필요한 구조적 및 효소적활동은 패키지 벡터 pPK-CSX(예 7, 도 8H 참조)를 추가로 사용함으로써 제공된다. 본 실시예에서, 기능적 지시유전자 바이러스 벡터는 5'부터 3'까지의 오리엔테이션에서 다음과 같은 요소들을 포함한다. (1) CMV IE 인핸서 프로모터 영역, (2) pre-C ORF 변환 초기 코돈과 DR1 및 5'ε의 바로 아래에 위치한 HBV 게놈의 영역, (3) 일부 또는 전부의 C, P, S, X 유전자를 포함하는 HBV 게놈 영역 내의 기능적 지시유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε, 3' HBV pA 신호영역을 포함하는 HBV 게놈 영역. 지시유전자 바이러스 벡터 내에서 상기 지시유전자 발현 카세트는 HBV 서열 요소와 같거나 반대되는 전사방향을 갖는다.

내성테스트 벡터-제조

치환된 프로모터와 함께 비기능적 지시유전자를 포함하는 내성테스트 벡터는 실시예 7에 나타난 것과 같이 항바이러스 표적 유전자를 포함한 HBV 서브게놈을 사용하여 만들어진다. 상기 지시유전자 바이러스 벡터나 패키지 벡터는 환자유래 분절(PDS)를 포함한 P 유전자의 삽입을 위한 환자 서열 수용체 부위(PSAS)를 포함하도록 개조된다(실시예 7, 도 8D 및 8E 참조). 실시예 7에 나타난 것과 같이 환자-추출 S 유전자의 발현은 제거된다(도 8D 참조).

약물감수성 및 내성테스트

약물감수성 및 내성테스트는 기능적 지시유전자 바이러스 벡터를 기초로한 내성테스트 벡터와, 지시유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)를 기초로한 pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)나 내성테스트 벡터 시스템, 그리고 패키지 벡터에 의해 실행된다. 트랜스팩션된 패키지 숙주세포에 있어서, 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 기능적 지시유전자 카세트를 포함하고 엔캡시데이션(encapsidation) 가능한(ε+) RNA 전사체를 만든다. 패키지 숙주세포의 보조트랜스팩션에 있어서, 상기 지시유전자 바이러스 벡터와 패키지 벡터는 엔캡시데이션된 지시유전자 바이러스 벡터 "프리게놈(pregenome)"RNA를 포함한 HBV 입자를 형성할 수 있게 되는 바, 상기 엔캡시데이션된 지시유전자 바이러스 벡터 "프리게놈(pregenome)"RNA를 포함한 HBV 입자는 기능적 지시유전자 카세트를 포함한다.

본 예에서 상기 지시유전자 바이러스 벡터는 기능적 지시유전자 카세트를 포함함으로써 트랜스팩션된 세포 내에서 HBV DNA 복제가 되지 않는 경우에 지시유전자가 활동하도록 한다(도 13 참조). 기능적 지시유전자의 경우에, 약물에 의한 HBV DNA 복제는 패키지 숙주세포에서 만들어진 바이러스 입자를 수확함으로써 평가되며, 입자(또는 입자 DNA)를 사용하여 표적 숙주세포를 감염(또는 트랜스팩션)시킨다. 이와 달리, 지시자로서 DNA를 사용하여, 패키지 숙주세포에서 분리된 바이러스 입자 내에서 DNA 복제를 측정할 수도 있다. HBV DNA 복제를 억제하는 약물은 기능적 지시유전자의 바이러스 벡터의 "성숙한"rc-DNA 형태를 포함하는 바이러스 입자의 형성을 감소시킨다. 결과적으로, 기능적 지시유전자는 감염/트랜스팩션 되는 동안에 표적 숙주세포에 효과적으로 전이되지 않으며, 이러한 세포에서의 지시유전자 바이러스

백터 cccDNA의 양과 지시유전자 활동은 줄어든다. 두 세포 어세이의 표적 숙주세포 내에서의 지시유전자 발현 검사는 실시예 7에 나타난 것과 같이 실행된다. 실시예 8에 기술되고 도 9F 및 9G에 나타난 것과 같이 바이러스 입자의 rc-DNA 검사는 DNA를 사용하여 실시된다.

약물 스크리닝

치환된 프로모터 및 초기 전이영역이 갖추어진 비기능적 지시유전자를 포함하는 지시유전자 바이러스 백터를 사용한 약물 스크리닝은 원칙적으로 실시예 7 및 8에 나타난 것과 같이 실행된다.

올리고뉴클레오타이드

- 1) 5'-AGTGAATTAGCCCTTCCACCCGGGTCGAGCTTGGCGTAATCA-3'
(42-mer) (서열 번호 :1)
- 2) 5'-CTGTTGGGAAGGGCGATCTCTAGATGCTAGAGATTTTCCACA-3'
(42-mer) (서열 번호 :2)
- 3) 5'-CTCCTCCTCCAAGTCTGAGCGGCCGCCTTTAGCATCTGATGCAC-3'
(44-mer) (서열 번호 :3)
- 4) 5'-CTCCTCCTCCAAGTCTGAGCGGCCGCCATATGGTGTCTTTACTAA-3'
(44-mer) (서열 번호 :4)
- 5) 5'-GGTCTAACCAGAGAGACCCGGTTCATAACGAGCT-3'
(36-mer) (서열 번호 :5)
- 6) 5'-GAATTCGCGGCCGCAATTCGCCCCCTCTCCCT-3'
(32-mer) (서열 번호 :6)
- 7) 5'-GTTAACGCGGCCGCGATATAGTTCCTCCTTTC-3'
(32-mer) (서열 번호 :7)
- 8) 5'-GAATTCTCGCGACCATGGAAGACGCCAAAAAC-3'
(32-mer) (서열 번호 :8)
- 9) 5'-GTTAACAGATCTCTCGAGTTACAATTTGGACTTTCC-3'
(36-mer) (서열 번호 :9)
- 10) 5'-AGACGGGCACACACTACTTAATACGACTCACTATAGGG
TGAAGCACTCAAGGCAAG-3' (56-mer) (서열 번호 :10)
- 11) 5'-AAGAGTGACCTGAGGGAAGTTAACGGATACAGTTCCTTGTCT-3'
(42-mer) (서열 번호 :11)
- 12) 5'-TCCAGCACTGACTAATTTGTGCTGACTTGTTCAATTCCTCCAAT-3'
(42-mer) (서열 번호 :12)
- 13) 5'-TAACGCCTATTCTGCTATGCCGACACCCAATTCTGAAAATGG-3'
(42-mer) (서열 번호 :13)
- 14) 5'-AAGGATACAGTTCCTTGTCGATCGGCTCCTGCTTCTGAGGGG-3'
(42-mer) (서열 번호 :14)
- 15) 5'-CTAAAAATAGTACTTTCCGGATCCCAGCACTGACTAATTTAT-3'
(42-mer) (서열 번호 :15)
- 16) 5'-TTAGTCCTTCGGTCCTCCAATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG-3'
(42-mer) (서열 번호 :16)
- 17) 5'-GTCCAGATAAGTGCCAAGGATTCGTTCACTAATCGAATGGA-3'

- (42-mer) (서열 번호 :17)
- 18) 5'-GAATTCGTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGG-3'
(33-mer) (서열 번호 :18)
- 19) 5'-GTTAACGTCGACTTGTTCAATTCCTCCAAT-3'
(30-mer) (서열 번호 :19)
- 20) 5'-GAATTCGATCGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCCC
TCAGATCACTCTTTGG-3' (55-mer) (서열 번호 :20)
- 21) 5'-GTTAACGGATCCCAGCACTGACTAATTTATCTACTTGTTT
ATTTCTCTCCAAT-3' (52-mer) (서열 번호 :21)
- 22) 5'-GAATTCGTAACTTCCCTCA (G/A) ATC (A/C) CTCTTTGG-3'
(33-mer pool) (서열 번호 :22)
- 23) 5'-GTTAACGTCGACTT (G/T) (T/C) TCATTTCTCTCC (A/T) AT-3'
(30-mer pool) (서열 번호 :23)
- 24) 5'-GAATTCGATCGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCCC
TCA (G/A) ATC (A/C) CTCTTTGG-3' (55-mer pool) (서열 번호 :24)
- 25) 5'-GTTAACGGATCCCAGCACTGACTAATTTATCTACTT (G/T)
(T/C) TCATTTCTCTCC (A/T) AT-3'
(52-mer pool) (서열 번호 :25)
- 26) 5'-ATCTCTTACCTGTCCTATCTAACAGGCCAGGATTAA-3'
(36-mer) (서열 번호 :26)
- 27) 5'-GAATTCTCGCGACCACCATGGCGCGTTCAACGCTC-3'
(35-mer) (서열 번호 :27)
- 28) 5'-GTTAACAGATCTTCATGGCTCGTACTCTAT-3'
(30-mer) (서열 번호 :28)
- 29) 5'-GAATTCGCGCGCAAGCGGCCGCAACCCGGGAAAAGCTT
AAGCATGCAACCCGGGAAGAATTCAATCGCGAAA-3'
(72-mer) (서열 번호 :29)
- 30) 5'-GTTAACGCGCGCTTCTCGAGTTGCGGCCGCTTGCTAGCTT
AGATCTTTGGGCCCTTTTCGCGATTGAATTCTT-3'
(72-mer) (서열 번호 :30)
- 31) 5'-GAATTCAAGCTTGGCCATTGCATACGTTGT-3'
(30-mer) (서열 번호 :31)
- 32) 5'-GTTAACGCATGCATAAGAAGCCAA-3'
(24-mer) (서열 번호 :32)

- 33) 5'-GAATTTCGCATGCTCCCCTGCTCCGACCCGG-3'
(30-mer) (서열 번호 : 33)
- 34) 5'-GTTAACGAATTCTCCTGCGGGGAGAAGCAG-3'
(30-mer) (서열 번호 : 34)
- 35) 5'-GAATTCAGATCTGCCATACCACATTTGTAG-3'
(30-mer) (서열 번호 : 35)
- 36) 5'-GTTAACGCTAGCTCCAGACATGATAAGATA-3'
(30-mer) (서열 번호 : 36)
- 37) 5'-GAATTCGCTAGCATCCCGCCCCTAACTCCG-3'
(30-mer) (서열 번호 : 37)
- 38) 5'-GTTAACGTCGACGCAAAAGCCTAGGCCTCC-3'
(30-mer) (서열 번호 : 38)
- 39) 5'-GAATTCTCGGAACAGTTGGCCCT-3'
(24-mer) (서열 번호 : 39)
- 40) 5'-GTTAACAGATCTTTACGCGAACGCGAAGTC-3'
(30-mer) (서열 번호 : 40)
- 41) 5'-GTTAACGAATTCTTGCAAAAAGCTTTGCAAGATGGATA
AAGTTTTTAGAACTCCAGTAGGACTCC-3'
(66-mer) (서열 번호 : 41)
- 42) 5'-GAATTCTCGCGATCTAGACGTTCTACCTTTCTCTTCTT
TTTTGGAGGAGTCCACTGGAGTTT-3'
(63-mer) (서열 번호 : 42)
- 43) 5'-GTTAACGAATTTCCACCATGATTGAACAAGATGGA-5'
(35-mer) (서열 번호 : 43)
- 44) 5'-GAATTCAGATCTTCAGAAGAACTCGTCAAG-3'
(30-mer) (서열 번호 : 44)
- 45) 5'-CCCCGTGCCAAGAGTGACTACGTAAGTACCGCCTATAGA-3'
(39-mer) (서열 번호 : 45)
- 46) 5'-CTCTGCTTCTCCCCGAGCTGGAGAATTCAATCGCGAAA-3'
(39-mer) (서열 번호 : 46)
- 47) 5'-GTTAACGAATTTCCACCATGAACACGATTAACATC-5'
(35-mer) (서열 번호 : 47)

[서열 목록]

(1) 일반정보:

(i) 출원인: 케이폰, 대니얼 제이. 및 크리스토스 제이. 페트로포울로우스

(ii) 발명의 명칭:

(iii) 서열의 수: 47

(2) 서열 번호 1에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 1]

AGTGAATTAG CCCTTCCACC CGGGTCGAGC TTGGCGTAAT CA
42

(2) 서열 번호 2에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 2]

CTGTTGGGAA GGGCGATCTC TAGATGCTAG AGATTTTCCA CA
42

(2) 서열 번호 3에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 44 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 3]

CTCCTCCTCC AAGTCTGAGC GGCCGCCTTT AGCATCTGAT GCAC
44

(2) 서열 번호 4에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 44 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 4]

CTCCTCCTCC **AAGTCTGAGC** GGCCGCCATA TGGTGTTTTA CTAA
44

(2) 서열 번호 5에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 36 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 5]

GGTCTAACCA **GAGAGACCCG** GTTCACTAAA CGAGCT
36

(2) 서열 번호 6에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 32 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 6]

GAATTTCGCGG **CCGCAATTCC** GCCCCTCTCC CT
32

(2) 서열 번호 7에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 32 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 7]

GTAAACGCGG CCGCGATATA GTTCCTCCTT TC
32

(2) 서열 번호 8에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 32 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 8]

GAATTCTCGC GACCATGGAA GACGCCAAAA AC
32

(2) 서열 번호 9에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 36 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 9]

GTTAACAGAT CTCTCGAGTT ACAATTTGGA CTTTCC
36

(2) 서열 번호 10에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 56 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 10]

AGACGGGCAC ACACTACTTA ATACGACTCA CTATAGGGTG AAGCACTCAA
GGCAAG 56

(2) 서열 번호 11에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 11]

AAGAGTGACC TGAGGGAAGT TAACGGATAC AGTTCCTTGT CT
42

(2) 서열 번호 12에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 12]

TCCAGCACTG ACTAATTTGT CGACTTGTTT ATTCCTCCA AT
42

(2) 서열 번호 13에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (게놈)

[서열 13]

TAACGCCTAT TCTGCTATGC CGACACCCAA TTCTGAAAAT GG
42

(2) 서열 번호 14에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (게놈)

[서열 14]

AAGGATACAG TTCCTTGTCG ATCGGCTCCT GCTTCTGAGG GG
42

(2) 서열 번호 15에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 15]

CTAAAAATAG TACTTTCCGG ATCCCAGCAC TGAATAATTT AT
42

(2) 서열 번호 16에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쌍

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 16]

TTAGCTCCTT CGGTCCTCCA ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GG
42

(2) 서열 번호 17에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 42 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쌍

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 17]

GTCCCAGATA AGTGCCAAGG ATTCGTTTAC TAATCGAATG GA
42

(2) 서열 번호 18에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 33 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 18]

GAATTCGTTA ACTTCCCTCA GATCACTCTT TGG
33

(2) 서열 번호 19에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 19]

GTAAACGTCG ACTTGTTTCAT TTCCTCCAAT
30

(2) 서열 번호 20에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 55 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 20]

GAATTCCGAT CGACAAGGAA CTGTATCCTT TAACTTCCCT CAGATCACTC TTTGG
55

(2) 서열 번호 21에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 52 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쉼

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 21]

GTAAACGGAT CCCAGCACTG ACTAATTTAT CTACTTGTTT ATTCCTCCA AT
52

(2) 서열 번호 22에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 33 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쉼

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 22]

GAATTCGTTA ACTTCCCTCA RATCMCTCTT TGG
33

(2) 서열 번호 23에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쉼

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 23]

GTAAACGTCG ACTTKYTCAT TTCCTCCWAT
30

(2) 서열 번호 24에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 55 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 24]

GAATTCCGAT CGACAAGGAA CTGTATCCTT TAACTTCCCT CARATCMCTC TTTGG
55

(2) 서열 번호 25에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 52 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 25]

GTTAACGGAT CCCAGCACTG ACTAATTTAT CTACTTKYTC ATTCCTCCW AT
52

(2) 서열 번호 26에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 36 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 26]

ATCTCTTACC TGTCCTATCT AACAGGCCAG GATTAA
36

(2) 서열 번호 27에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 35 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 27]

GAATTCTCGC GACCACCATG GCGCGTTCAA CGCTC
35

(2) 서열 번호 28에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 28]

GTTAACAGAT CTTTCATGGCT CGTACTCTAT
30

(2) 서열 번호 29에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 72 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 29]

GAATTCGCGC GCAAGCGGCC GCAACCCGGG AAAAGCTTAA GCATGCAACC
CGGGAAGAAT 60
TCAATCGCGA AA
72

(2) 서열 번호 30에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 72 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 30]

GTTAACGCGC GCTTCTCGAG TTGCGGCCGC TTGCTAGCTT AGATCTTTGG
GCCCTTTTCGC 60
GATTGAATTC TT
72

(2) 서열 번호 31에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 31]

GAATTCAAGC TTGGCCATTG CATACGTTGT
30

(2) 서열 번호 32에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 24 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (게놈)

[서열 32]

GTAAACGCAT GCATAAGAAG CCAA
24

(2) 서열 번호 33에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (게놈)

[서열 33]

GAATTCGCAT GCTCCCCTGC TCCGACCCGG
30

(2) 서열 번호 34에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (게놈)

[서열 34]

GTAAACGAAT TCTCCTGCGG GGAGAAGCAG
30

(2) 서열 번호 35에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 35]

GAATTCAGAT CTGCCATACC ACATTTGTAG
30

(2) 서열 번호 36에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 36]

GTAAACGCTA GCTCCAGACA TGATAAGATA
30

(2) 서열 번호 37에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1분쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 37]

GAATTCGCTA GCATCCCGCC CCTAACTCCG
30

(2) 서열 번호 38에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 38]

GTTAACGTCG ACGCAAAAGC CTAGGCCTCC
30

(2) 서열 번호 39에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 24 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 39]

GAATTCTCGC GAACAGTTGG CCCT
24

(2) 서열 번호 40에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쉼의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 40]

GTTAACAGAT CTTTACGCGA ACGCGAAGTC
30

(2) 서열 번호 41에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 66 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 41]

```

GTTAACGAAT  TCTTGCAAAA  AGCTTTGCAA  GATGGATAAA  GTTTTTAGAA
ACTCCAGTAG      60
GACTCC
    
```

(2) 서열 번호 42에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 63 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 42]

```

GAATTCTCGC  GATCTAGACG  TTCTACCTTT  CTCTTCTTTT  TTGGAGGAGT
CCTACTGGAG TTT      ,      63
    
```

(2) 서열 번호 43에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 35 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쇠의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 43]

GTTAACGAAT TCCCACCATG ATTGAACAAG ATGGA
35

(2) 서열 번호 44에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 44]

GAATTCAGAT CTTCAGAAGA ACTCGTCAAG
30

(2) 서열 번호 45에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 39 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 45]

CCCCGTGCCA AGAGTGACTA CGTAAGTACC GCCTATAGA
39

(2) 서열 번호 46에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 39 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (계놈)

[서열 46]

CTCTGCTTCT CCCCAGCT GGAGAATTCA ATCGCGAAA
39

(2) 서열 번호 47에 대한 정보:

(i) 서열의 특징:

(A) 길이: 35 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 쌍의 수: 1본쇄

(D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자의 타입: DNA (게놈)

[서열 47]

GTTAACGAAT TCCCACCATG AACACGATTA ACATC
35

도면의 간단한 설명

도 1A는 HIV-1의 DNA 게놈 구조를 나타내는 도면이다. 항바이러스 단백질은 gag, pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, env 및 nef 유전자에 의해 3개의 해독 틀(the three reading frame)으로 각각 코딩(encoding) 되어 있다. RNA는 항바이러스 DNA로부터 전사(轉寫)되어 있고, 바이러스 세포 효소에 의해 처리되어 게놈 바이러스 RNA 및 mRNA를 발생시킨다. 바이러스 장말단 반복 서열(the viral long terminal repeat)(LTR)의 U3, R 및 U5이 표시되어 있다.

도 1B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 HIV 게놈 항바이러스 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) HIV-LTR U3 영역, (2) HIV-LTR R 영역, (3) HIV-LTR U5 영역, (4) env 및 nef 유전자가 삭제된 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu의 코딩 영역, (5) 3' HIV-LTR.

도 1C는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 HIV 게놈 항바이러스 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터(a CMV IE enhancer-promotor), (2) HIV-LTR R 영역, (3) HIV-LTR U5 영역, (4) env 및 nef 유전자가 삭제된 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu의 코딩 영역, (5) 3' HIV-LTR.

도 1D는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 HIV 서브게놈 항바이러스 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) HIV-LTR U3 영역, (2) HIV-LTR R 영역, (3) HIV-LTR U5 영역, (4) HIV gag-pol 유전자의 코딩 영역, (5) 3' HIV-LTR.

도 1E는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 HIV 서브게놈 항바이러스 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터, (2) HIV-LTR R 영역, (3) HIV-LTR U5 영역, (4) HIV gag-pol 유전자의 코딩 영역, (5) 3' HIV-LTR.

도 2A는 HIV-1의 DNA 게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 2B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 갖는 치환된 프로모터를 구비한 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터를 나타내는 도면이다: (1) HIV-LTR U3 영역(pLG-lucPP-HS 및 pLG-lucPP-PB) 또는 CMV IE 인핸서-프로모터(pCG-lucPP-HS 및 pCG-lucPP-PB), (2) HIV-LTR R 영역, (3) LTRs의 전사 방향과 반대인 전사 방향을 갖는 삽입된 T7 파지 RNA 중합효소 프로모터(polymerase promotor)(이하 T7 프로모터)를 포함하는 HIV-LTR U5 영역, (4) env 및 nef 유전자가 삭제된 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu의 코딩 영역, (5) 환자 서열 수용체 부위로 삽입된 환자유래 분절, (6) 삭제된 env 유전자로 삽입된 지시 유전자 카세트, (7) 3' HIV-LTR.

도 2C는 2(a)에 기술된 내성 테스트 벡터의 비기능적 지시 유전자(치환된 프로모터)가 역전사 효소에 의해 기능적 지시 유전자로 변환하는 것을 나타내는 도면이다. 기능적 지시 유전자 변환은 지시 유전자 코딩 영역에 대한 T7 프로모터의 재배치에 의해 나타난다.

도 3A는 HIV-1의 DNA 게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 3B는 HIV-LTR U3 영역으로부터 전사되어 스플라이스(spliced)된 서브게놈 mRNA로 각각 발현된 vif, vpr, tat, rev, vpu 및 nef 유전자를 제공하는 패키지 발현 벡터 pLTR-HIV3'를 나타내는 도면이다.

도 3C는 CMV IE 인핸서 프로모터로부터 전사되어 스플라이스된 서브게놈 mRNA로 각각 발현된 vif, vpr, tat, rev, vpu 및 nef 유전자를 제공하는 패키지 발현 벡터 pCMV-HIV3'를 나타내는 도면이다.

도 3D는 CMV IE 인핸서 프로모터의 전사에 의해 앰포트로픽(the amphotrophic) MLB env 유전자물을 제공하는 패키지 발현 벡터 pVL-env4070A[pCXAS(4070A env)]를 나타내는 도면이다.

도 4A는 HIV-1의 DNA 게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 4B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 치환된 코딩 영역을 구비한 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) HIV-LTR U3 영역(pLG-lucPC-HS 및 pLG-lucPC-PB) 또는 제1의 CMV IE 인핸서-프로모터(pCG-lucPC-HS 및 pCG-lucPC-PB), (2) HIV-LTR R 및 U5 영역, (3) env 및 nef 유전자가 삭제된 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu의 코딩 영역, (4) 환자 서열 수용체 부위로 삽입된 환자유래 분절, (5) 루시페라제 유전자(the luciferase gene)의 5' 코딩 영역을 포함하는, 제1 지시 유전자 카세트, (6) 삭제된 3' HIV-LTR U3 영역으로 삽입되는 루시페라제 유전자의 3' 코딩 영역을 포함하는 제2 지시 유전자 카세트, (7) 3' HIV-LTR R 및 U5 영역.

도 4C는 4(a)에 기술된 내성 테스트 벡터의 비기능적 지시 유전자(치환된 코딩 영역)가 역전사 효소에 의해 기능적 지시 유전자로 변환하는 것을 나타내는 도면이다. 역전사 및 가닥 전이(strand transfer)후, 루시페라제 3' 코딩 영역은 3' LTR에서 5' LTR로 복사되어, 기능적 루시페라제 코딩 영역을 발생시킬 수 있도록 스플라이스될 수 있는 mRNA의 전사를 허용한다.

도 5A는 HIV-1의 DNA 게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 5B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 역전 인트론(an inverted intron)을 구비한 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) HIV-LTR U3 영역(pLG-lucII-HS 및 pLG-lucII-PB) 또는 제1의 CMV IE 인핸서-프로모터(pCG-lucII-HS 및 pCG-lucII-PB), (2) HIV-LTR R 및 U5 영역, (3) env 및 nef 유전자가 삭제된 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu의 코딩 영역, (4) 환자의 서열 수용체 부위로 삽입된 환자유래 분절, (5) 삭제된 env 유전자로 삽입된 지시 유전자 카세트, (5) 3' HIV-LTR.

도 5C는 5(a)에 기술된 내성 테스트 벡터의 비기능적 지시 유전자(역전 인트론)가 역전사 효소에 의해 기능적 지시 유전자로 변환하는 것을 나타내는 도면이다. 지시 유전자 카세트의 전체적인 전사 방향은 제1의 CMV 인핸서-프로모터와 바이러스 LTRs의 전사 방향과 반대이고, 반면에 인공 인트론의 방향은 나중 요소와 같은 동일한 방향을 갖는다. 제2의 CMV 인핸서-프로모터에 의한 지시 유전자의 전사는 역전 인트론이 이와 같은 방향으로 스플라이스되지 못하기 때문에 기능적 전사체를 생산하지는 못한다. 5' 바이러스 LTR 또는 제1의 CMV IE 인핸서-프로모터에 의한 지시 유전자의 전사는, 그러나 최종 전사가 앤티센스(an antisense) 방향을 갖기 때문에 지시 유전자가 여전히 기능적으로 발현되지 않음에도 불구하고, RNA 스플라이스에 의해 역전 인트론을 제거하게 된다. 이러한 전사의 역전사와 결과적인 프로바이러스(proviral) DNA의 삽입후에, 지시 유전자는 역전 인트론이 사전에 제거됨에 따라 제2의 CMV 인핸서-프로모터에 의해 기능적으로 전사될 수 있다.

도 6A는 상기 (a)와 (b)에 도시된 HIV-1의 DNA 게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 6B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 갖는 기능적 지시유전자를 구비한 내성 테스트 벡터를 나타내는 개략도이다: (1) HIV-LTR U3 영역(pLG-luc-HS-1 및 pLG-luc-PB-1) 또는 제1의 CMV IE 인핸서-프로모터(pCG-luc-HS-1 및

pCG-luc-PB-1), (2) HIV-LTR R 및 U5 영역, (3) env 및 nef 유전자가 삭제된 HIV gag-pol, vif, vpr, tat, rev, vpu의 코딩 영역, (4) 바이러스 LTRs의 반대 전사방향을 갖는 삭제된 env 유전자로 삽입된 기능적 지시 유전자 카세트, (5) 3' HIV-LTR.

도 6C는 지시 유전자 카세트의 전사 방향이 바이러스 LTRs의 전사 방향과 동일한 기능적 지시 유전자 카세트(pLG-luc-HS-2 및 pLG-luc-PB-2, pCG-luc-HS-2 및 pCG-luc-PB-2)를 구비한 내성 테스트 벡터를 나타내는 개략도이다

도 7A는 내성 테스트 벡터인 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA 및 pCG-CXAT(F-lucP)2-AA을 사용하여 약물의 감수성을 예시한 도면이다. 데이터는 AZT이 존재하지 않거나 5mM AZT이 존재하는 상대적으로 가벼운 단위(Relative Light Units (RLU))와 같은 표적 숙주 세포내의 루시페라제 유전자 활동으로 나타내어져 있다.

도 7B는 AZT 처리전과 AZT 처리후의 "테스트" 환자유래 분절을 포함하는 내성 테스트 벡터인 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA로 수행된 약물의 감수성과 내성 테스트를 나타내는 도면이다. 내성 테스트 벡터는 게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA로부터 유도된다. 데이터는 표적 숙주 세포 대 AZT 농도(log₁₀)로 루시페아제 유전자 활동의 억제가 백분율로 나타내어져 있다. pCG-CXCN(F-lucP)2-AA은 사각형의 점으로 표시되어 있다. AZT 처리에 앞서서 환자유래 분절을 포함하는 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA 원형의 점으로 표시되어 있으며 AZT 처리후에는, 삼각형의 점으로 표시되어 있다.

도 7C는 생물학적으로 활동하는 일부의 클론, pNL4-3으로부터 유도된 역전사 분절을 포함하는 내성 테스트 벡터인 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA로 수행된 약물의 감수성과 내성 테스트를 나타내는 도면이다. 데이터는 표적 숙주 세포 대 네비오라픽(nevirapine) 농도(log₁₀)로 루시페아제 유전자 활동의 억제가 백분율로 나타내어져 있고, 사각형의 점으로 표시되어 있다

도 7D는 생물학적으로 활동하는 일부의 클론, pNL4-3으로부터 유도된 프로테아제(the protease) 분절을 포함하는 내성 테스트 벡터 pCG-CXCN(F-lucP)2-AA로 수행된 약물 감수성과 내성 테스트를 나타내는 도면이다. 데이터는 표적 숙주 세포 대 인디나비로(indinavir) 농도(log₁₀)로 루시페아제 유전자 활동의 억제가 백분율로 나타내어져 있고, 사각형의 점으로 표시되어 있다.

도 8A는 HBV의 RNA 프리게놈(pregenom) 구조를 나타내는 도면이다. 프리게놈 RNA는 실선으로 나타내어져 있다. 직접적인 반복 서열(DR)이 폐사각형으로 도시되어 있다. 인캡시테이션(encapsidation) 신호 서열의 위치는 (())로 나타내어져 있다. C, P, C, S 및 X 유전자는 개사각형으로 도시되어 있다. 터미날 단백질(terminal protein)(TP), 스페이서(spacer), DNA 폴리메라아제/역전사 효소(pol/RT), 및 P 유전자의 RNase H 영역이 표시되어 있다. C, P, S, 및 X 번역 개시는 회색 삼각형으로 나타내어져 있다.

도 8B는 지시 유전자 카세트와 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 역전 인트론을 구비한 내성 테스트 벡터 시스템 성분인 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 5'((프리-C ORF 번역 개시 코돈(codon)이 제거됨)의 5' 영역, (3) 지시 유전자가 ORF가 역전 인트론을 포함하는 비기능적 지시 유전자, (4) DR2, DR1*, 3'e 및 3' HBV 폴리아덴릴레이션 (polyadenylation)(pA) 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 영역.

도 8C는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터인 pCS-HBV(F-IG)II(PSAS-)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는(covalently closed circular) DNA (cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 8D는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 환자유래 분절을 구비한 내성 테스트 벡터 시스템의 성분인 패키지 벡터 pPK-CPX를 일실시예로 나타내는 도면이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) C ORF 번역 개시 코돈에서부터 3' pA 신호까지 연결되고(spanning), C, P, S 및 X 유전자를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역. 패키지 벡터 pPK-CPX의 C 유전자는 프리-C ORF 서열을 포함하지 않고 (번역 개시 부위에서 X로 도시된 바와 같이) S 단백질을 발현하지 않도록 수정된다.

도 8E는 지시 유전자 바이러스 벡터 pSC-HBV(NF-IG)II-(PSAS-)와 패키지 플라스미드 pPK-CPX를 구비한 내성 테스트 벡터 시스템과 같이 공동 형질 전환되는, S 유전자 단백질을 제공하는 부차적인 패키지 벡터 pPK-S를 나타내는 도면이다.

도 8F는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 역전 인트론을 갖는 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터인 pSC-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)를 나타내는 도면이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 5'((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨)의 5' 영역, (3) 환자로부터 유도된 P 유전자 분절을 포함하는 HBV 게놈 영역내에서 (역전 인트론을 포함하는) 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε 및 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 영역.

도 8G는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트와 환자로부터 유도된 P 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터 pCS-HBV(F-IG)II-(PSAS+)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 8H는 저항 테스트 벡터 pSC-HBV(NF-IG)II-(PSAS+)와 같이 공동 형질 전환되는, C, S 및 X 유전자 단백질을 제공하는 패키지 벡터 pPK-CSX를 나타내는 도면이다.

도 9A는 HBV의 RAN 프리게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 9B는 비기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 HBV 지시 유전자 바이러스 벡터를 나타내는 도면이다. 표적 DNA 서열의 증폭을 위한 프라이머(primer) 결합 부위가 표시되어 있다. 전방 프라이머(Pf) 및 역(reverse) 프라이머(Pr) 결합 부위의 위치 및 방향은 기능적 증폭 유닛을 패키지 숙주 세포를 형질 변환시키기 위해 사용되는 벡터의 선형 형태로 구성하지 못한다. Pr 결합 부위는 프리게놈 RNA의 스플라이스트에 의해 발생하는 접합 서열을 연결할 수 있도록 설계된다.

도 9C는 10B에 기술된 지시 유전자 바이러스 벡터의 rc-DNA 형태를 나타내는 도면이다. 표적 DNA 서열의 증폭을 위한 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. Pf 및 Pr 프라이머 결합 부위의 위치 및 방향은 기능적 증폭 유닛을 패키지 숙주 세포에서 생성된 바이러스 입자내에 있는 HBV DNA에 의해 발생된 벡터의 rc-DNA 형태의 플러스 가닥 DNA 성분과 cccDNA 형태의 플러스 및 마이너스 가닥 DNA 성분으로 구성한다. Pr 결합 부위는 프리게놈 RNA의 스플라이스트에 의해 조립된다.

도 9D는 비기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 HBV 지시 유전자 바이러스 벡터를 나타내는 도면이다. 표적 DNA 서열의 증폭을 위한 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. Pf 및 Pr 결합 부위의 위치 및 방향은 기능적 증폭 유닛을 패키지 숙주 세포를 형질 전환하는데 사용되는 벡터의 선형 형태로 구성하지만, Pf 결합 부위는 벡터가 스플라이스트되지 않은 상태인 핵산말단 가수분해 효소(exonuclease) 검출 프로브[프로브(probe)] 결합 부위에 인접되어 있지 않다. Pf, Pr 및 프로브 결합 부위의 이러한 배열은 효과적인 핵산말단 가수분해 효소 검출 유닛을 구성하지 않는다.

도 9E는 도 9D에 기술된 지시 유전자 바이러스 벡터의 rc-DNA 형태를 나타내는 도면이다. 표적 DNA 서열의 증폭을 위한 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. Pf 및 Pr 프라이머 결합 부위의 위치 및 방향은 기능적 증폭 유닛을 패키지 숙주 세포에서 HBV DNA 복제에 의해 발생된 벡터의 rc-DNA 및 cccDNA 형태로 구성한다. Pf 결합 부위의 위치는 벡터의 rc-DNA 및 cccDNA 형태로 핵산말단 가수분해 효소 검출 프로브(프로브)에 아주 근접되게 된다. Pf, Pr 및 프로브 결합 부위의 이러한 배열은 효과적인 핵산말단 가수분해 효소 검출 유닛을 구성한다.

도 9F는 HBV 지시 유전자 바이러스 벡터를 나타내는 도면이다. 표적 DNA 서열의 증폭을 위한 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. 전방 프라이머(Pf) 및 역 프라이머(Pr) 결합 부위의 위치 및 방향은 기능적 증폭 유닛을 패키지 숙주 세포를 형질 변환하는데 사용되는 벡터의 선형 형태로 구성한다.

도 9G는 10F에 기술된 지시 유전자 바이러스 벡터의 rc-DNA 형태를 나타내는 도면이다. 표적 DNA 서열의 증폭을 위한 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. Pf 및 Pr 프라이머 결합 부위의 위치 및 방향은 패키지 숙주 세포에서 생성된 바이러스 입자내에 있는 HBV DNA에 의해 발생된 벡터의 rc-DNA 형태의 플러스 가닥 DNA 성분과 cccDNA 형태의 플러스 및 마이너스 가닥 DNA 성분에서 기능적 증폭 유닛으로 구성한다.

도 10A는 HBV의 RAN 프리게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 10B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터의 성분인 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS-)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 DR1 및 5'((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨)의 5' 영역, (3) 프로모터 영역이 3'에 위치되게 즉, 지시 유전자 ORF의 하부로 위치되게 조립된 비기능적 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε 및 3' HBV pA 신호 영역 (프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거되었다)을 포함하는 HBV 게놈 3' 영역. 환자로부터 유도된 P 유전자 분절을 구비한 내성 테스트 벡터 시스템인 성분인 패키지 벡터, pPK-CPX는 도 8D에 도시되어 있고, S 패키지 벡터, pPK-S는 도 8E에 도시되어 있다.

도 10C는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(F-IG)PP(PSAS-)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 10D는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터의 pCS-HBV(NF-IG)PP-(PSAS+)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) HBV 게놈과 ((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨) DR1 및 5' 카피(copy)의 5' 영역, (3) 인핸서 프로모터 영역(치환된 프로모터), (4) 환자유래 분절을 포함한 P 유전자, (5) 지시 유전자 ORF, (6) 내부 리보솜 진입 부위(IRES), (7) DR2, DR1*, 3'ε 및 3' HBV pA 신호 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨)을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역. C, S 및 X 유전자를 제공하는 패키지 벡터 pPK-CSX는 내성 테스트 벡터인 pCS-HBV(NF-IG)PP(PSAS+)와 함께 공동 형질 변환되며, 도 8H에 도시되어 있다.

도 10E는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트와 환자로부터 유도된 P 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터 pCS-HBV(F-IG)PP(PSAS+)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 11A는 HBV의 RNA 프리게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 11B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 치환된 프로모터 및 번역 개시 부위를 갖는 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터의 성분인 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS-(PSAS-)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨)을 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역, (3) 번역 개시 부위가 없는 지시 유전자 ORF, (4) 인핸서-프로모터 영역(치환된 프로모터), (5) DR2, 프리(pre)-C ORF 번역 영역 코돈, DR1*, 3'ε 및 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈 3' 영역. 환자유래 분절을 구비한 내성 테스트 벡터 시스템 성분인 패키지 벡터, pPK-CPX는 도 8D에 도시되어 있고, S 패키지 벡터, pPK-S는 도 8E에 도시되어 있다.

도 11C는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 pCS-HBV(F-IG)PPTIS(PSAS-)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 11D는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 포함하는 치환된 프로모터를 갖는 비기능적 지시 유전자를 구비한 내성 테스트 벡터의 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨)을 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역, (3) 번역 개시 부위를 갖지 않는 지시 유전자 ORF, (4) 환자유래 분절을 포함한 P 유전자, (5) 인핸서-프로모터 영역(치환된 영역), (6) DR2, 프리-C ORF 번역 개시 코돈, DR1*, 3'ε 및 3' HBV pA 신호 영역을 포함하는 HBV 게놈의 3' 영역. C, S 및 X 유전자를 제공하는 패키지 벡터 pPK-CSX는 내성 테스트 벡터인 pCS-HBV(NF-IG)PPTIS(PSAS+)와 함께 공동 형질 변환되었으며, 도 8H에 도시되어 있다.

도 11E는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트와 환자로부터 유도된 P 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터 pCS-HBV(F-IG)PPTIS(PSAS+)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 12A는 HBV의 RNA 프리게놈 구조를 나타내는 구조이다.

도 12B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 함유하는 치환된 코딩 영역을 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터 시스템 성분인 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS-)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨), (3) 프로모터 영역과 코딩 영역의 5' 부분이 3', 즉 코딩 영역의 나머지 3' 부분의 하류에, 위치되도록 조립된 비작용성 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε그리고 3' HBV pA 신호 영역을 함유하는 HBV 게놈의 3' 영역((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨). 환자에서 유도된 P 유전자 절편을 포함하는 내성 테스트 벡터 시스템 성분인 패키지 벡터, pPK-CPX는 도 8D에 도시되고 S 패키지 벡터, pPK-S는 도 8E에 도시된다.

도 12C는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 기능적 지시 유전자 카세트를 함유하는 서브게놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, pCS-HBV(F-IG)PCR(PSAS-)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA)를 나타내는 도면이다.

도 12D는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 함유하는 치환된 코딩 영역을 가진 비기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터, pCS-HBV(NF-IG)PCR-(PSAS+)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨), (3) 역방향으로 스플라이스 수용체 서열을 가지고 시작하는 지시 유전자 ORF의 3' 부분, (4) 환자에서 유도된 절편을 함유하는 P 유전자, (5) 인핸서-프로모터 영역, (6) 역방향으로 스플라이스 공여체 서열에서 끝나는 지시 유전자 ORF의 5' 부분, (7) DR2, DR1*, 3'ε그리고 3' HBV pA 신호 영역을 함유하는 HBV 게놈의 3' 영역((프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨). C, S 및 X 유전자를 제공하는 패키지 벡터, pPK-CSX는 내성 테스트 벡터로 공동 트랜스펙션되고, 도 8H에 도시된다.

도 12E는 HBV 바이러스 복제의 결과에 의해서 조립된 환자에서 유도된 P 유전자 절편과 기능적 지시 유전자 카세트를 함유하는, 내성 테스트 벡터, pCS-HBV(F-IG)PCR(PSAS+)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도 13A는 HBV의 RNA 프리게놈 구조를 나타내는 도면이다.

도 13B는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 함유하는 기능적 지시 유전자 카세트를 포함하는 내성 테스트 벡터 시스템 성분인 서브게놈 지시 유전자 바이러스 벡터 성분, pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨), (3) 기능적 지시 유전자 카세트, (4) DR2, DR1*, 3'ε그리고 3' HBV pA 신호 영역을 함유하는 HBV 게놈의 3' 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨). 환자에서 유도된 P 유전자 절편을 포함하는 내성 테스트 벡터 시스템 성분인 패키지 벡터, pPK-CPX는 도 8D에 도시되고 S 패키지 벡터, pPK-S는 도 8E에 도시된다.

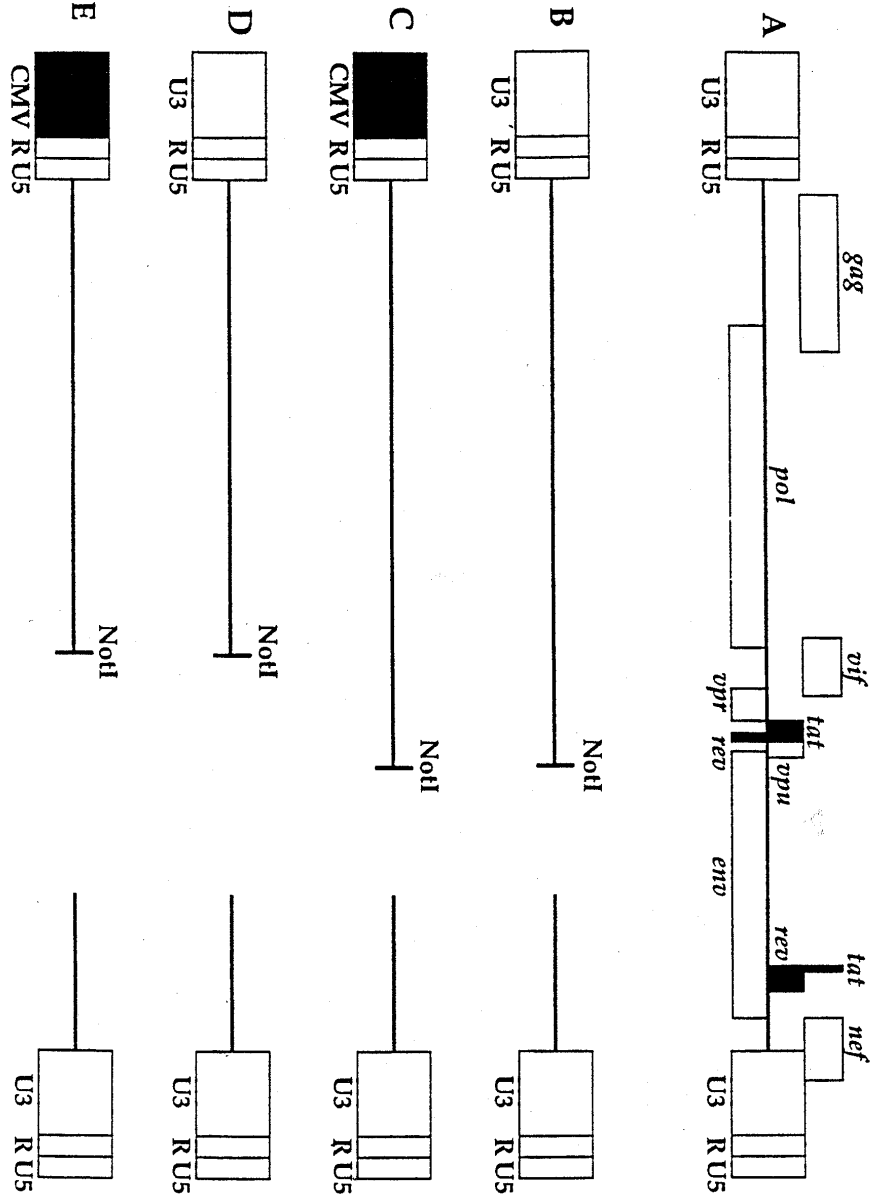
도 13C는 기능적 지시 유전자를 함유하는 서브게놈의 지시 유전자 바이러스성 벡터, pCS-HBV(F-IG)(PSAS-)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA)를 나타내는 도면이다.

도 13D는 5'에서 3' 방향으로 하기의 요소를 함유하는 기능적 지시 유전자를 포함하는 내성 테스트 벡터, pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)를 나타내는 개략도이다: (1) CMV IE 인핸서-프로모터 영역, (2) DR1 및 5'를 포함하는 HBV 게놈의 5' 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨), (3) 기능 지시 유전자 카세트, (4) 환자에서 유도된 절편을 함유하는 P 유전자, (5) DR2, DR1*, 3'ε그리고 3' HBV pA 신호 영역을 함유하는 HBV 게놈의 3' 영역(프리-C ORF 번역 개시 코돈이 제거됨). C, S 및 X 유전자를 제공하는 패키지 벡터, pPK-CSX는 내성 테스트 벡터, pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)로 공동 트랜스펙션되고, 도 8H에 도시된다.

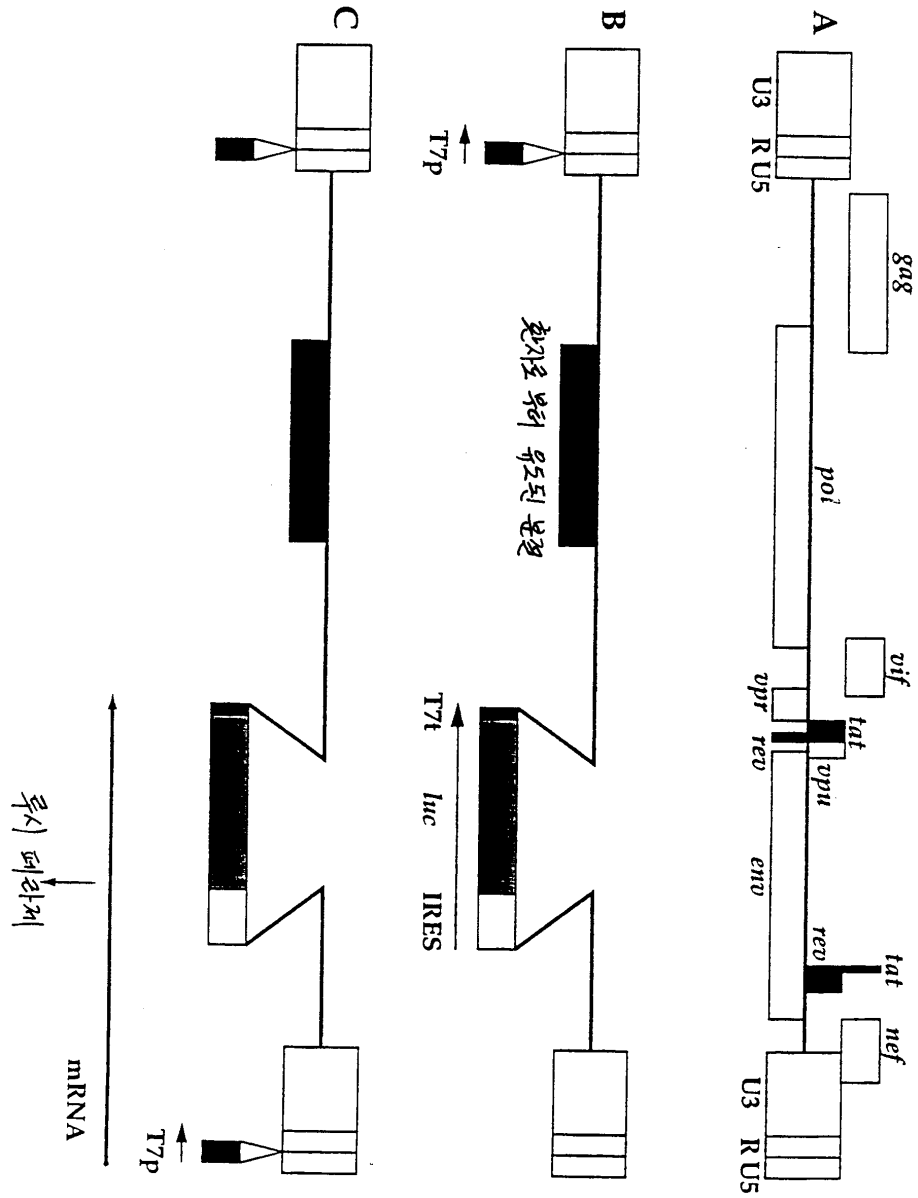
도 13E는 기능적 지시 유전자를 함유하는, 내성 테스트 벡터, pCS-HBV(F-IG)(PSAS+)의 전자쌍이 공유적으로 밀집되어 있는 DNA(cccDNA) 형태를 나타내는 도면이다.

도면

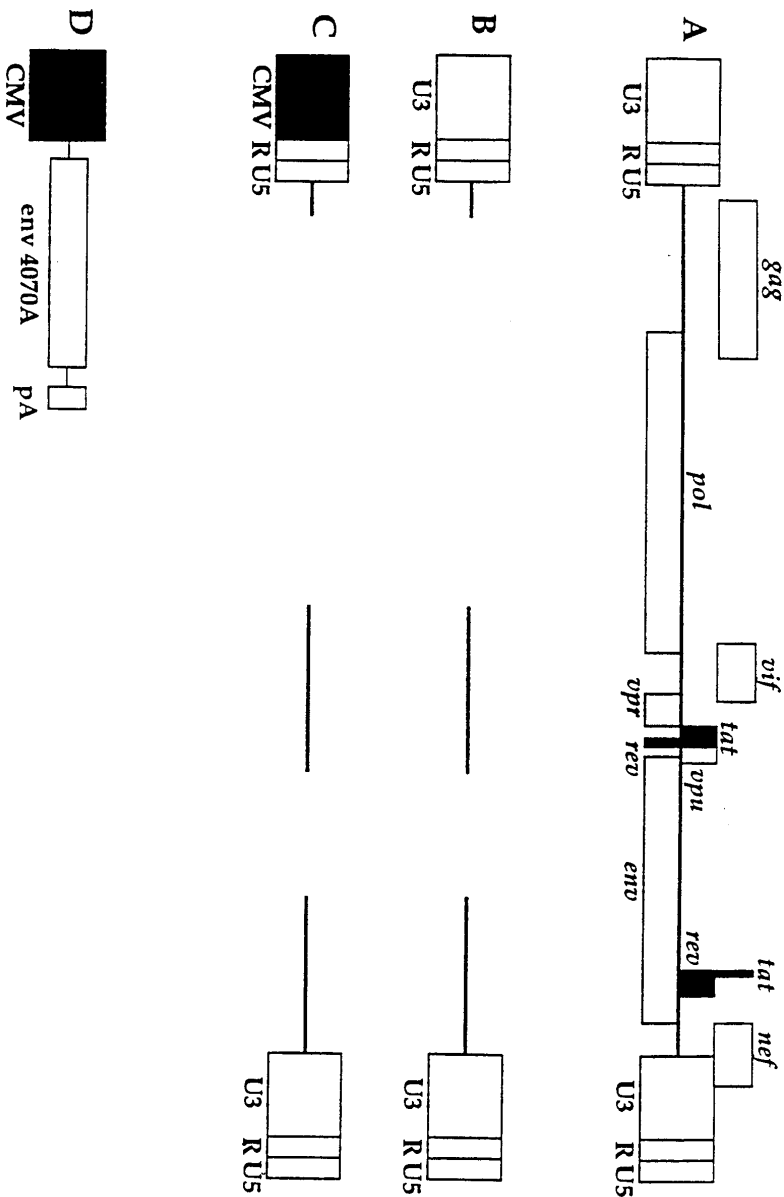
도면1



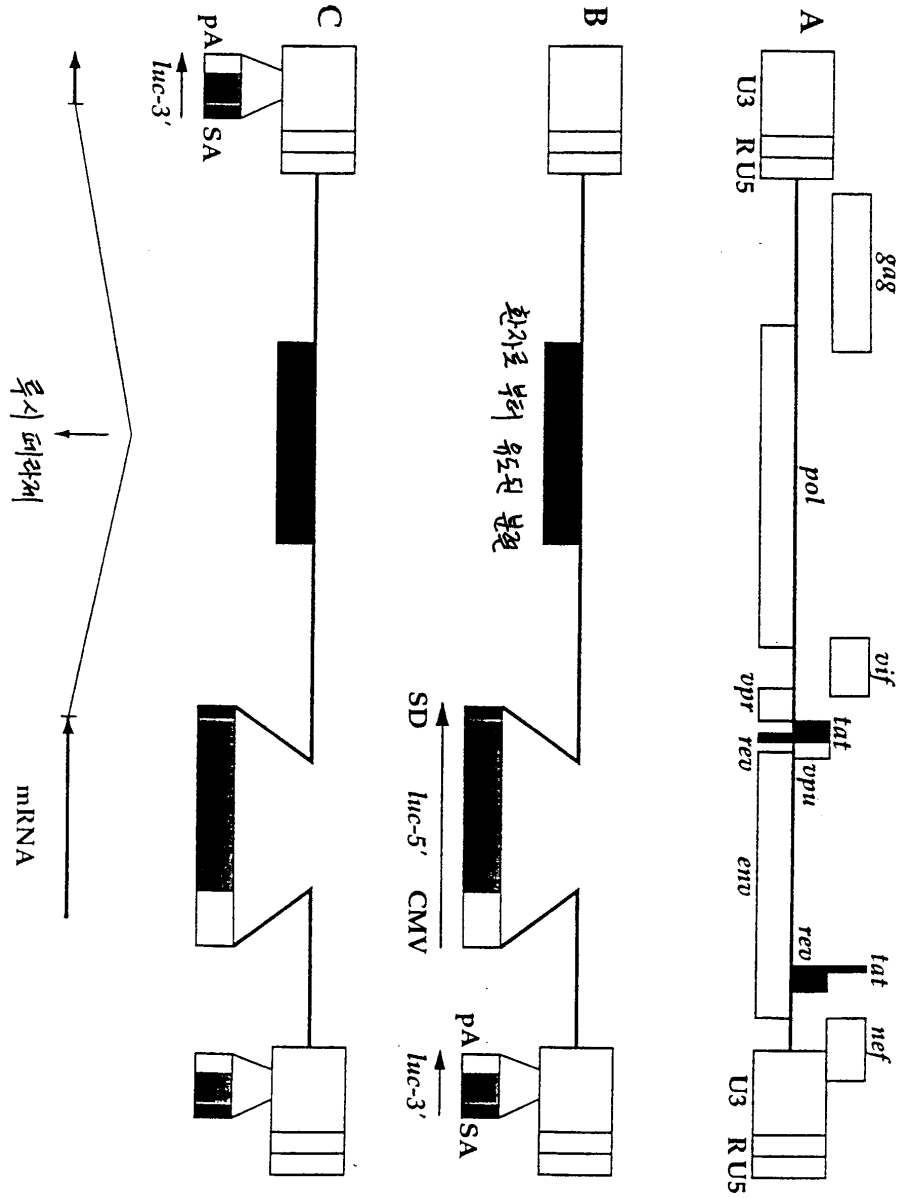
도면2



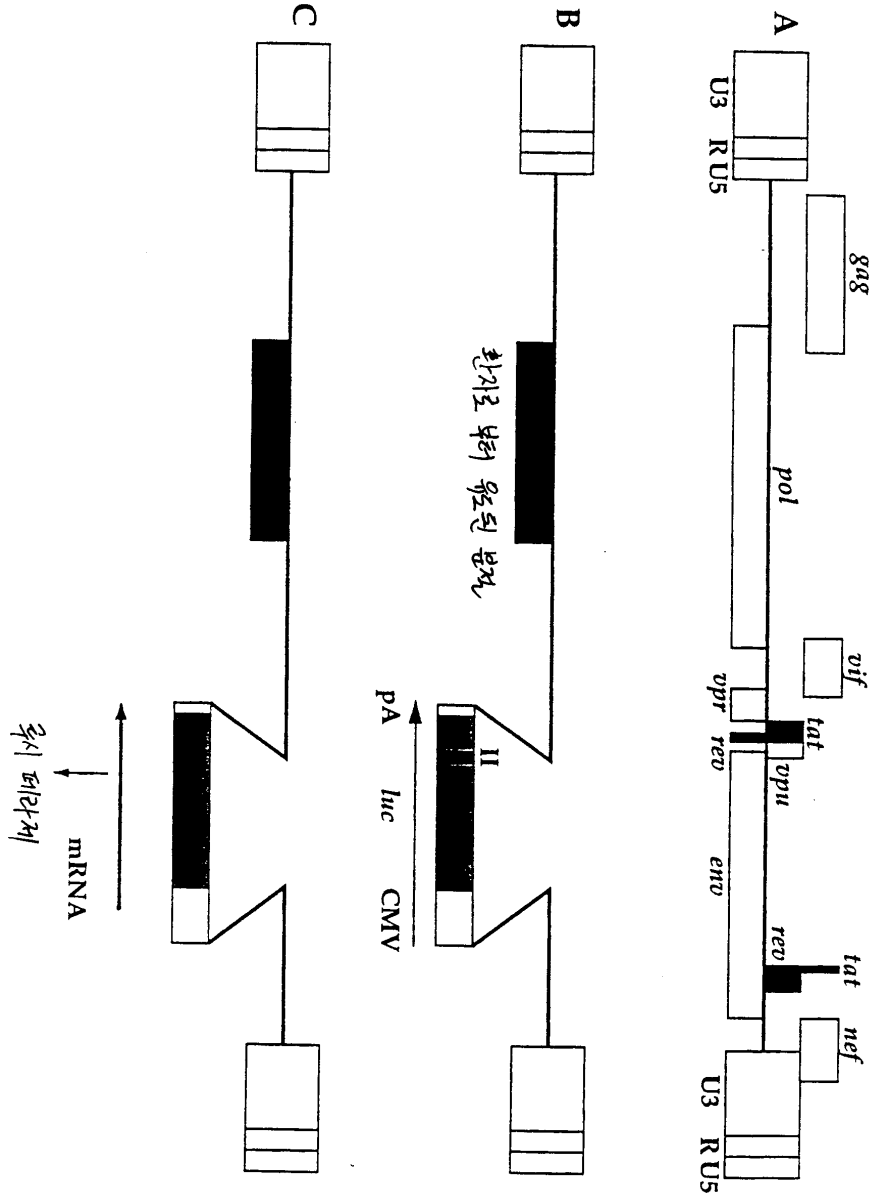
도면3



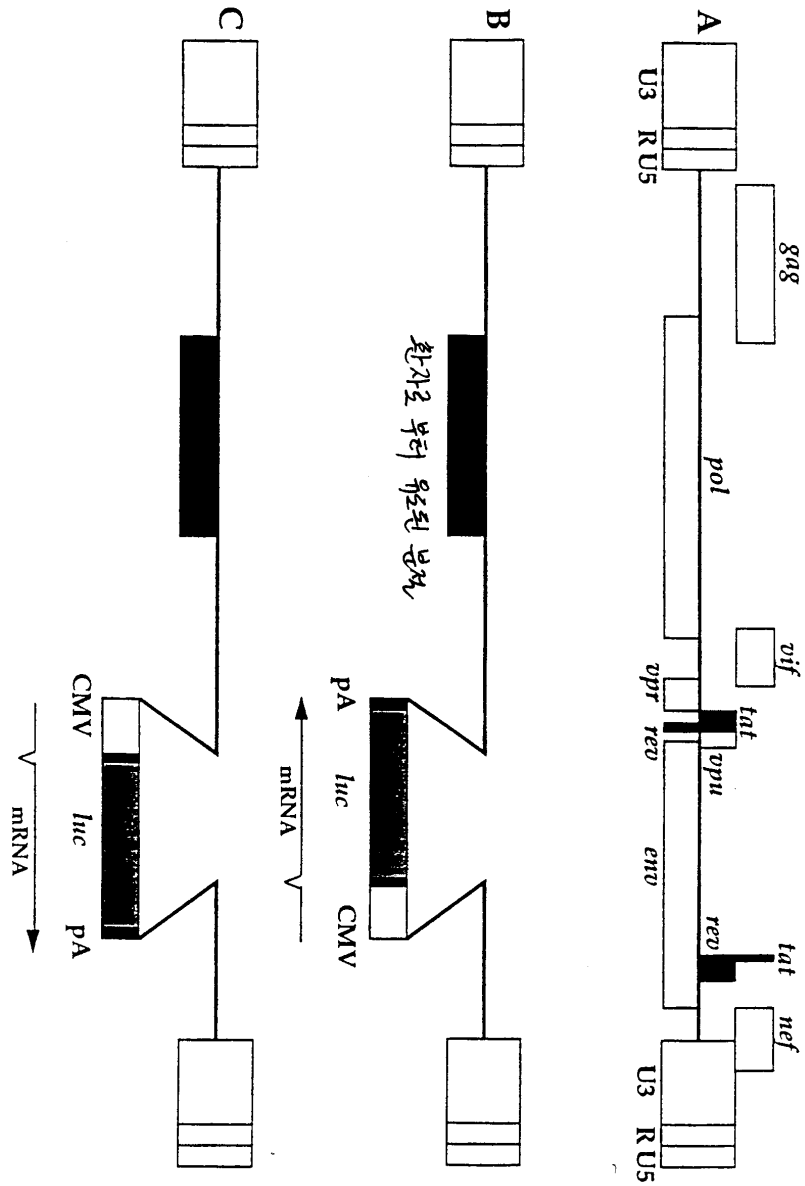
도면4

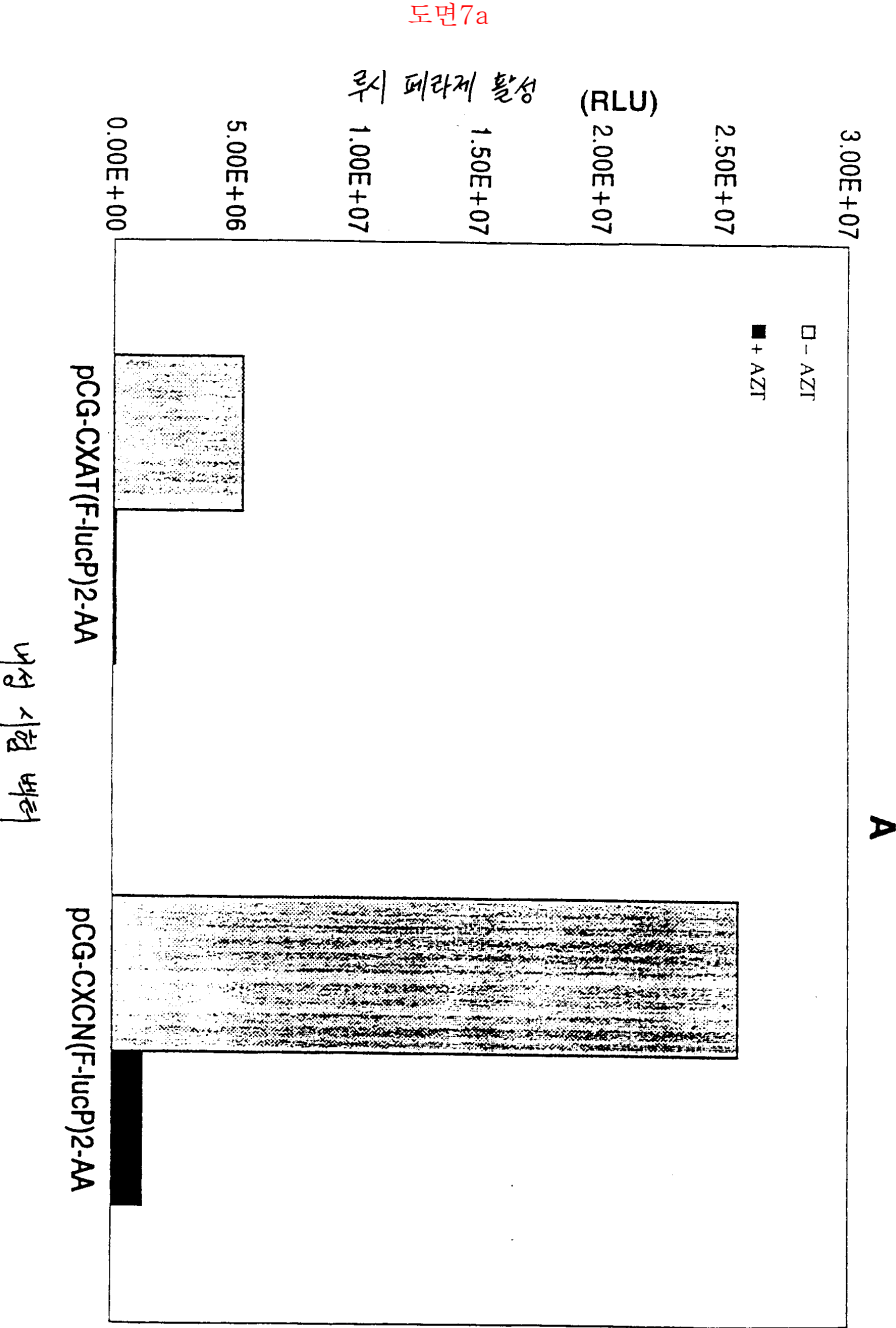


도면5

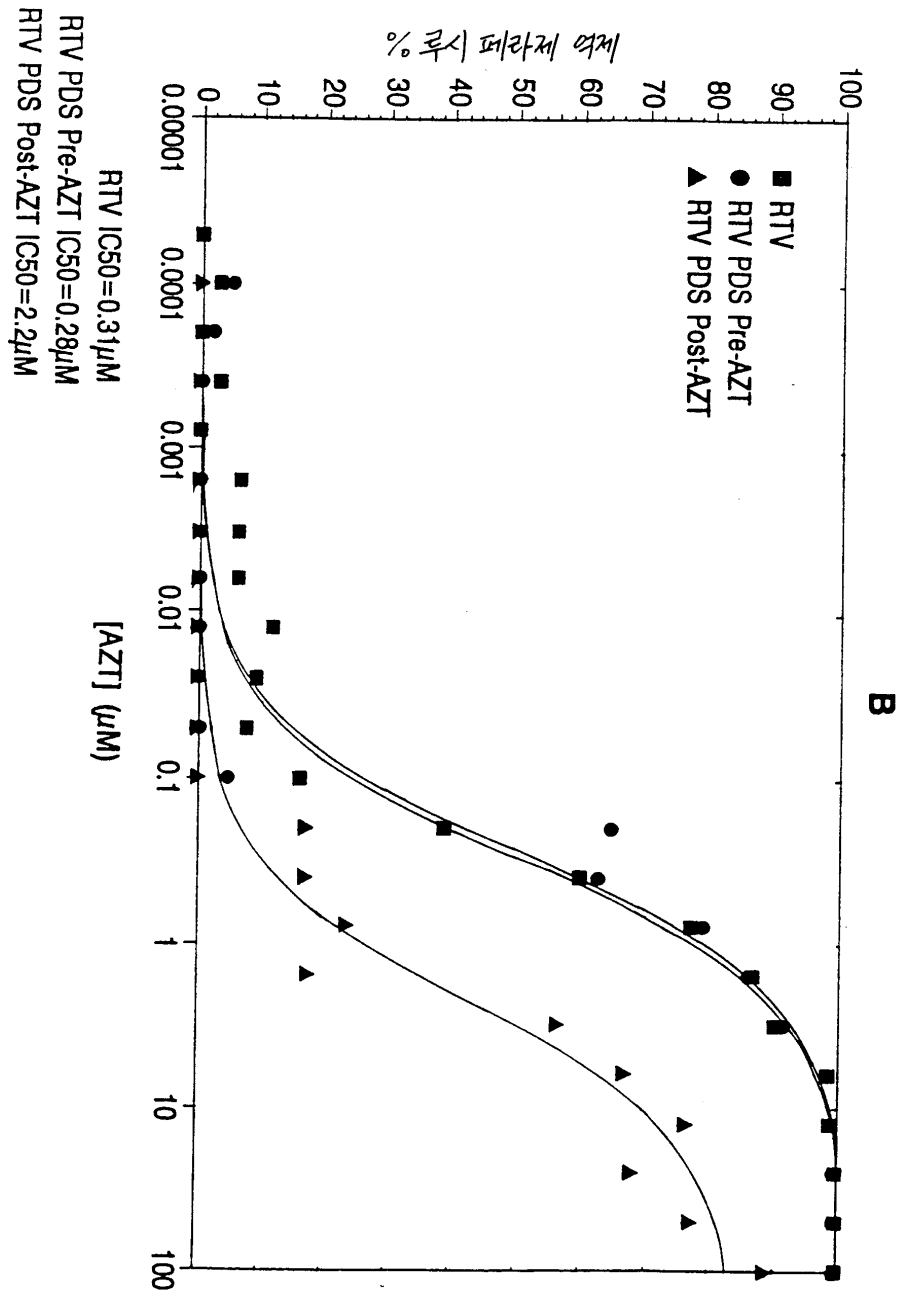


도면6

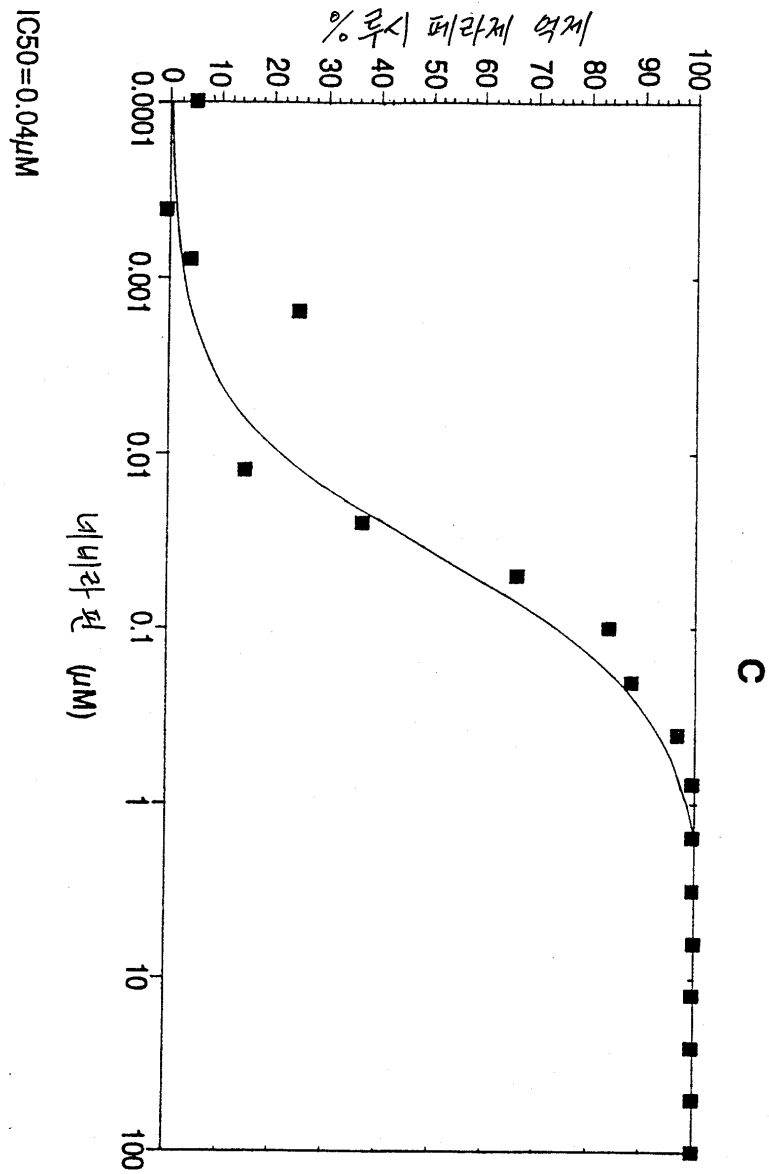




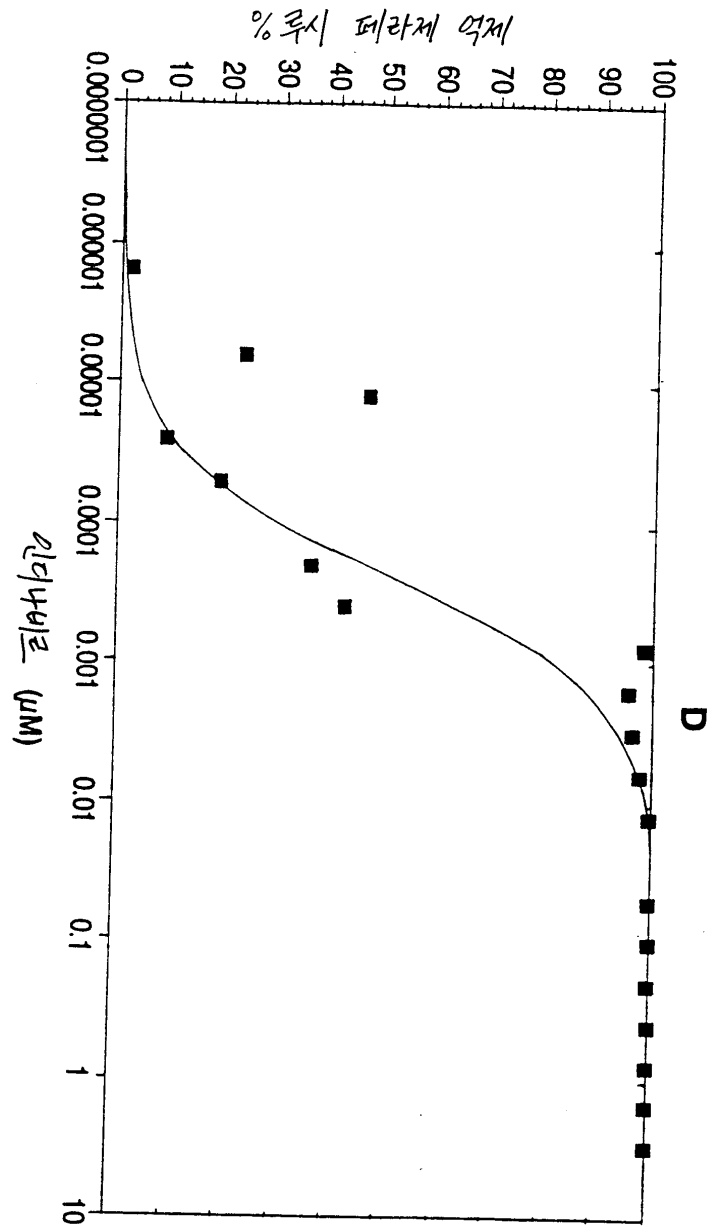
도면7b



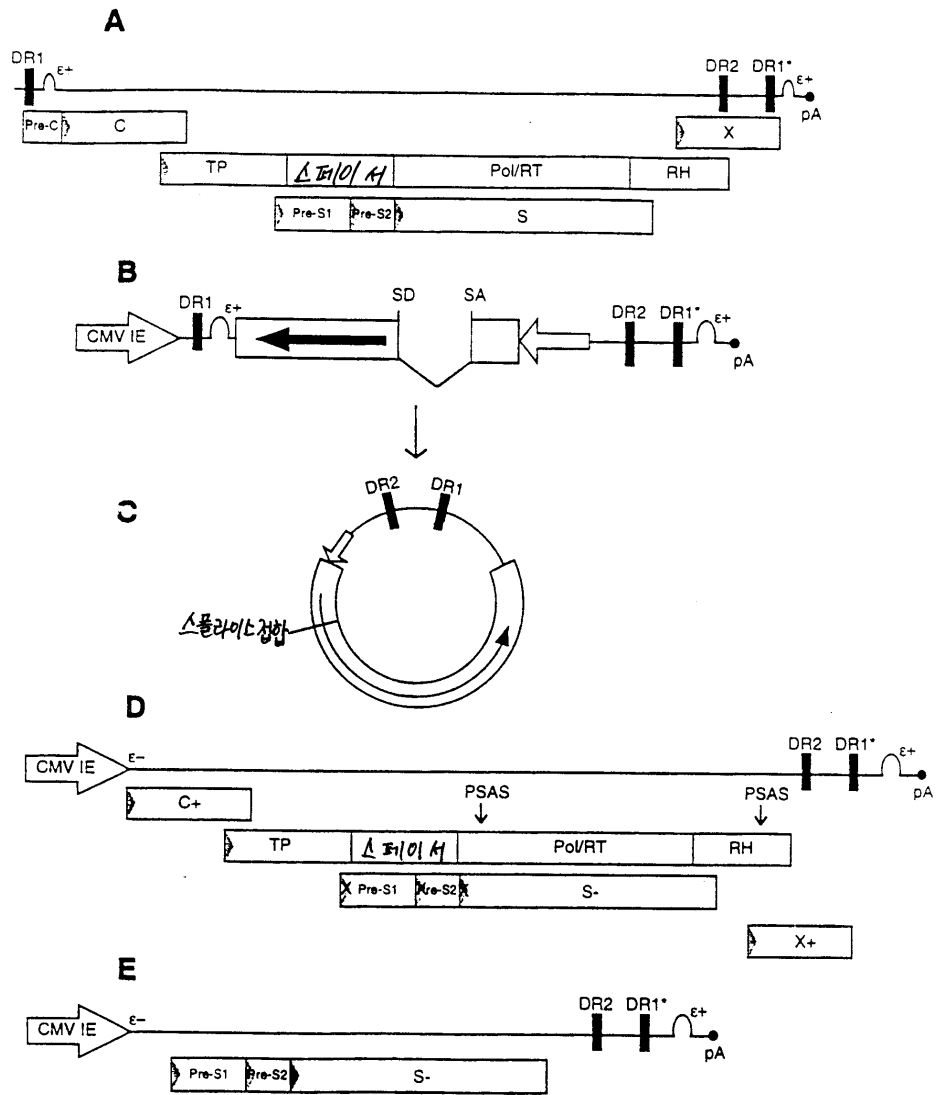
도면7c



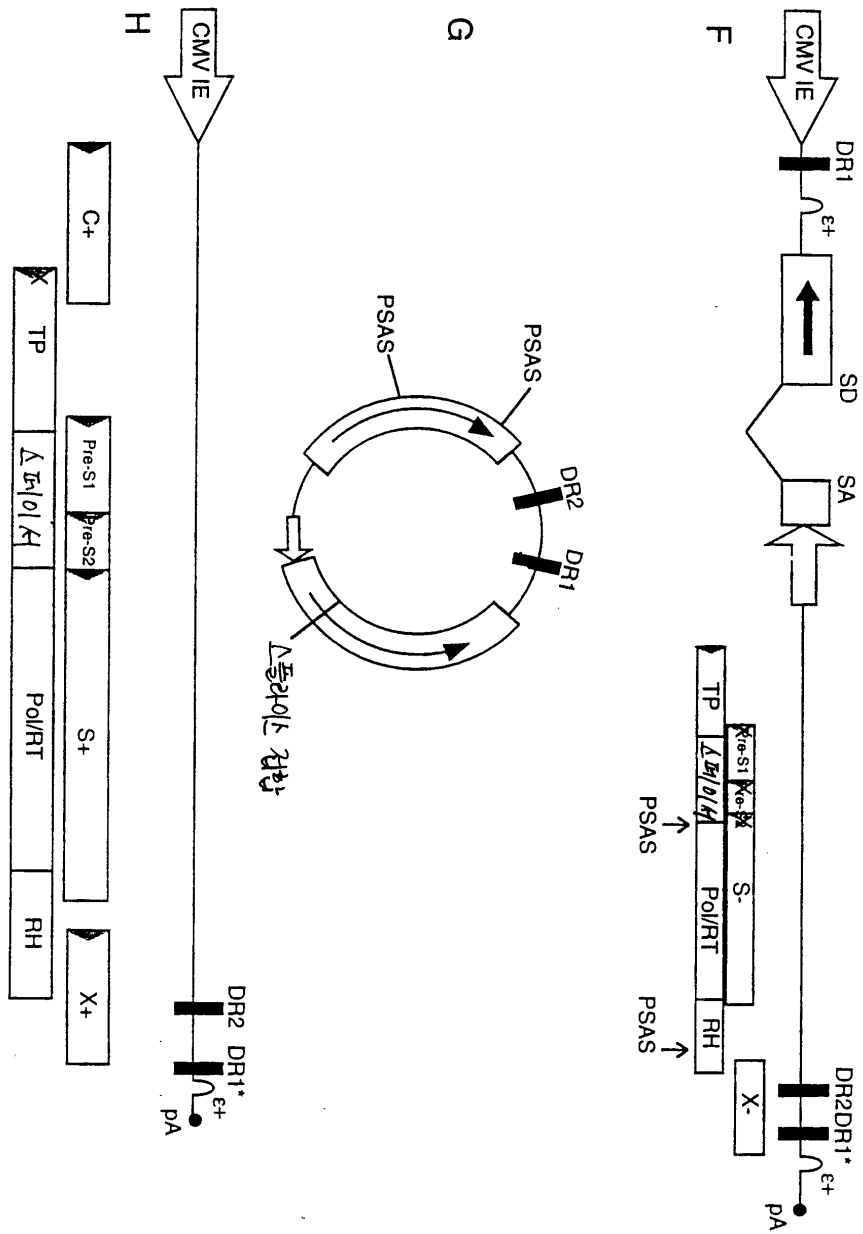
도면7d



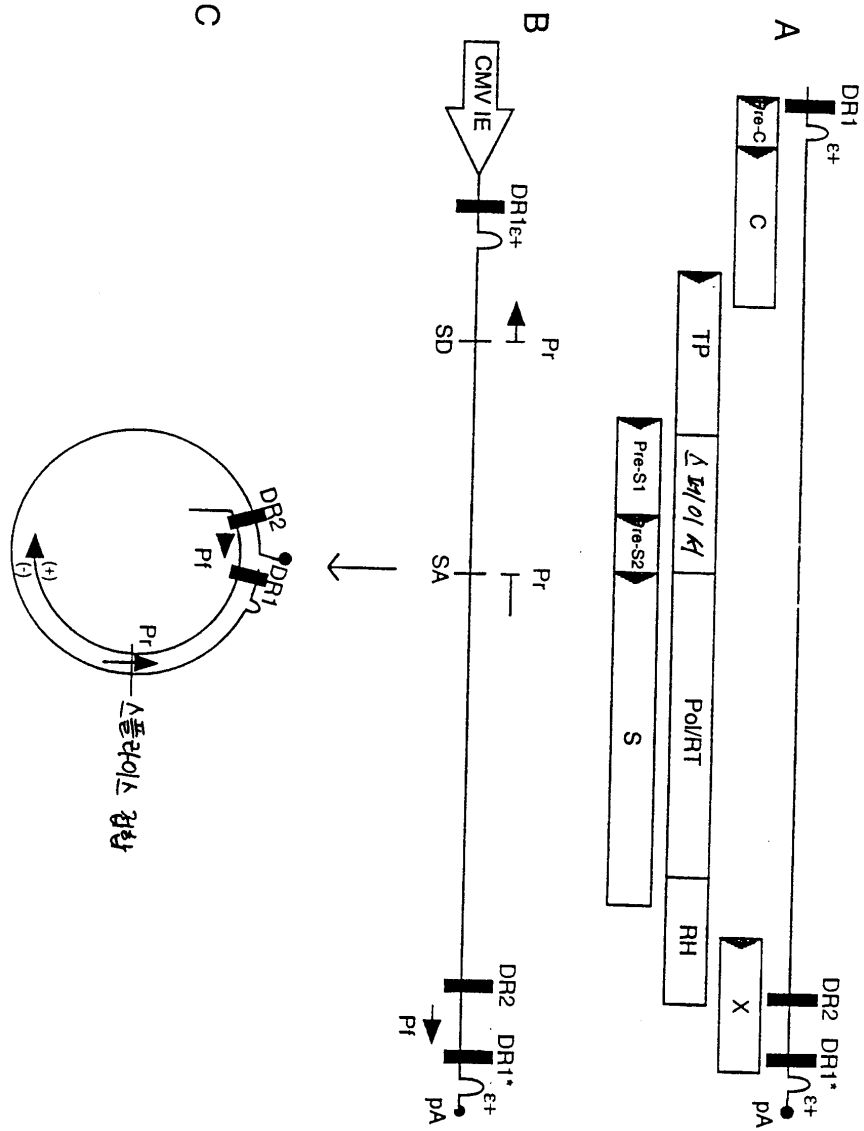
도면8a



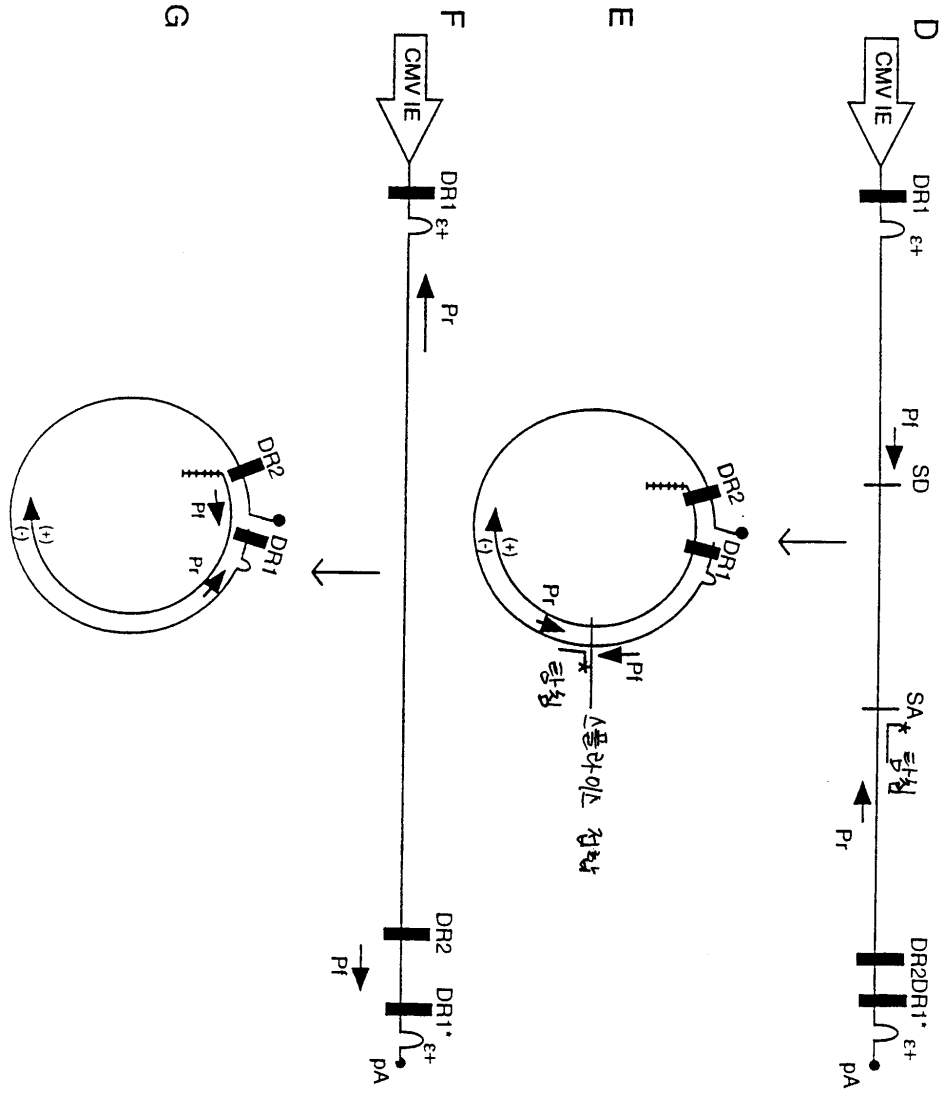
도면8b



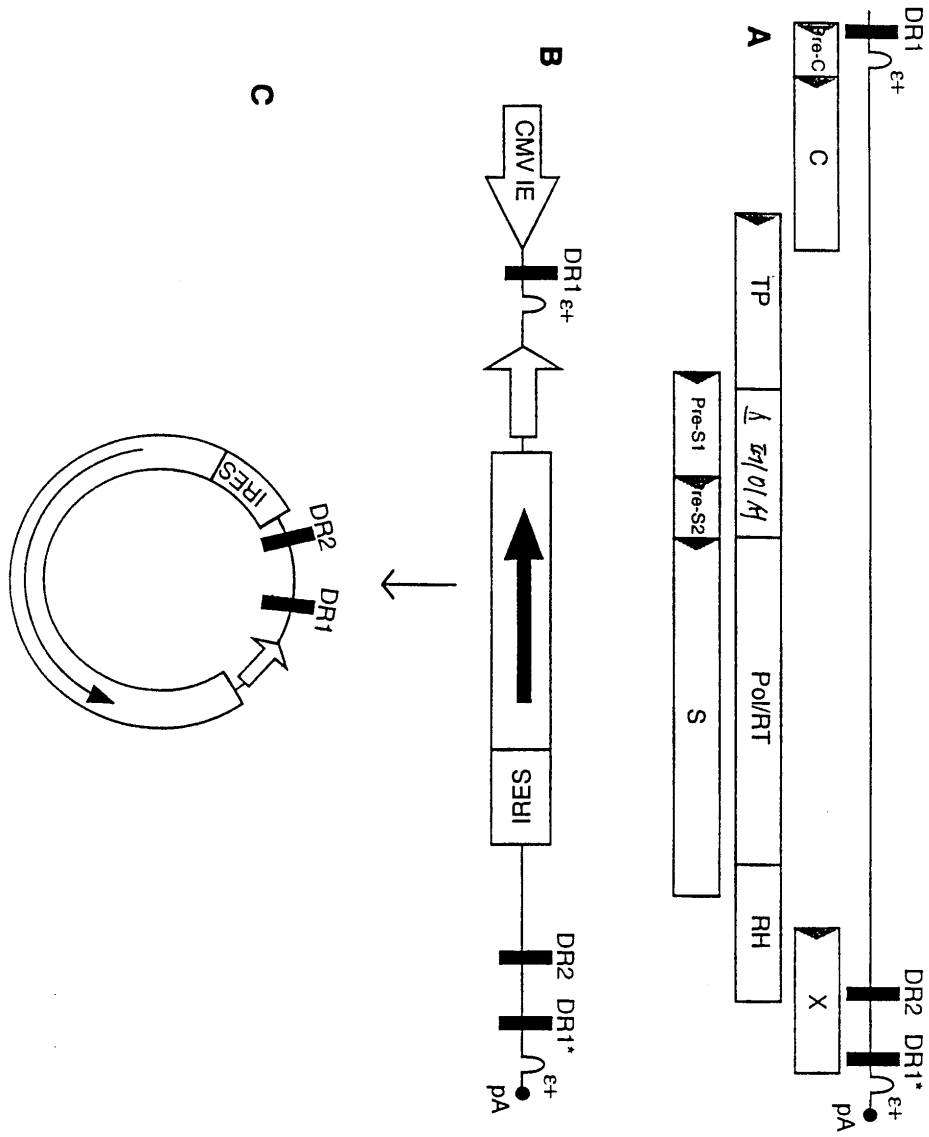
도면9a



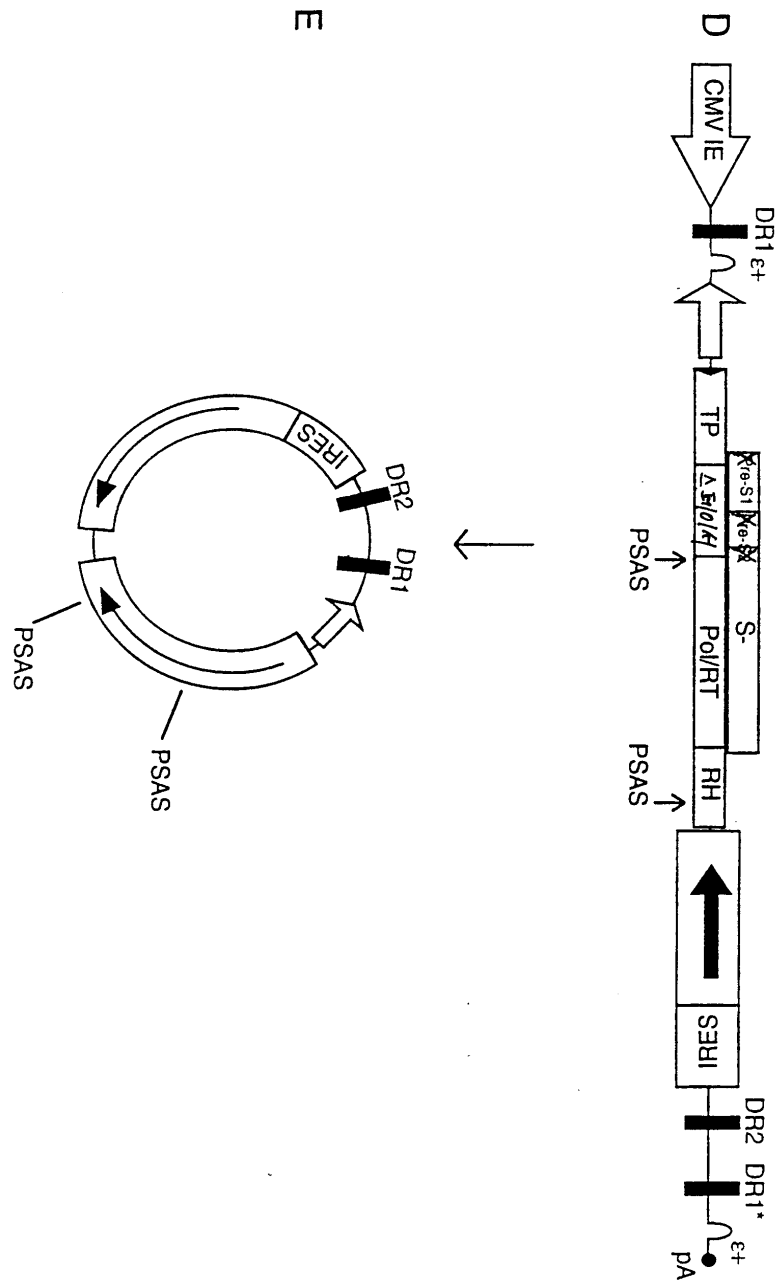
도면9b



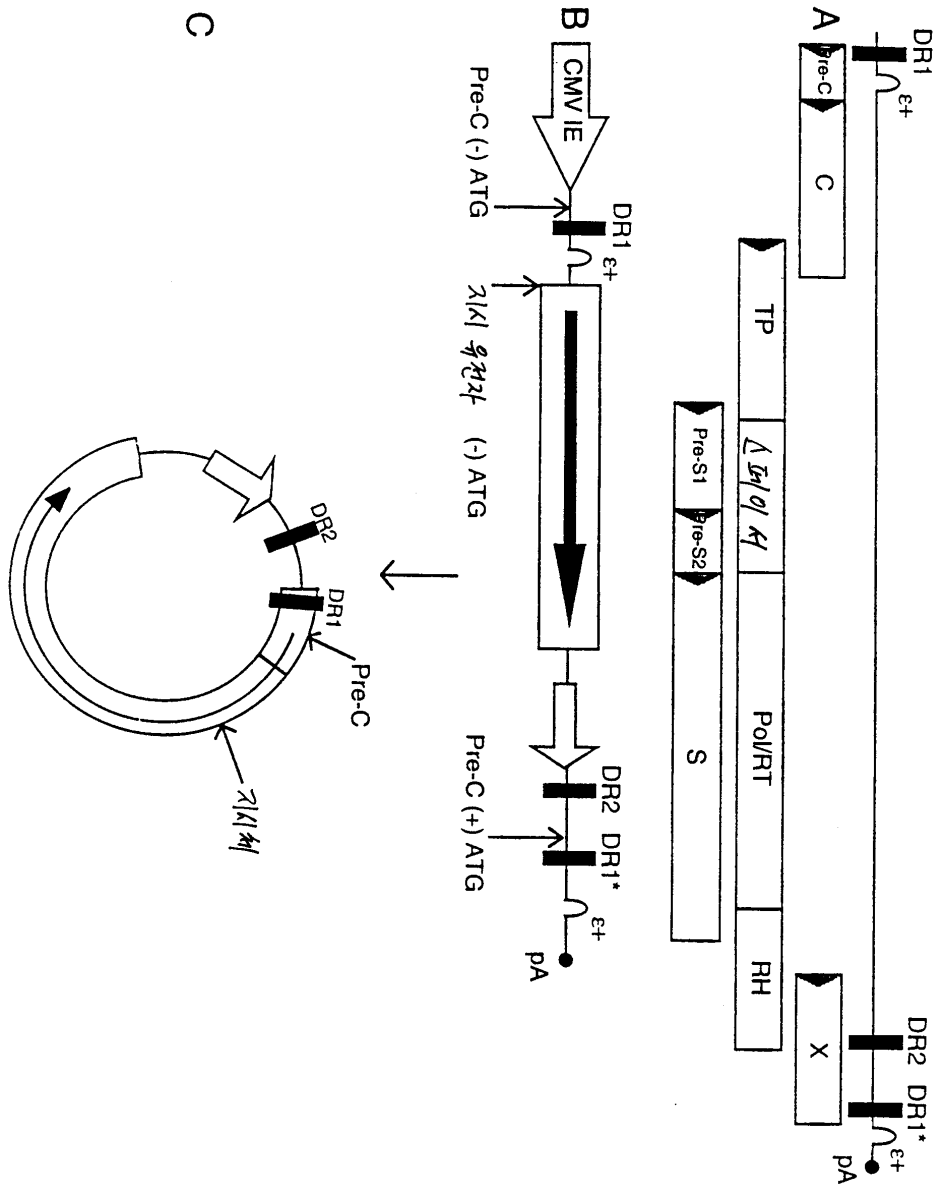
도면10a



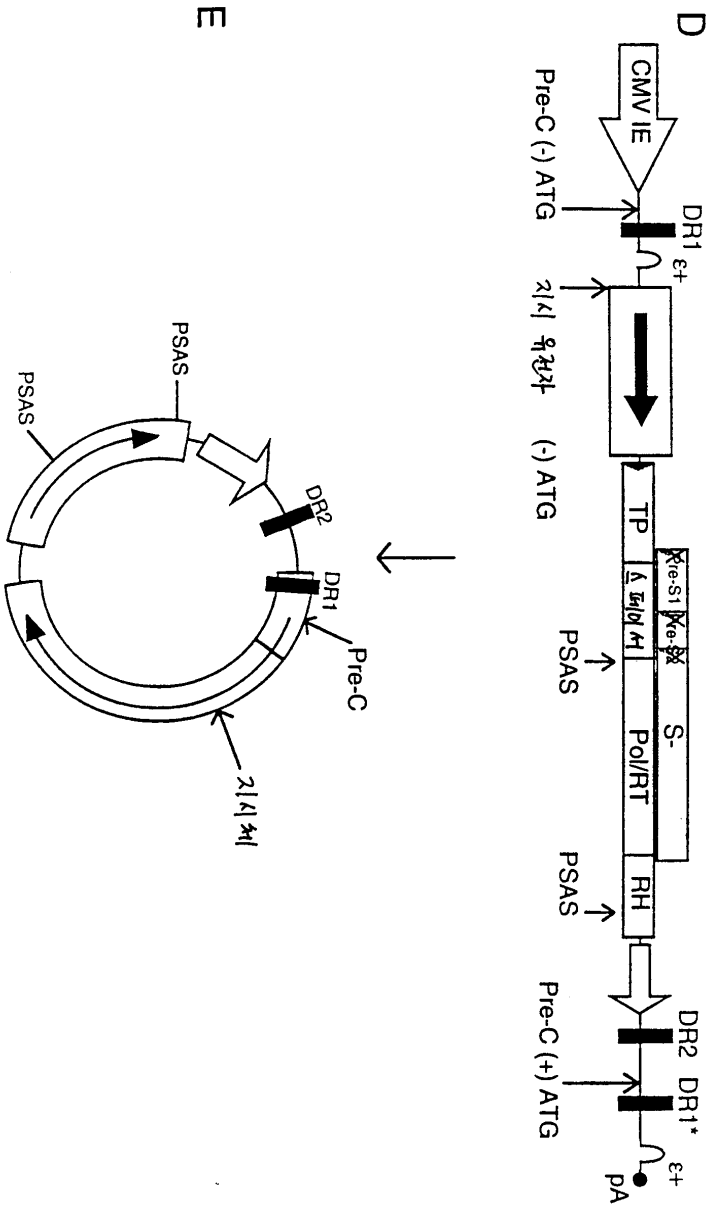
도면 10b



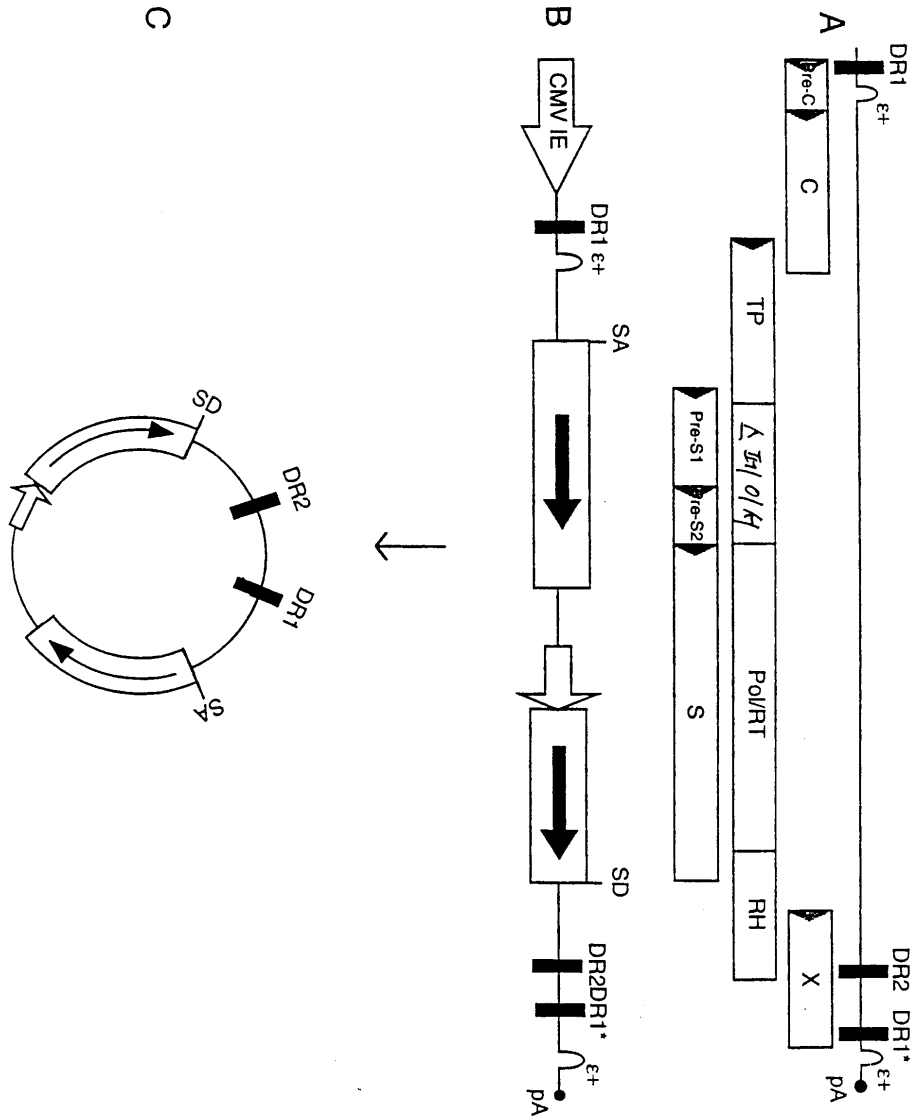
도면11a



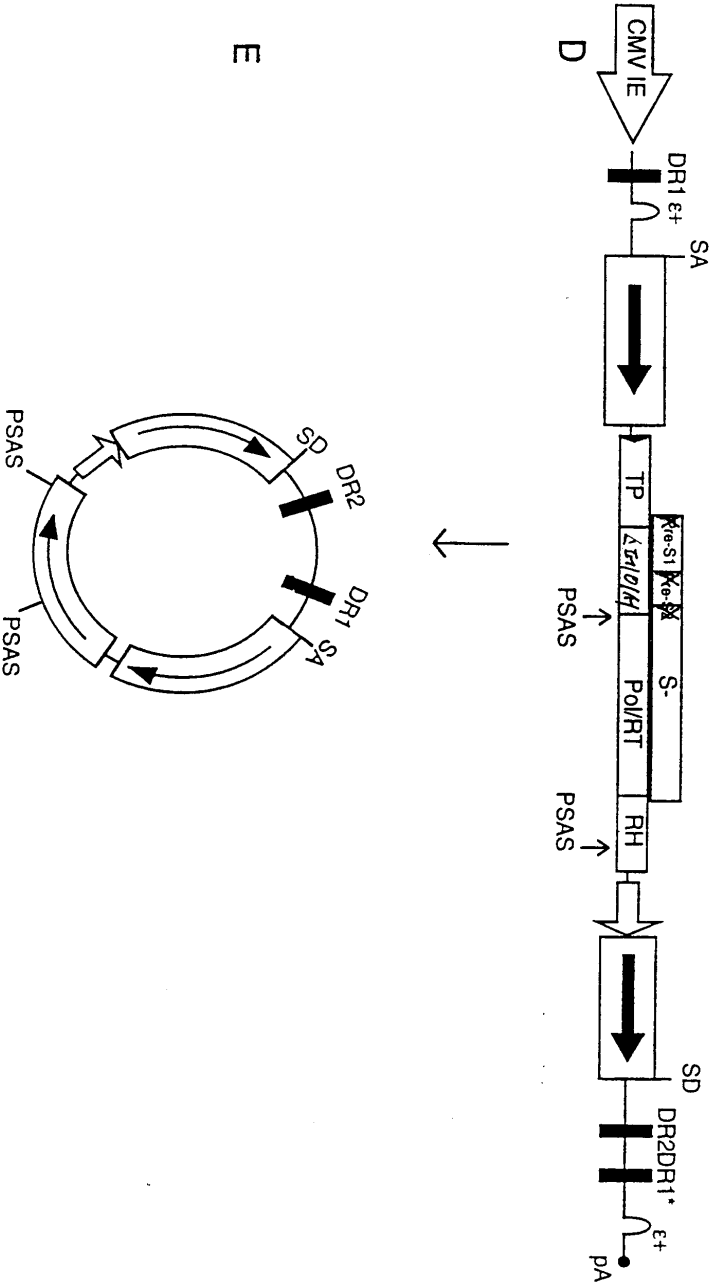
도면11b



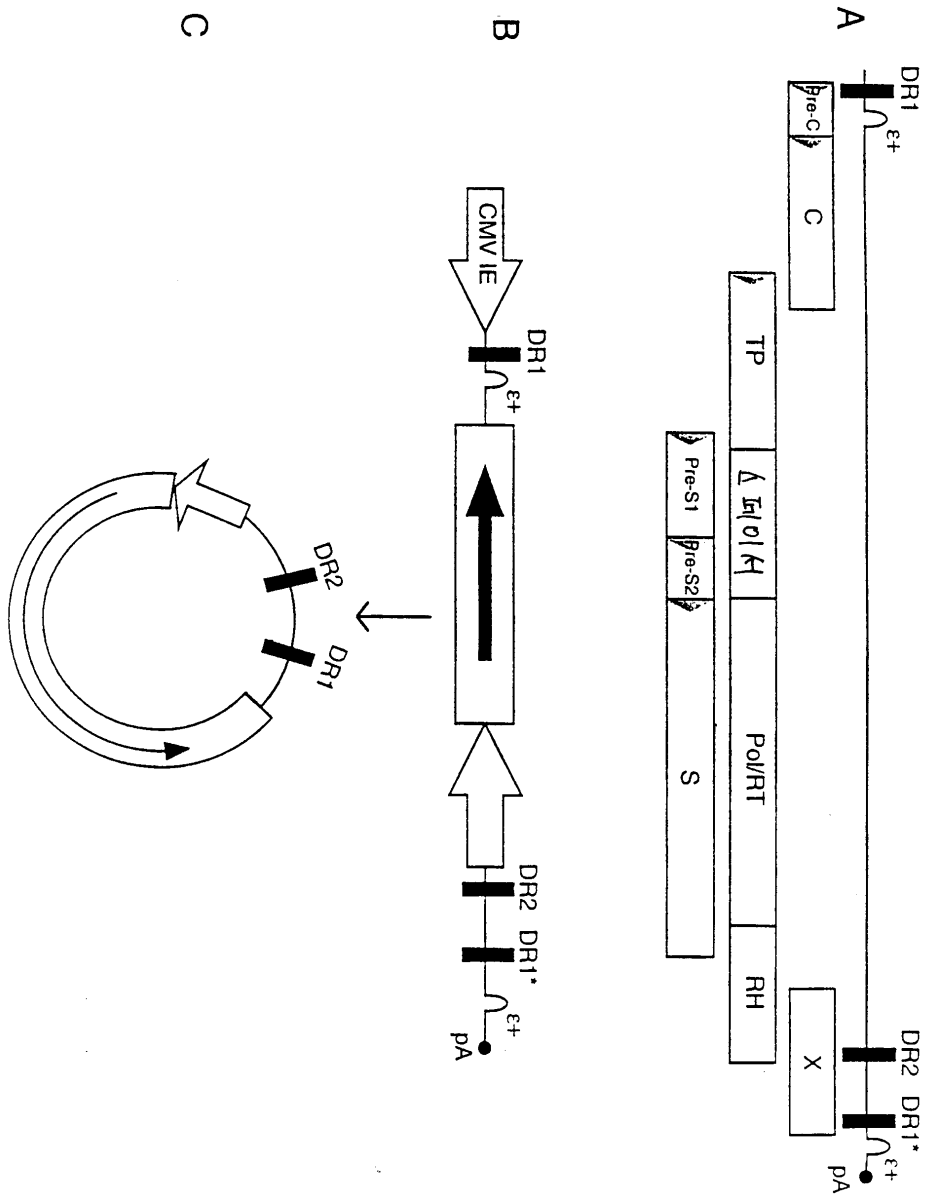
도면12a



도면12b



도면13a



도면13b

