



(19) **HU**

**MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**  
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 203**

(13) **B1**

## SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 99 02618**

(22) A bejelentés napja: **1997. 01. 24.**

(40) A közzététel napja: **1999. 12. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2008. 06. 30.**

(51) Int. Cl.: **G01N 33/50** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

**PCT/IB 97/00071**

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9727480**

(30) Elsőbbségi adatok:

**96200175.6**      **1996. 01. 26.**      **EP**

(72) Feltalálók:

**De Bethune, Marie-Pierre, Everberg (BE);**  
**Hertogs, Kurt, Antwerpen (BE);**  
**Pauwels, Rudi, Weerde (BE)**

(73) Jogosult:

**VIRCO B.V.B.A., Mechelen (BE)**

(74) Képviselő:

**Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó Szabadalmi**  
**és Védjegy Iroda, Frankné dr. Machytka Daisy**  
**szabadalmi ügyvivő, Budapest**

(54) **HIV-pozitív betegek kemoterápiájának meghatározására szolgáló módszer**  
**humán HIV-törzsek fenotípusos gyógyszerérzékenységére alapozva**

(57) Kivonat

A találmány HIV-pozitív betegek kemoterápiájának meghatározására szolgáló *in vitro* eljárásra vonatkozik, amelynek során egy betegből származó biológiai anyag-mintából vírus-RNS-t izolálnak, és a HIV-pol-gén egy kívánt szakaszát reverz transzkripcióval átírják, a kapott szekvenciával és egy HIV-DNS-szerkezettel, amelyből az említett szekvenciát törölték, egy HIV-fertőzésre fogékony sejtvonalat transzfektálnak, a transzfektált sejtek tenyésztésével kiméravírusok egy állományát állítják elő, meghatározzák a kiméravírusok

fenotípusos érzékenységét a HIV-pol-gén által kódolt enzim egy inhibitorával szemben, és erre meghatároznak egy értéket, készítenek egy adatsort, amely a kiméravírusra megállapított érzékenység értékét és egy kiméra vad típusú HIV-törzs megfelelő értékét tartalmazza, legalább két további inhibitorral szemben megismételik az érzékenységi vizsgálatot, az adatsorokat kétdimenziós vagy háromdimenziós grafikus formában ábrázolják, a grafikus ábrázolás alapján kiválasztják az optimális inhibitor(oka)t.

**HU 226 203 B1**

A találmány HIV-pozitív betegek kemoterápiájának meghatározására szolgáló in vitro eljárásra vonatkozik, az ilyen betegeket kezelő orvosok használatára. Ez az eljárás humán HIV-törzsek gyógyszerérzékenységén alapul, amely a HIV-pol-gén egy vagy több enzimének inhibitoraival szemben alakul ki. Vonatkozik még a találmány a HIV-pol-gén egy vagy több enzimének inhibitoraival szemben kialakult gyógyszerérzékenység egyidejű meghatározására.

Máig számos kemoterápiás protokollt dolgoztak ki a HIV-fertőzött betegek kezelésére. Néhány ilyen protokoll klinikai használatát már jóváhagyták, mások pedig még folyamatban lévő klinikai kipróbálás alatt állnak. Feltételezhető, hogy a jóváhagyott kemoterápiás protokollok száma a közeljövőben állandóan növekedni fog. Egyre nő a kombinált terápia vagy az összetett gyógyszerkezelési protokollok használata, minthogy gyógyszerrezisztens HIV-variánsok alakulnak ki a terápia folyamán. Jóllehet bebizonyosodott, hogy ezek a kemoterápiás protokollok hatást gyakorolnak a HIV-betegség virológiai (vírussterhelés), immunológiai és klinikai paramétereire, gyakorlati tapasztalatból azonban tudjuk, hogy ezek a hatások átmenetiek. Pontosabban azt találjuk, hogy a HIV-törzsek, amelyek egy adott beteget megfertőztek, egy idő után csökkent érzékenységet kezdenek mutatni a gyógyszerrel vagy a gyógyszerkombinációval szemben, amellyel az említett beteget kezelik. A kemoterápia hatásosságának elvesztése betegről betegre, gyógyszerről gyógyszerre, vagy gyógyszerkombinációról gyógyszerkombinációra változhat. Jól megállapított tény, hogy egy meghatározott típusú kemoterápia hatásosságának megszűnése összefügghet az aminosavváltozások genotípusos képével, amely a beteget megfertőző HIV-törzsek genomjában alakul ki. Valószínűleg az teszi ezeket a HIV-törzseket kevésbé érzékenyebbé a kemoterápiára.

Minthogy egy HIV-fertőzött beteg számos kemoterápiás protokollnak van kitéve hosszú időn át, a fertőző HIV-törzsek genomjában az aminosavváltozások összetettebb képe jelenik meg, és ez jelenleg megghiúsítja a megfertőzött beteg további kezelésének racionális megközelítését. Mint az előző magyarázat is utal rá, rutinszerűen meghatározhatók az olyan HIV-törzsekben előforduló genotípusos változások, amelyek ki vannak téve egy vagy több anti-HIV-gyógyszert magában foglaló különböző kemoterápiás protokollnak, de mindaddig nagyon nehéznek bizonyult ezekből az adatokból olyan információt kapni, amely felhatalmazná a kemoterápia előírásáért felelős orvost, vajon célszerű-e vagy sem megindítani vagy folytatnia egy sajátos kemoterápiás protokollt. Más szavakkal, a genotípusról kapott információt, amely korlátozottan áll rendelkezésre, nem lehet rutinszerűen olyan fenotípusra vonatkozó információra lefordítani, amely felhatalmazza a kezelőorvost olyan döntő elhatározás meghozatalára, hogy a betegnek milyen kemoterápiát kell követnie. Ez a probléma olyan, nem gyógyszerelt betegeknél is fennáll, akiket gyógyszerrezisztens HIV-törzsek fertőztek meg.

A vírussterhelés monitorozása a HIV-beteg-ellátás rutin vonatkozásává vált. Azonban egyedül a vírusster-

helés számát nem lehet alapul venni annál az elhatározásnál, hogy milyen gyógyszereket használjunk egyedül vagy kombinálva.

A választott kemoterápiás protokollban egyre több a kombinált terápia. Amikor egy gyógyszerkombinációt használó beteg kezdi észrevenni a gyógyszer eredménytelenségét, lehetetlen biztonsággal megállapítani, hogy a kombinációban melyik gyógyszer az, amelyik már nem aktív. Nem lehet az összes gyógyszert egyszerűen kicserélni, mivel a jelenleg rendelkezésre álló gyógyszerek száma korlátozott. Ezenkívül, ha valaki a teljes kemoterápiás protokollt lecseréli, eldobhat egy vagy több olyan gyógyszert, amelyek ennél az adott betegnél aktívak. Ezenkívül vírusoknál, amelyek rezisztenciát mutatnak egy adott inhibitorral szemben, előfordulhat, hogy különböző fokú keresztrezisztenciát mutatnak más inhibitorokkal szemben is.

Ideális esetben tehát, hogyha egy beteget bármikor vírussterhelésre tesztelnek, és a teszt a vírussterhelés növekedését mutatja ki, el kell végezni egy gyógyszer érzékenységi/rezisztencia tesztet is. Ameddig nincs kifejlesztve hatékony gyógyítóterápia, a HIV-betegség ellátása ilyen tesztelést igényel.

Létezik jelenleg egy olyan fenotipizáló eljárás, amely plazmából történő vírusizoláláson alapul, donor perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC-k) jelenlétében, és ezután végzik a fenotipizálást az említett sejtekben [A. J. Japour et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37,1095–1101 (1993)]. Ez az együttenyésztési eljárás, amelyet az AIDS Clinical Trial Group (ACTG főként az AZT- [a zidovudine/Retrovir (a Retrovir egy védjegy) szinonimája] rezisztencia fenotipizálására javasol, időigényes, költséges és túl komplikált a rutinszerű használathoz.

Az 1 típusú HIV-vírus-minták reverztranszkriptáz-(RT) inhibitorokkal szembeni gyógyszerérzékenységének megállapítására egy fenotípusos rekombinánsvírus-assay-t fejlesztett ki Kellam és Larder [P. Kellam, B. A. Larder, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 23–30, (1994)]. Ez az eljárás élő vírus képződését teszi lehetővé, mégpedig RT-kódoló szekvenciák PCR-rel előállított poolja és egy RT-re kimerített, nem fertőző provitális klón pHINΔRtBetEII homológ rekombinációja révén. Két betegnél zidovudine-terápia folyamán végzett analízis azt mutatta, hogy ez a próbálkozás olyan vírusokat hozott létre, amelyek pontosan ugyanazt a genotípust és fenotípust mutatták, mint az eredetileg fertőzött PBL-DNS-é. Azonban ez az eljárás a betegből való vírusizolálást úgy oldja meg, hogy együtt tenyésztik a beteg plazmáját vagy a beteg-PBMC-t a donor-PBMC-kkel. A vírusnak ezen előzetes tenyésztése eltorzíthatja az eredeti vírusösszetételt. Ezenfelül ez az eljárás, bár lehetővé teszi a minták érzékenységének a különböző inhibitorokkal szembeni meghatározását, mégsem nyújt az orvosnak olyan információt, hogy folytassa-e a meglévő kemoterápiás protokollt vagy változtasson a terápián.

Amennyiben a pol-génnek csak az egyik enzime kerül vizsgálatra, az eljárás a kombinációs terápia – amely rendszerint egy proteáz- és két RT-inhibitor

használatát tartalmazza – rutin fenotípusos meghatározására szintén nem könnyen alkalmas.

A rekombinánsvírus-assay-ben használt „fészkes” PCR (nested PCR: polymerase chain reaction: polimeráz-lánreakció) egy olyan helyzetet eredményezhet, amelyben a rekombináns vírus nem tükrözi helyesen a vizsgált beteget fertőző HIV-törzsekkel kialakult helyzetet. Ez a probléma a DNS-szekvencia homológiájában rejlik, és az emlőssejtekben bekövetkező homológ rekombinációhoz szükséges homológia minimális mennyiségében [C. Rubnitz, S., Subramini, *Molecular and Cellular Biology*, 4, 2253–2258 (1984)]. Tehát minden, rekombináns vírus használatán alapuló, fenotípusára irányuló assay-nek arra kell törekednie, hogy biztosítsa, amennyire lehetséges a betegből származó anyag sokszorozását és a maximális rekombinációt.

Tehát az RNS-extrakcióval és az alkalmazott „fészkes” (nested) PCR-eljárásokkal biztosítani kell, hogy a virális genetikai anyagot olyan módon sokszorozzuk fel, hogy a sokszorozott anyag maximálisan tükrözze a virális genetikai változatokat a vizsgálandó betegben.

A jelenlegi klinikai gyakorlatban tehát igen erős igény van arra, hogy (a) gyorsan és rutinszerűen határozzák meg azon HIV-törzsek fenotípusos gyógyszer-érzékenységét, amelyekkel egy adott beteg megfertőződött, hogy (b) az így kapott adatok könnyen érthető információvá legyenek feldolgozva, és hogy (c) az említett információ alapján kezdjék, folytassák vagy beállítsák az említett, adott beteg számára előírt kemoterápiát.

A találmány egy első szempontja szerint HIV-pozitív betegek HIV-kemoterápiájának meghatározására alkalmas in vitro eljárást bocsátunk rendelkezésre, amely tartalmazza a következőket: egy HIV-fertőzésre érzékeny sejtvonalat egy betegből izolált HIV-pol-génből származó szekvenciával és egy HIV-DNS-szerkezettel – amelyből az említett szekvenciát töröltük – transzfektálunk, az említett transzfektált sejteket tenyésztjük, és így kiméravírusok egy állományát hozzuk létre, meghatározzuk a kiméravírusok fenotípusos érzékenységét az említett, HIV-pol-gén által kódolt enzim egy inhibitorával szemben, és erre meghatározunk egy értéket, majd egy olyan adatsort szerkesztünk, amely magában foglalja a kiméravírusra megállapított érzékenység értékét és egy kiméra vad típusú HIV-törzs megfelelő értékét, az érzékenység meghatározását legalább két további inhibitor vonatkozásában megismételjük, és ezáltal legalább összesen három adatot tartalmazó sort hozunk létre, az említett adatsorokat kétdimenziós vagy háromdimenziós grafikus formában úgy ábrázoljuk, hogy mindhárom adatsor esetében a kiméra- és vad típusú érzékenység közötti különbség azon rezisztencia vizuális mértékével szolgáljon, amelyet a kiméraállomány a szóban forgó inhibitorral való kezeléssel szemben tanúsít, és kiválasztjuk az optimális inhibitor(oka)t az ilyen módon mért rezisztencia grafikus ábrázolása alapján.

A találmány szerinti eljárás nagyszámú individuális HIV-fertőzött betegről ad fenotípusra vonatkozó információt, gazdaságosan és gyorsan. Az eljárás minden,

jelenleg rendelkezésre álló kemoterápiás protokollra alkalmazható, és valószínűleg a jövőbeni kemoterápiás protokollokra is alkalmazható lesz.

A találmány szerinti eljárás a beteg HIV-törzseinek fenotípusára vonatkozóan olyan adatokkal szolgál az orvosnak, amelyeket azonnal fel tud használni annak meghatározására, hogy szükséges-e elkezdni, folytatni vagy módosítani egy egyéni kemoterápiás protokollt.

Előnyös, ha az adatsorokat egy sokszögű vagy egy kvázi kör alakú grafikonon ábrázoljuk, amelyben

a) egy középpontból (origóból) több korigált tengely indul ki, mindegyik tengely egy adatsornak vagy inhibitornak – vagy ezek kombinációjának – felel meg,

b) a tengelyeket úgy korigáljuk, hogy a vad típusú HIV-érzékenységi értékeit a különböző inhibitorokkal szemben minden tengelyen egyenlőnek vesszük fel, a vad típusú HIV-re vonatkozó adatpontokat tetszés szerint ábrázoljuk, és ezeket úgy kötjük össze, hogy szabályos sokszöget kapjunk, amelynek a csúcsai a tengelyeken vannak, és középpontját az origó határozza meg,

c) minden tengelyre felviszünk egy olyan adatpontot, amely a kiméra-HIV állománynak az említett tengelyeknek megfelelő inhibitorral szembeni érzékenységét reprezentálja, a kiméra adatpontokat adott esetben összekötjük, miáltal egy szabályos vagy szabálytalan sokszöget kapunk, amelynek az alakja a kiméraállomány rezisztenciáját jeleníti meg egy sor inhibitorral szemben.

Egy sokszögű vagy kvázi kör alakú ábra azzal az előnnyel jár, hogy a betegnek egy sor gyógyszerrel szembeni rezisztenciáját a beteg kiméra-HIV-állományának megfelelő sokszög és a vad típusú törzset képviselő sokszög közötti eltérés fokával fejezzük ki.

A sokszögek területei általában egyes területeken jobban el fognak térni, mint más területeken, ami minden esetben azt mutatja, hogy a rezisztencia foka azzal az inhibitorral szemben, amelynek a tengelye a szóban forgó területen áthalad, nagyobb vagy kisebb.

A találmány szerinti eljárás szerint tehát egy kiméra-HIV-állományt alkalmazunk, és elkészítjük ezen állomány egy sor inhibitorral szembeni rezisztenciájának a térképét. Ilyen módon a térkép, vagy diagram a kiméraállomány egy sajátosságáról olyan technikai jellemzést ad, amelyet hagyományos mérésekkel nem kapunk meg.

Egy előnyös kiviteli alakban a korigált tengelyek egymással azonos szöveget zárnak be.

Előnyös továbbá, ha a tengelyeken logaritmikus beosztás van.

Ezenkívül előnyös, ha a kimérasokszögben az ábrázolt adatpontok excentrikusan helyezkednek el, azok olyan inhibitorokat azonosítanak, amelyeknek a használhatóságáról feltételezhető, hogy a betegnél kevés vagy semmiféle jó eredményt nem adnak, míg ha az adatpontok belül helyezkednek el, a vad típusú sokszögon vagy közvetlenül ezenkívül, ezek olyan inhibitorokat azonosítanak, amelyeknek a hasznosságáról feltételezhető, hogy a betegnél valóságos jótékony hatást fejtenek ki.

Amennyiben a legrosszabb eseti értékeket a kiméra- és vad típusú HIV-vel együtt ábrázoljuk, egy rendszerint szabálytalan sokszög veszi körül a kiméra- és vad típusú sokszögeket. A fent használt „excentrikus” meghatározás egy olyan adatpontot jelöl, amely viszonylag közel esik a legrosszabb eseti határhoz és viszonylag távol a vad típusú sokszögtől. Hasonlóan, a közvetlenül a vad típusú sokszöghöz kívül kifejezés a vad típusú sokszöghöz való viszonylagos közelségre vonatkozik, ha a legrosszabb eseti határtól való távolsággal hasonlítjuk össze.

A fentiekben meghatározott eljárás abban az értelemben korlátozott, hogy az inhibitorral szembeni mérhető rezisztencia a használt inhibitor koncentrációinak adott mértékétől függ. Törekedni kell arra is, hogy csökkentsük a biológiai variabilitás hatásait. Ennek megfelelően kívánatos, hogy a maximálisan vagy legrosszabb esetre mérhető rezisztenciára egy olyan értéket kapjunk, amelynél feltételezhető, hogy az adott inhibitornak nincs hatása. Ez a koncentráció – például 100  $\mu\text{M}$  – általában az a maximális koncentráció, amely gyakorlatilag tesztelhető, de származhat például farmakológiai, toxikológiai vagy farmakokinetikai vizsgálatokból is. A vizsgálat alatt álló beteg rezisztenciaszintjének és a maximális mérhető rezisztenciának az összehasonlítása határozza meg, hogy a vizsgált betegnél milyen a szignifikáns rezisztenciaszint. A maximálisan mérhető rezisztencia és az aktuális rezisztencia megfelelő módon mutatható be egy alább leírt oszlopos diagramon.

A találmány egy további kiviteli alakjában az említett három vagy több adatsor tartalmaz még egy értéket a legrosszabb esetben mérhető rezisztenciára a szóban forgó inhibitor vonatkozásában, s az említett legrosszabb eseti értékeket úgy mutatják be az említett grafikus ábrák, hogy a kiméraállomány adatpontját mind a vad típusú, mind a legrosszabb eseti HIV-hez lehet hasonlítani, s ez egy adott esetben az inhibitor relatív értékének megállapítására nyújt lehetőséget.

A több mint 150 betegből vett mintával végzett kísérletek szoros összefüggést fedtek fel a rezisztencia kialakulása és a terápiás előzmények között, mind ezt a példákban még ismertetjük. Szoros összefüggést találtunk a találmánynak megfelelően kapott adatok és a klasszikus vírusizolációs és -fenotipizálási technikákkal kapott adatok között.

A találmány szerinti eljárás tehát a HIV-kemoterápia egyénre szabott és ésszerűbb menedzselésére használható. Ennélfogva, a találmány szerinti eljárás használata, kombinálva az anti-HIV-gyógyszerek helyes alkalmazásával, a HIV-vírussal fertőzött betegek megfelelőbb kezelését és jobb túlélését eredményezi.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásának akkor van különös jelentősége, amikor egy beteg sok különböző gyógyszert kapott, és a kezelőorvos nehezen tudja értelmezni mutációs motívumát.

A találmány egy további szempontja szerint a HIV-pozitív betegek HIV-kemoterápiájának meghatározására az alábbi lépéseket tartalmazó eljárást ismertetjük:

(a) időszakosan megállapítjuk egy beteg HIV-törzsének a fenotípusos érzékenységet egy fent leírt eljárással;

5 (b) a kemoterápiának a kiválasztott inhibitorral való fenntartására vonatkozó instrukciót adunk, ameddig a beteg HIV-törzsei érzékenyek maradnak a választott kemoterápiára;

(c) másik inhibitort választunk, ha és amikor az eredeti inhibitorral szembeni érzékenység csökken.

10 A leírásban ismertetett klinikai eszközre az „Antivirogram” (védjegy) kifejezést alkottuk meg, és a részletes leírásban ezután ezt a kifejezést fogjuk használni. Ez az eszköz a különböző inhibitorokkal szembeni relatív változásokról és érzékenységekről ad egyértelmű felvilágosítást az orvosnak, mégpedig, hogy mely inhibitorokat használja vagy mely inhibitorokat használhatja az egyes HIV-fertőzött betegek klinikai protokolljában.

20 HIV-en általában HIV-1-et értünk. A találmány azonban HIV-2 esetén is alkalmazható.

Előnyös, ha az említett kimérvírusok legalább két – HIV-pol-gén által kódolt – enzim inhibitorával szembeni fenotípusos érzékenységet egyszerre állapítjuk meg.

25 A találmány egy következő vonatkozása, hogy eljárást bocsátunk rendelkezésre egy betegben lévő egyedi HIV-törzsek legalább két – HIV-gén által kódolt – enzim inhibitorával szembeni gyógyszerérzékenységének a meghatározására, amelynek során egy betegből származó biológiai anyagmintából vírus-RNS-t izolálunk és a HIV-pol-gén egy kívánt szakaszát reverz transzkripcióval átírjuk, a kapott szekvenciával és egy HIV-DNS-szerkezettel amelyből az említett szekvenciát töröltük – egy HIV-fertőzésre fogékony sejtvonalat transzfektálunk, a transzfektált sejtek tenyésztésével kimérvírusok egy állományát állítjuk elő, meghatározzuk a kimérvírusok érzékenységét a HIV-pol-gén által kódolt enzimek inhibitoraival szemben.

30 A pol-génből származó kívánt szekvenciát annak a betegnek a biológiai anyagából vett mintából izoláljuk, akinek a fenotípusos gyógyszerérzékenységét meg óhajtjuk határozni. A biológiai anyagok széles választékát használhatjuk a kívánt szekvencia izolálására.

35 A biológiai anyag lehet plazma, szérum vagy egy sejtmentes testfolyadék, amelyet az ondó vagy a hüvelyi folyadék közül választunk ki. Különösen előnyös a plazma, amely – mint fent leírtuk – az eddigiek folyamán használt TBMC-khez viszonyítva előnyösebb.

40 A biológiai anyag lehet még teljes vér, amelyhez RNS-stabilizátort adtunk.

Egy további kiviteli alakban a biológiai anyag lehet szilárd szöveti anyag, például agyszövet, nyirokmirigy-szövet, vagy biopsziával kapott más szövet.

45 Mint alább bemutatjuk, amennyiben olyan biológiai anyagot használunk a kívánt szekvencia izolálásához, mint a plazma, minimális plazmamennyiséget használhatunk, általában körülbelül 100–250  $\mu\text{t}$ , pontosabban 200  $\mu\text{l}$  körüli mennyiséget.

60 Ezenkívül előnyös, ha a két enzimet a HIV-RT, -proteáz és -integráz közül választjuk ki.

A vírus-RNS könnyen izolálható ismert eljárásokkal, ilyen például Boom és munkatársai eljárása [R. Boom et al., *J. Clin. Microbiol.*, 28., 495–503 (1990)].

Plazma, szérum és szérummentes testfolyadék esetében használhatjuk a QIAamp (védjegy) virális-RNS-készletet (kitet) is, amelyet a Qiagen csoport forgalmaz.

A HIV-fertőzésre fogékony sejtvonal előnyösen egy CDH+ T-sejtvonal.

Előnyös ezenkívül, ha a CDH+ T-sejtvonal az MTH-sejtvonal vagy a HeLa CDH+ sejtvonal.

A reverz transzkripció kivitelezéséhez kereskedelmi kitet használhatunk, ilyen a Perkin–Elmer cég által forgalmazott GeneAmp (védjegy) Reverse Transcriptase Kit.

A beteg pol-génje kívánt szakaszának reverz transzkripcióját előnyösen egy specifikus 3' primer használatával végezhetjük.

Abban az esetben, amelyben a reverz transzkriptázt vagy reverz transzkriptázt és proteázt kódoló szekvencia, előnyös, ha a 3' primer az OUT3: 5'-CAT TGC TCT CCA ATT ACT GTG ATA TTT CTC ATG-3' (1. sz. szekvencia).

Egy különösen előnyös kiviteli alakban a HIV-RT-gén és HIV-proteáz-gén reverz transzkripcióját a HIV-1-specifikus OUT primer használatával és egy genetikailag manipulált, RNáz H aktivitásmentes reverz transzkriptázzal végezzük úgy, hogy az átírandó összes RNS degradálás nélkül alakuljon át cDNS-sé. Ilyen genetikailag manipulált reverz transzkriptáz az Expand (az Expand egy védjegy) reverz transzkriptáz, amely a Boehringer Mannheim GmbH-től beszerezhető.

Az Expand™ reverz transzkriptáz egy RNS-re ható DNS-polimeráz. Ez az enzim a Moloney Murine Leukaemia Virus Hoesz transzkriptáz (M-Mu +V-RT) egy genetikailag manipulált változata. Az RNáz H szekvencián belüli pontmutáció a kimutathatósági szint alá csökkenti az RNáz H aktivitását. Ennek a genetikailag manipulált reverz transzkriptáznak a használata lehetővé teszi, hogy nagyobb mennyiségű teljes hosszúságú cDNS-átíratokat kapjunk.

A reverz transzkripció után az átírt DNS-t PCR-technika használatával sokszorozzuk fel.

Előnyös, ha a reverz transzkripció termékét fészkes PCR- (nested PCR) technikával sokszorozzuk.

Abban az esetben, ha a szóban forgó szakasz az RT-szakasz, előnyösen a „fészkes” PCR-technikát alkalmazzuk, Kellam és Larder szerint. [P. Kellam, B. A. Larder, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 23–30 (1994)], belső és külső primereket használva. Amennyiben a szóban forgó szakasz átéri az RT- és a proteázzgént, akkor előnyösen az OUTS/INS (3') és RVP5 (5') kombinációt használjuk specifikus primerek gyanánt.

Az RVP5 primer [B. Maschera et al., *J. Virol.*, 69, 5431–5436 (1995)] szekvenciája a következő: 5'-G-G-G-AAGATCTGG-CC TTCCTACAAGGG-3' (2. sz. szekvencia).

A felsokszorozást a 3. ábrán mutatjuk be vázlatosan és a 2. példában ismertetjük nagyobb részletességgel.

A proteáz cDNS sokszorozása ténylegesen egy féloldali fészkes PCR- (heminested PCR) eljárást tartalmaz, ami a 3. ábrából kitűnik.

A „fészkes” PCR-technikának az az előnye az ismert, egyszerű PCR-technikákhoz képest, hogy lehetővé teszi, hogy sokkal specifikusabb PCR-terméket kapjunk.

Mindazonáltal, hogy a PCR folyamán még nagyobb pontosságot és kitermelést érjünk el, igénybe vehetünk egy hőstabil polimerázokból álló keveréket [(W. M. Barnes, *Proc. Natl., Acad. Sci.*, 91, 22316–2220 (1994)]. Ilyen polimerázkeverék a Boehringer Mannheim GmbH cégtől szerezhető be Expand (az Expand egy védjegy) nagy pontosságú PCR-rendszer (Sexpand high fidelity PCR system) néven. Ennek a rendszernek az alkalmazásával megnövekedett érzékenységet kaptunk, mégpedig olyan érzékenységet, amely tízszer nagyobb, mint ami egy hagyományos PCR-eljárással – egyedül Taq polimerázt használva – érhető el.

Amennyiben a pol-gén-szakasz felőleli mind az RT-, mind a proteázzgént, előnyös az a HIV-DNS-szerkezet, amelyből az RT- és a proteázzgént töröltük, és ez a pGENT3-ΔPRT plazmid, amelyet 1996. november 8-án helyeztünk letétbe a Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – BCCM LMBP Collection – intézményben LMBP3590 szám alatt.

Mindazonáltal számos megoldás alkalmazható egy olyan HIV-1 provírust tartalmazó plazmid előállítására, amelyben mind a proteáz-, mind az RT-gén deletált. Az egyik lehetőség, hogy a kívánt deléciót oligonukleotid-közvetített mutagenézissel vezetjük be. Az alábbi 2. példában követett eljárás azonban a kívánt szerkezetet specifikus restrikciós enzimek és szubklónozási eljárások használatával hozza létre, mint a későbbiekben leírjuk. Bár a végső eredmények a rendelkezésre álló restrikciós helyektől függnnek, az eljárás nagy előnye az, hogy ezzel gyorsan megbízható eredményeket kaphatunk.

Annak érdekében, hogy biztosítsuk a transzfecció leghatékonyabb végeredményét, a transzfecciót PCR-terméket tisztítanunk kell, ideálisan anioncserélő centrifugálható oszlopokon, ismert módon. Megfelelő kit erre a célra a Qiagen csoport által forgalmazott QIAquick (védjegy) PCR Purification Kit.

A transzfecciót végrehajthatjuk elektroporációval vagy más módon, lipidek, főként kationos lipidek, DEAE dextrán, kalcium-hidrogén-foszfát stb. használatával.

Lipides transzfecció esetében használhatjuk a PERFECT (a PERFECT egy védjegy) transzfecció kitet, amelyet az Invitrogen BV cég (Leek, Hollandia) forgalmaz.

Tehát a HIV-DNS-szerkezetet, amelyből töröltük a kiválasztott, pol-gén-eredetű gént vagy géneket, a felsokszorozás után kapott termékekkel együtt használjuk a transzfeccióhoz.

Ha csak az RT-gén deletált, a szerkezet a pHIVΔRT-plazmid (kapható a Medical Research Council – (MRC) -től) lehet. Ha mind az RT-, mind a proteázzgént deletált, akkor a megfelelő szerkezet az itt leírt

pGEMTS- $\Delta$ PRT plazmid, amely egy magas másolat-számú vektor. Az ilyen plazmidokat transzfecció előtt ismert eljárásokkal linearizáljuk.

Különösen előnyös egy olyan szerkezet használata, amely egynél több pol-gén-enzimet kódol, például a  $\Delta$ PRT-szerkezet, mivel az a szerkezet többet tartalmaz az eredeti beteg anyagából, mintha egyetlen gént használnánk, így a sokszorozott anyag nagyobb mértékben tükrözi a vizsgálat alatt álló konkrét betegben a virális genetikai különbségeket.

Megítélhető annak előnye, hogy a „fészkes” PCR-hez választott specifikus primerek a sokszorozandó és vizsgálandó célnézemek szekvenciáinak fő részén kívül helyezkednek el. Úgy ítéljük meg továbbá, hogy az RT és a proteáz kombinációja valószínűleg jobb eredményeket ad az RT vizsgálatához, mint egyedül az RT; mivel a csak RT használatával kialakult helyzethez képest így negyvennél több aminosav származik a betegből. A proteáz vizsgálatánál tudni kell, hogy a proteáz első kilenc aminosava még a szerkezet (pGEMT3- $\Delta$ PRT) vad típusú gerincéből származik.

Amennyiben a sejtek transzfeccióját elektroporációval végezzük, a választott paramétereket úgy optimalizáljuk, hogy jó sejtnövekedést és vírustermelést érjünk el. Az elektroporáció megfelelően kivitelezhető 250  $\mu$ F és 300 V mellett. Előnyös, ha az elektroporációt körülbelül 10  $\mu$ g linearizált plazmid például pHIV $\Delta$ RTBstEII – és körülbelül 5  $\mu$ g sokszorozott PCR-termék – például RT-PCR-termék – jelenlétében végezzük. Eredményes intracelluláris homológ rekombináció esetén 5–10 napon belül új kiméra-HIV képződik. Ismert technikák esetén a tenyésztési idő általában 12–14 nap, mielőtt kiméra-HIV képződik. A tenyésztés-felülűszók részleteit –70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk.

Könnyen belátható, hogy a fenti eljárások felhasználhatók más HIV-gének – például az integrázgén – vagy egynél több HIV-gén – például RT- és integrázgén – izolálására és sokszorozására és egy CD4+ T-sejtnak az illető integráz- vagy RT/integráz PCR-termékekkel és egy megfelelő linearizált HIV-DNS-szerkezettel – amelyből a szóban forgó gént (vagy géneket) töröltük együtt való transzfecciózására.

Az újonnan képződött kiméravírusokat megtitráljuk, majd a különböző pol-gén-enzim-inhibitorokkal szembeni fenotípusos érzékenységüket (azaz fogékonyságukat), előnyösen egy automatizált, sejtre alapozott assay-ben analizáljuk.

A kiméravírusok és a vad HIV-törzs – amely alkalmasan egy rekombináns vad HIV-törzs – egy vagy több RT-, proteáz- vagy integrázinhibitorral szemben megnyilvánuló gyógyszerérzékenységét előnyösen gátlókoncentrációban (IC=inhibitory concentration) fejezzük ki.

A kiméravírusok és a vad típusú HIV-törzs egy vagy több RT-inhibitorral és/vagy egy vagy több proteázinhibitorral és/vagy egy vagy több integrázinhibitorral szembeni érzékenysége például 50%-os vagy 90%-os gátlókoncentrációként (IC<sub>50</sub> vagy IC<sub>90</sub> értékek) fejezhető ki.

Előnyös, ha az RT-inhibitorokat az AZT, ddI [didanosine/Videx (a Videx egy védjegy)], ddC (zalcitabine), 3TC (lamivudine), d4T (stavudine) nukleozid RT-inhibitorok közül, és a delavirdene [U 9051125 (BMAP)/Rescriptor (a Rescriptor egy védjegy)], loviride (alfa-APA), nevirapine [B1-RG-587/Viramune (a Viramune egy védjegy)] és tivirapine [8-CI-TIBO(R86183)] nemnukleozid RT-inhibitorok közül választjuk ki, a proteázinhibitorok közül a saquinavirt, indinavirt és ritonavirt és az integrázinhibitorok közül a koffeinsav-fenil-etil-észtert (CAPE) választjuk.

A következő alkalmas RT- és/vagy proteázinhibitorok és/vagy integrázinhibitorok közül választunk: nukleozid RT-inhibitor az AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T, 1592V89 és hasonló, nemnukleozid RT-inhibitor a loviride, nevirapine, delavirdine, atevirdine és tivirapine (8-CI TIBO) és hasonló, proteázinhibitor a saquinavir, indinavir és ritonavir, és integrázinhibitor a koffeinsav-fenil-etil-észter (CAPE) és a WO 95/0 8540 számú nemzetközi szabadalmi leírásban és a GB 2,271,566 számú nagy-britanniai szabadalmi leírásban ismertetett típusú HIV-integráz-inhibitorok.

A találmány szerinti eljárás tartalmazhat olyan lépést, amelyben összehasonlítjuk a betegek HIV-törzseinek a fenotípusos gyógyszerérzékenységét a vad típusú HIV-törzs egy vagy több RT-inhibitorral és/vagy egy vagy több proteázinhibitorral és/vagy egy vagy több integrázinhibitorral szembeni fenotípusos érzékenységével. A vizsgált különböző gyógyszervegyületekkel (vagy kombinációkkal) szembeni érzékenységben történő relatív változások könnyen érthető ábrázolása végett egy Antivirogram diagramot szerkesztünk.

A diagramot a következőképpen kell értelmezni: az excentrikus adatpontok az antivirogramban olyan kemoterápiás protokollokra utalnak, amelyek valószínűleg többé már nem használnak a HIV-fertőzött betegek, míg azok az adatpontok, amelyek a referencia-sokszögön belül vagy rajta vannak, vagy csak kevéssé lépik túl a sokszöget, olyan kemoterápiás protokollokra utalnak, amelyek valószínűleg jótékonyan hatnak a HIV-fertőzött betegre.

Az anti-HIV-gyógyszerek pontos alkalmazásával kombinálva a találmány szerinti eljárásokat, ezek végül jobb kezelést, javított életminőséget és a HIV-fertőzött betegeknek kedvezőbb túlélést kell eredményezzenek; azaz a hatástalan kezelés (rezisztens HIV-törzsek jelenléte vagy felbukkanása következtében) megelőzhető vagy abbahagyható, és a hatásos kemoterápia időben megindítható.

#### Az ábrák rövid ismertetése

1. ábra: a pGEMT3- $\Delta$ PRT plazmid szerkesztésének vázlatos bemutatása;
2. ábra: a pGEMT3- $\Delta$ PRT plazmid szerkesztésének további és kiegészítő vázlatos bemutatása;
3. ábra: a HIV-HXB2D szekvencia proteáz- és RT-gént tartalmazó részének vázlatos bemutatása;

- 4A–H. ábrák: a HIV-HXB2D szekvencia proteáz- és RT-gént tartalmazó részének teljes szekvenciája;
5. ábra: 3TC-rezisztens HIV-törzseket tartalmazó beteg Antivirogramja (védjegy), az 5. példában leírtak szerint;
6. ábra: vad típus-szerű HIV-törzseket tartalmazó nem gyógyszerelt beteg Antivirogramja (védjegy), a 6. példában leírtak szerint;
- 7A. ábra: a 7. példában említett beteg gyógyszerérékenységében bekövetkező relatív változást bemutató oszlopos diagram;
- 7B. ábra: a 7. példában említett beteg Antivirogramja (védjegy);
- 8A. ábra: a 8. példában említett beteg gyógyszerérőségének relatív változását bemutató oszlopos diagram;
- 8B. ábra: a 8. példában említett beteg Antivirogramja (védjegy);
- 9A. ábra: a 9. példában említett beteg gyógyszerérőségének relatív változását bemutató oszlopos diagram;
- 9B. ábra: a 9. példában említett beteg Antivirogramja (védjegy);
- 10A. ábra: a 10. példában említett beteg gyógyszerérőségének relatív változását bemutató oszlopos diagram;
- 10B. ábra: a 10. példában említett beteg Antivirogramja (védjegy);
- 11A. ábra: a 11. példában említett beteg gyógyszerérőségének relatív változását bemutató oszlopos diagram;
- 11B. ábra: a 11. példában említett beteg Antivirogramja (védjegy);
- 12A. ábra: a 12. példában említett beteg gyógyszerérőségének relatív változását bemutató oszlopos diagram;
- 12B. ábra: a 12. példában említett beteg Antivirogramja (védjegy).
- A találmányt az alábbi példákkal szemléltetjük, azonban ezekkel a példákkal nem óhajtjuk korlátozni a találmány oltalmi körét.

### 1. példa

#### Protokoll

#### 1. A vírus-RNS izolálása és sokszorozása

Az RNS-t 100 µl plazmából izoláltuk Boom és munkatársai [R. Boom et al., J. Clin. Microbiol., 28, 495–503 (1990)] eljárása szerint, majd reverz transzkripcióval írtuk át GeneAmp (védjegy) reverztranszkriptáz-kit (Perkin-Elmer) használatával – az előállító cég előírása szerint – és egy HIV-1-specifikus 3' primer (OUT3: 5'-CAT TGC TCT CCA ATT ACT GTG ATA TTT CTC ATC-3'; 1. számú szekvencia) használatával. A reverz átírt RNS PCR-sokszorozását belső és külső primerekkel végeztük Kellam és Larder [P. Kellam, B. A. Larder, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, 23–30 (1994)] leírása szerint. Kloroformos extrahálás és Centricon 100 oszlopokon való centrifugálás

vagy anioncserélő centrifugaoszlopokon (Qiagen) való centrifugálás után az izolált PCR-termék kész a transzfekeciós reakciókban való felhasználásra.

#### 2. A plazmid termelése és izolálása

A pHIVΔRT- (MCR) plazmid termelését E. coliban végeztük. A plazmid DNS-t egyéjszakás tenyészetekből izoláltuk Qiagen oszlopokat használva, ahogyan a gyártó leírta. Az izolált plazmid kitermelését spektrofotometriásan határoztuk meg A260/280 mérésével (optikai sűrűségmérés λ=260 és 280 nm-en). Körülbelül 250 µg ultratiszta plazmid DNS-t kaptunk 500 ml baktériumtenyészetből. Az izolált plazmid azonosságát restrikciós analízissel igazoltuk. Ezután az izolált DNS-t BstEII-vel linearizáltuk, majd egy klasszikus fenol/kloroform extrahálással újból tisztítottuk.

#### 3. A sejtek transzfekeciója

MT4 sejteket tenyésztettünk szubkultúrában 250 000 sejt/ml sűrűségig a transzfekeció előtt (exponenciális növekedési fázis). A sejteket lecentrifugáltuk és foszfáttal pufferolt konyhasóoldatban (PBS) reszuszpendáltuk úgy, hogy a szuszpenzió koncentrációja  $3,1 \times 10^6$  sejt/ml legyen. Minden egyes transzfekecióhoz 0,8 ml-t ( $2,5 \times 10^6$  sejt/ml) használtunk. A transzfekeciót Bio-Rad Gene pulserkészülékkel, 0,4 cm-es elektrodoküveték használatával végeztük. A sejtek elektroporációját 10 µg linearizált pHIVΔRT-plazmid és körülbelül 5 µg RT-PCR-termék jelenlétében, 250 µF és 300 V mellett végeztük. Ezután 30 perces szobahőmérsékleten való inkubálás következett. A sejtsuszpenzióhoz ezután 10 ml friss táptalajt adtunk, és az inkubálást 37 °C-on, 5% szén-dioxid-tartalmú nedves atmoszférában végeztük.

#### 4. A transzfekektált sejtek tenyésztése és ellenőrzése

Transzfekeció után a sejteket 7–10 napon át monitoroztuk citopatogén hatás (CPE=citopathogenic effect) megjelenése szempontjából. Amennyiben ilyen hatás nem észleltünk, a sejteket különböző palackokban tenyésztettük. Ezután a transzfekektált sejtek tenyészetének felülúszóit használtuk fel egy rekombináns vírusálmány létrehozásához, amelyet 1,5 ml-es részletenként 70 °C-on tároltunk.

#### 5. Betegeredetű virális RNS-ből származó rekombináns vírus analízise

Az új vírusok titrálása után az álmányokat használtuk antivirális kísérletekhez, a különböző HIV-inhibitorok sorozathígításai jelenlétében. A learatott felülúszók titerét MT4 sejteken határhígításos (véghígításos) titrálással határoztuk meg.

A használható titerű vírusokat használtuk az antivirális kísérletekben. Erre a célra 96 tartályos mikrotitrálólemezek tartályaiba 100 µl teljes táptalajt töltöttünk. Ezután a vegyületek törzsoldataiból 25 µl-eket mértünk be a tartályok párhuzamos soraiba. Mindegyik gyógyszernél (vagy gyógyszer-kombinációnál) HIV-vel és vakkal fertőzött sejt mintákat alkalmaztunk. Ekkor exponenciális növekedésben lévő MT4 sejteket vittünk a mikrotitrálólemezekre 150 000 sejt/ml sűrűségben. A sejtenyészeteket ezután 37 °C-on, 5% szén-dioxid-tartalmú, pársított atmoszférában inkubáltuk. A befer-tőzés után 5 nappal MTT-eljárással [R. Pauwels et al.,

J. Virol. Meth., 20, 309–321 (1988)] spektrofotometrián vizsgáltuk – az alábbi 6. pontban leírtak szerint – a vak- és HIV-fertőzött sejtek életképességét.

#### 6. MTT-assay

A mikrotitrálólemezek tartályaiba 20 µl MTT (tiazolililkék) oldatot (7,5 mg MTT/ml PBS) mértünk. A lemezeket ezután 1 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Ezután a tartályokból kiveszünk 150 µl táptalajt anélkül, hogy a formazánkristályokat tartalmazó MT4 sejtcsoportot felzavarnánk. A formazánkristályok feloldása végett 100 µl 5%-os Triton X-100-at – savanyított izopropanolban (5 ml koncentrált sósav per 1 liter oldószer) – mérünk be. A formazánkristályok teljes oldódását úgy érzük el, hogy a lemezeket 10 percre lemezzázó gépre helyezzük. Végül két hullámhosszúság (540 és 690 nm) mellett olvassuk le az abszorpciót. Az optikai sűrűsége (OD) vonatkozó adatokból vezetjük le az 50%-os gátló- (IC<sub>50</sub>) és az 50%-os citotoxikus (CC<sub>50</sub>) koncentrációkat.

#### 2. példa

HIV-1-proteáz és reverz transzkriptáz-géndeléción tartalmazó pHIVΔRTBstEII-variáns szerkesztése

Az 1. példában leírt protokoll szerint jártunk el, kivéve, hogy a szóban forgó HIV-pol-génszekvencia az RT- és proteázkodoló szekvencia volt, és az előállított szerkezet az alább leírt pGEMT3-ΔPRT plazmidnak felelt meg. Amennyiben más módosításokra került sor az 1. példában előadott eljáráshoz képest, azokat az alábbiakban ismertetjük.

A virális RNS sokszorozása céljából az RNS reverz transzkripcióját DNS-sé ugyancsak az OUT3 primerrel végeztük. Azonban a „fészkes” PCR- (nested PCR) eljáráshoz a 3. ábrán bemutatott primereket használtuk. Tehát megjegyezzük, hogy a „fészkes” PCR- (nested PCR) eljárás külső primerek gyanánt az RVP5-öt és OUT3-at és belső primerek gyanánt az RVP5-öt és IN3-at használja. Ennél fogva ez a „fészkes” eljárás (nested procedure) valójában egy „félfészkes” PCR- (hemi-nested PCR) eljárás.

A pGEMT3-ΔPRT termelése és izolálása

A végső pGEMT3-ΔPRT szerkezetet a pGEM9-Zf(-) (Promega) származéka.

Röviden kifejtve, a pGEMT3-ΔPRT szerkezetet úgy építettük fel, hogy a kívánt HIV-HXB2 inszertumot (egy proteáz és reverz transzkriptáz deletált provirális HIV-1-klón, amelyet humán szekvenciák szegélyeznek) a pGEM9-Zf(-) vektor XbaI restrikciós helyére építettük be. A provirális genomot a proteázgénen belüli AhdI helytől (körülveszi a 9-es aminosavat) a pHIVΔRTBstEII szerkezet (MRC-letét hivatkozási száma: ADB231) BstEII helyéig töröltük. A ΔProRT-deléción csatlakozásánál a SmaI és BstEII hely helyezkedik el, amelyeket fel lehet használni a provirális szerkezet linearizálására a transzfekció előtt. A pGEMT3-ΔPRT szerkesztését az 1. és 2. ábrán mutatjuk be vázlatosan. A pGEMT3-ΔPRT kihozatala körülbelül 1 mg volt 500 ml baktériumtenyészetből.

Mint fent említettük, a pGMT3-ΔPRT plazmidot 1996. november 8-án helyeztük letétbe a Belgian Coor-

dated Collections of Microorganisms – BCCM LMBP Collection intézményben LMBP3590 számon.

Nem tartottuk valószínűnek, hogy a provirális genom bevezetése más vektorba [pIB120 helyett pGEM9-Zf(-)] nagyobb problémát okozna. A pIB120, amely a pEMBL8(-) (a Kodak Scientific Imaging Systems-től kapott információ szerint) egy származéka és a pGEM9-Zf(-) hasonló vektorok. Mindazonáltal a pIB120HIV provirális vektor recA+ E. coli-gazdasejtekben instabil lehet [B. Maschera, et al., J. Virol., 69, 5431–5436 (1995)]. Ezért a pGEMT3-ΔPRT szerkezet stabilitásáról meg kell győződni minden új plazmid előállítása után.

#### HIV-HXB2 szekvencia

A HIV-HXB2D szekvencián (1800-tól 4400-ig terjedő nukleotidok) belüli lényeges szakaszt a 3. ábrán (vázlatosan) és a 4. ábrán (teljes szekvencia) mutatjuk be. Számos gén, restrikciós hely, primer és deléción (ΔPro, ΔRT, ΔProRT) helyzetét is jelöljük.

A HIV-1-szekvenciát (HXB2-izolálás, referenciage-nom, 9718 bp) a National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, National Institutes of Health intézménytől szereztük be, az ENTREZ Document Retrieval System útján.

Génbank név: HIVHXB2CG

Génbank lajstromszám: Ø3455

NCBI szekvenciaszám: 327742

#### Rekombinációs szakaszok

A pGEMT3-ΔPRT vektort, az RVP5 és OUT3/IN3 primerek segítségével előállított RT-PCR-fragmentumokkal kombinálva használhatjuk az MT4 sejtek transzfektálására az 1. példa 3. pontjában leírtak szerint. A ΔPRT 5' végén lévő rekombinációs szakasz 188 nukleotidot tartalmaz. A ΔProRT 3' végén lévő, rekombinációhoz szolgáló szakasz hasonló a korábban leírt [P. Kellam, B. A. Larder, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, 23–30 (1994)] szakaszhoz, és 130 nukleotidot tartalmaz.

A rekombinációhoz szolgáló ezen szakaszok hossza fontos. Előzőleg kapott adatok [P. K. Bandiopadhyay, et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 81, 3476–3480 (1984) J. Rubnitz, S. Subramani, Molecular and Cellular Biology, 4, 2253–2258 (1984)] mutatják, hogy a rekombináció gyakoriságában tízszeres csökkenés következhet be, ha a szekvenciahomológia 214 bázispártól 163 bázispárra csökken. Ezenkívül elegendő rekombinációs eseménynek kell történnie az elektroporációval kezelt sejtben annak biztosítására, hogy a képződött virális fenotípus a kezelt HIV-pozitív betegben jelen lévő kvázispeciest megbizhatóan tükrözze vissza. A rekombinációs események optimalizálását egyrészt úgy érhetjük el, hogy beállítjuk a linearizált provirális vektor arányát a célsejtek elektroporációjához használt RT-PCR-fragmentumhoz. Az ehhez szükséges standardeljárást – a jellemző végeredményekkel – előzőleg Kellam és Larder [P. Kellam, B. A. Larder, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, 23–30 (1994)] írták le. Végeredményben elhatározás született, hogy a PCR-termékből a körülbelül 2 µg (10 µg



vektorral) kezdeti bevitel körülbelül 5 µg-ra vagy többre emelendő. Ennek az eredménye a transzfektált sejtek tenyésztésében a látható vírusnövekedés (citopatogén hatás) gyorsabb megjelenésében nyilvánult meg.

A rekombinációs események optimalizálását szolgáló másik választás lenne olyan primerek tervezése, amelyek hosszabb rekombinációs szekvenciákat eredményeznek.

Ámbár a transzfektációs reakcióba való bevitel mindig a PCR után kapott kihozattól függ. Bizonyos mintáknak magas a kihozatala, és ennek eredményeként több sokszorozott anyag vihető be a transzfektációs reakcióba (a rekombináció hatékonyságára jobb eredményeket kapunk). Azonban az alacsonyabb rekombinációs hatékonyság ellenére, az alacsonyabb kihozattal adó mintákat is transzferálhatjuk, és ez a víruspopuláció megbízható visszatükröződését eredményezi az élő vírusban.

### 3. példa

A ProRT-szekvencia alternatív RT-PCR-primerei

Olyan új primereket (A–D) terveztünk a 2. példában használt primerekhez képest, amelyeknek hosszabb rekombinációs szekvenciákat kell eredményezniük a ProRT-szakasznak mind az 5', mind a 3' végén. Két-két primert terveztünk az illető szakasz 5' és 3' végére, a „fészkes” PCR (nested PCR) kivitelezéséhez. Mint a 3. és a 4. ábrában jelezzük, az illető primerek tervezésénél figyelembe vettük a ProRT-szakasz 5' végén lévő direkt ismétlődést. Az új primerek a következők:

A PRTO-5: 5'-GCCCTAGGA-AAAAGGGCTG-TTGG (3. sz. szekvencia),

B PRTI-5: 5'-TGAAAGATTG-TACTGAGAGA-CAGG (4. sz. szekvencia),

C PRTI-3: 5'-GATATTTCTC-ATGTTCACTACT-TGGG (5. sz. szekvencia),

5 D PRTO-3: 5'-AGGTGGCAGG-TTAAAATCAC-TAGC (6. sz. szekvencia).

### 4. példa

Alternatív ΔProRT-vektor szerkesztése

10 Mint fent említettük, egy alternatív ProRT deletált vektor szerkesztése oligonukleotidközvetített mutagenézissel valósítható meg. Az is lehetséges azonban, hogy kiszélesítjük a ProRT-deléciót a meglévő 3'-végtől az RT-génben lévő legközelebbi Kpui helyig (40 bázispár tovább 3' felé). Egy Klenow-kezelt Kpui hely ligálása egy Klenow-kezelt BstEII helyhez, helyreállítja az eredeti BstEII felismerőszekvenciát. Ez az alternatív vektor a 2. példában leírt pGMT3-ΔPRT vektorhoz hasonlóan viselkedik, de kissé nagyobb RT-deléciót tartalmaz.

20

### 5. példa

25 Egy HIV-fertőzött beteg – aki 1989. decemberétől egy nem dokumentált későbbi időpontig AZT-t kapott, és akit 1994 februártól 1995. októberig AZT+3TC (1:1) kombinált terápiára fogtak – leadott plazmájának egy sor RT-inhibitorral szembeni érzékenységét az 1. példában leírt technológia szerint határoztuk meg. Rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtunk az említett technológiában referencia-HIV-vírus gyanánt. Az 1. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (µM) és az említett értékek hányadosát mutatja. Az Antivirogramot (védjegy) az 5. ábra mutatja.

30

1. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref (2)	(1)/(2) hányados
Loviride	0,1	0,12	0,11	0,05	2
Tivirapine	0,019	0,018	0,019	0,01	1,5
AZT	0,001	0,002	0,002	0,004	0,4
3TC	31,6	100	65,8	0,56	118
d4T	0,07	0,49	0,06	0,12	0,5
ddl	2,0	0,8	1,4	2,83	0,5
ddC	0,2	0,2	0,2	0,38	0,5
AZT+3TC (1:1)	0,001	0,001	0,001	0,002	0,5

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a 3TC-vel való monoterápia valószínűleg nem használ az adott betegnek. Az AZT+3TC-vel végzett kombinált terápiának (a folyó terápia) valószínűleg még pozitív hatása van.

### 6. példa

Egy nem gyógyszerelt betegől levett plazmának számos RT-inhibitorral szembeni érzékenységét az 1.

55

60

példában fent leírt technológia szerint határoztuk meg. Referencia-HIV-vírusként a rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtuk az említett technológiákban. A 2. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (µM) és az említett értékek hányadosát mutatja. Antivirogramot (védjegy) készítettünk, amelyet a 6. ábra mutat.

2. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref (2)	(1)/(2) hányados
3TC	1,81	2,02	1,91	3,08	1
ddl	3,07	4,47	3,77	8,58	0,4
ddC	1,45	1,47	1,46	2,21	1
AZT	0,04	0,05	0,05	0,06	1
d4T	1,31	0,97	1,14	1,74	1
AZT+3TC (1:1)	0,05	0,04	0,05	0,02	3
ddC+d4T (1:1)	0,62	0,44	0,53	0,77	1
3TC+d4T (1:1)	0,42	0,44	0,43	1,11	0,4

Az adatokból megállapítható, hogy a beteg olyan HIV-törzsekkel fertőződött, amelyek nagyon hasonlóak a vad típusú HIV-hez. Egyetlen gyógyszer-adagolási séma sem kizárt, tehát a kemoterápia elkezdhető egy olyan gyógyszerrel, mint az AZT, amely pozitív előzménnyel (track record) rendelkezik.

#### 7. példa

Egy nem gyógyszerelt betegtől levett plazma több RT-inhibitorral szembeni érzékenységét az 1. példában

ismertetett technológia szerint határoztuk meg. Referencia-HIV-vírusként a rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtuk. A 3. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (µM) és az említett értékek hányadosát mutatja. A 7A. ábrán látható oszlopos diagram a gyógyszerérzékenységben bekövetkező relatív változást mutatja. Antivirogramot (védjegy) is készítettünk, amelyet a 7B. ábra mutat be.

3. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref. (2)	(1)/(2) hányados
AZT	0,052	0,050	0,051	0,023	2
3TC	2,173	ND	2,173	1,381	2
ddl	0,475	0,429	0,452	0,648	0,7
ddC	1,042	1,389	1,216	1,616	0,8
d4T	1,142	1,657	1,399	1,368	1
Loviride	0,035	0,025	0,030	0,024	1
Tivirapine	0,042	0,049	0,046	0,021	2

Az adatokból megállapítható, hogy a beteg olyan HIV-törzssel fertőződött, amely nagyon hasonló a vad típusú HIV-hez. Egyetlen gyógyszer-adagolási séma sem kizárt, tehát a kemoterápia elkezdhető egy olyan gyógyszerrel, mint az AZT, 3TC vagy mások, amelyek pozitív előzménnyel (track record) rendelkeznek.

#### 8. példa

Egy HIV-fertőzött betegtől – olyan terápiás előzménnyel, amely AZT-t, 3TC-t és loviride-et tartalmazott

– levett plazma több RT-inhibitorral szembeni érzékenységét az 1. példában ismertetett technológia szerint határoztuk meg. Referencia-HIV-vírusként a rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtuk. A 4. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (µM) és az említett értékek hányadosát mutatja. A 8A. ábrán látható oszlopos diagram a gyógyszerérzékenység relatív változását ábrázolja. Antivirogramot (védjegy) is készítettünk, amelyet a 8B. ábra mutat be.

4. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (μM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref. (2)	(1)/(2)hányados
AZT	18,264	22,251	20,257	0,084	241
3TC	>100,000	>100,000	>100,000	6,304	>16
ddl	26,861	15,435	21,148	1,586	13
ddC	9,290	8,506	8,898	1,931	5
d4T	7,500	7,097	7,298	5,465	1
Loviride	>100,000	>100,000	>100,000	0,037	>2717
Tivirapine	1,626	1,604	1,615	0,021	78

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a beteg olyan HIV-törzssel fertőződött, amely a legtöbb vizsgált nukleozid és nemnukleozid antiretrovirális gyógyszerrel szemben csökkent érzékenységet mutat. A terápia még megkezdhető d4T-vel vagy ddC-vel. Megfontolandó proteázinhibitoroknak a terápiába való bevonásának a lehetősége.

#### 9. példa

Egy HIV-fertőzött betegről – akinél a terápiás előzményben számos nukleozidanalóg RT-inhibitor szere-

20 pelt – levett plazma több RT-inhibitorral szembeni érzékenységét az 1. példában ismertetett technológia szerint határoztuk meg. Referencia-HIV-vírusként a rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtuk. Az 5. táblázat a mért IC<sub>50</sub> (μM) értékeket és az említett értékek hányadosát tartalmazza. A 9A. ábrán látható oszlopos diagram a gyógyszerérzékenység relatív változását mutatja. A 9B. ábrán bemutatjuk az elkészített Antivirogramot (védjegy) is.

5. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (μM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref. (2)	(1)/(2) hányados
AZT	>100,000	ND	>100,000	0,291	>344
3TC	>100,000	>100,000	>100,000	16,670	>6
ddl	>100,000	>100,000	>100,000	4,757	>21
ddC	60,079	73,049	66,564	3,444	19
d4T	>100,000	>100,000	>100,000	12,030	>8
Loviride	0,064	0,058	0,061	0,065	0,9
Tivirapine	0,052	0,043	0,048	0,042	1

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a beteg egy olyan HIV-törzs fertőzte meg, amely minden nukleozidanalóg antiretrovirális gyógyszerrel szemben csökkent érzékenységet mutat. A nemnukleozid antiretrovirális gyógyszereket nem kellene kizárni a terápiából. Megfontolandó proteázinhibitorok bevonulásának lehetősége a terápiába.

#### 10. példa

55 Az 1. példában ismertetett technológia szerint meghatároztuk egy nemgyógyszerelt betegről levett plazma érzékenységét számos RT-inhibitorral szemben. Referencia-HIV-vírusként a rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtuk. A 6. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (μM) és az említett értékek hányadosát mutatja. A 10A. ábrán látható oszlopos diagram a gyógyszerérzékenység relatív változását ábrázolja. A 10B. ábrán bemutatjuk az elkészített Antivirogramot (védjegy) is.

6. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref. (2)	(1)/(2) hányados
AZT	0,019	0,019	0,019	0,041	0,5
3TC	1,525	1,718	1,622	4,608	0,4
Saquinavir	0,003	0,003	0,003	0,006	0,4
Ritonavir	0,022	0,017	0,019	0,033	0,6
Indinavir	0,013	0,013	0,013	0,016	0,8

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a beteg 15 olyan HIV-törzsekkel fertőződött, amelyek nagymértékben hasonlóak a vad típusú HIV-hez. Nem zárandó ki egyetlen gyógyszertípus sem, tehát a kemoterápia megkezdhető egy olyan gyógyszerrel, mint az AZT, 3TC vagy mások, amelyek pozitív előzménnyel (track record) rendelkeznek. 20

## 11. példa

Egy HIV-fertőzött betegről – akinél a terápiás előzményben RT- és proteázinhibitorok szerepeltek – levett 25

plazma érzékenységét számos RT-inhibitorral szemben, az 1. példában ismertetett technológia szerint határoztuk meg. Referencia-HIV-vírusként a rekombináns vad típusú HIV-reclIIB törzset használtuk. A 7. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (µM) és az említett értékek hányadosát tartalmazza. A 11A. ábrán látható oszlopos diagram a gyógyszerérzékenység relatív változását mutatja. A 11B. ábrán bemutatjuk az elkészített Antivirogramot (védjegy) is.

7. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref. (2)	(1)/(2) hányados
AZT	ND	0,015	0,015	0,047	0,3
3TC	>100,000	93,962	96,981	5,178	19
Saquinavir	0,014	0,015	0,014	0,012	1
Ritonavir	1,198	1,739	1,468	0,062	24
Indinavir	0,229	0,416	0,323	0,027	12

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a beteg 40 egy olyan HIV-törzssel fertőzött, amely a 3TC RT-inhibitorral és az indinavir és ritonavir proteázinhibitorral szemben csökkent érzékenységet mutat. Ennek megfelelően a kemoterápia olyan gyógyszerekkel végezhető, mint az AZT vagy saquinavir, amelyek pozitív előzménnyel rendelkeznek. 45

## 12. példa

Egy HIV-fertőzött betegről – akinél a terápiás előzményben RT- és proteázinhibitorok szerepeltek – el-

vett plazma számos inhibitorral szembeni érzékenységét az 1. példában leírt technológia szerint határoztuk meg. A 8. táblázat a mért IC<sub>50</sub>-értékeket (µM) és az említett értékek hányadosát tartalmazza. A 12A. ábrán látható oszlopos diagram relatív változást mutat a gyógyszerérzékenységben. A 12B. ábrán bemutatjuk az elkészített Antivirogramot (védjegy).

8. táblázat

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIIB ref. (2)	(1)/(2) hányados
AZT	3,833	3,355	3,594	0,041	88
3TC	>100,000	>100,000	>100,000	4,608	22

8. táblázat (folytatás)

Gyógyszer	Anti-HIV-1-aktivitás IC <sub>50</sub> (µM)				
	Vizsg. 1.	Vizsg. 2.	Középérték (1)	reclIB ref. (2)	(1)/(2) hányados
Saquinavir	0,350	0,352	0,351	0,006	56
Ritonavir	1,610	1,530	1,570	0,033	47
Indinavir	0,124	ND	0,124	0,016	8

Ezekből az adatokból megállapítható, hogy a beteg egy olyan HIV-törzzsel fertőzött, amely a 3TC és AZT RT-inhibitorral és az indinavir, zalcitabidin és saquinavir proteázinhibitorral szemben csökkent érzékenységet mutat.

## 13. példa

A fenotipizálás összevetése a genotipizálással

Plazmamintákat vettünk olyan HIV-fertőzött egyénektől, akik hosszan tartó nemnukleozid RT-inhibitor (NNRTI) monoterápiában részesültek. A HIV-RNS-t extraháltuk, reverz transzkripcióval átírtuk és felszorzoztuk az 1. példában leírtak szerint. A pozitív minták külső anyagából kiindulva, az RT-gén első 785 nukleotidját felszorzoztuk, és a továbbiakban ezt az anyagot használtuk genotipizáláshoz.

Röviden: a 785 nukleotidból álló fragmentumot ciklikus szekvenálási reakcióknak vettettük alá, a Thermo-

Sequenase (a ThermoSequenase egy védjegy) fluorescent labelled primer cycle sequencing kit és 7-deazadGTP (amersham, kat. szám: RPN2438) használatával. Négy szekvenálóprimert használtunk minden mintához, hogy mindkét irányban – az RT-gén 27. nukleotidjától a 681. nukleotidig – lehetővé váljék a szekvenáciameghatározás. A reakciókat egy ALF (az ALF egy védjegy) automata szekvenátorral (Pharmacia) analízáltuk. A képződött szekvenációkat egy Power Macintosh (védjegy) gépre vittük ki, és tovább analízáltuk a GeneWork (védjegy) 2.5 software (Oxford Molecular Group Inc.) segítségével. A kapott aminosavszekvenciókat a laboratóriumi HXB2D HIV-1-klón megfelelő szekvenációjával hasonlítottuk össze, és a betegmintákban azonosítottuk a rezisztenciával összefüggő mutációkat.

Az eredményeket a 9. táblázat tartalmazza, amelyben az egybetűs aminosavkódokat használtuk.

9. táblázat

P	Rezisztenciához társult mutációk														Rezisztencia foka			
	M 41	D 67	K 70	A 98	K 101	K 103	V 108	E 138	Y 181	M 184	G 190	T 215	K 219	AZT	3TC	NNRTI 1	NNRTI 2	
1						N								1	1	56	437	
2						S								1	0,4	102	53	
3						N								0,4	1	36	87	
4														0,3	0,1	1	0,4	
5														1	0,4	4	3	
6						N								1	0,3	103	245	
7						S								1	0,04	112	57	
8						N								1	1	30	81	
9									C					2	1	>1432	12	
10						N								0,4	0,1	53	172	
11	L	N	R			N				V		F	Q	94	>8	321	669	
12	L											Y		28	2	1	3	
13					E	K/N		A			G/A		NK	1	1	>1466	455	
14						N								1	1	93	349	
15						N								2	1	>2424	449	
16						N				V				1	>8	21	115	
17						N								1	1	29	102	
18						S								1	1	95	181	
19						N								1	1	78	260	

9. táblázat (folytatás)

P	Rezisztenciához társult mutációk													Rezisztencia foka			
	M 41	D 67	K 70	A 98	K 101	K 103	V 108	E 138	Y 181	M 184	G 190	T 215	K 219	AZT	3TC	NNRTI 1	NNRTI 2
20				G										0,4	1	22	25
21						N								1	0,4	47	68
22							I							1	0,4	3	3
23						N								0,2	0,2	9	9
24					Q									1	1	7	59

B=beteg

NK=nem kimutatható

A 9. táblázat felső sora a vad típusú szekvenciában talált aminosavakat (AA) és pozíciójukat tartalmazza. A következő sorokban az egyes betegeknek ezekben a pozíciókban észlelt aminosavváltozások vannak feltüntetve. Csak azokat a pozíciókat mutatjuk, amelyeknél változást kaptunk a beteg anyagában. A 9. táblázat jobb oldali része a különböző RT-inhibitorokkal szembeni rezisztencia fokát tartalmazza, amelyet az egyes betegek mintáira vonatkozóan a találmány szerinti eljárással határoztunk meg. Az NNRTI 1 a betegeknek adott nemnukleozid RT-inhibítort jelenti. Az NNRTI 2 egy másik nemnukleozid inhibitor, amelynél bizonyos mértékű keresztreakciót észleltünk az egyessel.

A genotípezálás eredménye a nukleozidanalóg RT-inhibitorok rezisztenciáját illetően a következő:

- M41L, D67N, K70R, T215F/Y és K219Q/E AZT-rezisztenciával társult mutációk [B. Larder, S. Kemp, Science, 246, 1155–1158 (1989); P. Kellam et al., PNAS, 89, 1934–1938 (1992)]. Ezeknek a jelenléte – egyedül vagy különböző kombinációkban – a betegből izolált HIV genomjában a megszerkesztett Antivirogram (védjegy) által meghatározott fenotípusos rezisztenciával mutat összefüggést (11-es és 12-es beteg).
- Ugyanez vonatkozik a 3TC-vel szembeni rezisztenciára, amely az M184V mutációval van kapcsolatban [M. Tisdale, PNAS, 90, 5653–5656 (1993)], és ezt csak azokban a betegekben figyeltük meg, akik a gyógyszerrel szemben fenotípusos rezisztenciát mutattak (11-es és 16-os beteg).

A genotípezálás az NNRTI-k rezisztenciáját illetően a következőket eredményezte:

- Három betegnél (3-as, 4-es és 12-es beteg) nem volt NNRTI-rezisztenciához kapcsolódó mutáció,

és a gyógyszerrel szemben fenotípusos érzékenységet mutattak.

- Azoknál a betegeknek, akik az NNRTI-kkel szemben rezisztenciát mutattak, a 103-as pozícióban (K103N/S) NNRTI-rezisztenciával társult mutációt mutattunk ki.

Egy beteg (9-es), akinél Y181C NNRTI-rezisztenciához társult mutációt mutattunk ki, jelentős fenotípusos rezisztenciát (>1432-szeres) mutatott.

- A 13-as betegnél számos NNRTI-rezisztenciához társult mutációt (K101E, K103N részleges és G190A részleges) észleltünk. Ez a beteg az NNRTI 1 ellen is jelentős fenotípusos rezisztenciát (>1466-szoros) mutatott. A mintában kimutatott E138A mutáció eddig nem függött össze rezisztenciával. Azonban ugyanebben a pozícióban egy másik mutációról, az E138K-ról kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a TSAO-vegyületekkel szembeni rezisztenciában [J. Balzarini et al., PNAS, 90, 6952–6956 (1993)]. Az E138A mutáció szerepét még tisztázni szükséges.

- A 20-as betegnél, aki fenotípusos rezisztenciát mutatott a tesztelt NNRTI-kkel szemben, az A98G NNRTI-rezisztenciához társult mutáció fordult elő.

- A 22-es betegnél a V108I NNRTI-rezisztenciához társult mutáció fordult elő, de a tesztelt NNRTI-kkel szemben nem mutatott fenotípusos rezisztenciát.

- A 24-es betegnél nem találtunk NNRTI-rezisztenciához társult mutációt (a K101Q mutációt számos vad típusú HIV-1 genomjában kimutatták), de fenotípusos rezisztenciát mutatott a tesztelt NNRTI-kkel szemben.

## SZEKVENCIAJEGYZÉK

Az 1. számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői
  - A. Hosszúság: 33 bázispár
  - B. Típus: nukleinsav
  - C. Számtípus: egyszálú
  - D. Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: CDNS

- (iii) Hipotetikus: nem
- (vi) Eredeti származás
  - A. Organizmus: Humán immunelégztelenség-vírus, típus: 1
- (xi) A szekvencia leírása: 1. sz. szekvencia

CATTGCTCTC CAATTACTGT GATATTTCTC ATG

A 2. számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői
  - A. Hosszúság: 26 bázispár
  - B. Típus: nukleinsav
  - C. Száltípus: egyszálú
  - D. Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Hipotetikus: nem
- (vi) Eredeti származás
  - A. Organizmus: Humán immunelégztelenség-vírus, típus: 1
- (xi) A szekvencia leírása: 2. sz. szekvencia

GGGAAGATCT GGCCTTCCTA CAAGGG

A 3. számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői
  - A. Hosszúság: 24 bázispár
  - B. Típus: nukleinsav
  - C. Száltípus: egyszálú
  - D. Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Hipotetikus: nem
- (vi) Eredeti származás
  - A. Organizmus: Humán immunelégztelenség-vírus, típus: 1
- (xi) A szekvencia leírása: 3. sz. szekvencia

GCCCCTAGGA AAAAGGGCTG TTGG

A 4. számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői
  - A. Hosszúság: 24 bázispár
  - B. Típus: nukleinsav
  - C. Száltípus: egyszálú
  - D. Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Hipotetikus: nem
- (vi) Eredeti származás
  - A. Organizmus: Humán immunelégztelenség-vírus, típus: 1
- (xi) A szekvencia leírása: 4. sz. szekvencia

TGAAAGATTG TACTGAGAGA CAGG

Az 5. számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői
  - A. Hosszúság: 24 bázispár
  - B. Típus: nukleinsav
  - C. Száltípus: egyszálú
  - D. Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Hipotetikus: nem
- (vi) Eredeti származás
  - A. Organizmus: Humán immunelégztelenség-vírus, típus: 1

(xi) A szekvencia leírása: 5. sz. szekvencia

GATATTTCTC ATGTTTCATCT TGGG

A 6. számú szekvencia adatai

- (i) A szekvencia jellemzői
  - A. Hosszúság: 24 bázispár
  - B. Típus: nukleinsav
  - C. Száلتípus: egyszálú
  - D. Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Hipotetikus: nem
- (vi) Eredeti származás
  - A. Organizmus: Humán immunelégtelesség-vírus, típus: 1
- (xi) A szekvencia leírása: 6. sz. szekvencia

AGGTGGCAGG TTAAAATCAC TAGC

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *In vitro* eljárás HIV-pozitív betegek kemoterápiájának meghatározására, *azzal jellemezve*, hogy egy betegből származó biológiai anyag-mintából vírus-RNS-t izolálunk és a HIV-pol-gén egy kivánt szakaszát reverz transzkripcióval átírjuk,

a kapott szekvenciával és egy HIV-DNS-szerkezettel, amelyből az említett szekvenciát töröltük, egy HIV-fer-tőzésre fogékony sejtvonalat transzfektálunk, a transzfektált sejtek tenyésztésével kiméravírusok egy állapotját állítjuk elő,

meghatározzuk a kiméravírusok fenotípusos érzékenységet a HIV-pol-gén által kódolt enzim egy inhibitorával szemben, és erre meghatározunk egy értéket, készítünk egy adatsort, amely a kiméravírusra megá-lapított érzékenység értékét és egy kiméra vad típusú HIV-törzs megfelelő értékét tartalmazza, legalább két további inhibitorral szemben megismétel-jük az érzékenységi vizsgálatot, az adatsorokat kétdimenziós vagy háromdimenziós grafikus formában ábrázoljuk, a grafikus ábrázolás alapján kiválasztjuk az optimális inhibitor(oka)t.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az adatsort sokszögű, vagy kvázi kör alakú grafi-konon ábrázoljuk, amelyben

(a) egy középpontból (origóból) több normalizált ten-gely indul ki, mindegyik tengely egy adatsornak vagy in-hibitornak, vagy ezek kombinációjának felel meg;

(b) a tengelyek normalizálását úgy végezzük, hogy a vad típusú HIV érzékenységi értékeit a különböző inhi-bitorokkal szemben minden tengelyen egyenlőnek tün-tetjük fel, adott esetben ábrázoljuk a vad típusú HIV-re vo-natkozó adatpontokat, és összekötve szabályos sokszö-get képezünk, amelynek a csúcsai a tengelyeken van-nak, és középpontját az origó határozza meg;

(c) minden tengelyre felvisszünk egy olyan adatpon-tot, amely a kiméra-HIV-állománynak az említett ten-

gelynek megfelelő inhibitorral szembeni érzékenységet jeleníti meg, a kiméraadatpontokat adott esetben összekötjük, a kapott szabályos vagy szabálytalan sok-szög alakja a kiméraállomány rezisztenciáját ábrázolja egy sor inhibitorral szemben.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tengelyeken logaritmusos lépték van.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a három vagy több adatsor tar-talmaz még egy értéket a szóban forgó inhibitornál a legrosszabb esetben mérhető rezisztenciára.

5. Eljárás HIV-pozitív betegek HIV-kemoterápiájá-nak meghatározására, *azzal jellemezve*, hogy tartal-mazza a következő lépéseket:

(a) időszakosan megállapítjuk egy beteg HIV-tör-zsének a fenotípusos érzékenységet az 1–4. igénypon-tok bármelyike szerinti;

(b) a kemoterápiának a kiválasztott inhibitorral való fenntartására vonatkozó instrukciót adunk, ameddig a beteg HIV-törzsei érzékenyek maradnak a választott kemoterápiára;

(c) másik inhibitorra választunk, ha és amikor az ere-deti inhibitorral szembeni érzékenység csökken.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kiméravírusoknak legalább két – HIV-pol-gén által kódolt – enziminhibitorával szembeni érzékenységét egyszerre határozzuk meg.

7. Eljárás egy betegben lévő egyedi HIV-törzsek legalább két – HIV-gén által kódolt – enziminhibitorával szembeni gyógyszerérzékenységének a meghatározá-sára, *azzal jellemezve*, hogy egy betegből származó biológiai anyag-mintából vírus-RNS-t izolálunk, és a HIV-pol-gén egy kivánt szakaszát reverz transzkripcióval átírjuk,

a kapott szekvenciával és egy HIV-DNS-szerkezettel – amelyből az említett szekvenciát töröltük – egy HIV-fer-tőzésre fogékony sejtvonalat transzfektálunk, a transzfektált sejtek tenyésztésével kiméravírusok egy állapotját állítjuk elő,



meghatározzuk a kiméravírusok fenotípusos érzékenységet a HIV-pol-gén által kódolt enzimek inhibitoraival szemben.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biológiai anyagot a következők közül választjuk: plazma, szérum, sejtmentes testfolyadék, például mag- és hüvelyfolyadék.

9. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy biológiai anyagként teljes vért alkalmazunk, amelyhez RNS-stabilizátort adtunk.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy biológiai anyagként szövetet alkalmazunk, amely lehet agyszövet vagy nyirokmirigyszövet.

11. A 7–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HIV-RT, -proteáz és -integráz közül legalább két enzimet választunk ki.

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HIV-fertőzésre fogékony sejtvonalaként egy CD4<sup>+</sup> T-sejtvonalat alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy CD4<sup>+</sup> T-sejtvonalaként MT34 sejtvonalat vagy HeLa CD4<sup>+</sup> sejtvonalat alkalmazunk.

14. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a beteg pol-génjének kívánt szakaszát reverz transzkripcióval, egy specifikus 3' primer használatával írjuk át.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reverz transzkriptázt és proteázt kódoló szekvenciát írjuk át reverz transzkripcióval.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3' primerként a következőt alkalmazzuk: OUT3: 5'-CAT TGC TCT CCA ATT ACT GTG ATA TTT CTC ATG-3' (1. számú szekvencia).

17. A 14–16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reverz transzkripció ter-

mékét „fészkes” PCR- (nested PCR) technikával sokszorozzuk fel.

18. Az 1–17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HIV-DNS-szerkezet egy olyan szerkezet, amelyből az RT- és a proteázgént töröltük, és ez az 1996. november 8-án a Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – BCCM LMBP – Collection intézményben, LMBP3590 számon letétbe helyezett pGEMT3-ΔPRT plazmid.

19. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a transzfekeiót elektroporációval végezzük.

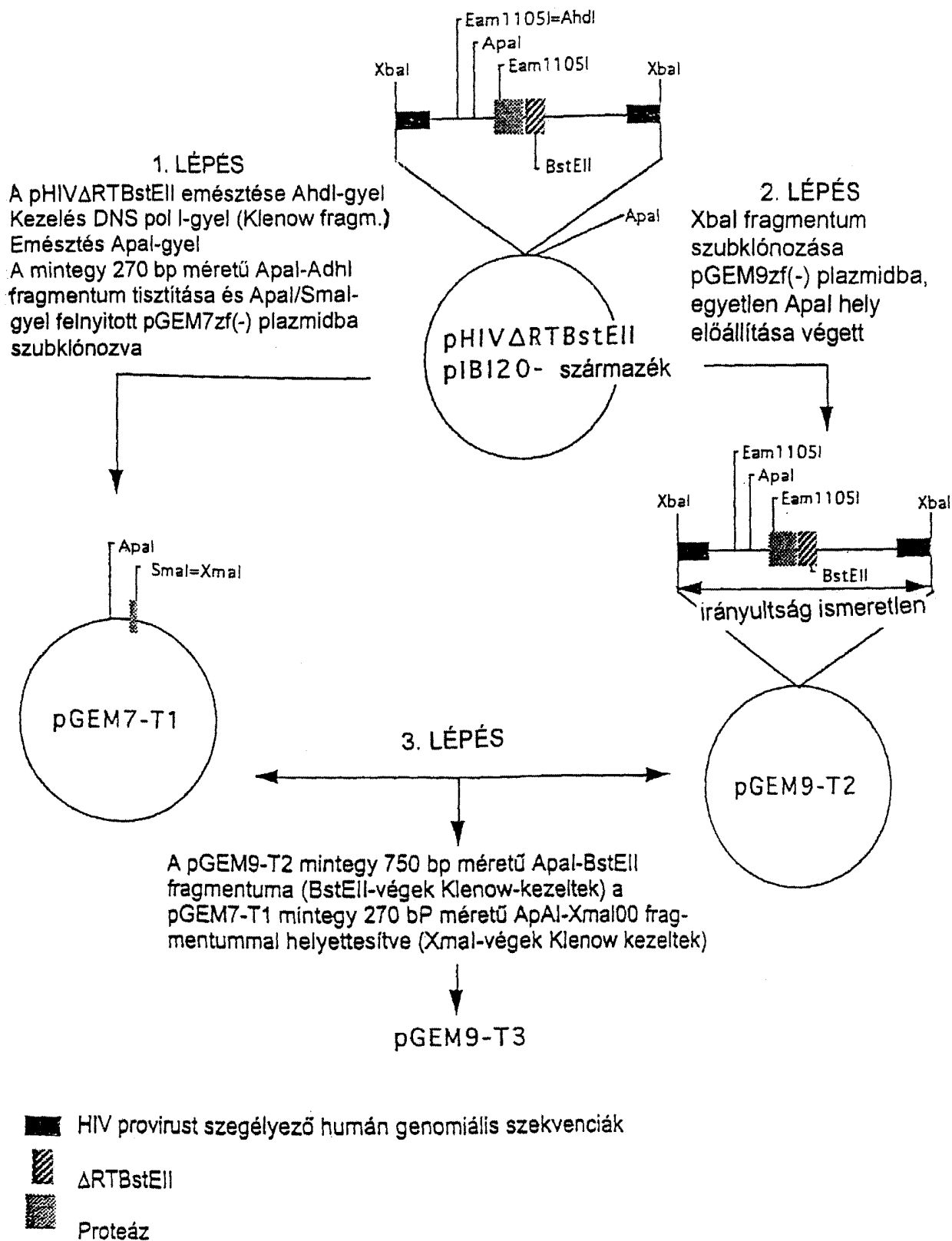
20. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a transzfekeiót kationos lipidek használatával végezzük.

21. Az 1–20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kiméravírusoknak a különböző RT-, proteáz- és integrázinhibitorokkal szembeni fenotípusos gyógyszerérzékenységet automatizált, sejtre alapozott assay-ben határozzuk meg.

22. Az 1–21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kiméravírusoknak és a vad típusú HIV-törzsnek egy vagy több RT-, proteáz- vagy integrázinhibitorral szembeni fenotípusos gyógyszerérzékenységet gátló koncentrációként (IC érték) fejezzük ki.

23. Az 1–22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az RT-inhibitorokat a nukleozid RT-inhibitorok közül – ilyenek az AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T – a nemnukleozid RT-inhibitorok közül – ilyenek a loviride, nevirapine és tivrapiine – választjuk ki, a proteázinhibitorokat a sasquinavir, indinavir és ritonavir közül választjuk, és az integrázinhibitorok közül, például a koffeinsav fenil-etil-észter (CAPE) választjuk.

1. ábra



2. ábra

**1. LÉPÉS**

5'-GACNNN/NGTC (AhdI felismerő hely és hasítási hely)

5'-GACCCC/TCGTC (AhdI hely a proteáz kódoló szakasz elején)

AhdI hasítás  
3'-túlnyúló 1-nukleotid eltávolítása DNA polimeráz I  
(Klenow fragment) kezeléssel

5'-GACCC ←————→ 5'-CCC/CGG (SmaI)

tompá végek ligálása helyre-  
állítja a SmaI véget

**3. LÉPÉS**

5'-GAC/CCGGG

5'-G/GTNACC (BstEII)

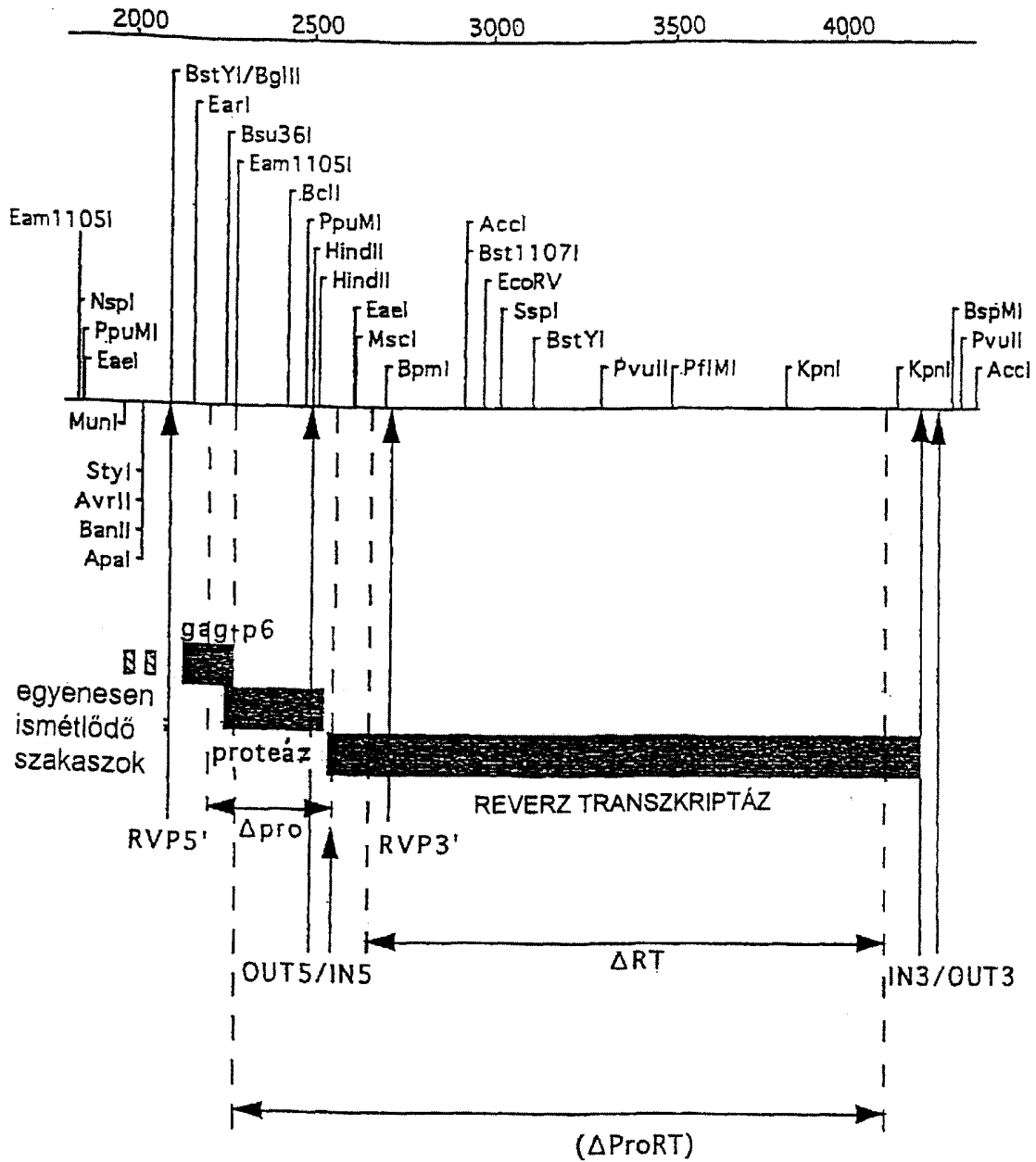
5'-G/GTGACC (BstEII a ΔRT-klónban)

A helyreállított SmaI felismerő hely hasítása XmaI-  
gyel (egy 4-nukleotid túlnyúló vég előállítása) és át-  
alakítása tompa véggé DNS polimeráz I-gyel (Kle-  
now fragment)  
A pGEM9-T2 BstEII-vel emésztett recipiens vektort  
is kezeljük DNS pol. I-gyel (Klenow fragment) Apal-  
gyel való kezelés előtt

GACCCGG ←————→ GTGACC

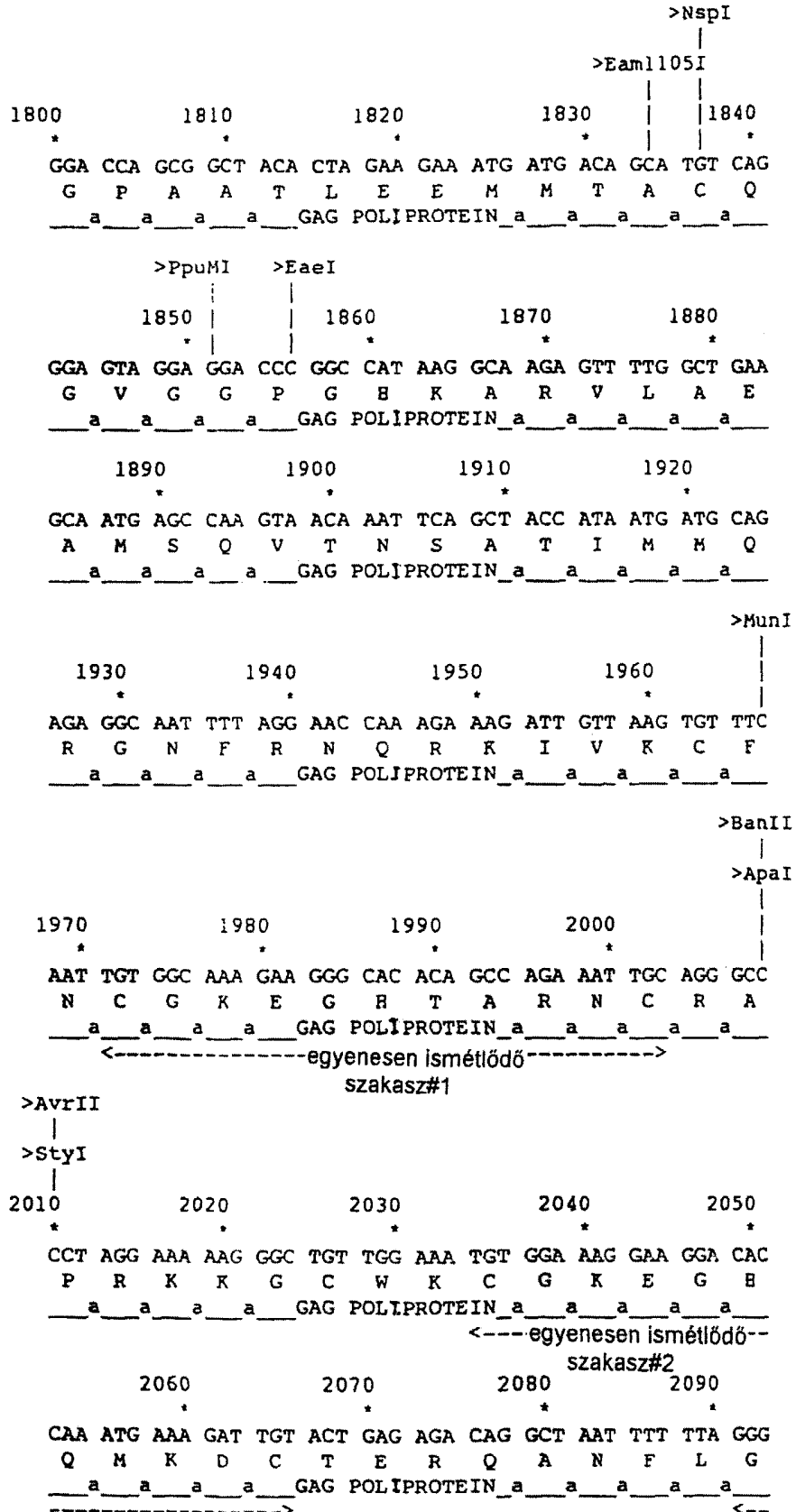
A GACCCgggtgACC (az aláhúzott kódon a P9 a proteázban)  
A ΔProRT junkciónál van egy SmaI/XmaI és egy BstEII hely  
A ΔProRT junkciónál lévő "idegen szekvenciákat" kisbetűkkel jeleztük

3. ábra

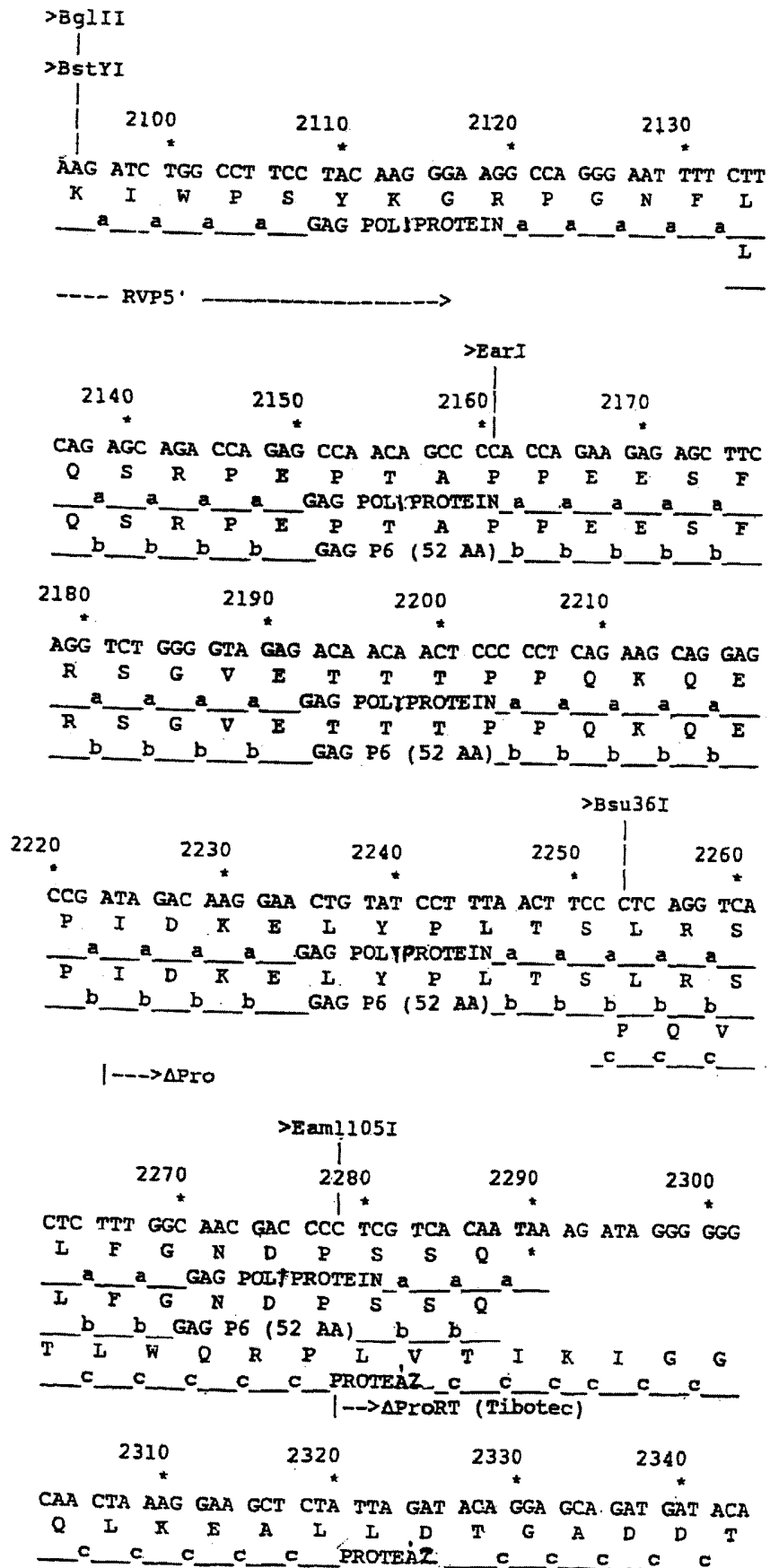


## HXB2 (szekvencia részlet:1880-4400)

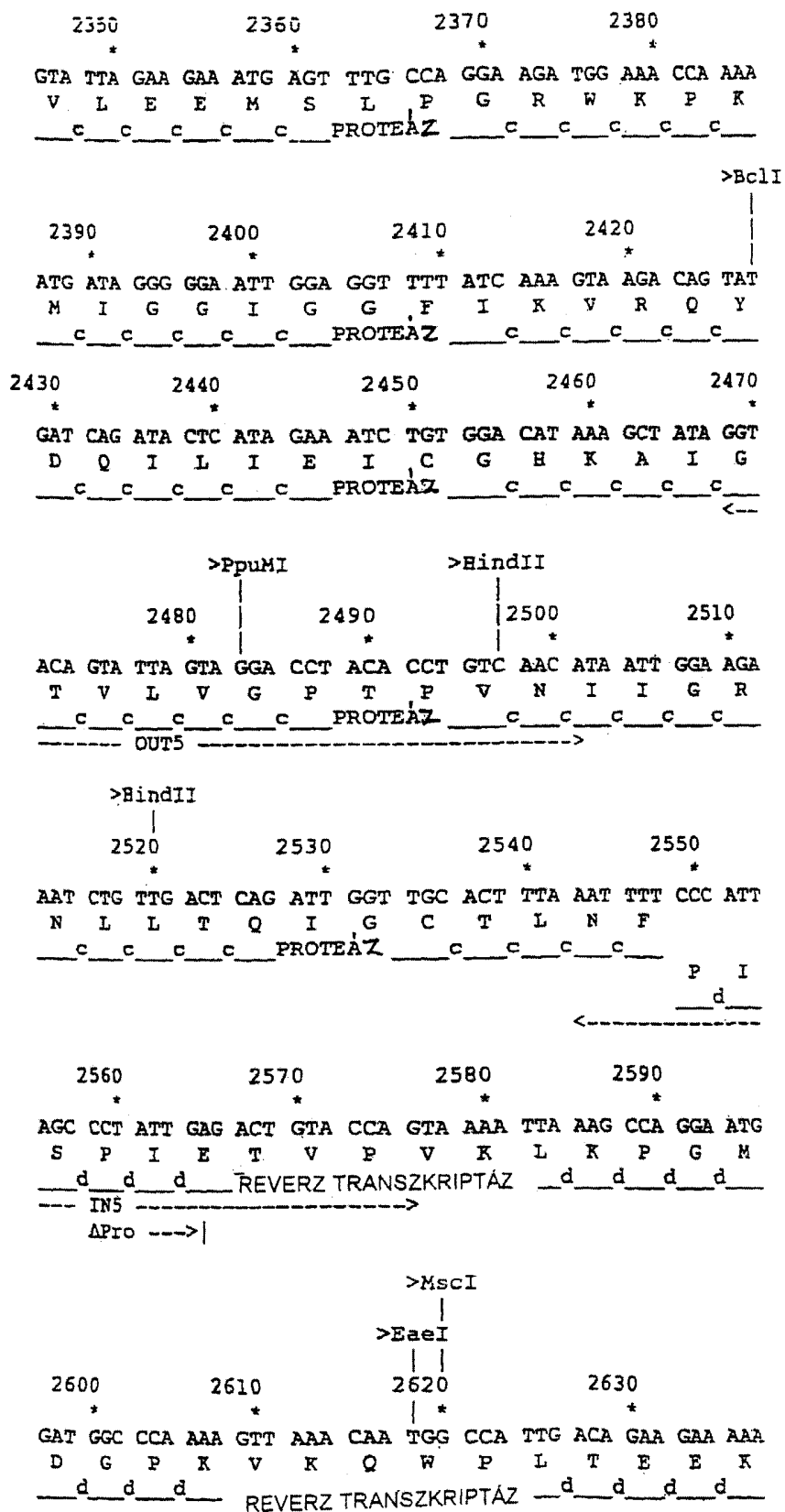
4A. ábra



4B. ábra



4C. ábra



4D. ábra

2640                    2650                    2660                    2670                    2680  
 \*                    \*                    \*                    \*                    \*  
 ATA AAA GCA TTA GTA GAA ATT TGT ACA GAG ATG GAA AAG GAA  
 I K A L V E I C T E H E K E  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_  
 |---->ΔRT

>BpmI

                  2690                    2700                    2710                    2720  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 GGG AAA ATT TCA AAA ATT GGG CCT GAA AAT CCA TAC AAT ACT  
 G K I S K I G P E N P Y N T  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

                  2730                    2740                    2750                    2760  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 CCA GTA TTT GCC ATA AAG AAA AAA GAC AGT ACT AAA TGG AGA  
 P V F A I K K K D S T K W R  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

                  2770                    2780                    2790                    2800  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 AAA TTA GTA GAT TTC AGA GAA CTT AAT AAG AGA ACT CAA GAC  
 K L V D F R E L N K R T Q D  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

                  2810                    2820                    2830                    2840  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 TTC TGG GAA GTT CAA TTA GGA ATA CCA CAT CCC GCA GGG TTA  
 F W E V Q L G I P E P A G L  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

2850                    2860                    2870                    2880                    2890  
 \*                    \*                    \*                    \*                    \*  
 AAA AAG AAA AAA TCA GTA ACA GTA CTG GAT GTG GGT GAT GCA  
 K K K K S V T V L D V G D A  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

>Bst1107I

>AccI

                  2900                    2910                    2920                    2930  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 TAT TTT TCA GTT CCC TTA GAT GAA GAC TTC AGG AAG TAT ACT  
 Y F S V P L D E D F R K Y T  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

                  2940                    2950                    2960                    2970  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 GCA TTT ACC ATA CCT AGT ATA AAC AAT GAG ACA CCA GGG ATT  
 A F T I P S I N N E T P G I  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_

>EcoRV

                  2980                    2990                    3000                    3010  
 \*                    \*                    \*                    \*  
 AGA TAT CAG TAC AAT GTG CTT CCA CAG GGA TGG AAA GGA TCA  
 R Y Q Y N V L P Q G W K G S  
 \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_ REVERZ TRANSZKRIPTÁZ \_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_d\_\_\_



4E. ábra

>SspI  
3020 \* 3030 \* 3040 \* 3050 \*  
CCA GCA ATA TTC CAA AGT AGC ATG ACA AAA ATC TTA GAG CCT  
P A I F Q S S M T K I L E P  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3060 \* 3070 \* 3080 \* 3090 \* 3100 \*  
TTT AGA AAA CAA AAT CCA GAC ATA GTT ATC TAT CAA TAC ATG  
F R K Q N P D I V I Y Q Y M  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

>BstYI  
3110 \* 3120 \* 3130 \* 3140 \*  
GAT GAT TTG TAT GTA GGA TCT GAC TTA GAA ATA GGG CAG CAT  
D D L Y V G S D L E I G Q B  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3150 \* 3160 \* 3170 \* 3180 \*  
AGA ACA AAA ATA GAG GAG CTG AGA CAA CAT CTG TTG AGG TGG  
R T K I E E L R Q H L L R W  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3190 \* 3200 \* 3210 \* 3220 \*  
GGA CTT ACC ACA CCA GAC AAA AAA CAT CAG AAA GAA CCT CCA  
G L T T P D K K H Q K E P P  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3230 \* 3240 \* 3250 \* 3260 \*  
TTC CTT TGG ATG GGT TAT GAA CTC CAT CCT GAT AAA TGG ACA  
F L W M G Y E L H P D K W T  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

>PvuII  
3270 \* 3280 \* 3290 \* 3300 \* 3310 \*  
GTA CAG CCT ATA GTG CTG CCA GAA AAA GAC AGC TGG ACT GTC  
V Q P I V L P E K D S W T V  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3320 \* 3330 \* 3340 \* 3350 \*  
AAT GAC ATA CAG AAG TTA GTG GGG AAA TTG AAT TGG GCA AGT  
N D I Q K L V G K L N W A S  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3360 \* 3370 \* 3380 \* 3390 \*  
CAG ATT TAC CCA GGG ATT AAA GTA AGG CAA TTA TGT AAA CTC  
Q I Y P G I K V R Q L C K L  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

4F. ábra

3400                    3410                    3420                    3430  
\*                    \*                    \*                    \*  
CTT AGA GGA ACC AAA GCA CTA ACA GAA GTA ATA CCA CTA ACA  
L R G T K A L T E V I P L T  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3440                    3450                    3460                    3470  
\*                    \*                    \*                    \*  
GAA GAA GCA GAG CTA GAA CTG GCA GAA AAC AGA GAG ATT CTA  
E E A E L E L A E N R E I L  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

>PILMI

3480                    3490                    3500                    3510                    3520  
\*                    \*                    \*                    \*                    \*  
AAA GAA CCA GTA CAT GGA GTG TAT TAT GAC CCA TCA AAA GAC  
K E P V B G V Y Y D P S K D  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3530                    3540                    3550                    3560  
\*                    \*                    \*                    \*  
TTA ATA GCA GAA ATA CAG AAG CAG GGG CAA GGC CAA TGG ACA  
L I A E I Q K Q G Q G Q W T  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3570                    3580                    3590                    3600  
\*                    \*                    \*                    \*  
TAT CAA ATT TAT CAA GAG CCA TTT AAA AAT CTG AAA ACA GGA  
Y Q I Y Q E P F K N L K T G  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3610                    3620                    3630                    3640  
\*                    \*                    \*                    \*  
AAA TAT GCA AGA ATG AGG GGT GCC CAC ACT AAT GAT GTA AAA  
K Y A R M R G A E T N D V K  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3650                    3660                    3670                    3680  
\*                    \*                    \*                    \*  
CAA TTA ACA GAG GCA GTG CAA AAA ATA ACC ACA GAA AGC ATA  
Q L T E A V Q K I T T E S I  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3690                    3700                    3710                    3720                    3730  
\*                    \*                    \*                    \*                    \*  
GTA ATA TGG GGA AAG ACT CCT AAA TTT AAA CTG CCC ATA CAA  
V I W G K T P K F K L P I Q  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3740                    3750                    3760                    3770  
\*                    \*                    \*                    \*  
AAG GAA ACA TGG GAA ACA TGG TGG ACA GAG TAT TGG CAA GCC  
K E T W E T W W T E Y W Q A  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

3780                    3790                    3800                    3810  
\*                    \*                    \*                    \*  
ACC TGG ATT CCT GAG TGG GAG TTT GTT AAT ACC CCT CCC TTA  
T W I P E W E F V N T P P L  
\_d\_d\_d\_ REVERZ TRANZKRIPTÁZ \_d\_d\_d\_d\_

4G. ábra

>KpnI  
 |

3820	3830	3840	3850	
*	*	*	*	
GTG AAA TTA TGG TAC CAG TTA GAG AAA GAA CCC ATA GTA GGA				
V K L W Y Q L E K E P I V G				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
3860	3870	3880	3890	
*	*	*	*	
GCA GAA ACC TTC TAT GTA GAT GGG GCA GCT AAC AGG GAG ACT				
A E T F Y V D G A A N R E T				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
3900	3910	3920	3930	3940
*	*	*	*	*
AAA TTA GGA AAA GCA GGA TAT GTT ACT AAT AGA GGA AGA CAA				
K L G K A G Y V T N R G R Q				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
3950	3960	3970	3980	
*	*	*	*	
AAA GTT GTC ACC CTA ACT GAC ACA ACA AAT CAG AAG ACT GAG				
K V V T L T D T T N Q K T E				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
3990	4000	4010	4020	
*	*	*	*	
TTA CAA GCA ATT TAT CTA GCT TTG CAG GAT TCG GGA TTA GAA				
L Q A I Y L A L Q D S G L E				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
4030	4040	4050	4060	
*	*	*	*	
GTA AAC ATA GTA ACA GAC TCA CAA TAT GCA TTA GGA ATC ATT				
V N I V T D S Q Y A L G I I				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
4070	4080	4090	4100	
*	*	*	*	
CAA GCA CAA CCA GAT CAA AGT GAA TCA GAG TTA GTC AAT CAA				
Q A Q P D Q S E S E L V N Q				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
4110	4120	4130	4140	4150
*	*	*	*	*
ATA ATA GAG CAG TTA ATA AAA AAG GAA AAG GTC TAT CTG GCA				
I I E Q L I K K E K V Y L A				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	
ΔRT ---->				
ΔProRT (Tibotec) -->				
>KpnI 	4160	4170	4180	4190
	*	*	*	*
TGG GTA CCA GCA CAC AAA GGA ATT GGA GGA AAT GAA CAA GTA				
W V P A B K G I G G N E Q V				
__d__d__d__	REVERZ TRANZSKRIPTÁZ		__d__d__d__d__	

4H. ábra

```

      4200      4210      4220      4230
      *        *        *        *
GAT AAA TTA GTC AGT GCT GGA ATC AGG AAA GTA CTA TTT TTA
D  K  L  V  S  A  G  I  R  K  V  L  F  L
_d _d _d _d REVERZ TRANSZKRIPTÁZ : _d _d _d _d
<----- IN3 ----->

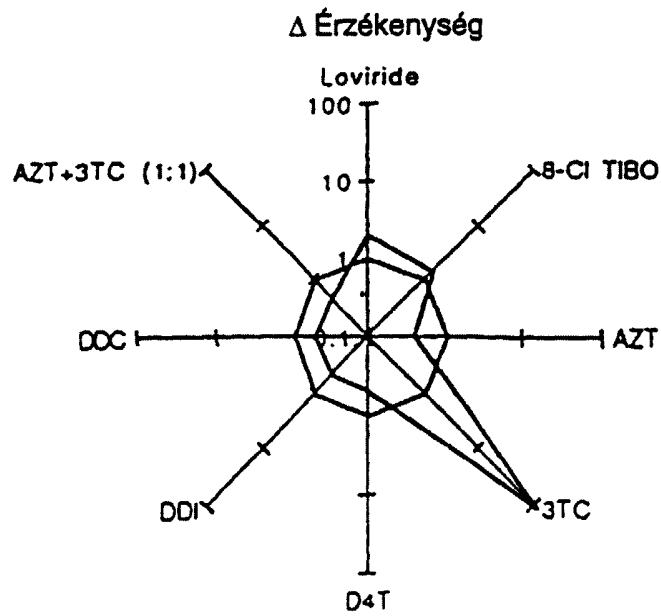
      4240      4250      4260      4270      4280
      *        *        *        *        *
GATGGA ATAGATAAGG CCCAAGATGA ACATGAGAAA TATCACAGTA
-----> <----- OUT3 ----->

                                     >BspMI
                                     |
      4290      4300      4310      4320      4330
      *        *        *        *        *
ATGGGAGAGC AATGGCTAGT GATTTTAACC TGCCACCTGT AGTAGCAAAA
----->

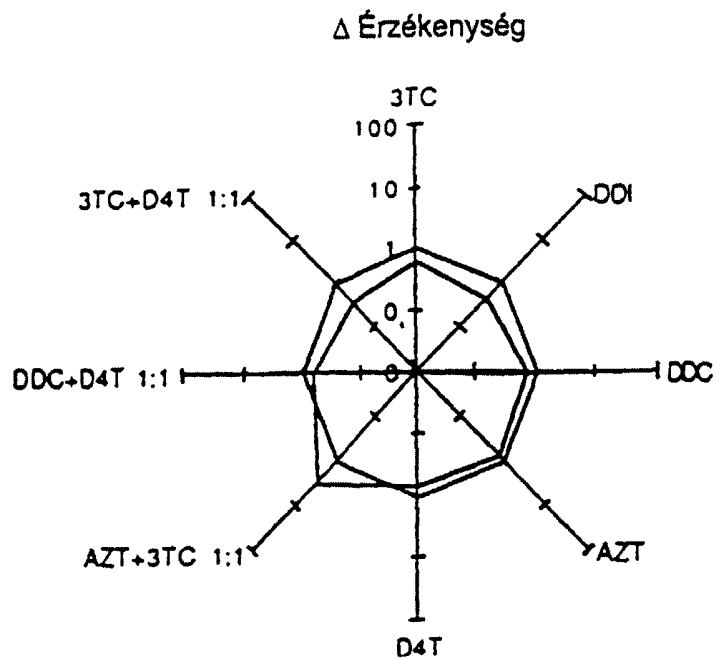
                                     >PvuII
                                     |
      4340      4350      4360      4370      4380
      *        *        *        *        *
GAAATAGTAG CCAGCTGTGA TAAATGTCAG CTAAAAGGAG AAGCCATGCA

                                     >AccI
                                     |
      4390      4400
      *        *
TGGACAAGTA GACTGTAGTC

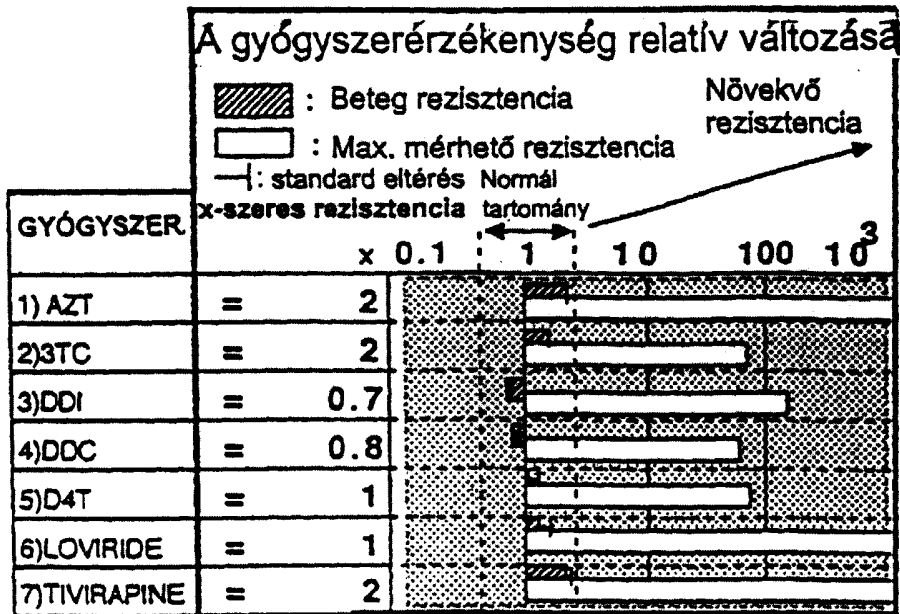
```



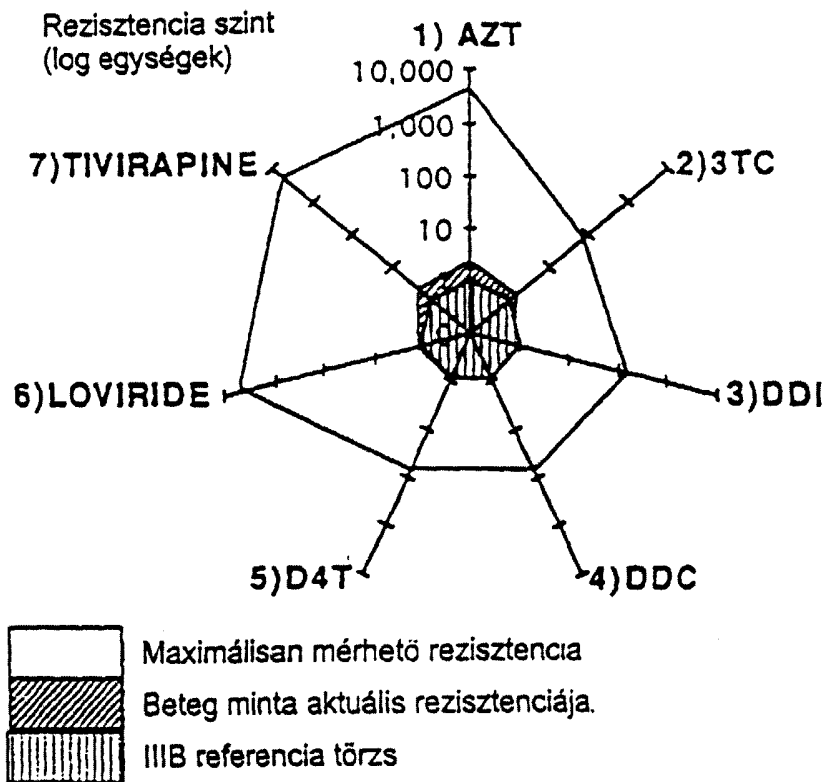
5. ábra



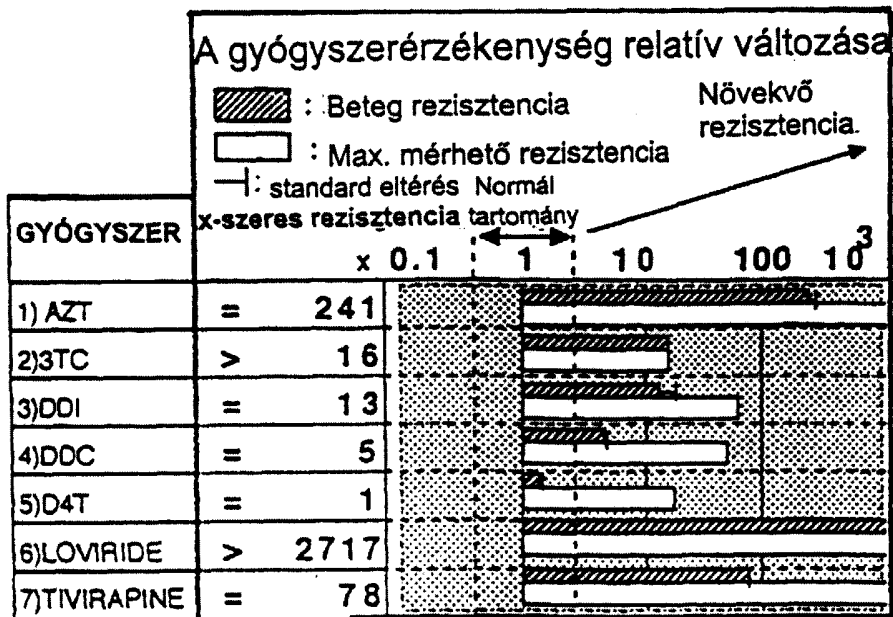
6. ábra



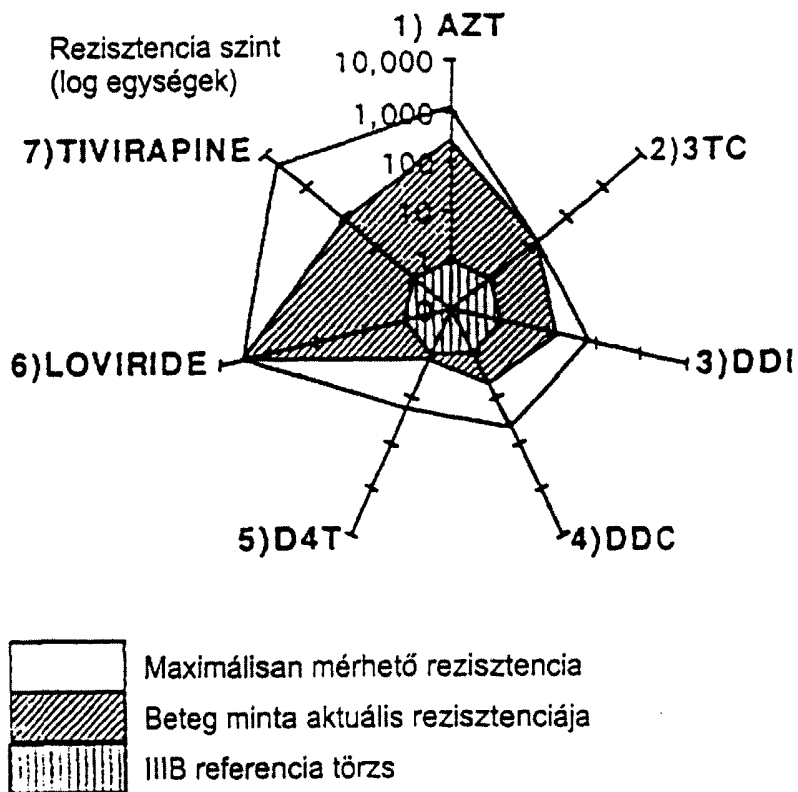
7A. ábra



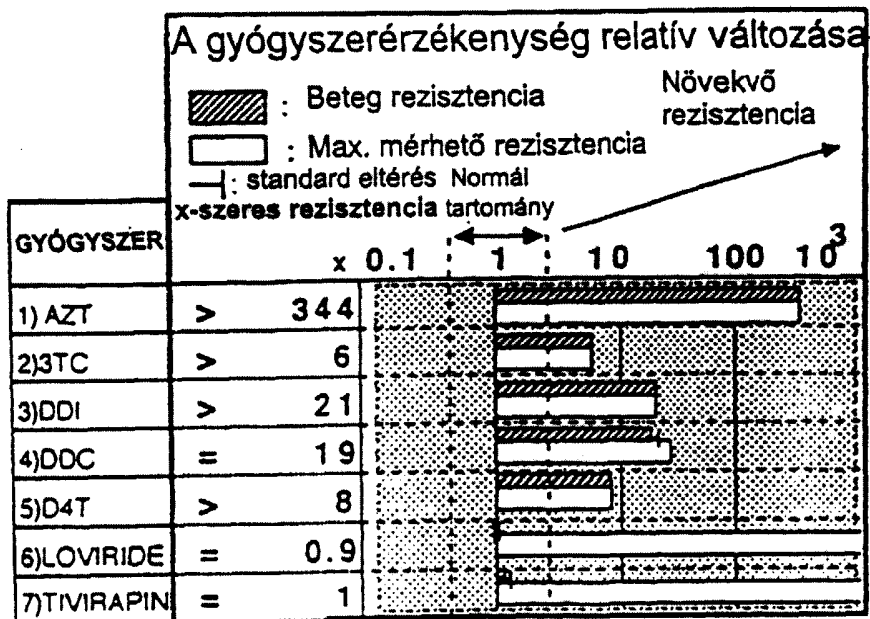
7B. ábra



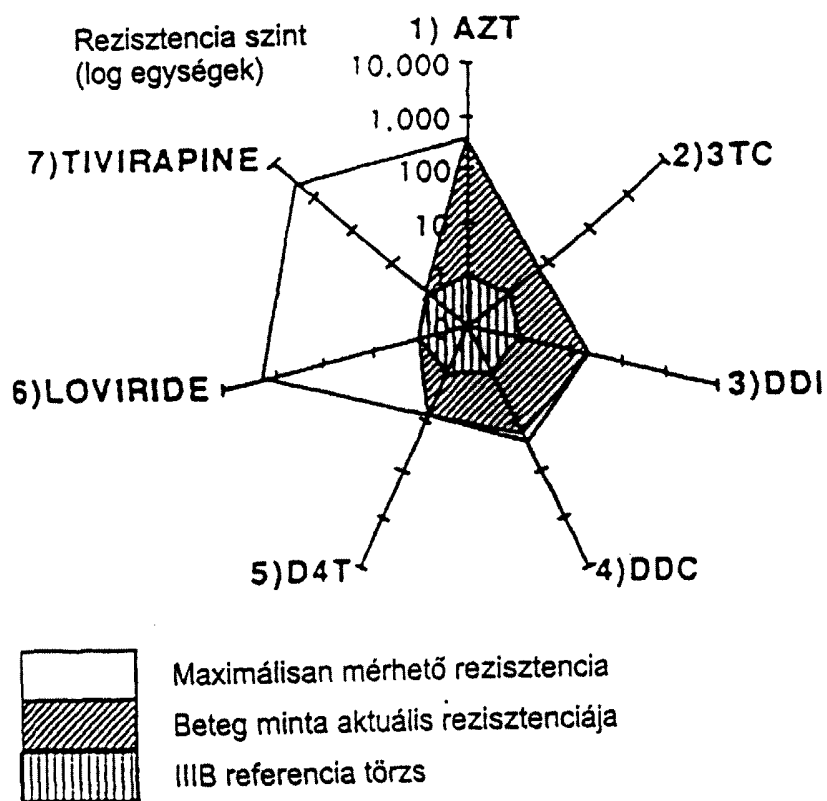
8A. ábra



8B. ábra

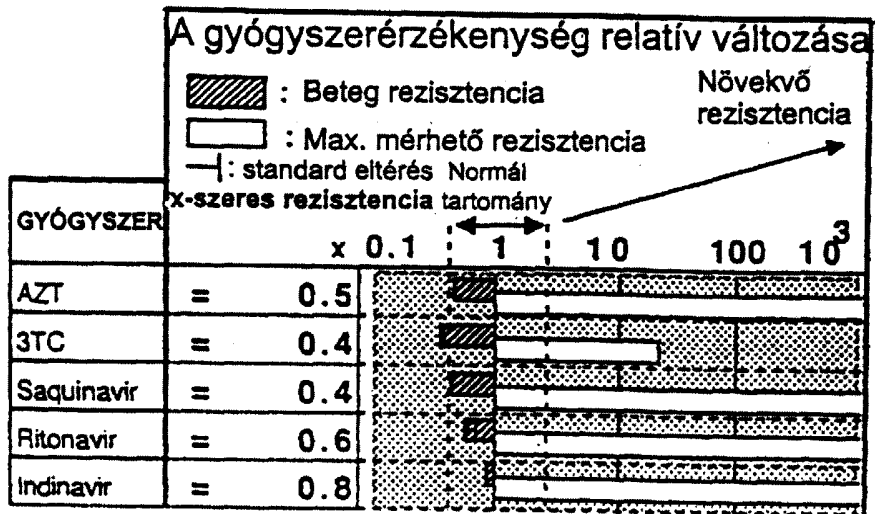


9A. ábra

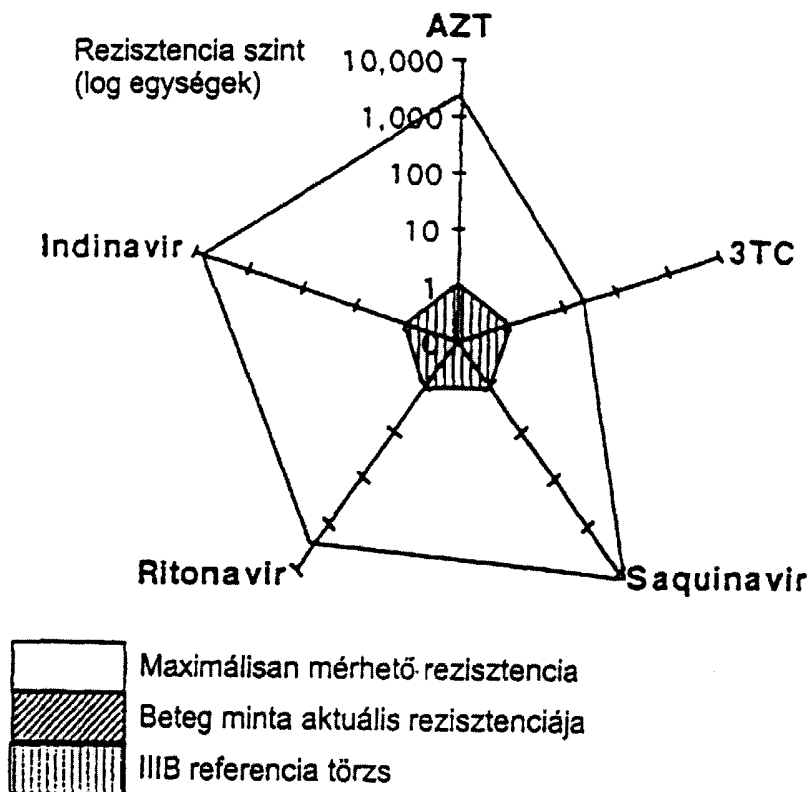


9B. ábra

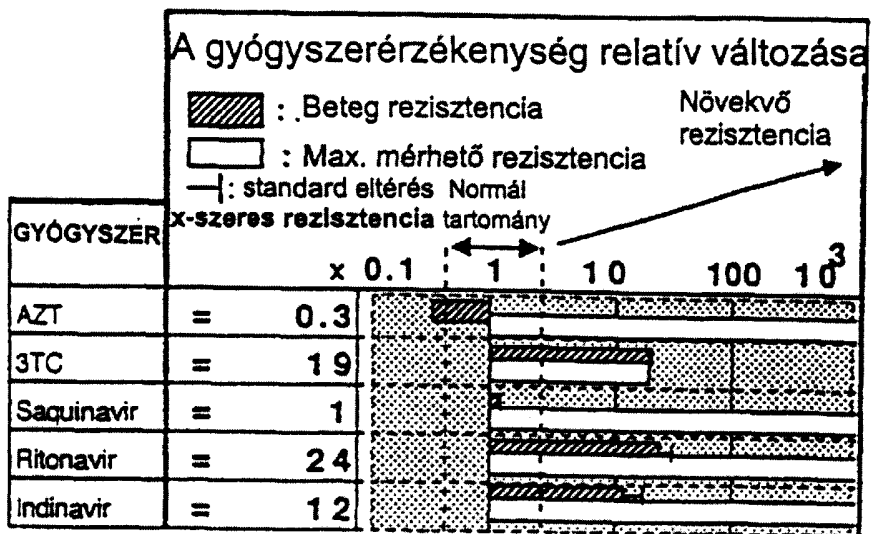




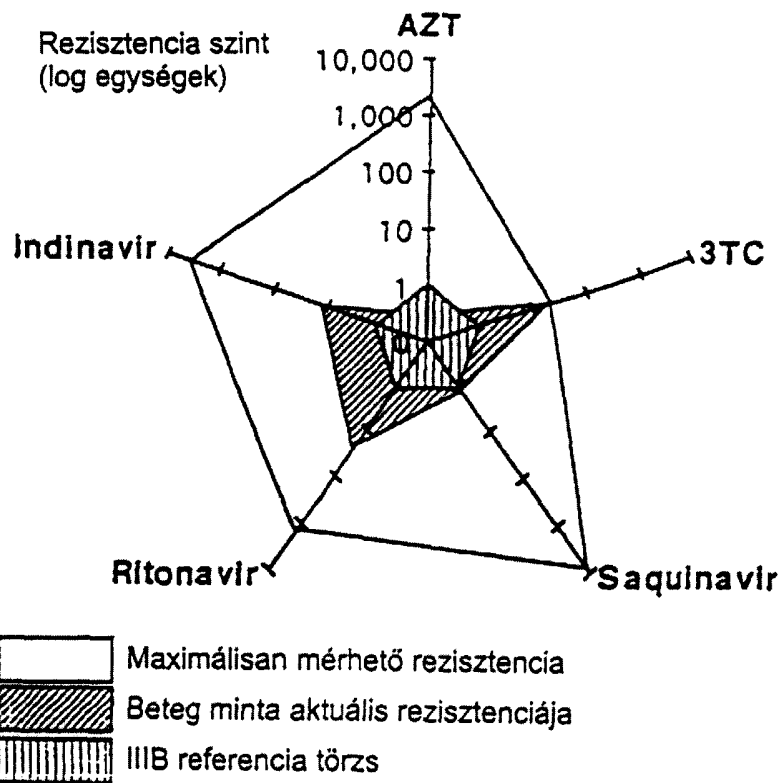
10A. ábra



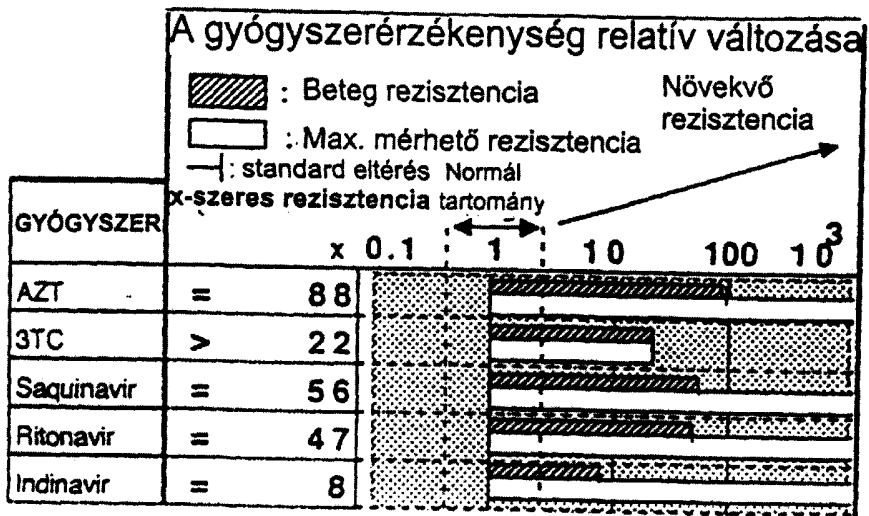
10B. ábra



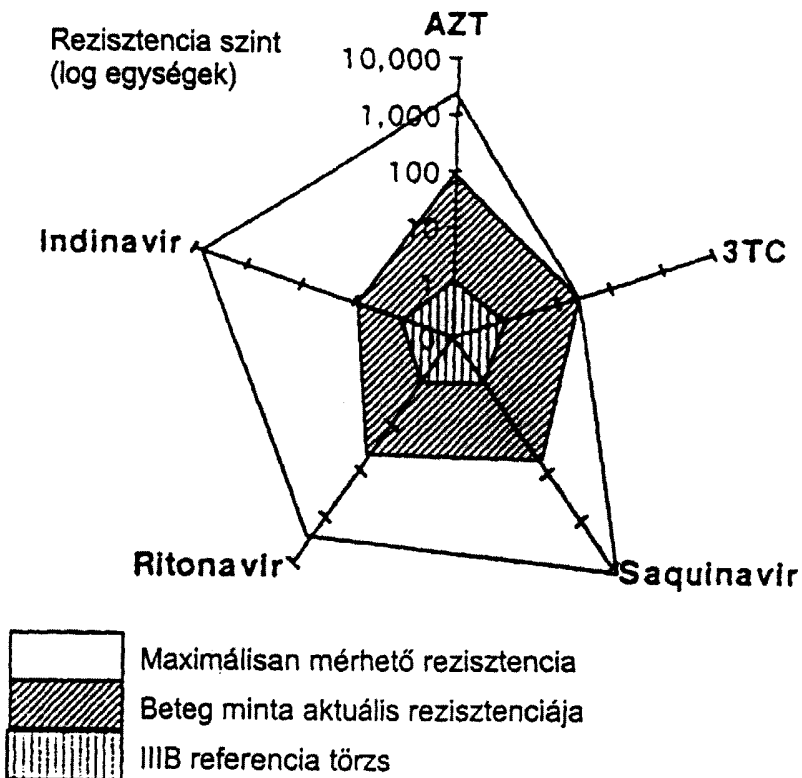
11A. ábra



11B. ábra



12A. ábra



12B. ábra