

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. November 2009 (19.11.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/138146 A2

- (15) Internationale Patentklassifikation: Nicht klassifiziert
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/001780
- (22) Internationales Anmeldedatum:
12. März 2009 (12.03.2009)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2008 024 010.9 16. Mai 2008 (16.05.2008) DE
10 2008 029 669.4 24. Juni 2008 (24.06.2008) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: **SCHLAAK, Jörg, Friedrich** [DE/DE]; Bon-
nenbergstrasse 5, 45259 Essen (DE).
- (74) Anwalt: **STREHLKE, Ingo, K.**; Gesthuysen, von Rohr
& Eggert, Huysenallee 100, 45128 Essen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

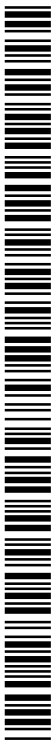
- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz
2 Buchstabe g)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5
Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: NOVEL THERAPEUTIC AGENTS AGAINST HEPATITIS

(54) Bezeichnung: NEUE THERAPEUTIKA FÜR DIE HEPATITIS-THERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to the treatment of hepatitis infections or hepatitis diseases, in particular hepatitis C. The invention more particularly relates to the use of an inhibitor and/or repressor of a nucleic acid molecule, especially gene, which is related to the proliferation and/or replication of hepatitis viruses, in particular hepatitis C viruses, in order to produce a medicament for preventing and/or curing hepatitis, in particular hepatitis C, as well as a pharmaceutical composition, preferably for preventing or treating hepatitis C diseases, said composition containing the repressor and/or inhibitor.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft das Gebiet der Behandlung von Hepatitis-Infektionen bzw. Hepatitis-Erkrankungen, insbesondere von Hepatitis Typ C. Insbesondere ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung eines Inhibitors und/oder Repressors eines mit der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder kurativen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C, sowie eine pharmazeutische Zusammensetzung, vorzugsweise für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen, welche den Repressor und/oder Inhibitor enthält.



WO 2009/138146 A2

Neue Therapeutika für die Hepatitis-Therapie

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, insbesondere in Form von Inhibitoren bzw. Repressoren, welche die Genaktivität eines mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Gens zu regulieren imstande sind, im Bereich der Diagnostik und Therapie von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C. Bei dem mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Zusammenhang stehenden Gen handelt es sich vorzugsweise um das humane interferonstimulierte Gen ISG15.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer die Genaktivität eines mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Gens unterbindenden bzw. inhibierenden oder zumindest herabsetzenden Substanz, insbesondere Inhibitors bzw. Repressors, zur Herstellung eines Medikamentes bzw. Arzneimittels zur prophylaktischen bzw. kurativen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines interferonstimulierten Gens, insbesondere ISG15, zur Auffindung bzw. Bereitstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen bzw. kurativen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C, und/oder zur Vorhersage von individuellen Arzneimittelwirkungen und/oder zur Vorhersage von Nebenwirkungen bzw. des Ansprechens von Arzneimitteln.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, insbesondere Inhibitoren bzw. Repressoren, welche die Genaktivität eines interferonstimulierten, insbesondere im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, stehenden Gens, vorzugsweise ISG15, regulieren bzw. ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, welche die Aktivität der entsprechenden Genprodukte bzw. von mit dem Gen im Zusammenhang stehenden Produkten regulieren. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein

Verfahren zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanzen.

5 Schließllich betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche zumindest eine auf Basis der erfindungsgemäßen Verfahren aufgefundene pharmakologisch aktive Substanz, insbesondere Inhibitor bzw. Repressor, enthält, wobei die Substanz die Genaktivität eines mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Zusammenhang stehenden Gens beeinflusst, insbesondere hemmt bzw. inhibiert; zudem betrifft
10 die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, vorzugsweise für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen, welche in wirksamen, insbesondere pharmazeutisch wirksamen Mengen mindestens eine siRNA enthält.

15 Die chronische Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) ist mit weltweit etwa 170 Millionen Infizierten ein globales Gesundheitsproblem. Bei einer Chronifizierungsrate von etwa 80 % stellt die Hepatitis Typ C eine der Hauptursachen für Hepatitis, Leberzirrhose und Leberzellkarzinome dar.

20 Das Hepatitis-C-Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae* und ist der einzige Vertreter des Genus der Hepaciviren. Das Hepatitis-C-Virus wurde ursprünglich den sogenannten NonA-NonB-Hepatitis-Viren zugeordnet, bis im Jahre 1989 die Sequenzierung des viralen Genoms gelang. Heute sind sechs Genotypen charakterisiert, die sich wiederum in Subtypen unterteilen. Die Infektion
25 mit dem Virus erfolgt in den meisten Fällen über eine Transfusion infizierter Blutkonserven, insbesondere in den siebziger Jahren, bzw. über Kanülenstichverletzungen beispielsweise beim Krankenhauspersonal. Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind der ungeschützte Geschlechtsverkehr und die Verwendung gemeinsamer Spritzen unter Drogenabhängigen. Die akute Infektion
30 verläuft meist asymptomatisch. In etwa 70 bis 80 % der Fälle kommt es dann zu einer chronischen Infektion der Leber, die im Verlauf zu einer Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom führen kann.

35 Als bislang effizienteste Therapie der chronischen Hepatitis Typ C wird im Stand der Technik Interferon (IFN), insbesondere α -Interferon (synonym auch als Interferon-alpha oder IFN- α bezeichnet, vorzugsweise pegyliertes IFN- α ,

gegebenenfalls in Kombination mit dem Virustatikum Ribavirin, angewendet. Abhängig vom Genotyp und anderen Faktoren führt diese Therapie nur in 50 bis 90 % der Patienten zu einer Ausheilung. Eine der häufigsten Nebenwirkungen dieser Therapie sind IFN-induzierte schwere Depressionen, welche neben der Verschlechterung der Lebensqualität zum Therapieabbruch oder gar zum Suizid führen können. Ein Impfstoff gegen das Hepatitis-C-Virus konnte bisher noch nicht entwickelt werden.

Interferone (IFN) sind niedermolekulare Proteine und werden zu den Zytokinen gezählt. Es wird zwischen Interferonen vom Typ-I und Interferonen vom Typ-II unterschieden. Die Interferone vom Typ-I kommen in monomerer Form vor und lassen sich in Superfamilien unterteilen, deren Hauptunterschied ihr Entstehungsort ist. Bei den Interferonen vom Typ-I machen IFN- α und IFN- β den größten Teil aus. Die Gruppe der α -Interferone läßt sich wiederum in eine Reihe von Subtypen unterteilen, die von unterschiedlichen Genen exprimiert werden. Sie entstehen größten Teils in Leukozyten und Fibroblasten, während IFN- β hauptsächlich von Endothelzellen und Fibroblasten produziert wird. Weiterhin zählen IFN- λ und IFN- ω zu den Interferonen vom Typ-I.

Die Expression der Interferone vom Typ-I wird durch die Erkennung von viralen aber auch bakteriellen pathogenen Mustern induziert. Sie werden von infizierten Zellen sezerniert und wirken sowohl parakrin auf benachbarte Zellen als auch autokrin auf die IFN-produzierende Zelle selbst. Die Bindung an den Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, die in der Induktion von interferonstimulierten Genen (ISGs) endet.

Die Wirkung von über 150 ISGs wird zusätzlich über eine Modifikation erhöht und ihre Leistung gesteigert. Das ISG15, ein 15 kD großes, IFN induziertes Protein, besitzt eine dem Ubiquitin ähnliche Domäne und wird über ein Set von Enzymen (E1 = Ube1L, E2 = UbcH8 und E3 = Herc5), wie bei der Ubiquitylierung, kovalent an die Zielproteine gebunden. In der Literatur nennt man diesen Prozeß auch ISGylierung. Die Enzyme E1, E2 und E3 werden ebenfalls durch Typ-I Interferone hochreguliert, was zu einer vermehrten ISGylierung führt und die Interferonantwort verstärkt. Gleichzeitig wird jedoch auch Usp18, die Protease, welche die ISGylierung wieder rückgängig macht,

induziert, was neben geringen Halbwertzeiten und mit weiteren negativ wirkenden Regulationsmechanismen zu einer zeitlichen Begrenzung der Wirkung von IFN führt.

5 Was die Interferone weiterhin anbelangt, so werden diese aufgrund ihrer Eigenschaften und der Möglichkeit, eine Vielzahl zellulärer Abwehrmechanismen zu induzieren und die körpereigene Immunantwort zu unterstützen, zur Therapie von Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen (z.B. HBV und HCV) verwendet.

10 Wie zuvor beschrieben, hat sich in der Therapie von Hepatitis Typ C-Erkrankungen bzw. Infektionen insbesondere der Einsatz von pegyliertem IFN- α 2a oder IFN- α 2b in Kombination mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin (RBV) etabliert. Das Ansprechen auf die Therapie ist abhängig von dem
15 HCV-Genotyp, der Viruslast, dem Alter des Patienten, bereits aufgetretenen Leberschäden und Co-Infektionen. Bei der Infektion mit den Genotypen 2 und 3 ist nach 24 Wochen bei bis zu 80 % der Patienten ein anhaltender Virusrückgang zu verzeichnen, während bei Infektionen mit Genotyp 1 nur ca. 50 % der Patienten auf die Therapie ansprechen und einen anhaltenden Rückgang der Viruslast nach 48 Wochen bei einer körperrgewichtabhängigen
20 RBV-Dosierung aufweisen.

Das Ansprechen auf die Therapie läßt sich in zwei Phasen unterteilen. Ein frühes Ansprechen des Virus (engl. EVR, *early viral response*) in Abhängigkeit vom Genotyp und der eingesetzten Dosis an Medikamenten in der ersten
25 Phase wird gefolgt von einem langsameren, aber anhaltenden Rückgang der Viruslast (engl. SVR, *sustained viral response*) in der zweiten Phase. Untersuchungen haben ergeben, daß, wenn innerhalb der ersten 12 Wochen nach Therapiebeginn keine EVR mit einem Rückgang der Viruslast um mindestens
30 $2\log_{10}$ -Phasen zu verzeichnen ist, kein anhaltendes Ansprechen zu erwarten ist und die Therapie abgebrochen werden kann. Unterschiedliche Expressionsmuster der ISGs sowohl in PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) als auch Leberbiopsien von Patienten ermöglichen ebenfalls die Erstellung von Prognosen über ein Ansprechen auf die Therapie.

35

Nachteilig bei der vorgenannten Therapie des Standes der Technik sind somit deren mitunter starke Nebenwirkungen, insbesondere was die Ausbildung einer Depression anbelangt, und die Tatsache, daß ein effektiver Therapieerfolg – wie zuvor beschrieben – nicht immer gewährleistet ist.

5

Vor diesem Hintergrund besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, neue und effiziente Therapie- bzw. Behandlungsmöglichkeiten von Hepatitis-Erkrankungen, insbesondere Hepatitis-C-Erkrankungen, bereitzustellen, welche gegenüber den im Stand der Technik bekannten Ansätzen eine höhere Wirksamkeit bei gleichzeitig verringerter Nebenwirkung aufweisen sollen.

10

In diesem Zusammenhang besteht eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren zur Ermittlung von Substanzen bzw. Substanzen als solche bereitzustellen, mit welchen die Genexpression bzw. Genaktivität von im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Zusammenhang stehenden Genen, insbesondere ISG15, vermindert bzw. unterbunden werden kann, um auf diese Weise die Virusvermehrung bzw. -replikation zumindest zu vermindern.

20

Im übrigen besteht eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit welchem konkrete Gene identifiziert werden können, welche maßgeblich an der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren beteiligt sind, wobei es sich hierbei vorzugsweise um humane bzw. interferonstimulierte Gene handelt.

25

Schließlich besteht eine der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe darin, Verfahren, Verwendungen und Substanzen der vorgenannten Art bereitzustellen, welche die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden oder aber diese zumindest zu verringern oder abzuschwächen imstande sind.

30

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es dem Anmelder in völlig überraschender Weise gelungen, erstmalig ein spezielles Gen identifiziert zu haben, welches maßgeblich im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren in einem Wirtssystem, insbesondere beim Menschen, steht. In diesem Zusammenhang hat der Anmelder völlig überraschend gefun-

35

den, daß das interferonstimulierte Gen ISG15 maßgeblich an der zuvor genannten Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren beteiligt ist und eine Induktion bzw. Aktivierung dieses Gens zu einer unerwünschten Erhöhung der Virusreplikation führen kann. Das hinsichtlich seiner Relevanz betreffend die Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren identifizier-
5 te Gen ISG15 kann somit erfindungsgemäß als Grundlage für Verfahren bzw. Medikamente zur Therapie einer Hepatitis-C-Erkrankung bzw. -Infektion herangezogen werden, wobei diesbezüglich erfindungsgemäß auf eine Inaktivierung des entsprechenden Gens abgestellt wird.

10 Denn der Anmelder hat in völlig überraschender Weise gefunden, daß die gezielte Verwendung eines Inhibitors bzw. Repressors, mit welchem die (Gen-)Aktivität des im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren stehenden Gens, insbesondere ISG15, und somit eine
15 Beeinflussung dessen Genaktivität zu einer signifikanten Verringerung der Hepatitis-C-Virenlast führt, was maßgeblich auf eine deutlich verminderte Vermehrung bzw. Replikation der Hepatitis-C-Viren zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang konnte der Anmelder – völlig überraschend – insbesondere zeigen, daß die gezielte Verwendung einer speziell auf ISG15 abge-
20 stimmten bzw. gegen ISG15 gerichteten sogenannten siRNA bei deren Applikation zu einer deutlichen Abnahme der Genaktivität von ISG15 und folglich zu einer signifikant verminderten Synthese bzw. Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Wirtssystem führt. Auf diese Weise ist es dem Anmelder gelungen, einen völlig neuartigen und zudem nebenwirkungsarmen
25 therapeutischen Ansatz bereitzustellen, auf dessen Basis eine Hepatitis-C-Erkrankung effektiv behandelt werden kann.

Es versteht sich von selbst, daß Ausgestaltungen, Ausführungsformen, Vorteile und dergleichen, welche nachfolgend zu Zwecken der Vermeidung von
30 Wiederholungen nur zu einem Erfindungsaspekt ausführt sind, selbstverständlich auch in bezug auf die übrigen Erfindungsaspekte entsprechend gelten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist somit die erfindungsgemäße Verwendung nach
35 Anspruch 1, d. h. also mit anderen Worten die Verwendung eines Inhibitors und/oder Repressors eines mit der Vermehrung und/oder Replikation von He-

patitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneten (Poly-)Peptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C.

Wie zuvor angeführt, liegt die zentrale Idee der vorliegenden Erfindung somit darin, in spezifischer Weise die Genaktivität eines solchen Gens herabzusetzen und/oder zu unterbinden, insbesondere zu inhibieren, welches mit der Vermehrung bzw. Replikation bzw. Synthese von Hepatitis-C-Viren insbesondere insofern zusammenhängt, als die Expression bzw. Aktivierung des Gens, welche beispielsweise aufgrund der Virusinfektion induziert sein kann, zu einer erhöhten Replikation bzw. Vermehrung von Hepatitis-C-Viren im Wirt führt.

In diesem Zusammenhang bezieht sich der erfindungsgemäß verwendete Begriff "Inhibitor" und/oder "Repressor" insbesondere auf eine die Genaktivität vermindernde und/oder unterbindende, insbesondere inhibierende Substanz. Der Inhibitor bzw. der Repressor stellt somit mit anderen Worten eine die Genaktivität unterbindende oder zumindest herabsetzende Verbindung dar, wobei die diesbezügliche pharmakologische Wirkung des Inhibitors bzw. Repressors sowohl auf Genebene, d. h. beispielsweise durch eine direkte Interaktion mit dem Gen bzw. diesem zugeordneten Promotoren und/oder Enhancern, als auch auf Ebene des bzw. der Genprodukte, wie Transkriptionsprodukte (z. B. mRNA) und/oder Translationsprodukte (z. B. Proteine), ansetzen kann. Zudem kann die pharmakologische Wirkung bzw. die die Genaktivität vermindernde und/oder unterbindende, insbesondere inhibierende Wirkung des Inhibitors bzw. Repressors auf Ebene von genregulierten Mediatoren bzw. Faktoren und/oder auf Ebene von genregulierenden Mediatoren bzw. Faktoren ansetzen. Somit kann der erfindungsgemäß verwendete Inhibitor bzw. Repressor zu einer Verringerung der Expression bzw. Genaktivität beispielsweise und in nichtbeschränkender Weise durch direkte oder indirekte Interaktion mit der DNA-Sequenz bzw. DNA und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz bzw. mRNA und/oder durch direkte bzw. indirekte Beeinflussung bzw. Interaktion mit dem Genprodukt in Form des von dem Gen bzw. von der DNA-

Sequenz codierten (Poly-)Peptids führen. Bei dem Inhibitor bzw. Repressor handelt es sich insbesondere um eine Substanz mit antiviralen Eigenschaften gegenüber Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren.

5 Mit anderen Worten zielt die vorliegende Erfindung maßgeblich auf eine zweckgerichtete Suppression der Genexpression bzw. Genaktivität von im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation bzw. Synthese von Hepatitis-C-Viren stehenden Genen, insbesondere ISG15, was im allgemeinen auch als *gene-knockdown* bzw. als *gene-silencing* bezeichnet werden kann.

10

Was den erfindungsgemäß verwendeten Begriff "Gen" anbelangt, so ist diesbezüglich gleichermaßen das entsprechende Nukleinsäuremolekül bzw. die entsprechende DNA-Sequenz eingeschlossen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich aber gleichermaßen auch, wie zuvor angeführt, auf die dem Gen zugeordnete RNA-Sequenz, insbesondere mRNA, welche sozusagen als posttranskriptionales Produkt fungiert und sozusagen komplementär zum codogenen Strang der DNA des Gens sein kann. Gleichermaßen kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch das von der Nukleinsäure bzw. dem Gen, insbesondere wie zuvor definiert, codierte (Poly-)Peptid – und somit gewissermaßen das Translationsprodukt – verwendet bzw. als Zielmolekül bzw. "Target" verwendet werden. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül" ist gleichbedeutend mit dem Begriff "Polynukleinsäure" bzw. "Polynukleinsäuremoleküle" und kann sowohl auf DNA als auch auf RNA bezogen sein. Der Begriff "DNA-Sequenz" bzw. "RNA-Sequenz" bezieht sich in diesem Zusammenhang nicht nur auf die vollständige, dem Gen zugeordnete bzw. entsprechende DNA, sondern auch auf entsprechende Abschnitte des Gens bzw. nicht nur auf insbesondere im Rahmen der Transkription synthetisierte vollständige RNA, sondern auch auf RNA-Abschnitte bzw. RNA-Fragmente.

20
25
30 Was das im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung in Betracht gezogene Gen anbelangt, so handelt es sich vorzugsweise um ein humanes Gen.

Insbesondere kann es sich bei dem im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung in Betracht gezogenen Gen um ein interferonstimuliertes Gen (ISG) handeln. Diesbezüglich kann das Gen ein durch Interferone vom Typ 1, vorzugsweise α -Interferon und/oder β -Interferon, stimuliertes Gen sein. Wie zu-

35

vor beschrieben, handelt es sich hierbei insbesondere um ein solches Gen, welches infolge einer erhöhten Interferonkonzentration induziert bzw. aktiviert werden kann, so daß dessen Expression insbesondere unter Interferoneinfluß – beispielsweise hervorgerufen durch eine Infektion mit Hepatitis-C-Viren – erhöht wird.

Diesbezüglich hat der Anmelder in völlig überraschender Weise herausgefunden, daß ein hinsichtlich der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren verantwortliches bzw. damit im Zusammenhang stehendes Gen durch das Gen ISG15 gebildet wird. Hierbei handelt es sich gleichermaßen um ein interferonstimuliertes Gen. Insbesondere handelt es sich bei dem in Rede stehenden Gen um ISG15, insbesondere mit der Transkript-ID (Lokus) NM_005101 bzw. insbesondere gemäß Sequenzprotokoll I und/oder insbesondere gemäß SEQUENCE LISTING. Diesbezüglich hat der Anmelder in völlig überraschender Weise gefunden, daß es sich bei ISG15, welches auch als sogenannter *Homo Sapiens ISG15 Ubiquitin-like Modifier* bezeichnet wird, um ein hinsichtlich der erfindungsgemäßen Verwendung im Rahmen der Therapie von Hepatitis Typ C besonders effektives Ziel bzw. Target handelt, dessen Inaktivierung bzw. Suppression zu einer signifikanten Reduzierung der Hepatitis-C-Viren im Wirtssystem führt.

Das zuvor angegebene Sequenzprotokoll I und das zuvor angeführten SEQUENCE LISTING beziehen sich auf die DNA-Sequenz zu dem Gen ISG15. Dabei ist das Sequenzprotokoll I zu dem entsprechenden SEQUENCE LISTING synonym bzw. inhaltsgleich. Der wesentliche Unterschied zwischen den Sequenzprotokollen besteht darin, daß das Sequenzprotokoll I auf Basis einer wissenschaftlich standardisierten Angabe bzw. Darstellung beruht, während das SEQUENCE LISTING auf Basis einer patentrechtlich standardisierten Angabe bzw. Darstellung unter Verwendung der Software PatentIN Version 3.3 erstellt wurde. Hierbei handelt es sich also in bezug auf die DNA bzw. in bezug auf das Gen um einen rein formal darstellungsgemäßen, nicht aber um einen inhaltlichen Unterschied.

Was den im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung eingesetzten Inhibitor bzw. Repressor anbelangt, so sollte es sich diesbezüglich um eine die

Aktivität des Gens, insbesondere von ISG15, herabsetzende bzw. unterbindende, insbesondere inhibierende Substanz handeln.

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es besonders vorteilhaft, wenn der Inhibitor bzw. der Repressor eine mit dem Gen, insbesondere mit ISG15, bzw. mit dessen DNA-Sequenz und/oder mit dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder mit dessen zugeordnetem (Poly-)Peptid interagierende Substanz ist. Diesbezüglich ist es besonders vorteilhaft, wenn die Substanz die Aktivität des Gens, insbesondere von ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder
10 dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneten (Poly-)Peptids herabsetzt und/oder unterbindet, insbesondere inhibiert.

In diesem Zusammenhang ist der Begriff "Inhibitor" bzw. "Repressor" sehr
15 breit zu verstehen, insbesondere kann es sich hierbei um eine Substanz handeln, welche direkt und/oder indirekt, beispielsweise über Stoffwechsellaskaden oder Signaltransduktionen, mit dem entsprechenden Target bzw. Ziel, insbesondere mit ISG15, interagiert und dabei dessen Genaktivität herabsetzt bzw. unterbindet, insbesondere inhibiert. Dabei kann die Beeinflussung des Gens, insbesondere von ISG15, bzw. der dem Gen bzw. ISG15 zugeordneten
20 Produkte (z. B. Transkriptions- und/oder Translationsprodukte) auch in Form von Vorläufersubstanzen hervorgerufen werden, welche beispielsweise erst im Zell- bzw. Wirtssystem zu der eigentlich interagierenden Substanz beispielsweise über stoffwechselspezifische Prozesse umgewandelt wird.

25 Wie nachfolgend angeführt, kann die direkte und/oder indirekte Interaktion der Substanz mit der Zielstruktur, insbesondere mit dem Gen, wie ISG15, auf vielerlei Ebenen realisiert sein:

30 Gemäß einer ersten erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform kann die interagierende Substanz bzw. der Inhibitor und/oder Repressor mit dem Promotor und/oder Enhancer des Gens, insbesondere von ISG15, wechselwirken und/oder interagieren derart, daß die Bindung von insbesondere körpereigenen Transkriptionsfaktoren, insbesondere Aktivatoren, an den Promotor und/oder Enhancer verhindert oder zumindest gehemmt wird.

Gleichermaßen ist es aber auch möglich, daß die Substanz bzw. der Inhibitor und/oder Repressor mit einem insbesondere körpereigenen Transkriptionsfaktor, insbesondere Aktivator, wechselwirkt derart, daß die Bindung des Transkriptionsfaktors, insbesondere Aktivators, an den Promotor und/oder Enhancer des Gens, insbesondere von ISG15, verhindert oder zumindest ge-
5 hemmt wird.

Gleichermaßen ist es aber auch möglich, daß die Substanz bzw. der Inhibitor und/oder Repressor mit einem insbesondere körpereigenen Transkriptionsfaktor, insbesondere Aktivator, wechselwirkt derart, daß die Bindung des Transkriptionsfaktors, insbesondere Aktivators, an den Promotor und/oder Enhancer des Gens, insbesondere von ISG15, verhindert oder zumindest ge-
10 hemmt wird. In diesem Zusammenhang kann der Inhibitor und/oder Repressor mit insbesondere körpereigenen, von dem Gen regulierten Mediatoren und/oder Faktoren, insbesondere ISG15-regulierten Mediatoren und/oder Fak-
15 toren, und/oder mit insbesondere körpereigenen, das Gen regulierenden Mediatoren und/oder Faktoren, insbesondere ISG15-regulierenden Mediatoren und/oder Faktoren, interagieren insbesondere derart, daß die Aktivität des Gens, insbesondere von ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder des-
20 sen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneten (Poly-)Peptids herabgesetzt und/oder unterbunden, insbesondere inhibiert, wird.

Gleichermaßen ist es aber auch möglich, daß die Substanz bzw. der Inhibitor und/oder Repressor mit den endogenen bzw. körpereigenen Transkriptionsaktivatoren selbst reagiert und hierdurch eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors bzw. -aktivators an sich hervorruft, um auf diese Weise die Genaktivität, insbesondere von ISG15, zu verringern bzw. zu unterbinden, insbesondere zu inhibieren.
25

Bei der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung eingesetzten Substanz in Form eines Inhibitors und/oder Repressors kann es sich zum einen um eine Substanz handeln, welche auf Basis des nachfolgend noch geschilderten erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung solcher Substanzen aufgefunden wurde.
30

Gemäß einer erfindungsgemäß besonders bevorzugten Ausführungsform kann es sich bei dem Inhibitor und/oder Repressor zum anderen um eine vorzugsweise mit der dem Gen, insbesondere ISG15, zugeordneten RNA-Sequenz, insbesondere mRNA-Sequenz, interagierende RNA-Sequenz handeln. Gemäß dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sollte es sich bei dem Inhibitor bzw. Repressor um eine RNA bzw. RNA-Sequenz handeln, welche insbesondere komplementär zu der dem Gen zugeordneten RNA bzw. mRNA bzw. RNA-Sequenz bzw. mRNA-Sequenz ist.

10 In diesem Zusammenhang ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung von besonderem Vorteil, wenn der Inhibitor und/oder Repressor eine RNA-Sequenz in Form eines Oligomers, insbesondere mit 15 bis 20 bp (Basenpaare), vorzugsweise 18 bis 25 bp, bevorzugt 21 bis 23 bp, ist.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der mit der dem Gen, insbesondere ISG15, zugeordneten RNA-Sequenz interagierenden RNA-Sequenz vorzugsweise um eine Einzelstrang-RNA, wobei es sich diesbezüglich gemäß einer besonders bevorzugten Ausführung um einen sogenannten *antisense*-Strang insbesondere in bezug auf die dem Gen zugeordnete RNA, insbesondere mRNA, handeln sollte.

20 Gleichmaßen ist es aber auch möglich, daß es sich bei der erfindungsgemäß eingesetzten, mit der dem Gen, insbesondere ISG15, zugeordneten RNA-Sequenz interagierenden RNA-Sequenz um eine Doppelstrang-RNA handelt, welche insbesondere im Rahmen weiterer Modifikationen bzw. Stoffwechselforgänge zu einer Einzelstrang-RNA, insbesondere in Form eines *antisense*-Stranges, wie zuvor definiert, umgewandelt bzw. modifiziert wird.

30 Gemäß einer erfindungsgemäß besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem zuvor beschriebenen Inhibitor und/oder Repressor um eine siRNA (*small interfering RNA*), insbesondere wobei die siRNA gegen ISG15, insbesondere gegen ISG15-spezifische mRNA bzw. gegen ISG15 zugeordneter mRNA, gerichtet ist. Mit anderen Worten sollte die siRNA ausgestaltet sein derart, daß eine Interaktion mit der mRNA, insbesondere wie zuvor definiert, möglich ist und in der Folge zur Deaktivierung bzw. zum Abbau der entsprechenden RNA führt. Beispielsweise kann die siRNA komplementär

zur mRNA bzw. zu Abschnitten der mRNA sein. In diesem Zusammenhang hat der Anmelder in völlig überraschender Weise gefunden, daß eine derartige siRNA zu besonders guten Ergebnissen hinsichtlich einer Verminderung bzw. Unterbindung der Genaktivität des mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Zusammenhang stehenden Gens, insbesondere ISG15, führt.

Bei der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung eingesetzten siRNA handelt es sich gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführung um eine siRNA gegen ISG15, welche von der Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland unter der Produktnummer bzw. Bestellnummer SI00072387 (human) bzw. SI01007531 (murin) bezogen werden kann.

Ohne sich auf diese Theorie festlegen zu wollen, kann die Wirkweise der speziellen ISG15-spezifischen siRNA derart verstanden werden, daß zunächst im Zell- bzw. Wirtssystem ein siRNA/Protein-Komplex gebildet wird, welcher auch als *RNA-induced silencing-Complex* (RISC) bezeichnet wird, bei welchem ein Proteinkomplex den *antisense*-Strang der siRNA bindet und die dazu komplementäre mRNA schneidet. In diesem Zusammenhang weist der RISC-Komplex RNA-Helicase- und RNA-Nuklease-Aktivitäten auf. Diese Eigenschaften führen bei Interaktion mit der mRNA, welche sozusagen das Transkriptionsprodukt des mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren in Zusammenhang stehenden Gens, insbesondere ISG15, darstellt, zu dessen Entwindung und Spaltung. Die mRNA wird folglich abgebaut, was zu einer Reduktion der Translation dieser mRNA und somit zu einem *gene-silencing* bzw. einem *gene-knockout* auf posttranskriptionaler Ebene und somit zu einer Geninaktivierung führt.

Erfindungsgemäß kann es auch vorgesehen sein, daß der Inhibitor und/oder Repressor ein insbesondere den *antisense*-Strang einer siRNA darstellender Inhibitor bzw. Repressor ist. Gleichermäßen kann es im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch vorgesehen sein, daß der Inhibitor bzw. Repressor einen Komplex aus einem *antisense*-Strang der siRNA und mindestens einer Proteinkomponente darstellt, wobei es sich bei diesem Komplex insbesondere um einen RISC-Komplex (RISC = *RNA-induced silencing complex*) handeln kann.

Ein zentrales Konzept der vorliegenden Erfindung gemäß diesem Erfindungs-
aspekt unter Verwendung einer siRNA ist darin zu sehen, daß insbesondere
synthetisch hergestellte siRNA mit Spezifität gegenüber mRNA als Transkrip-
tionsprodukt insbesondere von ISG15 in das Zell- bzw. Wirtssystem einge-
bracht wird, was zu einem Abbau der mRNA des Zielgens, nämlich insbeson-
5 dere ISG15, führt, was wiederum zu einer Verringerung der Genprodukte und
somit zu einem *gene-silencing* bzw. *gene-knockout* führt. Das der Erfindung
zugrundeliegende Prinzip gemäß dieser Ausführungsform kann auch als
RNA-Interferenz bezeichnet werden, auf deren Basis die Expression bestimm-
ter (Ziel-)Gene, im vorliegenden Fall insbesondere ISG15, verringert wird.
10 Dies geschieht insbesondere durch die Interaktion von speziell gegen ein Gen
gerichteter siRNA mit der mRNA des Gens mit der Folge des Abbaus der
mRNA, was einer (Gen-)Inaktivierung entspricht.

15 Die Applikation bzw. das Einbringen der entsprechenden siRNA in das Zell-
bzw. Wirtssystem ist dem Fachmann an sich bekannt, so daß es diesbezüglich
keiner weiteren Ausführungen bedarf. Beispielsweise kann das Einbringen
bzw. Transfizieren auch über eine sogenannte Polyethylenimin-
Komplexierung (PEI-Komplexierung) durchgeführt werden.

20 Der gemäß der Verwendung nach der vorliegenden Erfindung eingesetzte In-
hibitor bzw. Repressor sollte bei Anwendung in pharmazeutisch wirksamen
Mengen verabreicht werden. Zudem sollte der Inhibitor bzw. der Repressor
systemisch, beispielsweise intravenös, verabreicht werden. Auch die diesbe-
züglichen Maßnahmen sind dem Fachmann als solche bekannt, so daß es
25 diesbezüglich keiner weiteren Ausführungen bedarf.

Im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung kann es gleichermaßen vor-
gesehen sein, daß der Inhibitor bzw. Repressor, insbesondere wie zuvor be-
30 schrieben, gemeinsam mit mindestens einem Interferon, insbesondere α -
Interferon, vorzugsweise pegyliertem α -Interferon, verabreicht wird. In die-
sem Zusammenhang ist eine Kombination der zuvor beschriebenen ISG15-
spezifischen siRNA bzw. gegen ISG15 gerichteten siRNA mit einem Interfe-
ron von besonderem Vorteil. Denn der Anmelder konnte – wie nachfolgend
35 anhand der Ausführungsbeispiele angeführt – in völlig überraschender Weise
einen synergistischen Effekt im Rahmen der zuvor beschriebenen Kombinati-

on von Inhibitor und/oder Repressor einerseits und Interferon andererseits hinsichtlich der Unterbindung bzw. Verminderung der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren in den betroffenen Wirtssystemen bzw. Zellsystemen beobachten. Gleichmaßen ist es möglich, daß der Inhibitor und/oder
5 Repressor gemeinsam und/oder in Kombination mit mindestens einer Substanz mit antiviralen Eigenschaften gegenüber Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, verabreicht wird.

Insgesamt wird im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung gemäß dem
10 hier vorliegenden Erfindungsaspekt ein neuer Weg zur Behandlung einer Hepatitis-C-Infektion bzw. -Erkrankungen bereitgestellt, welcher auf einem völlig neuen Ansatz basiert, nämlich der gezielten Inaktivierung eines im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren stehenden Gens, insbesondere ISG15.

15 Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem **zweiten** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist die erfindungsgemäße Verwendung gemäß Anspruch 15, d. h. also mit anderen Worten die Verwendung mindestens einer Substanz, insbesondere eines Inhibitors und/oder Repressors, zur
20 Herstellung eines Medikamentes oder Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C, wobei die Substanz die Genaktivität und/oder Genexpression mindestens eines interferonstimulierten Gens, insbesondere von ISG15 reguliert, insbesondere zumindest vermindert oder hemmt.

25 Für weitere Ausführungen in bezug auf die erfindungsgemäße Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung kann auf die vorstehenden Ausführungen zu dem vorangehenden Aspekt verwiesen werden, welche diesbezüglich entsprechend gelten.

30 Wiederum weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem **dritten** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist die erfindungsgemäße Verwendung gemäß Anspruch 17, d. h. also mit anderen Worten eine Verwendung mindestens eines interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls,
35 insbesondere Gens, vorzugsweise ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder mindestens eines von

der Nukleinsäure codierten (Poly-)Peptids zur Auffindung und/oder Bereitstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder kurativen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C, und/oder zur Vorhersage von individuellen Arzneimittelwirkungen und/oder Arzneimittelnebenwirkungen.

Was die Verwendung gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt anbelangt, so kann das im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren stehende Gen, insbesondere ISG15, gewissermaßen als Ausgangsobjekt zur Auffindung bzw. Bereitstellung von Arzneimitteln in bezug auf eine Hepatitis-C-Infektion bzw. -Erkrankung eingesetzt werden. Dabei können die Arzneimittel dergestalt sein, daß sie – wie zuvor angeführt – direkt oder indirekt mit dem zuvor definierten Gen bzw. der diesem zugeordneten RNA, insbesondere mRNA, und/oder dem entsprechenden (Poly-)Peptid interagieren, um auf diese Weise insbesondere über eine Verringerung bzw. Unterbindung, insbesondere Inhibierung, der Genaktivität zu einer Verringerung bzw. Unterbindung der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren und somit zu einer Linderung bzw. Ausheilung der Hepatitis-C-Erkrankung zu führen. Dabei kann es sich somit um solche Substanzen handeln, die eine genregulatorische Wirkung aufweisen.

Dem Fachmann sind die Grundlagen in bezug auf das spezifische Anwendungsgebiet der erfindungsgemäßen Verwendung gemäß diesem Erfindungsaspekt maßgeblich bekannt, so daß es diesbezüglich keiner weiteren Ausführungen bedarf.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem vierten Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 18, d. h. also mit anderen Worten ein Verfahren zur Identifizierung eines Inhibitors und/oder Repressors eines interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise von ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen des Nukleinsäuremoleküls mit mindestens einer Testsubstanzen unter Bedingungen, die eine Wechselwirkung, insbesondere Bindung, der Testsubstanzen an das Nukleinsäuremolekül erlauben; und
- 5 (b) Nachweis und/oder Analyse, ob die Testsubstanzen die Genaktivität und/oder Expression des Nukleinsäuremoleküls einschränken oder unterbinden und/oder ob die Testsubstanzen die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, einschränken oder unterbinden.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise *in vitro* durchgeführt werden, wobei gewissermaßen eine Interaktion der Testsubstanzen mit dem Nukleinsäuremolekül bzw. dem Gen untersucht wird und bei vorliegender Interaktion auf eine resultierende verminderte Genaktivität als Folge dieser Interaktion geschlossen werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren kann gleichermaßen in einem entsprechenden Wirtssystem durchgeführt werden, wobei der Wirt ein Träger des im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren stehenden Gens, insbesondere ISG15, sein sollte und vorteilhafterweise auch über ein entsprechendes Expressionssystem verfügt. Der Nachweis der Interaktion bzw. Wechselwirkung bzw. der Nachweis der Beeinflussung der Genaktivität kann mit dem Fachmann an sich geläufigen Verfahren durchgeführt werden.

15

20

In diesem Zusammenhang betrifft die vorliegende Erfindung – gemäß einem

25 **fünften** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ein Verfahren nach Anspruch 19, d. h. also mit anderen Worten ein Verfahren zur Identifizierung eines Inhibitors und/oder Repressors eines von einem interferonstimulierten Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen, vorzugsweise ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz codierten (Poly-)Peptids, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

30

35

- (a) Inkontaktbringen des (Poly-)Peptids mit mindestens einer Testsubstanzen unter Bedingungen, die eine Wechselwirkung, insbesondere Bindung, der Testsubstanzen an das (Poly-)Peptid erlauben; und
- (b) Nachweis und/oder Analyse, ob die Testsubstanzen die Aktivität des (Poly-)Peptids einschränken oder unterbinden und/oder ob die Testsub-

stanz(en) die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatits-C-Viren, einschränken oder unterbinden.

Das erfindungsgemäße Verfahren gemäß diesem Aspekt fokussiert somit auf
5 eine Beeinflussung des Genproduktes insbesondere in Form eines Proteins
bzw. (Poly-)Peptids. Das Verfahren kann in einer dem Fachmann an sich be-
kannten Art und Weise sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem Wirtsystem
durchgeführt werden, wobei im letzteren Fall der Wirt vorzugsweise die das
zu untersuchende (Poly-)Peptid codierende Nukleinsäure tragen sollte. Gleich-
10 chermaßen kann eine Interaktion aber auch *in vitro* an isolierten (Poly-)
Peptiden durchgeführt werden.

Zudem betrifft die vorliegende Erfindung gleichermaßen ein Verfahren zur
Identifizierung einer mit einem insbesondere körpereigenen Mediator
15 und/oder Faktor, welcher von einem interferonstimulierten Nukleinsäuremo-
lekül, insbesondere Gen, vorzugsweise ISG15 reguliert wird oder welcher ein
interferonstimuliertes Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen, vorzugsweise
ISG15 reguliert, interagierenden Substanz, wobei das Verfahren die folgenden
Schritte umfaßt:

- 20
- (a) Inkontaktbringen des Mediators und/oder Faktors mit mindestens einer
Testsubstanz unter Bedingungen, die eine Wechselwirkung, insbesondere
Bindung, der Testsubstanz(en) an den Mediator und/oder Faktor erlauben;
25 und
 - (b) Nachweis und/oder Analyse, ob die Testsubstanz(en) die Aktivität des
Mediators und/oder Faktors beeinflussen und/oder ob die Testsub-
stanz(en) die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, ins-
besondere Hepatits-C-Viren, einschränken oder unterbinden.

30 Gemäß dem vorgenannten Verfahren handelt es sich bei der interagierenden
Substanz vorzugsweise um einen Inhibitor und/oder Repressor des Mediators
und/oder Faktors, sofern dieser mit einer Aktivierung des interferonstimulier-
ten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise ISG15, in Ver-
35 bindung steht. Sofern der Mediator und/oder Faktor selbst mit einer Inaktivie-
rung bzw. Repression des interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls, insbe-
sondere Gens, vorzugsweise ISG15, in Verbindung steht, handelt es sich bei

der interagierenden Substanz in bezug auf den Mediator und/oder Faktor um einen Aktivator – hinsichtlich des interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise ISG15, handelt es sich auf Basis der obigen Definition bei einer derartigen Substanz jedoch gleichermaßen um einen Inhibitor bzw. Repressor, da auch in diesem Fall letztendlich eine Inaktivierung bzw. Repression des interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise ISG15, resultiert.

Die erfindungsgemäßen Verfahren nach dem vierten und fünften Aspekt der vorliegenden Erfindung können derart durchgeführt werden, daß mehrere Testsubstanzen eingesetzt und die folgenden Schritte durchgeführt werden:

- (a) Testung verschiedener Testsubstanzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen, wobei diejenigen Testsubstanzen, welche die Genaktivität und/oder Expression und/oder Aktivität des Nukleinsäuremoleküls (DNA oder RNA, insbesondere mRNA) nicht einschränken oder nicht unterbinden und/oder welche die Aktivität des (Poly-)Peptids nicht einschränken oder nicht unterbinden und/oder welche die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, nicht einschränken oder nicht unterbinden und/oder welche mit dem Mediator und/oder Faktor nicht interagieren im weiteren Testverfahren nicht mehr berücksichtigt werden;
- (b) Verteilung von Testsubstanzen aus solchen Reaktionsgefäßen, bei welchen eine Verringerung oder Unterbindung der Genaktivität und/oder Expression und/oder Aktivität des Nukleinsäuremoleküls und/oder bei welchen eine Verringerung oder Unterbindung der Aktivität des (Poly-)Peptids und/oder bei welchen eine Verringerung oder Unterbindung der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren und/oder bei welchen eine Interaktion mit dem Mediator und/oder Faktor, in Schritt (a) ermittelt wurde, auf neue Reaktionsgefäße und Wiederholung von Schritt (a) mit den neuen Reaktionsgefäßen; und
- (c) Wiederholung von Schritt (b), bis eine einzelne Testsubstanz identifiziert wird, welcher die Verringerung oder Unterbindung der Genaktivität und/oder Expression des Nukleinsäuremoleküls und/oder welcher die Verringerung oder Unterbindung der Aktivität des (Poly-)Peptids und/oder welcher die Verringerung oder Unterbindung der Vermehrung und/oder

Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, zugeordnet werden kann und/oder welcher die Interaktion mit dem Mediator und/oder Faktor zugeordnet werden kann.

5 Dabei ist es gleichermaßen möglich, daß die Verfahren gemäß dem vierten und fünften Aspekt der vorliegenden Erfindung derart durchgeführt werden, daß die Testsubstanz(en), das Nukleinsäuremolekül (DNA oder RNA, insbesondere mRNA) und/oder das (Poly-)Peptid an ein Auslesesystem (*readout*-System) gekoppelt sind und/oder daß dem Testansatz ein Auslesesystem zu-
10 gesetzt wird und/oder daß das Auslesesystem nach Bindung der Testsubstanz(en) mit dem Nukleinsäuremolekül und/oder dem (Poly-)Peptid ein nachweisbares Signal liefert.

Im Rahmen der vorgenannten Verfahren können die Testsubstanzen niedermolekulare Substanzen, Peptide, Aptamere, Antikörper, DNA, RNA, insbesondere siRNA und/oder Fragmente oder Derivate davon, sein.
15

Wie zuvor angeführt, können die vorgenannten Verfahren beispielsweise in einem Wirt bzw. Wirtssystem durchgeführt werden, wobei der Wirt bzw. das Wirtssystem vorzugsweise die zuvor definierten Gene umfaßt sowie über ein entsprechendes Expressionssystem verfügt. Derartige Wirte sind dem Fachmann an sich geläufig bzw. der Fachmann ist jederzeit in der Lage, spezifische Wirtssysteme vor dem Hintergrund der vorliegenden Erfindung auszuwählen, so daß es diesbezüglich keiner weiteren Ausführungen bedarf. Die erfindungsgemäßen Verfahren können gleichermaßen in Form von Hochdurchsatzverfahren und/oder computerassistent durchgeführt werden.
20
25

Für weitere Einzelheiten in bezug auf die erfindungsgemäßen Verfahren gemäß dem vierten und dem fünften Aspekt der vorliegenden Erfindung kann auf die Ausführungen zu den übrigen Aspekten bzw. Gegenständen der vorliegenden Erfindung verwiesen werden, welche diesbezüglich entsprechend gelten.
30

Wiederum weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem **s e c h s t e n** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 26, d. h. also mit anderen Worten ein Verfahren
35

zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften der nach dem Verfahren gemäß dem vierten und/oder fünften Aspekt der vorliegenden Erfindung identifizierten Testsubstanzen, wobei man

- 5 (a) die Bindungsstelle der Testsubstanz an das Nukleinsäuremolekül (DNA oder RNA, insbesondere mRNA) oder an das (Poly-)Peptid und gegebenenfalls die Bindungsstelle des Nukleinsäuremoleküls oder des (Poly-)Peptids an die Testsubstanz identifiziert;
- 10 (b) die Bindungsstelle der Testsubstanz und des Nukleinsäuremoleküls oder des (Poly-)Peptids durch molekulares Modellieren modifiziert; und
- (c) die Testsubstanz dergestalt modifiziert, daß ihre Bindungsspezifität oder Bindungsaffinität oder Bindungsavidität für das Nukleinsäuremolekül
15 oder das (Poly-)Peptid erhöht wird.

Diesbezüglich kann die Bindungsstelle in Schritt (a) durch ortsspezifische Mutagenese ermittelt werden, wobei die diesbezüglichen Verfahren dem Fachmann an sich bekannt sind.

20

Wiederum weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem **siebten** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 28, d. h. also mit anderen Worten ein Verfahren zur Modifizierung einer Testsubstanz, die nach den Verfahren gemäß dem
25 vierten und/oder fünften und/oder sechsten Aspekt der vorliegenden Erfindung identifiziert oder verbessert ist, wobei die Testsubstanz als Leitstruktur weiter modifiziert wird, um

- (i) ein modifiziertes aktives Zentrum, ein modifiziertes Aktivitätsspektrum
30 und/oder eine modifizierte Organspezifität und/oder
- (ii) eine verbesserte Aktivität und/oder
- (iii) eine verminderte Toxizität (einen verbesserten therapeutischen Index)
35 und/oder
- (iv) verminderte Nebenwirkungen und/oder
- (v) einen zeitlich versetzten Beginn der therapeutischen Wirksamkeit
40 und/oder Länge der therapeutischen Wirksamkeit und/oder

- (vi) veränderte pharmakokinetische Parameter (insbesondere Resorption, Distribution, Metabolismus und/oder Exkretion) und/oder
- (vii) modifizierte physikochemische Parameter, insbesondere Löslichkeit, hygroskopische Eigenschaften, Farbe, Geschmack, Geruch, Stabilität und/oder Zustandsform, und/oder
- (viii) eine verbesserte generelle Spezifität, Organ-/Gewebespezifität, und/oder
- (ix) eine optimierte Verabreichungsform und/oder -route, insbesondere durch
- (a) Veresterung von Carboxylgruppen und/oder
 - (b) Veresterung von Hydroxylgruppen mit Carbonsäuren und/oder
 - (c) Veresterung von Hydroxylgruppen, insbesondere zu Phosphaten, Pyrophosphaten oder Sulfaten und/oder Hemisuccinaten und/oder
 - (d) Bildung von pharmazeutisch verträglichen Salzen und/oder
 - (e) Bildung von pharmazeutisch verträglichen Komplexen und/oder
 - (f) Synthese von pharmakologisch aktiven Polymeren und/oder
 - (g) Einführung von hydrophilen Gruppen und/oder
 - (h) Einführung und/oder Austausch von Substituenten in Aromaten und/oder Seitenketten und/oder Veränderung des Substituentenmusters und/oder
 - (i) Modifikation durch Einführung von isosterischen und/oder bioisosterischen Gruppen und/oder
 - (j) Synthese von homologen Verbindungen und/oder
 - (k) Einführung von verzweigten Seitenketten und/oder
 - (l) Konversion von Alkylsubstituenten zu zyklischen Analogen und/oder
 - (m) Derivatisierung von Hydroxylgruppen zu Ketalen und/oder Acetalen und/oder
 - (n) N-Acetylierung zu Amiden und/oder Phenylcarbamaten und/oder
 - (o) Synthese von Mannich-Basen und/oder Iminen und/oder

- (p) Umwandlung von Ketonen und/oder Aldehyden in Schiff-Basen, Oximen, Acetalen, Ketalen, Enolestern, Oxazolidinen, Thiozolidinen oder deren Kombinationen,

5 zu erreichen.

Dabei ist es im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich, daß die identifizierte, verbesserte oder modifizierte Testsubstanz, insbesondere der Inhibitor und/oder Repressor der bzw. des zuvor genannten Gens, durch Peptidomimetika pharmakologisch weiter verbessert wird.

Für weitere Ausführungen in bezug auf die erfindungsgemäßen Verfahren gemäß diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann auf die Ausführungen zu den vorangehenden Aspekten der vorliegenden Erfindung verwiesen werden, welche diesbezüglich entsprechend gelten.

Wiederum weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem **a c h t e n** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 30, d. h. also mit anderen Worten ein Verfahren zur Identifikation und/oder Ermittlung mindestens eines mit der Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise humanen und/oder interferonstimulierten Gens, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

(a) Erstellung eines Genexpressions- und/oder Genaktivitätsprofils von einer Vielzahl von Probanden eines Probandenkollektivs, wobei (i) die Probanden einer ersten Gruppe des Probandenkollektivs eine Infektion mit Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, aufweisen und (ii) die Probanden einer zweiten Gruppe des Probandenkollektivs keine solche Infektion aufweisen;

(b) Analyse und Vergleich bzw. Abgleich der jeweiligen Genexpressions- und/oder Genaktivitätsprofile von (i) Probanden der ersten Gruppe und (ii) Probanden der zweiten Gruppe und

(c) Identifikation mindestens eines Nukleinsäuremoleküls, insbesondere mindestens eines Gens, welches bei (i) den Probanden der ersten Gruppe im

Vergleich zu (ii) den Probanden der zweiten Gruppe eine erhöhte Genexpression und/oder Genaktivität aufweist.

Das Verfahren kann im Anschluß an Schritt (c) den nachfolgenden Schritt (d) umfassen:

(d) Zuordnung des in Schritt (c) identifizierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, als ein mit der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehendes Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen.

Das erfindungsgemäße Verfahren gemäß diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise anhand differenzieller Expression unter Einsatz von sogenannten DNA-Chips eingesetzt werden. Dabei kann beispielsweise derart verfahren werden, daß zunächst RNA aus dem Blut eines zu untersuchenden Probanden isoliert und dieses Isolat auf speziellen Gen-Chips gegeben wird und im Rahmen von dem Fachmann an sich bekannten Auswertebzw. Analyseverfahren der Expressionsgrad bei Probanden mit Hepatitis-C-Infektion im Vergleich zu Probanden ohne Hepatitis-C-Infektion für bestimmte Gene ermittelt wird und einem Gen, insbesondere einem interferonstimulierten Gen, mit einem erhöhten Expressionsgrad die Eigenschaften eines im Zusammenhang mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Zusammenhang stehenden Gens, insbesondere die Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren fördernden Gens zugesprochen werden kann.

Auf diese Weise ist es möglich, weitere Gene, insbesondere interferonstimulierte Gene, zu identifizieren, welche mit der Vermehrung bzw. Replikation von Hepatitis-C-Viren im Zusammenhang mit einer Hepatitis-C-Infektion bzw. Hepatitis-C-Erkrankung stehen.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung – gemäß einem neunten Aspekt der vorliegenden Erfindung – eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 32, mit anderen Worten somit eine pharmazeutische Zusammensetzung, vorzugsweise für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen, enthaltend in wirksamen, insbesondere pharmazeutisch wirksamen Mengen mindestens eine pharmakolo-

gisch aktive Substanz, insbesondere einen Inhibitor und/oder Repressor, für ein mit der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehendes Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen, vorzugsweise ISG15, und/oder für dessen DNA-Sequenz und/oder für dessen zugeordnete RNA-Sequenz, insbesondere für dessen zugeordnete mRNA-Sequenz, und/oder für dessen zugeordnete (Poly-)Peptid, wobei die Substanz nach dem Verfahren gemäß dem vierten und/oder fünften und/oder sechsten Aspekt der vorliegenden Erfindung erhältlich ist.

Für weitere diesbezügliche Einzelheiten im bezug auf die erfindungsgemäße pharmakologisch aktive Substanz kann auf die übrigen Ausführungen zu den weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung verwiesen werden, welche in diesem Zusammenhang entsprechend gelten.

Wiederum weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung – gemäß einem **z e h n t e n** Aspekt der vorliegenden Erfindung – ist zudem eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 33, mit anderen Worten somit eine pharmazeutische Zusammensetzung, vorzugsweise für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen, enthaltend in wirksamen, insbesondere pharmazeutisch wirksamen Mengen mindestens eine siRNA, wobei die siRNA die Genaktivität und/oder Genexpression mindestens eines interferonstimulierten Gens, insbesondere von ISG15, reguliert, insbesondere vermindert oder zumindest hemmt.

Bei der im Rahmen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung eingesetzten siRNA handelt es sich gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform um eine siRNA gegen ISG15, welche von der Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland unter der Produktnummer bzw. Bestellnummer SI00072387 bezogen werden kann.

Für weitere Einzelheiten in bezug auf die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung gemäß diesem Erfindungsaspekt der vorliegenden Erfindung kann auf die Ausführungen zu den übrigen vorgenannten Aspekten der vorliegenden Erfindung verwiesen werden, welche in diesem Zusammenhang entsprechend gelten.

Weitere Ausgestaltungen, Abwandlungen und Variationen der vorliegenden Erfindung sind für den Fachmann beim Lesen der Beschreibung ohne weiteres erkennbar und realisierbar, ohne daß er dabei den Rahmen der vorliegenden Erfindung verläßt.

5

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele veranschaulicht, welche die vorliegende Erfindung jedoch keinesfalls beschränken.

AUSFÜHRUNGSBEISPIELE:

Methoden und Untersuchungsergebnisse:

5 1. Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurden die Zellen mit 500 µl Trizol überschichtet. Die adhärennten Zellen wurden mit einem Plastischaber vom Grund gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,1 ml Chloroform / 1 ml Trizol hinzugegeben und durch Schütteln vermischt. Zentrifugieren bei 10 12.000 g und bei 2 bis 8 °C für 15 min führte zur Phasentrennung des Phenol/Chloroform-Gemisches. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und die gelöste RNA durch 0,5 ml Isopropanol/1 ml Trizol ausgefällt. Das Pellet wurde dann mit 75 % Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und abschließend in RNase-freiem Wasser gelöst. Im Anschluß wurde die RNA mit 15 Hilfe des „RNeasy Mini“ Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen aufgereinigt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2. Quantitative *realtime*-PCR:

20 Die reverse Transkription von RNA, gefolgt von einer *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung spezifischer mRNAs. In einem Ein-Schritt-RT-PCR-Verfahren (*one-step RT-PCR*) wird durch den Einsatz spezifischer Primer zuerst die mRNA des gesuchten Gens in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche wiederum das 25 Template bzw. die Vorlage für die folgende PCR liefert.

Um eine quantitative Aussage über die eingesetzte Menge an mRNA machen zu können, wurde der *LightCycler* Rotor-Gene 2000 von Corbett (Mortlake, Australien) verwendet. Der *LightCycler* erfaßt über eine Fluorimeterkomponente die Fluoreszenz des Fluorophoren nach Bindung an doppelsträngige DNA. Eingesetzt wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von QIAGEN, ein 25-µl-Ansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert: 5,25 µl H₂O (RNase-frei), 12,5 µl SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,25 µl QuantiTect RT-Mix, 2,5 µl jedes Primers (0,5 mM) und 2 µl Gesamt-RNA (100 ng bis 35 200 ng). Das verwendete *LightCycler*-Programm startete mit einem 30minütigen RT-Schritt bei 55 °C, gefolgt von einer 15minütigen Hitzeinaktivierung der RT-Polymerase mit dem Anschluß eines herkömmlichem

PCR-Schemas, d. h. pro Zyklus 5 s Denaturierung bei 95 °C, 10 s Annealing-temperatur (55 °C) und 30 s Elongation bei 72 °C. Die Produktbildung wurde nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt. Nach im Durchschnitt 40 Replikationszyklen wurden die Schmelzkurven der gebil-

5 deten Produkte erfaßt, um so die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist. Die vom *LightCycler* kalkulierten Kopienzahlen

10 der gemessenen Gene wurden gegen das *housekeeping* Gen bzw. Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen und analysiert.

3. Suppression der Genexpression von ISG15 mittels siRNA:

Die Expression von ISG15 wurde auf Zellkulturebene im HCV-Replikon-

15 System ausgeschaltet, um die direkte Wirkung auf die HCV-Replikation zu untersuchen. Die Suppression der Genexpression, auch *gene-knockdown* bzw. *gene-knockout* genannt, erfolgt mittels siRNA über einen zellulären Mechanismus des Prozessierens. Der Dicer-Enzymkomplex spaltet zelluntypische dsRNA in 21 bis 23 bp große Oligomere, die sogenannten *small interfering RNAs* (siRNA). Die siRNA kann mit einem Proteinkomplex den *RNA-induced silencing complex* (RISC) ausbilden; dieser bindet den *antisense*-Strang der siRNA und schneidet die dazu komplementäre mRNA. Die Degradation der mRNA führt zu einer Reduktion der Translation dieser mRNAs und somit zu

20 einem *gene-silencing* auf posttranskriptionaler Ebene.

25 Ein auf der humanen Hepatomzelllinie HuH-7 basierendes con1-Replikon-System sowie die murinen MH1-Zellen, die ebenfalls ein HCV-Replikon enthalten, wurden im 96er Lochplattenformat mit siRNAs gegen ISG15 (Qiagen) transfiziert (human: Best.-Nr. SI00072387, murin: Best.-Nr. SI01007531).

30 Dann wurde der Effekt der Gensuppression auf die HCV-Replikation untersucht.

Hierzu wurden in einem reversen Transfektionsansatz zuerst 12,5 ng der siRNAs (5 nM) in 3 μ l Suspensionspuffer gelöst und in die Vertiefungen der

35 Lochplatte vorpipettiert. In einem weiteren Ansatz wurden jeweils 2,5 ng der siRNAs für ein gleichzeitiges Ausschalten weiterer Gene eingesetzt (nicht graphisch dargestellt). Als Kontrolle wurde eine nichtcodogene siRNA einge-

setzt. Anschließend wurden pro Ansatz 0,75 µl des Transfektionsreagenz HiPerFect™ (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 24,25 µl serumfreies Kulturmedium überführt, gemischt und zu den vorgelegten siRNAs gegeben. Der Transfektionsansatz wurde nun 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1·10⁴ Zellen zu den Transfektionsansätzen gegeben und das Volumen mit Kulturmedium auf 200 µl aufgefüllt und für 12 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die RNA wurde wie bereits beschrieben extrahiert und der Rückgang der Genexpression von ISG15 sowie die HCV-Replikation mittels quantitativer RT-PCR bzw. Westernblot untersucht.

4. Hemmung der HCV-Replikation im Dauerversuch über 3 Monate – fehlende Induktion resistenter Mutanten:

Murine MH1-HCV-Replikon-Zellen wurden über 19 Zellpassagen mit nichtkodierender siRNA bzw. gegen ISG15 gerichteter siRNA kultiviert. Zur Zellpassage 1, 7, 11, 15 und 19 wurde die HCV-Kopienzahl/100.000 Kopien β-Aktin bestimmt und jeweils gegen die unbehandelte Kontrolle (100 %) abgeglichen. Da die gegen ISG15 gerichtete siRNA während der gesamten Dauer des Versuchs ihre anti-HCV-Aktivität behielt, ist davon auszugehen, daß keine gegen diesen Ansatz resistenten Mutanten entstanden sind oder selektioniert wurden. Fig. 1A und Fig. 1B veranschaulichen die erhaltenen Ergebnisse (mit siNC = *non silencing control*, siISG15 = ISG15-spezifische siRNA). In Fig. 1A ist die HCV-Kopienzahl gegen die unbehandelte Kontrolle (MH1) normiert und abgeglichen, und in Fig. 1B ist die HCV/ISG15-Kopienzahl gegen die siNC-Kontrolle normiert und abgeglichen. Fig. 1A und Fig. 1B zeigen den erheblichen Rückgang der HCV-Kopienzahl bei Behandlung mit ISG15-spezifischer siRNA (siISG15). Folglich ist auch die Vermehrung bzw. Replikation unter Einfluß von siISG15 verringert.

5. Hemmung der HCV-NS5A-Proteinexpression mittels siRNA-Knockdown von ISG15 – Synergismus mit IFN-α:

Die murinen MH1- und die humanen con1-HCV-Replikonzellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 30 bis 40 % bei 37 °C und einem CO₂-Luftgehalt von 5 % inkubiert. Die Transfektion mit 5 nM siRNA (siNC = *non silencing control*, siISG15 = ISG15-spezifische humane sowie murine siRNA) erfolgte mittels „HiPerFect™ Transfection Reagent“

(Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach 8 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurden die Zellen gewaschen und wieder in Kulturmedium sowie mit IFN- α versetztem Medium aufgenommen und für weitere 64 h inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen lysiert und eine Proteinextraktion durchgeführt. Mittels Westernblot konnten das virale Proteine NS5A sowie das *housekeeping* Gen β -Aktin nachgewiesen werden.

Fig. 2A und Fig. 2B zeigen im Rahmen eines Westernblots, daß eine Behandlung mit gegen ISG15 gerichteter siRNA sowohl in murinen als auch in humanen HCV-Replikonsystemen zu einer deutlichen Suppression des HCV-NS5A-Proteins führt. Ferner zeigen Fig. 2A und Fig. 2B, daß ein Synergismus mit IFN- α besteht, da die zusätzliche Gabe von IFN- α (vgl. Fig. 2A und Fig. 2B: + IFN- α) zu einer signifikanter Verringerung der NS5A-Synthese im Vergleich zu dem nicht mit IFN- α behandelten Ansatz (vgl. Fig. 2A und Fig. 2B: - IFN- α) führt.

Fig. 1A zeigt die Hemmung der HCV-Replikation und die fehlende Induktion resistenter Mutanten bei Behandlung mit ISG15-spezifischer siRNA (siISG15) gegenüber einer Behandlung mit siNC, wobei die HCV-Kopienzahl gegen die unbehandelte Kontrolle (MH1) normiert und abgeglichen ist.

Fig. 1B zeigt die Hemmung der HCV-Replikation und die fehlende Induktion resistenter Mutanten bei Behandlung mit ISG15-spezifischer siRNA (siISG15) gegenüber einer Behandlung mit siNC, wobei die HCV/ISG15-Kopienzahl gegen die siNC-Kontrolle normiert und abgeglichen ist.

Fig. 2A zeigt anhand eines Westernblots die Ergebnisse einer an humanen con1-HCV-Replikonzellen durchgeführten Behandlung mit gegen ISG15 gerichteter siRNA ohne zusätzliche Applikation von IFN- α einerseits (- IFN- α) und mit zusätzlicher Applikation von IFN- α andererseits (+ IFN- α).

Fig. 2B zeigt anhand eines Westernblots die Ergebnisse einer an murinen MH1-HCV-Replikonzellen durchgeführten Behandlung mit gegen ISG15 gerichteter siRNA ohne zusätzliche Applikation von IFN- α einerseits (- IFN- α) und mit zusätzlicher Applikation von IFN- α andererseits (+ IFN- α).

Fig. 3 zeigt einen Vergleich der Replikation von Hepatitis-C-Viren in MH1-Zellen für verschiedene Passagen, wobei die HCV-Kopienzahl auf 100.000 β -Aktin-Moleküle bezogen ist (MH1 = unbehandelte Kontrolle, NC = *non silencing control*, ISG15 = ISG15-spezifische si-RNA). Für sämtliche Passagen ist unter Einsatz von ISG15-spezifischer si-RNA im Vergleich zu MH1 und NC ein deutlicher Rückgang der HCV-Kopienzahl und somit eine Verminderung der Virussynthese bzw. -replikation zu beobachten.

15

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Inhibitors und/oder Repressors eines mit der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneten (Poly-)Peptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Gen ein humanes Gen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Gen ein interferonstimuliertes Gen ist, insbesondere wobei das Gen ein durch Interferone vom Typ I, vorzugsweise α -Interferon und/oder β -Interferon, stimuliertes Gen ist.
4. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Gen ISG15 ist, insbesondere mit der Transkript-ID (Lokus) NM_005101 und/oder insbesondere gemäß Sequenzprotokoll I und/oder insbesondere gemäß SEQUENCE LISTING.
5. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Inhibitor und/oder Repressor eine die Aktivität des Gens, insbesondere von ISG15, herabsetzende und/oder unterbindende, insbesondere inhibierende Substanz ist.
6. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Inhibitor und/oder Repressor eine mit dem Gen, insbesondere mit ISG15, und/oder mit dessen DNA-Sequenz und/oder mit dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder mit dessen zugeordnetem (Poly-)Peptid interagierende Substanz ist, insbesondere wobei die Substanz die Aktivität des Gens, insbesondere von ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder dessen zugeord-

neten (Poly-)Peptids herabsetzt und/oder unterbindet, insbesondere inhibiert.

- 5 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Inhibitor und/oder Repressor mit dem Promoter und/oder Enhancer des Gens, insbesondere von ISG15, wechselwirkt und/oder interagiert derart, daß die Bindung von insbesondere körpereigenen Transkriptionsfaktoren, insbesondere Aktivatoren, an den Promoter und/oder Enhancer verhindert oder zumindest gehemmt wird.
- 10 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Inhibitor und/oder Repressor mit einem insbesondere körpereigenen Transkriptionsfaktor, insbesondere Aktivator, wechselwirkt und/oder interagiert derart, daß die Bindung des Transkriptionsfaktors, insbesondere Aktivators, an den Promoter und/oder Enhancer des Gens, insbesondere von ISG15, verhindert oder zumindest gehemmt wird und/oder wobei der Inhibitor und/oder Repressor mit insbesondere körpereigenen, von dem Gen regulierten Mediatoren und/oder Faktoren, insbesondere ISG15-regulierten Mediatoren und/oder Faktoren, und/oder mit insbesondere körpereigenen, das Gen regulierenden Mediatoren und/oder Faktoren, insbesondere ISG15-regulierenden Mediatoren und/oder Faktoren, interagiert insbesondere derart, daß die Aktivität des Gens, insbesondere von ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneten (Poly-)Peptids herabgesetzt und/oder unterbunden, insbesondere inhibiert, wird.
- 15 20 25 9. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Inhibitor und/oder Repressor eine vorzugsweise mit der dem Gen, insbesondere ISG15, zugeordneten RNA-Sequenz, insbesondere mRNA-Sequenz, interagierende RNA-Sequenz ist.
- 30 10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Inhibitor und/oder Repressor eine RNA-Sequenz in Form eines Oligomers, insbesondere mit 15 bis 20 Basenpaaren (bp), vorzugsweise 18 bis 25 bp, bevorzugt 21 bis 23 bp, ist.
- 35

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Inhibitor und/oder Repressor eine siRNA ist, insbesondere wobei die siRNA gegen ISG15, insbesondere gegen ISG15 zugeordneter mRNA, gerichtet ist.
- 5 12. Verwendung nach einem der Ansprüche Anspruch 9 bis 11, wobei der Inhibitor und/oder Repressor ein insbesondere den antisense-Strang der siRNA und mindestens eine Proteinkomponente umfassender RISC-Komplex ist.
- 10 13. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Inhibitor und/oder Repressor in wirksamen, insbesondere pharmazeutisch wirksamen Mengen verabreicht wird und/oder wobei der Inhibitor und/oder Repressor systemisch verabreicht wird.
- 15 14. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Inhibitor und/oder Repressor gemeinsam mit mindestens einem Interferon, insbesondere α -Interferon, vorzugsweise mit pegyliertem α -Interferon, verabreicht wird und/oder wobei der Inhibitor und/oder Repressor gemeinsam und/oder in Kombination mit mindestens einer Substanz mit
20 antiviralen Eigenschaften gegenüber Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, verabreicht wird.
- 15 15. Verwendung mindestens einer Substanz, insbesondere eines Inhibitors und/oder Repressors, zur Herstellung eines Medikamentes oder Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von
25 Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C, wobei die Substanz die Genaktivität und/oder Genexpression mindestens eines interferonstimulierten Gens, insbesondere von ISG15, reguliert, insbesondere vermindert oder zumindest hemmt.
- 30 16. Verwendung nach Anspruch 15, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der Merkmale nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
- 35 17. Verwendung mindestens eines interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz und/oder minde-

- 5 stens eines von der Nukleinsäure codierten (Poly-)Peptids zur Auffindung und/oder Bereitstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen und/oder kurativen Behandlung von Hepatitis, insbesondere Hepatitis Typ C, und/oder zur Vorhersage von individuellen Arzneimittelwirkungen und/oder Arzneimittelnebenwirkungen.
- 10 18. Verfahren zur Identifizierung eines Inhibitors und/oder Repressors eines interferonstimulierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise von ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz, umfassend die folgenden Schritte:
- 15 (a) Inkontaktbringen des Nukleinsäuremoleküls mit mindestens einer Testsubstanz unter Bedingungen, die eine Wechselwirkung, insbesondere Bindung, der Testsubstanz(en) an das Nukleinsäuremolekül erlauben; und
- 20 (b) Nachweis und/oder Analyse, ob die Testsubstanz(en) die Genaktivität und/oder Expression des Nukleinsäuremoleküls einschränken oder unterbinden und/oder ob die Testsubstanz(en) die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, einschränken oder unterbinden.
- 25 19. Verfahren zur Identifizierung eines Inhibitors und/oder Repressors eines von einem interferonstimulierten Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen, vorzugsweise ISG15, und/oder dessen DNA-Sequenz und/oder dessen zugeordneter RNA-Sequenz codierten (Poly-)Peptids, umfassend die folgenden Schritte:
- 30 (a) Inkontaktbringen des (Poly-)Peptids mit mindestens einer Testsubstanz unter Bedingungen, die eine Wechselwirkung, insbesondere Bindung, der Testsubstanz(en) an das (Poly-)Peptid erlauben; und
- 35 (b) Nachweis und/oder Analyse, ob die Testsubstanz(en) die Aktivität des (Poly-)Peptids einschränken oder unterbinden und/oder ob die Testsubstanz(en) die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, einschränken oder unterbinden.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei mehrere Testsubstanzen eingesetzt und die folgenden Schritte durchgeführt werden:
- 5 (a) Testung verschiedener Testsubstanzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen, wobei diejenigen Testsubstanzen, welche die Genaktivität und/oder Expression und/oder Aktivität des Nukleinsäuremoleküls nicht einschränken oder nicht unterbinden und/oder welche die Aktivität des (Poly-)Peptids nicht einschränken oder nicht unterbinden und/oder welche die Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatits-C-Viren, nicht einschränken oder nicht unterbinden im weiteren Testverfahren nicht mehr berücksichtigt werden;
- 10 (b) Verteilung von Testsubstanzen aus solchen Reaktionsgefäßen, bei welchen eine Verringerung oder Unterbindung der Genaktivität und/oder Expression und/oder Aktivität des Nukleinsäuremoleküls und/oder bei welchen eine Verringerung oder Unterbindung der Aktivität des (Poly-)Peptids und/oder bei welchen eine Verringerung oder Unterbindung der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatits-C-Viren, in Schritt (a) ermittelt wurde, auf neue Reaktionsgefäße und Wiederholung von Schritt (a) mit den neuen Reaktionsgefäßen; und
- 15 (c) Wiederholung von Schritt (b), bis eine einzelne Testsubstanz identifiziert wird, welcher die Verringerung oder Unterbindung der Genaktivität und/oder Expression des Nukleinsäuremoleküls und/oder welcher die Verringerung oder Unterbindung der Aktivität des (Poly-)Peptids und/oder welcher die Verringerung oder Unterbindung der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatits-C-Viren, zugeordnet werden kann.
- 20
- 25
- 30
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Testsubstanz(en), das Nukleinsäuremolekül und/oder das (Poly-)Peptid an ein Auslesesystem (*readout*-System) gekoppelt sind und/oder wobei dem Testansatz ein Auslesesystem zugesetzt wird und/oder wobei das Auslesesystem nach Bindung der Testsubstanz(en) mit dem Nukleinsäuremolekül und/oder dem (Poly-)Peptid ein nachweisbares Signal liefert.
- 35

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die Testsubstanzen niedermolekulare Substanzen, Peptide, Aptamere, Antikörper, DNA, RNA, insbesondere siRNA und/oder Fragmente oder Derivate davon, sind.
- 5
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei das Verfahren in einem Wirt durchgeführt wird.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 23, wobei das Verfahren als ein Hochdurchsatzverfahren durchgeführt wird.
- 10
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei das Verfahren computerassistent durchgeführt wird.
- 15
26. Verfahren zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften der nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 25 identifizierten Testsubstanzen, wobei man
- 20
- (a) die Bindungsstelle der Testsubstanz an das Nukleinsäuremolekül oder an das (Poly-)Peptid und gegebenenfalls die Bindungsstelle des Nukleinsäuremoleküls oder des (Poly-)Peptids an die Testsubstanz identifiziert;
- 25
- (b) die Bindungsstelle der Testsubstanz und des Nukleinsäuremoleküls oder des (Poly-)Peptids durch molekulares Modellieren modifiziert; und
- 30
- (c) die Testsubstanz dergestalt modifiziert, daß ihre Bindungsspezifität oder Bindungsaffinität oder Bindungsavidität für das Nukleinsäuremolekül oder das (Poly-)Peptid erhöht wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Bindungsstelle in Schritt (a) durch ortsspezifische Mutagenese ermittelt wird.

28. Verfahren zur Modifizierung einer Testsubstanz, die nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 27 identifiziert oder verbessert ist, wobei die Testsubstanz als Leitstruktur weiter modifiziert wird, um
- 5 (i) ein modifiziertes aktives Zentrum, ein modifiziertes Aktivitätsspektrum und/oder eine modifizierte Organspezifität und/oder
 - (ii) eine verbesserte Aktivität und/oder
 - 10 (iii) eine verminderte Toxizität (einen verbesserten therapeutischen Index) und/oder
 - (iv) verminderte Nebenwirkungen und/oder
 - 15 (v) einen zeitlich versetzten Beginn der therapeutischen Wirksamkeit und/oder Länge der therapeutischen Wirksamkeit und/oder
 - (vi) veränderte pharmakokinetische Parameter (insbesondere Resorption, Distribution, Metabolismus und/oder Exkretion) und/oder
 - 20 (vii) modifizierte physikochemische Parameter, insbesondere Löslichkeit, hygroskopische Eigenschaften, Farbe, Geschmack, Geruch, Stabilität und/oder Zustandsform, und/oder
 - 25 (viii) eine verbesserte generelle Spezifität, Organ-/Gewebespezifität, und/oder
 - (ix) eine optimierte Verabreichungsform und/oder -route, insbesondere
 - 30 (a) Veresterung von Carboxylgruppen und/oder
 - (b) Veresterung von Hydroxylgruppen mit Carbonsäuren und/oder
 - 35 (c) Veresterung von Hydroxylgruppen, insbesondere zu Phosphaten, Pyrophosphaten oder Sulfaten und/oder Hemisuccinaten und/oder
 - 40 (d) Bildung von pharmazeutisch verträglichen Salzen und/oder
 - (e) Bildung von pharmazeutisch verträglichen Komplexen und/oder
 - 45 (f) Synthese von pharmakologisch aktiven Polymeren und/oder

- 5
- (g) Einführung von hydrophilen Gruppen und/oder
- (h) Einführung und/oder Austausch von Substituenten in Aromaten und/oder Seitenketten und/oder Veränderung des Substituentenmusters und/oder
- 10
- (i) Modifikation durch Einführung von isosterischen und/oder bioisosterischen Gruppen und/oder
- (j) Synthese von homologen Verbindungen und/oder
- (k) Einführung von verzweigten Seitenketten und/oder
- 15
- (l) Konversion von Alkylsubstituenten zu zyklischen Analogen und/oder
- (m) Derivatisierung von Hydroxylgruppen zu Ketalen und/oder Acetalen und/oder
- 20
- (n) N-Acetylierung zu Amiden und/oder Phenylcarbamaten und/oder
- (o) Synthese von Mannich-Basen und/oder Iminen und/oder
- 25
- (p) Umwandlung von Ketonen und/oder Aldehyden in Schiff-Basen, Oximen, Acetalen, Ketalen, Enolestern, Oxazolidinen, Thiozolidinen oder deren Kombinationen,
- zu erreichen.
- 30
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 28, wobei die identifizierte, verbesserte und/oder modifizierte Testsubstanz durch Peptidomimetika pharmakologisch weiter verbessert wird.
- 35
30. Verfahren zur Identifikation und/oder Ermittlung mindestens eines mit der Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehenden Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, vorzugsweise humanen und/oder interferonstimulierten Gens, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
- 40

- 5 (a) Erstellung eines Genexpressions- und/oder Genaktivitätsprofils von einer Vielzahl von Probanden eines Probandenkollektivs, wobei (i) die Probanden einer ersten Gruppe des Probandenkollektivs eine Infektion mit Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, aufweisen und (ii) die Probanden einer zweiten Gruppe des Probandenkollektivs keine solche Infektion aufweisen ;
- 10 (b) Analyse und Vergleich bzw. Abgleich der jeweiligen Genexpressions- und/oder Genaktivitätsprofile von (i) Probanden der ersten Gruppe und (ii) Probanden der zweiten Gruppe und
- 15 (c) Identifikation mindestens eines Nukleinsäuremoleküls, insbesondere mindestens eines Gens, welches bei (i) den Probanden der ersten Gruppe im Vergleich zu (ii) den Probanden der zweiten Gruppe eine erhöhte Genexpression und/oder Genaktivität aufweist.
- 20 31. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Verfahren im Anschluß an Schritt (c) den nachfolgenden Schritt umfaßt:
- (d) Zuordnung des in Schritt (c) identifizierten Nukleinsäuremoleküls, insbesondere Gens, als ein mit der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehendes Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen.
- 25 32. Pharmazeutische Zusammensetzung, vorzugsweise für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen, enthaltend in wirksamen, insbesondere pharmazeutisch wirksamen Mengen mindestens eine pharmakologisch aktive Substanz, insbesondere einen Inhibitor und/oder Repressor, für ein mit der Vermehrung und/oder Replikation von Hepatitis-Viren, insbesondere Hepatitis-C-Viren, im Zusammenhang stehendes Nukleinsäuremolekül, insbesondere Gen, vorzugsweise ISG15, und/oder für dessen DNA-Sequenz und/oder für dessen zugeordnete RNA-Sequenz, insbesondere für dessen zugeordnete mRNA-Sequenz, und/oder für dessen zugeordnete (Poly-)Peptid, wobei
- 30 die Substanz nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 18 bis 31 erhältlich ist.
- 35

- 5 33. Pharmazeutische Zusammensetzung, vorzugsweise für die prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen, enthaltend in wirksamen, insbesondere pharmazeutisch wirksamen Mengen mindestens eine siRNA, wobei die siRNA die Genaktivität und/oder Genexpression mindestens eines interferonstimulierten Gens, insbesondere von ISG15, reguliert, insbesondere vermindert oder zumindest hemmt.

1/3

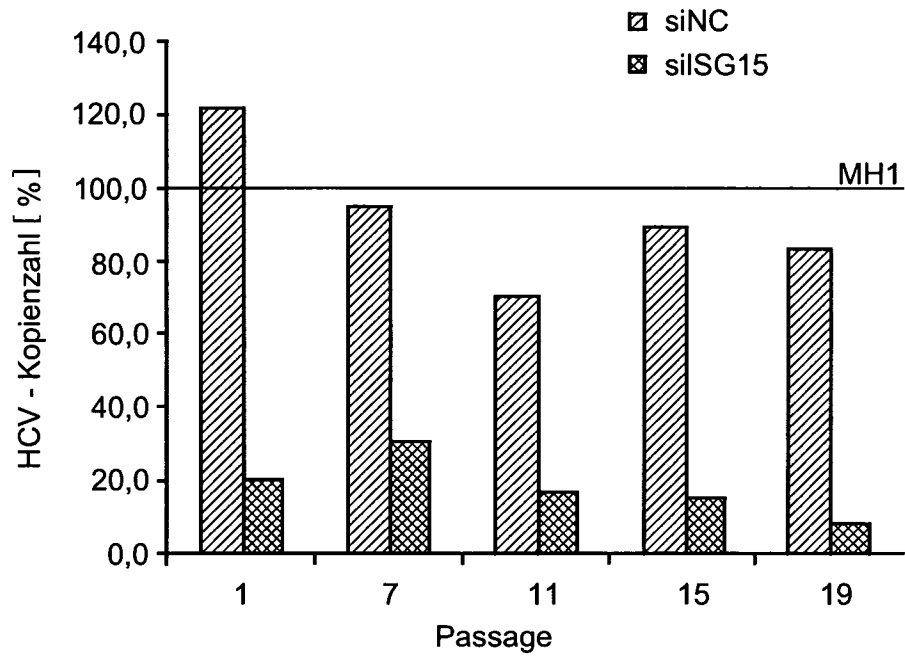


Fig. 1A

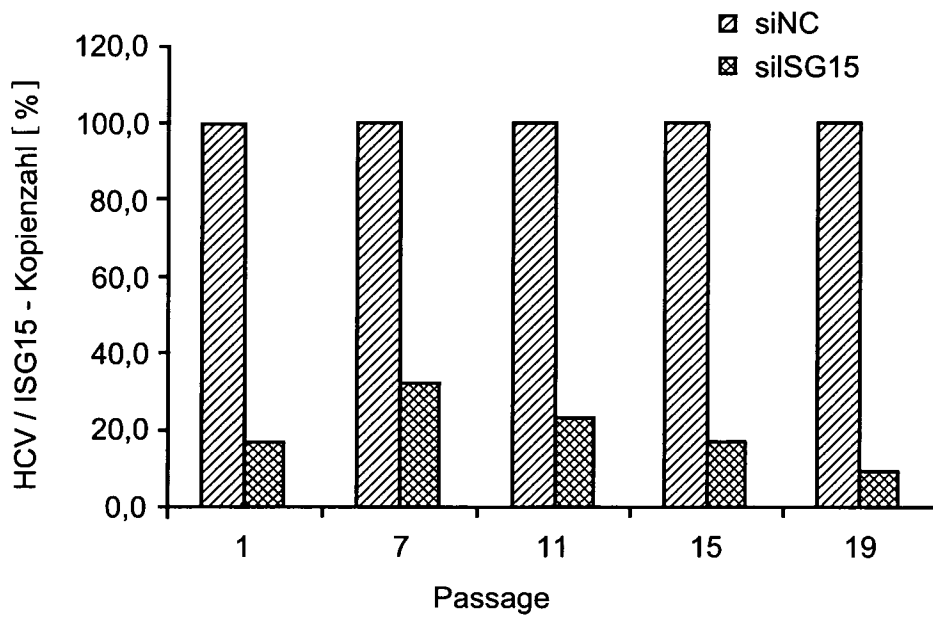


Fig. 1B

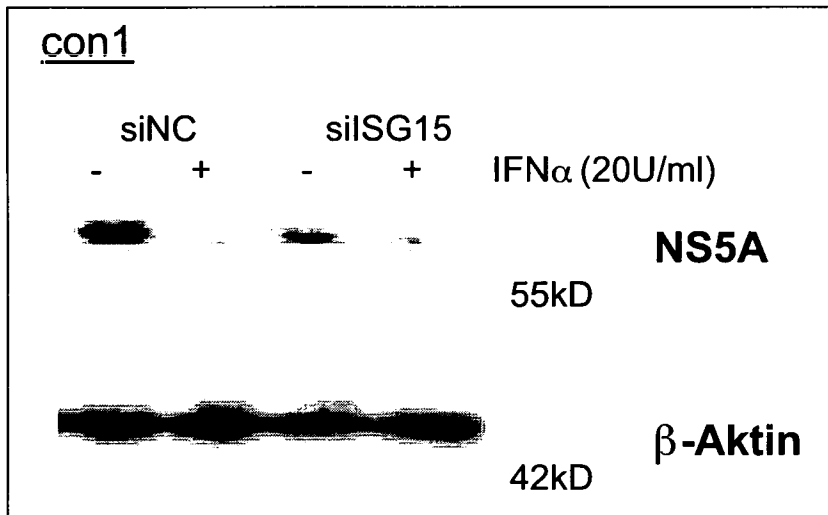


Fig. 2A

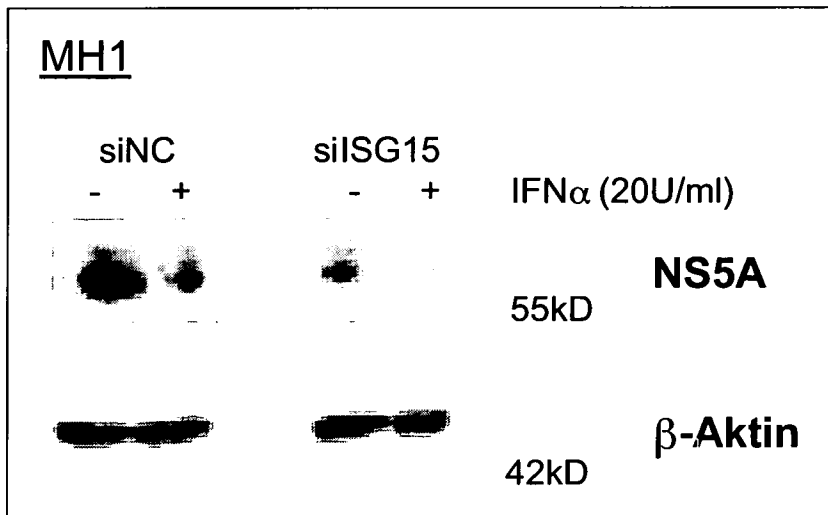


Fig. 2B

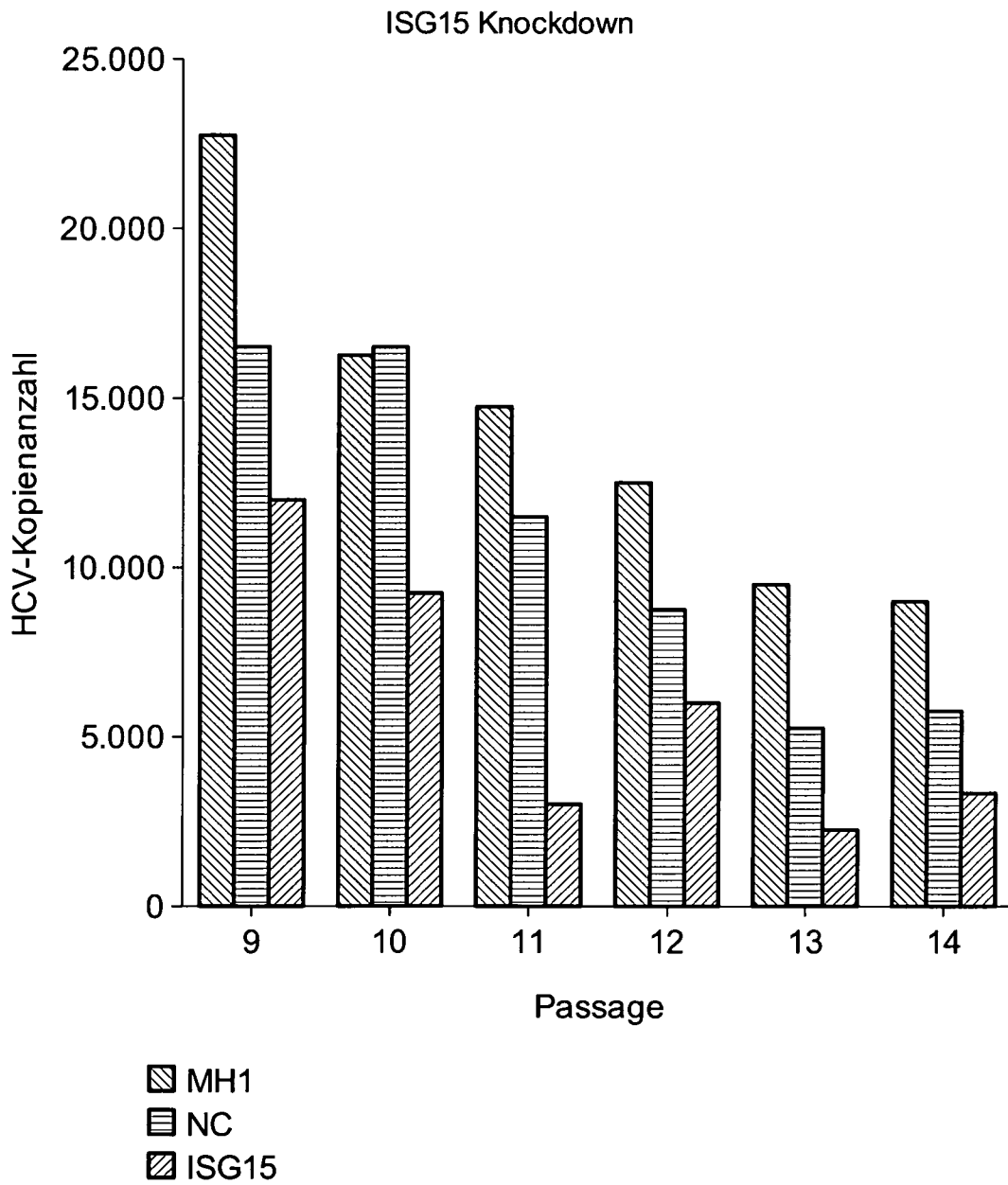


Fig. 3