



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 864 T2** 2006.10.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 859 833 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 864.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/15571**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 933 178.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/012033**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.09.1996**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **03.04.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.08.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **01.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.10.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 9/12** (2006.01)

**C12N 15/54** (2006.01)

**C12Q 1/48** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**4383 P**                      **27.09.1995**                      **US**

(73) Patentinhaber:

**Emory University, Atlanta, Ga., US**

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European  
Patent Attorneys, 81671 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HAGEDORN, H., Curt, Atlanta, GA 30319, US; AL,  
H., Reinoldus, Atlanta, GA 30329, US**

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTE RNA-REPLIKASE VON HEPATITIS-C-VIRUS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der US Provisional Anmeldung Serial Nr. 60/004,383, die am 27. September 1995 eingereicht wurde.

### Gebiet der Erfindung

**[0002]** Die vorliegende Erfindung betrifft Hepatitis C Virus (HCV), insbesondere die Expression und Reinigung einer RNA abhängigen RNA Polymerase (RDRP), die von dem HCV Genom kodiert wird, Antikörper, die gegen HCV-RDRP gerichtet sind und Verfahren zur Verwendung des Enzyms, um chronische HCV Infektionen zu diagnostizieren und um antivirale Mittel, die gegen HCV wirksam sind, zu screenen.

### Hintergrund der Erfindung

**[0003]** HCV ist das hauptverursache Agens für Posttransfusions- und für sporadische non A, non B Hepatitis (Alter, H.J. (1990) J. Gastro. Hepatol. 1:78–94; Dienstag, J.L. (1983) Gastro 85:439–462). Trotz verbessertem Screening verursacht HCV immer noch mindestens 25% der akuten viralen Hepatitis in vielen Ländern (Alter, H.J. (1990) supra; Dienstag, J.L. (1983) supra; Alter, M.J. et al. (1990a) J.A.M.A. 264:2231–2235; Alter, M.J. et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327:1899–1905; Alter, M.J. et al. (1990b) N. Engl. J. Med. 321:1494–1500). Die Infektion durch HCV ist heimtückisch in einem großen Anteil von chronisch infizierten (und infektiösen) Trägern, die für viele Jahre keine klinischen Symptome zeigen. Die hohe Progressionsrate von akuter Infektion zu chronischer Infektion (70–100%) und Lebererkrankung (> 50%), seine weltweite Verteilung und der Mangel eines Impfstoffs macht HCV zu einer signifikanten Ursache von Morbidität und Mortalität.

**[0004]** HCV ist ein umhülltes Virus, dessen Genom eine 9,4 kb einzelsträngige RNA (sense(+)) ist, die ein einziges Polypeptid kodiert, das durch Proteolyse gespalten wird, um mindestens 9 Proteine zu ergeben. HCV ist mit Pestiviren und Flaviviren verwandt (Choo, Q.-L. et al. (1989) Science 244:362–364; Choo, Q.-L. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451–2455). Die Reinfektion von zuvor HCV-infizierten Schimpansen legt nahe, dass eine protektive Immunität transient oder nicht existent ist (Farci, P. et al. (1992) Science 258:135–140). Weiterhin legen Ergebnisse von kürzlichen Vakzinversuchen nahe, dass die Entwicklung einer wirksamen Vakzine in der Ferne liegt (Houghton, M. et al. (1994) 2. Internat. Meeting über Hepatitis C (San Diego)). Versuchte Behandlung von chronischer HCV Infektion unter Verwendung von bestehenden antiviralen Mitteln liefert niedrige Heilungsraten und ernste Nebeneffekte (Dienstag, J.L. (1983) supra).

**[0005]** Die Nukleotidsequenz des HCV Genoms wurde kloniert, und ein einzelner offener Leserahmen wurde identifiziert. Unter Verwendung eines Vaccinia Virus Expressionssystems wurden einige Spaltungsprodukte vorläufig identifiziert (Lin, C. et al. (1994) J. Virol. 68:5063–5073; Grakoui, A. et al. (1993) J. Virol. 67:1385–1395). Die verschiedenen putativen Spaltungsprodukte wurden durch Antikörper erkannt, die gegen verschiedene Peptide gerichtet waren, die aus Aminosäuresequenzen synthetisiert wurden, die von verschiedenen Segmenten der kodierenden Regionen abgeleitet waren. Die Größen der Antikörper reaktiven Peptide wurden durch SDS-PAGE (siehe [Fig. 1](#)) geschätzt. Von dem Nicht Strukturprotein, das als 5B (NS5B) bezeichnet wird, wurde gezeigt, dass es eine aminoterminal Sequenz SMSY (Ser-Met-Ser-Tyr) aufweist. Ein Molekül, das die gesamte NS5B Region, die von Met-Gly vorangegangen wird, umfasst, wird von Lin et al., J. Virol. 68(12):8147–8157 (1994) offenbart. Die NS5B Region kodiert ein 68 kd Protein (p68), das ein internes GDD (Gly-Asp-Asp) Motiv enthält, das in RNA abhängigen RNA Polymerasen von anderen RNA Viren gefunden wird (Koonin, E.V. (1991) J. Gen. Virol. 72:2197–2206). Jedoch wurde keine Polymerase Aktivität für HCV p68 nachgewiesen. Tatsächlich wurde die Frage erhoben, dass das 5B Protein (p68) alleine kein aktives RNA abhängiges RNA Polymerase Enzym kodiert, und dass eine andere Untereinheit, möglicherweise das NS5A Genprodukt, für die katalytische Aktivität essenziell ist. Vorherige Versuche der Erfinder und von anderen, die NS5B kodierende Region als ein Fusionsprotein unter Verwendung bestehender Expressionssysteme, welche die Reinigung des Fusionsprodukts fördern, zu exprimieren, und spezifische Spaltung haben versagt, irgendeine aktive Polymerase zu liefern. Jedoch haben Bartenschläger et al., (J. Virol. 1994, 68(8), 5045–55) ein Protein isoliert, das mit NS5B Antiserum reagiert, aber es sind keine weiteren Details über dieses Protein bekannt.

### Zusammenfassung der Erfindung

**[0006]** Die vorliegende Erfindung stellt ein rekombinantes Protein von HCV mit RDRP Aktivität (r-HCV-RDRP) bereit, das durch Expression in einer Wirtszelle oder bakteriellen Zelle einer modifizierten NS5B kodierenden Region von HCV erhältlich ist. Insbesondere stellt die Erfindung ein rekombinantes HCV-RDRP gemäß Anspruch 1 bereit. Die Daten, die hier beschrieben sind, wurden mit einem r-HCV-RDRP mit einem N-terminalen

MA (Met-Ala) Dipeptid erhalten, was eine N-terminale Sequenz MASMSY (SEQ ID NR: 6) anstelle der vorhergesagten SMSY Sequenz des Wildtyp gespaltenen Proteins ergibt. Die kodierende Sequenz von NS5B ist folglich modifiziert, so dass sie ein Met Kodon (ATG) am 5'-Ende ebenso wie gegebenenfalls Kodons für andere Aminosäuren, die eingeschlossen oder deletiert werden sollen, enthält. Minimale Modifikationen sind bevorzugt, um möglicherweise schädliche Wirkungen auf die Enzym Aktivität zu vermeiden, und um die Bildung von künstlichen Epitopen zu vermeiden. Das r-HCV-RDRP kann in *E. coli* und in Säugerzellen exprimiert werden, um aktives RDRP zu erhalten. Die Expression von aktivem r-HCV-RDRP in *E. coli* zeigt, dass kein anderes HCV kodiertes Protein für die Polymerase Aktivität notwendig ist.

**[0007]** Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Löslichkeit von r-HCV-RDRP ohne zerstörende Aktivität bereit.

**[0008]** Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Reinigung von gelöstem HCV-RDRP bereit. Ein solches Verfahren, das in Kombination mit anderen verwendet werden kann, ist die Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Antikörpers gegen r-HCV-RDRP als dem Affinitätsliganden. Andere Affinitätsliganden werden durch einen kombinatorischen Bibliotheksansatz erhalten, wie z.B. von Wu, J. et al. (1994) *Biochemistry* 33:14825–14833; und Ohlmeyer, M.H.J. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922–10926 beschrieben ist.

**[0009]** Zusätzlich stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper, die spezifisch für HCV-RDRP sind, bereit. Solche Antikörper können durch bekannte Techniken unter Verwendung des gereinigten Enzyms als Antigen hergestellt werden. Solche Antikörper binden entweder an r-HCV-RDRP oder Wildtyp HCV-RDRP. Die Verfügbarkeit solcher Antikörper ermöglicht es, eine affinitätsmarkierte Chromatographiematrix für die schnelle Reinigung von HCV-RDRP herzustellen. Der Antikörper ermöglicht auch den schnellen Nachweis von HCV-RDRP in biologischen Materialien, zum Beispiel in Serum von HCV infizierten Patienten.

**[0010]** Säugerzellen können mit einer exprimierbaren kodierenden Sequenz, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodiert, transfiziert werden. Folglich stellt die Erfindung auch eine Säuger Zelllinie bereit, die r-HCV-RDRP exprimiert. Solche Zellen können für das Untersuchen der Wirkungen von antiviralen Kandidatenverbindungen als Inhibitoren von RDRP Aktivität verwendet werden.

**[0011]** Somit stellt die Erfindung auch ein Verfahren zum Screenen möglicher Inhibitoren von RDRP Aktivität bereit. Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität können eine antivirale Aktivität aufweisen, weil die Inhibierung der Polymerase die virale Replikation und die Expression von Virus Genprodukten inhibiert. Der in vitro Assay ist vorteilhaft, weil er Verbindungen ausschließen kann, die nicht in die infizierte Zelle eindringen können. Eine Klasse von attraktiven Kandidatenverbindungen sind die Nukleosid Analoga; Verbindungen, die, nachdem sie innerhalb von Zellen modifiziert (phosphoryliert) wurden, an Substratstellen auf dem Enzym binden können oder die in eine neu synthetisierte RNA eingebaut werden können, aber deren Anwesenheit dort die normale Funktion der HCV Polymerase oder die weitere Replikation einer RNA, die das Analogon enthält, zerstört. Acyclovir ist ein Beispiel eines sehr wirksamen und sicheren Nukleosid Analogs, das die DNA Virusreplikation durch Inhibieren einer viralen Polymerase (DNA abhängige DNA Polymerase) inhibiert und mit der Primer-Matrizenfunktion (Kettenabbruch) interferiert. Solche Analoga sind nahezu immer nur in der Nukleotidtriphosphat Form wirksam. Der in vitro Assay stellt ein einfaches Verfahren zum Verabreichen der Verbindung in seiner Nukleosid Form oder Nukleosid Monophosphat Form bereit, die es der endogenen metabolischen Aktivität der Zelle erlaubt, diese Form in das aktive Triphosphat umzuwandeln, wodurch ein Schritt der chemischen Synthese des Triphosphats, der in einem in vivo Assay benötigt werden würde, vermieden wird.

**[0012]** Ein Verfahren zum Messen der HCV-RDRP Aktivität in vitro wird ebenfalls bereitgestellt. Ein solcher Assay erlaubt die Identifizierung des Enzyms und die Bewertung seiner Konzentration während der Reinigung. Zusätzlich stellt der Assay ein zusätzliches in vitro Verfahren zum Screenen potenzieller Inhibitoren von RDRP als antivirale Kandidatenmittel bereit.

**[0013]** Grundsätzlich kann irgendeine Verbindung als ein Kandidaten Inhibitor getestet werden. Bestimmte Klassen von Verbindungen werden als attraktive Kandidaten erachtet. Diese schließen ohne Einschränkung Nukleosid Analoga, Oligonukleotide und Peptide ein. Bestimmte Verbindungen mit planaren polycyclisch aromatischen Eigenschaften sind ebenfalls potenzielle Inhibitoren. Es wird verstanden, dass Verbindungen, die als wirksame RDRP Inhibitoren identifiziert wurden, weiter hinsichtlich Toxizität, Bioverfügbarkeit, Nebenwirkungen und ähnlichem gescreent werden müssen, bevor sie als therapeutische Mittel getestet werden. Nichts desto trotz ist die anfängliche Identifizierung als ein Inhibitor von HCV-RDRP ein essenzieller erster Schritt in

der Entwicklung einer antiviralen Therapie. Es wird auch erkannt werden, dass ein Inhibitor von r-HCV-RDRP auch Wildtyp HCV-RDRP inhibieren wird.

**[0014]** In einem anderen Aspekt der Erfindung ermöglicht es die Existenz von gereinigtem HCV-RDRP oder r-HCV-RDRP, Antikörper gegen RDRP, die in dem Serum eines HCV infizierten Patienten vorkommen, nachzuweisen und zu messen. Die Tatsache, dass solche Antikörper überhaupt existieren, ist an sich ein Befund, der durch die Expression und Herstellung von erfindungsgemäßen gereinigten r-HCV-RDRP ermöglicht wird. Die Existenz von zirkulierenden Antikörpern gegen HCV-RDRP in infiziertem Serum kann in der Lyse von infizierten Zellen und der Freisetzung von HCV-RDRP in die extrazellulären Flüssigkeiten und den Blutstrom begründet sein, wo es eine Antikörper Antwort stimulieren kann. Weil die Erkrankung in ihrer Schwere schwankt, schwanken auch die freigesetzten Mengen von HCV-RDRP und die Mengen des Antikörpers dagegen. Deshalb kann die Menge des Antikörpers gegen HCV-RDRP, die in dem Serum eines Patienten anwesend ist, als ein Indikator nicht nur für die Anwesenheit der Infektion verwendet werden, sondern auch für ihre Schwere zu einer gegebenen Zeit. Der Assay für Anti-HCV-RDRP kann als ein Mittel zum Diagnostizieren einer Infektion und auch als ein Mittel zum Überwachen des Verlaufs der Erkrankung über die Zeit oder als Antwort auf eine Behandlung dienen. Der Assay für Anti-HCV-RDRP kann durch eine Vielzahl von bekannten Techniken, wie das Geltrennungsverfahren, das hier beschrieben ist, durchgeführt werden. Andere geeignete Verfahren schließen ELISA und Radioimmunassay ein. Ein Assay des Sandwich Typs, der immobilisiertes r-HCV-RDRP verwendet, um den Antikörper zu fangen, kann anschließend ein Anti-Immunglobulin Reagenz, das mit einem geeigneten Marker, wie einem Enzym, Radioisotop, Fluoreszenzmolekül oder Chemilumineszenz Marker oder ähnlichem markiert ist, die alle vom Fachmann verstanden werden, verwenden. (Antibodies: A laboratory manual, Ed Harlow und David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) S. 553–611).

#### Kurzbeschreibung der Figuren

**[0015] Fig. 1** Hepatitis C Virus Genom und Polypeptid Spaltungsprodukte. Die Spaltungsprodukte des HCV Polyproteins wurden vorläufig unter Verwendung von Vaccinia Virus Expressionssystemen identifiziert. Der Aminoterminus des 5B Proteins, der in diesem System exprimiert und prozessiert wurde, ist SMSY (Ser-Met-Ser-Tyr). Obwohl veröffentlichte Berichte nicht bewiesen haben, dass das 5B Protein RNA Polymerase Aktivität aufweist, besitzt es das GDD (Gly-Asp-Asp) Motiv, das in anderen RNA abhängigen RNA Polymerasen gefunden wird. Es wurde die Frage aufgeworfen, dass das 5B Protein alleine kein aktives RNA abhängige RNA Polymerase Enzym kodiert, und dass eine andere Untereinheit (möglicherweise das NS5A Genprodukt) für die katalytische Aktivität essentiell ist. Während der anfänglichen Phasen dieser Arbeit waren wir unsicher, ob das Protein, das von NS5B kodiert wird, eine RNA abhängige RNA Polymerase Aktivität einfach aufgrund des Mangels von anderen essenziellen Faktoren zeigen würde.

**[0016] Fig. 2.** Expression von r-HCV-RDRP abhängiger RNA Polymerase in E. coli unter Verwendung von T7 Polymerase getriebenen Studier Vektoren. E. coli, die den veränderten T7 Polymerase getriebenen Expressionsvektor enthalten, wurden bei 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Es wurde eine Probe von Zellen erhalten, und IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Die Proben wurden nach 1, 2 und 3 Stunden nach der IPTG Induktion gesammelt. Die ganzen Zellen wurden in 1X Probenpuffer bei 95°C lysiert, und die Proben wurden durch 10% SDS-PAGE analysiert. Das Foto zeigt ein repräsentatives Coomassie Blue gefärbtes Gel. Die Spur 1 zeigt molekulare Größenmarker; Spur 2, die nicht induzierte Kontrolle (0 h); Spur 3, 1 h; Spur 4, 2 h; und Spur 5, 3 h nach IPTG Induktion. Rekombinante r-HCV-RDRP abhängige RNA Polymerase ist durch einen Pfeil (RDRP) gekennzeichnet.

**[0017] Fig. 3.** Einige Patienten mit chronischer Hepatitis C weisen zirkulierende Antikörper auf, die mit rekombinanter HCV RNA abhängiger RNA Polymerase reagieren. Zellen, die r-HCV-RDRP exprimieren, wurden geerntet und durch Erhitzen in SDS-PAGE Probenpuffer lysiert. Lösliche Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose Membrane transferiert und mit menschlichen Seren unter Verwendung einer Immunetics Miniblotter Matrize (Hagedorn, et al. FEBS Lett. (1990) 264:59–62) immungeblottet. Die Immunblots wurden mit einem sekundären anti-humanen Meerrettich Peroxidase konjugierten Antikörper und den verstärkten chemilumineszenten Verfahren (ECL, Amersham) entwickelt. Das Foto zeigt einen Immunblot, in dem Spur 1 mit normalem humanem Serum und die Spuren 2 (1:500 Verdünnung), 3 (1:300) und 4 (1:200) mit Serum aus einem Patienten mit chronischer Hepatitis C inkubiert wurden. Die Lage von rekombinantem HCV-RDRP (durch Coomassie und Ponceau S Färbung sichtbar gemacht) ist durch einen Pfeil gezeigt. Diese Banden mit geringen molekularen Massen, die in den Spuren 3 und 4 beobachtet werden, stellen proteolytische Fragmente von RDRP dar, die beobachtet werden, wenn Gesamt E. coli Lysate in den Immunblots verwendet wurden.

**[0018] Fig. 4.** Löslichkeit von HCV-RDRP unter nicht denaturierenden Bedingungen. Zellen, die r-HCV-RDRP

exprimierten, wurden geerntet und unter Verwendung von Standardverfahren verarbeitet. Proben, die unlösliche E. coli Pellets (Pellet, Positivkontrolle), und lösliche Fraktionen von Zellen, die den RDRP Expressionsvektor enthalten oder nicht enthalten (Negativkontrolle) wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose Membranen transferiert. Proteine, die an Nitrocellulose gebunden waren, wurden mit Kaninchen Präimmun und Kaninchen Anti-RDRP Seren, wie in [Fig. 3](#) angegeben ist, inkubiert. Die Blots wurden mit dem ECL System (Amersham) entwickelt. Das Foto zeigt einen Immunblot, in dem die Spuren 1, 3, 5, 7 und 9 mit dem Präimmunserum und die Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 mit dem Immunserum inkubiert wurde. Zwei unabhängig voneinander hergestellte Proben von löslichen Proteinen (plus IPTC #1 & #2, Spuren 3–6) wurden untersucht.

**[0019] Fig. 5.** Enzymatisch aktive rekombinante r-HCV RNA abhängige RNA Polymerase. Poly(U) Polymerase Aktivität von gereinigter rekombinanter Poliovirus RDRP (ungefähr 50 ng) und gleiche Mengen an löslichem Protein (ungefähr 1 µg) aus E. coli, das r-HCV-RDRP (HCV-RDRP Lysat) exprimiert oder Kontrollzellen, die kein RDRP exprimieren (Kontrolllysat) sind gezeigt. Die Inkubationen wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt, und CPM von poly(U), das aus 15 µl der Inkubation gewonnen wurde, wurden nach 30 min (eine Probe) und 60 min (Mittelwert von Duplikaten) Inkubation gezeigt (J. Virol. (1986) 58:790–796).

**[0020] Fig. 6.** Enzym Assay von teilweise gereinigter rekombinanter HCV RNA abhängiger RNA Polymerase. Es wurden Lysate von E. coli, die r-HCV-RDRP exprimieren, hergestellt, und Enzym Assays wurden wie in [Fig. 5](#) durchgeführt. Das gezeigte Experiment verwendete ein DEAE Harz in einem Batch Reinigungsansatz unter pH und Pufferbedingungen, die es RDRP erlaubten, an das Harz zu binden. Gleiche Mengen von Protein wurden aus Zelllysaten (als RDRP Lysat bezeichnet) untersucht, und es wurden Proteine von dem DEAE Harz mit 0,5 M NaCl (als DEAE Batch bezeichnet) eluiert, die auf ungefähr jene des Lysats konzentriert wurden. Zusätzliche Studien mit DEAE Harz und anderen Testharzen haben gezeigt, dass eine teilweise Reinigung der RDRP Enzym Aktivität mit dem Anstieg in der Menge von nicht proteolytisch gespaltenem RDRP korreliert, das wir durch Immunblotten unter Verwendung von Kaninchen Antiserum und den im [Fig. 4](#) beschriebenen Verfahren nachgewiesen haben.

**[0021] Fig. 7.** Immunaффinitätsreinigung von rekombinanter r-HCV-RDRP. Diese Fotokopie zeigt das anfängliche Ergebnis mit einer Immunaффinitätssäule, die mit Kaninchen polyklonalen Protein A Sepharose gereinigten Anti-RDRP Antikörpern hergestellt wurde. Das Ausgangsmaterial war gelöstes Protein aus E. coli, die rekombinante r-HCV-RDRP exprimieren. Die Figur zeigt einen Immunblot von Proteinen, die aus zwei identischen Säulen eluiert wurden, auf die Protein unter verschiedenen Detergenz Bedingungen aufgetragen wurde. Spur 1 zeigt Proteine, die von Antikörper/Sepharose Kügelchen eluiert wurden, die über Nacht mit der gelösten rekombinanten RDRP in 20 mM Tris-pH 7,5, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% Glycerol und 0,05% Triton X-100 gemischt wurden. Diese Kügelchen wurden am folgenden Morgen mit 10 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7,2 gewaschen, und die Proteine wurden mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert. Das eluierte Protein wurde in 1 M Tris pH 8,0 gesammelt, um den pH erneut einzustellen. Die Proteine, die von der Säule eluierten, wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert und wie in [Fig. 4](#) immun geblottet. Spur 2 zeigt Proteine, die von identischen Kügelchen eluierten, die mit demselben Ausgangsmaterial gemischt wurden, mit der Ausnahme, dass 0,05% NP-40 anstelle von 0,05% Triton X-100 anwesend war. Die Lage von r-HCV-RDRP ist angegeben.

## Detaillierte Beschreibung der Erfindung

### Definitionen

**[0022]** "RDRP" steht für RNA abhängige RNA Polymerase, ein Enzym, das RNA Synthese katalysiert, wobei die synthetisierte RNA eine Sequenz aufweist, die komplementär zu einer RNA-Matrize ist. "HCV-RDRP" ist die RDRP von Hepatitis C Virus. Die hier beschriebene modifizierte HCV-RDRP wird als r-HCV-RDRP bezeichnet. Die Region des HCV Genoms, die als NS5B bezeichnet wird, wurde als ein Protein Spaltungsprodukt des HCV Polypeptids identifiziert, indem ein Vaccinia Virus Expressionssystem wie supra beschrieben, verwendet wurde. Die Nukleotidsequenz von NS5B ist in SEQ ID NR: 1 eingeschlossen. Die putative Aminosäure, die durch die NS5B Sequenz kodiert wird, beginnt mit Nukleotid 7. Wo die Sequenz am 5'-Ende deletiert wurde, wurde die verbleibende Sequenz durch die Nukleotidzahlen beginnend und endend an den verbleibenden kodierenden Sequenzen, ohne das Stopp Kodon einzuschließen, bezeichnet. Zum Beispiel bezeichnet NS5B<sub>34–1779</sub> den Teil von NS5B einschließlich der Nukleotide 34–1779 von SEQ ID NR: 1.

**[0023]** Die Aminosäuresequenz, die das hier beispielhafte r-HCV-RDRP kodiert, ist in SEQ ID NR: 2 angegeben. Die Aminosäuresequenz, die von NS5B kodiert wird, beginnt bei Aminosäure Nr. 3 von SEQ ID NR: 2. Wo die Sequenz, die von NS5B kodiert wird, am N-Terminus deletiert wurde, ist die verbleibende Sequenz als

$\Delta^n$ NS5B bezeichnet, wobei n die Zahl der von dem N-Terminus von NS5B deletierten Aminosäuren ist. Zum Beispiel ist  $\Delta^9$ NS5B die Sequenz von Aminosäuren 12–593 in SEQ ID NR: 2. Die Erfindung stellt ein rekombinantes HCV-RDRP gemäß Anspruch 1 bereit.

**[0024]** Der Begriff "ausgetauscht" soll geändert in eine Aminosäure anders als die, die ursprünglich in der NS5B Sequenz gefunden wird, bedeuten. Zum Beispiel können einzelne Aminosäuren durch das bekannte Verfahren der Alanin Scanning Mutagenese in Alanin geändert werden. Die Alanin Scanning Mutagenese stellt ein schnelles und einfaches Verfahren zum Identifizieren von Aminosäure Positionen bereit, wo eine Substitution toleriert wird ohne im Wesentlichen die Funktion negativ zu beeinflussen. Positionen, an denen das Alanin Scanning eine Toleranz für Substitutionen zeigt, können wahrscheinlich andere Aminosäure Substitutionen ebenso tolerieren. Bevorzugte Substitutionen sind eine oder mehrere Histidin Reste, die als Affinitätsliganden für Metall (z.B. Nickel) Säulen dienen können. Die Anwesenheit von Histidin stellt bevorzugte Bindung an die Säule bereit, um die Reinigung von r-HCV-RDRP zu erleichtern. Die Erfindung stellt auch exprimierbare kodierende Sequenzen, die solche r-HCV-RDRP kodieren, bereit. [NS5B<sub>34–1779</sub>], wie definiert, stellt die Nukleotidsequenz der verbleibenden SEQ ID NR: 1, von den Nukleotiden 34–1779 dar, die das Stopp Kodon nicht einschließt. Die Techniken zur Herstellung irgendeiner der zuvor genannten Sequenzen sind im Wesentlichen wie unten beschrieben. Es ist offensichtlich, dass Primer für die gewünschte Sequenz, kombiniert mit gewünschten Restriktionsstellen Sequenzen, synthetisiert werden können, um die Insertion in geeignete Expressionsvektoren zu erleichtern. Die Wahl des Vektors beruht auf Faktoren, die im Stand der Technik bekannt sind, einschließlich der Wirtszelle, der Art des gewünschten Promotors und der Anwesenheit oder Abwesenheit von zusätzlichen Sequenzen, die mit der r-HCV-RDRP koexprimiert werden könnten. Die Reaktionsbedingung, PCR, Vektorinsertion und das Wirtszell Wachstum sind wie unten beschrieben oder wie im Stand der Technik bekannt ist.

**[0025]** Weitere Modifikationen können an r-HCV-RDRP gemacht werden. Eine Deletion von ungefähr 25% der C-terminalen Region, die das Gly-Asp-Asp Motiv nicht einschließt, wurde konstruiert (r-HCV-RDRP- $\Delta$ C) und hinsichtlich Aktivität getestet. Obwohl Protein exprimiert wurde und durch Immunblotten mit Anti-RDRP Serum nachgewiesen werden konnte, besaß das Lysat aus E. coli, die r-HCV-RDRP- $\Delta$ C exprimierten, keine messbare Aktivität in sowohl dem poly(U) Assay als auch mit Globin mRNA als Matrize. Jedoch wird die Region der Aminosäuren 565–572 von NS5B (565–574 von SEQ ID NR: 2) nahe dem C-Terminus auf Basis von Modellstudien erachtet, dass sie an der Proteinoberfläche exponiert ist. Eine seitengerichtete Mutagenese wurde verwendet, um die Kodierung von Arg 570→His, Arg 572→His und Try 573→His zu ändern (unter Verwendung der Nummerierung von SEQ ID NR: 2). Durch das Klustern von einem oder mehreren zusätzlichen Histidin Resten in der Oberflächenregion nahe einem Ende des Proteins wird die Reinigung durch Metall Affinitätschromatographie erleichtert, während die Enzym Aktivität im Wesentlichen nicht beeinflusst ist. Andere vorhergesagte Oberflächenregionen, die als Stellen für Mutagenese verwendet werden können, um eine existierende Aminosäure gegen Histidin auszutauschen, schließt die Aminosäuren 47–56, 152–159, 183–184, 210–215, 269–272, 384–391 und 439–442 in SEQ ID NR: 2 ein.

**[0026]** Obwohl die r-HCV-RDRP in nahezu irgendeinem Wirtszelltyp exprimiert werden kann, sollte das Enzym vorzugsweise in löslicher Form vorliegen, um in in vitro Studien verwendet zu werden, wie dem Testen hinsichtlich Inhibitoren. Wenn es intrazellulär synthetisiert wird, liegt das Enzym in einer unlöslichen Form in Zellysaten vor, außer es werden Schritte unternommen, um das Enzym zu lösen. Im Allgemeinen werden Wirtszellen gesammelt und konzentriert, anschließend durch Mittel, von denen bekannt ist, dass sie die Wirtszellen zerstören, lysiert, zum Beispiel durch die Verwendung eines Wirtszellwand lyisierenden Enzyms, durch Beschallen oder ähnlichem. Im Allgemeinen wird ein Protease Inhibitor hinzugefügt, um vor proteolytischen Enzymen, die durch Zellyse freigesetzt werden, zu schützen. Ein nicht ionisches Detergenz kann ebenfalls eingesetzt werden. Beschallte Zellen und subzelluläre Komplexe werden dem Gefrieren und Auftauen in der Anwesenheit der oben genannten Verbindungen unterworfen. Verbleibendes teilchenförmiges Material wird durch Zentrifugation bei 10.000–35.000 × g entfernt. Die r-HCV-RDRP verbleibt im Überstand. Ein detailliertes Protokoll zum Lösen von r-HCV-RDR, die in E. coli exprimiert wird, ist unten beschrieben.

**[0027]** Die weitere Reinigung des Enzyms wird durch Techniken und Mittel, die im Stand der Technik bekannt sind, erreicht. Diese schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf Antikörper Affinitätschromatographie, Metallbindungs Affinitätschromatographie (eine Technik, die insbesondere für modifizierte Formen des Enzyms mit hinzugefügten Histidin Resten geeignet ist), ebenso wie herkömmliche Ionenaustausch Säulen, differenzielle Präzipitation mit Ammoniumsulfat und andere Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, nicht beschränkt auf die Verfahren, die hier spezifisch offenbart sind. "Gereinigte Form" wird hier verwendet, um irgendeine Präparation des Enzyms mit mindestens 4-fach größerer spezifischer Aktivität als jener, die in einem gelösten Zellysat gemessen wird, zu bedeuten.

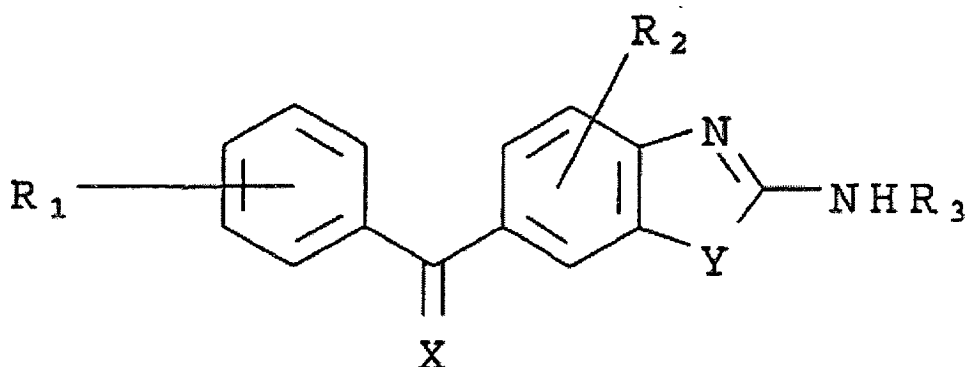


**[0028]** Antikörper gegen r-HCV-RDRP können durch eine Vielzahl von bekannten Techniken zur Herstellung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gebildet werden. Antikörper gegen r-HCV-RDRP binden auch HCV-RDRP von infizierten Zellen, wie durch die Entdeckung gezeigt wird, dass zirkulierende Antikörper gegen HCV-RDRP im Serum von HCV-infizierten Patienten unter Verwendung von r-HCV-RDRP als dem Antikörper Liganden, nachgewiesen werden können. Eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern mit Affinität für verschiedene Epitope von r-HCV-RDRP, wie im Stand der Technik bekannt, kann ausgewählt werden. Einige Antikörper können gegenüber der Enzym Aktivität inhibitorisch sein. Andere können eine moderate Affinität aufweisen, welche die Bindung an eine Antikörper Affinitätssäule und anschließende Elution unter Bedingungen, die das Enzym nicht inaktivieren, erleichtern.

**[0029]** Säugerzellen sind eine bevorzugte Wirtszelle für bestimmte Zwecke, insbesondere für in vitro Screening von Inhibitoren von HCV-RDRP und auch für die Entwicklung von Zelllinien, die HCV in Zellkultur propagieren können. Irgendeine der bekannten Zelllinien, die für die Transformation verwendet werden, kann prinzipiell transformiert werden, um r-HCV-RDRP zu exprimieren. Bevorzugte Zelllinien sind jene, die von Geweben abstammen, von denen bekannt ist, dass sie von HCV oder ähnlichen Viren infiziert sind, wie Flaviviren. Solche Zelllinien schließen zum Beispiel die humane Makrophagen Zelllinie U937, die humane Leber abgeleiteten hepG2 Zellen und die Schweinenieren Zelllinie PK15 ein. Ein kürzlich entdecktes Segment nahe dem 3'-Ende von HCV-RNA besitzt eine vorhergesagte Cloverleafartige Sekundärstruktur, die eine wahrscheinliche Stelle für Interaktion für ein Protein oder Peptid (das wirtskodiert sein kann), das HCV-RDRP reguliert, darstellt (Tanaka, T., et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:744, 749). Eine solche Regulation kann die Form des Veränderens der Matrizenspezifität oder der katalytischen Aktivität von r-HCV-RDRP ebenso wie des Wildtyp Enzyms annehmen. Die Expression von r-HCV-RDRP in Zellen, die normalerweise das regulatorische Protein exprimieren, stellt ein in vivo Zellsystem bereit, in dem die Expression von r-HCV-RDRP fast die Weise der Expression in HCV infizierten Zellen erreicht. Auch die Anwesenheit von aktiver HCV-RDRP in einer Zelle kann die Replikation von HCV, das durch Infektion eingeführt wurde oder genomische HCV RNA, die durch Transfektion eingefügt wurde, indem ein "Jump Start" für HCV Replikation bereitgestellt wird, verstärken. Am wichtigsten stellt die Fähigkeit, r-HCV-RDRP-Aktivität in transformierten Zellen zu messen, einen essenziellen Schlüssel zum Screenen potenzieller Inhibitoren von HCV-RDRP hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das Enzym in vivo zu inhibieren, bereit.

**[0030]** Ein Assay für RNA-Synthese durch r-HCV-RDRP in vitro hat gezeigt, dass das Enzym die Synthese von poly(U) unter Verwendung einer poly(A) Matrize und die Synthese von RNA unter Verwendung einer Globin mRNA Matrize katalysieren kann. Beide Reaktionen waren > 90% unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen primerabhängig. Das Enzym wies keine nachweisbare Aktivität in der Abwesenheit von  $Mg^{++}$  auf und zeigte maximale Aktivität in der Anwesenheit von ungefähr 20 mM  $Mg^{++}$ . Ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen, die antivirale Aktivität aufweisen, wird bereitgestellt durch das Testen der Wirkung von verschiedenen Verbindungen auf die RDRP Enzym Aktivität in vitro. Das in vitro Verfahren schließt das Vergleichen der Mengen der synthetisierten RNA in der Anwesenheit und Abwesenheit einer Testverbindung ein. Eine inhibitorische Wirkung wird angezeigt, wenn die Menge der synthetisierten RNA in einer Reaktion verringert ist, in der die Testverbindung anwesend ist im Vergleich zu einer Kontrollreaktion, in der die Testverbindung abwesend ist.

**[0031]** Die stabil transfizierte Zelllinie, die r-HCV-RDRP exprimiert, ist insbesondere zum Durchführen von Screenings nach Verbindungen, welche die Polymerase in intakten Säugerzellen inhibieren, verwendbar. Solche Inhibitoren sind wahrscheinlich Inhibitoren von HCV Replikation in infizierten Zellen. Ein solcher Test ist vorteilhaft, weil er zytotoxische Verbindungen und Verbindungen, die nicht in ausreichender Menge in die Zelle eintreten können, herausscreenen kann. Er stellt auch die zusätzliche Fähigkeit des Testens von Verbindungen bereit, die Vorläufer des aktuellen Inhibitors sind, aber die in den Inhibitor durch die zellulären metabolischen Vorgänge umgewandelt werden. Beispiele von Vorläufer Inhibitoren schließen Nukleosid Analoga ein, die phosphoryliert werden müssen, um in den aktiven Inhibitor umgewandelt zu werden, und Verbindungen mit einer aktiven Gruppe, die durch eine Verknüpfung geschützt ist, die hydrolytische Spaltung intrazellulär durchläuft, um den aktiven Inhibitor zu bilden. Nicht Nukleosid Analoga mit der gezeigten allgemeinen Struktur werden als aktive Kandidaten für r-HCV-RDRP Inhibitoren erachtet



wobei  $R_1$  und  $R_2$  Alkyl, Amino, Hydroxy, Alkoxy oder Halogen Gruppen sind,  $R_3$  eine Alkyl, Aryl, Hydroxy oder Alkoxy Gruppe ist,  $X$  O,  $NR_3$ , O,  $CH_2$  oder  $CHR_3$  ist. Im Allgemeinen werden die Testzellen zusätzlich mit einem Reporter Konstrukt transformiert, dessen Expression die Wirkung von r-HCV-RDRP benötigt, oder dessen Expression durch die Anwesenheit von r-HCV-RDRP amplifiziert wird. Reporter Gene sind im Stand der Technik gut bekannt, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Luciferase, sekretierte alkalische Phosphatase und das grünfluoreszierende Protein, die alle kommerziell erhältlich sind. Eine attraktive Strategie ist es, ein Antisense Gen für den Reporter zu verwenden, dies ist eine Version des Reporter Gens, die eine Antisense oder (–) Strang-Boten-RNA des Reporter Gens exprimiert. Die Aktivität einer RDRP wird anschließend benötigt, um einen Sense (+) Strang der RNA herzustellen, die translatiert werden kann, um den aktiven Reporter zu erhalten. Dieses System besitzt den Vorteil, dass es keine Hintergrundmenge an Reporter Aktivität in der Abwesenheit von aktiver HCV-RDRP gibt, wenn die RDRP inhibiert ist. Eine Zusammenfassung für die Konstruktion eines geeigneten (–) Strang Reporter Gens ist unten angegeben.

#### Material und Methoden

**[0032]** Material – Alle Chemikalien wurden von Fisher und alle Enzyme von Gibco BRL bezogen, außer es ist anders angegeben. AmpliTag wurde von Perkin-Eimer gekauft. Alle anderen PCR und Ligationsbestandteile stammten von Invitrogen. Lysozym, Antibiotika und vorgefärbte Protein Standards stammten von Sigma. Nukleotide und poly(A) stammten von Pharmacia.  $[^3H]$ -UTP stammte von Dupont NEN. Oligo(U) war ein großzügiges Geschenk von E. Ehrenfeld (Universität von Kalifornien, Irvine).

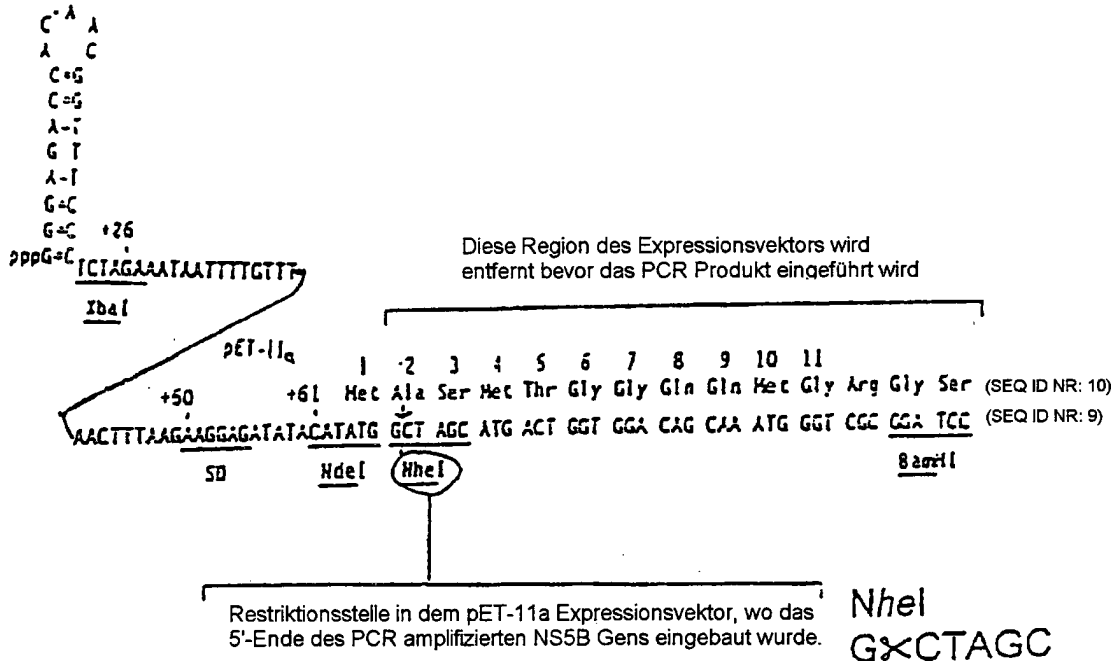
**[0033]** Subklonierung der HCV NS5B Region – PCR Primer für die Amplifikation der NS5B Region wurden basierend auf dem N-Terminus, wie durch Vaccinia Virus Expressionsstudien vorhergesagt (Lin, C. et al. (1994) supra; Grakoui, A. et al. (1993) supra) und der C-Terminus basierend auf dem Ende des offenen Leserahmens des HCV Polyproteins (Choo, Q-L. et al. (1991) supra) hergestellt. Die Matrize war der Original Prototyp HCV (Typ 1a) Klon (erhalten vom CDC) Choo, Q-L. et al. (1989), (1991), supra). Unter Verwendung der folgenden Primer, 5'-ATA GCT AGC ATG TCT TAC TCT TGG ACA GG-3' (SEQ ID NR: 3) und 5'-ATA GGA TCC TCA TCG GTT GGG GAG GAG G-3' (SEQ ID NR: 4) amplifizierten wir die NS5B Region mit minimalen Änderungen am N-Terminus (ASMSY SEQ ID NR: 5 anstelle SMSY SEQ ID NR: 7) und klonierten es gerichtet in pET-11a (Novagen) in die NheI und BamHI Restriktionsstellen (Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York). Das PCR amplifizierte Gen wies eine NheI Stelle, die am 5'-Ende angeordnet war und eine BamHI Stelle am 3'-Ende auf. Dieses Konstrukt führte zu der Synthese eines rekombinanten Proteins mit einer aminoterminalen Sequenz von MASMSY anstelle des SMSY Aminoterminus des putativen Wildtyp NS5B Proteins, das durch Vaccinia Virus Expressionsstudien vorhergesagt wurde.



A S M S Y S W T (Aminosäure kodiert im Primer, SEQ ID NR: 8)

5'-ATA GCT AGC ATG TCT TAC TCT TGG ACA GG-3' PCR Primer gerichtet an das 5'-Ende des NS5B  
 ↑ Gens der Hepatitis-C-Virus DNA, SEQ ID NR: 3

NheI Schnittstelle



**[0034]** Der PCR Reaktion ging eine 2 min Inkubation bei 94°C voran, gefolgt von 20 Zyklen von 1 min 94°C, 2 min 55°C und 3 min 72°C (Coy Corporation Tempcycler II). Die Reaktionen wurden abgeschlossen, indem die Temperatur bei 72°C für weitere 7 min gehalten wurde und anschließend auf 4°C abgekühlt wurde. Die amplifizierte DNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt, mit NheI und BamHI gespalten und erneut unter Verwendung von Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

**[0035]** Das Insert und der Vektor wurden über Nacht bei 14,5°C in einem 3:1 Verhältnis (Insert:Vektor) unter Verwendung von T4 Ligase (Maniatis, supra) ligiert. Das ligierte Material wurde verwendet, um E. coli (Top10™ von Invitrogen) unter Verwendung von CaCl<sub>2</sub> Verfahren zu transformieren. Die Kolonien wurden auf Ampicillin Platten selektiert, und Minipreps von Plasmid DNA, die aus einzelnen Kolonien isoliert wurde, wurden unter Verwendung von Restriktionsenzym Analysen charakterisiert. Die Plasmid DNA, die durch Minipräparationsverfahren erhalten wurde, wurde verwendet, um BL21 (ΔDE3) E. coli (Novagen) zu transformieren. Organismen, welche das Plasmid enthielten, wurden unter Verwendung von Ampicillin selektiert, und Minipräparationen von Plasmid DNA aus einzelnen Kolonien wurden durch Restriktionsenzymsspaltung analysiert.

**[0036]** Expression, Reinigung und Löslichkeit der putativen HCV-RDRP – BL21 (ΔDE3) E. coli, die das oben beschriebene pET-11a-NS5B Konstrukt enthielten, wurden in über Nacht Kulturen (M9ZB Medien mit Carbenicillin) angezogen und 1:20 in frischem Medium am nächsten Morgen verdünnt. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert, bis das Kulturmedium eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreichte. IPTG wurde zu dieser Zeit in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Die Expression der putativen RDRP wurde durch SDS-PAGE Analyse der Gesamtzellen, die in Probenpuffer bei 90°C lysiert wurden, gefolgt.

**[0037]** Um RDRP unter nicht denaturierenden Bedingungen zu lösen wurden die Zellen 2 h nach der IPTG Induktion geerntet. RDRP wurde gelöst, indem die Zellen auf Eis für 20 min in 20 mM Tris pH 7,5, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100 und 30 µg/ml Lysozym lysiert wurden. Die Proben wurde auf Eis mit einer 0,5 Inch Sonde (pulse setting) für 5 min (Ultrasonics Inc. W-225, outputsetting 7) beschallt und zentrifugiert (19.000 g bei 4°C für 30 min). Die unlösliche Fraktion (Pellet), die aus diesen Präparationen gewonnen wurde, war mit RDRP angereichert. Die Pellets wurden in SDS-PAGE Probenpuffer suspendiert und für 10 min bei 90°C erhitzt und als RDRP Marker für SDS-PAGE Gele verwendet. Jedoch wurde aktives Enzym im Überstand gefunden, wie in dem folgenden Protokoll angegeben ist.

Zusammenfassung des Löslichkeitsverfahrens für rekombinante RDRP

1. Auftauen von 5 g E. coli Pellet.
2. Resuspendieren von 5 g des Pellets in:  
45 ml Lysis-Puffer  
40 µl 100 mM PMSF (plus andere Protease Inhibitoren)  
150 µl Lysozym (10 mg/ml)

Lysis-Puffer:

20 mM Tris pH 7,5 (bei 4°C)  
0,5 mM EDTA  
100 mM KCl  
1 mM DTT  
0,1% Triton X-100 (oder 0,1% NP-40)  
10,0% (v/v) Glycerol

3. Anordnen der Proben auf Eis für 20 min, anschließend Beschallen für 5 min (Pulsmodus; Setting zwischen 6–7). Mischen während des Beschallens.
4. Nach dem Beschallen, Schockgefrieren des Lysats in flüssigem Stickstoff (Einsetzen des Lysats in flüssigen Stickstoff für ungefähr 1–2 min).
5. Schnelles Auftauen des Lysats bei 37°C im Wasserbad.
6. Beschallen des Lysats für 1 min.
7. Hinzufügen von zusätzlichen 5 ml Lysis-Puffer pro 45 ml beschallter Probenmix.
8. Aufteilen der gesamten beschallten Probe in 50 ml Fraktionen (Fisher 50 ml Gefäße).
9. Zentrifugieren des Lysats bei 12.500 rpm für 20 min im Beckman J-17 Rotor (oder 12.00 rpm in einem Sorvall SS-34 Rotor).
10. Entfernen des Überstands in saubere (sterile) 50 ml Fisher Gefäße und Hinzufügen von sterilem Glycerol des Protein Reinheitsgrades zu einer Endkonzentration von 10% (zum Beispiel 4,44 ml Glycerol/40 ml Überstand). Diese Lösung wird bei 4°C gelagert und als Ausgangsmaterial für die Reinigung von enzymatisch aktiver HCV-RDRP verwendet.

**[0038]** Die weitere Reinigung wird durchgeführt indem die folgenden Schritte, entweder einzeln oder in Kombination, verwendet werden.

**Lösliche Proteine aus Lysat aus *E. coli*, die rekombinante HCV-RDRP exprimieren**

(10.000 x g Überstand)

**45 % Ammoniumsulfat präzipitierte Proteine**(anschließend dialysiert in Tris-pH 7,5  
mit 10 % Glycerol und 1 mM DTT)**DEAE Anionenaustausch Chromatographie**(Ausgangsmaterial angewendet bei pH 8,5 - Tris Puffer,  
Waschschritt mit demselben Puffer und Enzym  
wird mit einem 0 - 0,5 M NaCl Gradienten eluiert)**Phosphocellulose Chromatographie**(konzentrierte DEAE Fraktionen, die Enzym enthalten,  
wurden verdünnt, um die Salzkonzentration zu verringern  
und den pH auf 8,0 (Tris/HCl) zu ändern, bevor die Proben  
auf die Säule aufgetragen wurden, Waschschritt, und  
Elution mit einem 0 - 0,5 M NaCl Gradient)**FPLC Gel Filtrationschromatographie****(Superose 12 HR 10/30 - Pharmacia)**(Ausgangsmaterial ist konzentriert, Puffer geändert  
auf 150 mM NaCl mit Tris pH 8,0 und angewendet in  
einem 200 µl Volumen mit einer Fließgeschwindigkeit  
von 0,3 ml/min)**Rekombinante HCV-RDRP für Enzym Assays**(gelagert in Aliquots bei -70°C mit Tris-pH 8,0,  
100 mM NaCl, 20 % Glycerol, 0,1 % NP-40 & 1 mM DTT)

**[0039]** Wie in allen Protein Reinigungsverfahren kann man Puffer, pH und andere Bedingungen modifizieren, um die Reinigung von HCV-RDRP weiter zu optimieren. Ein zusätzlicher Endreinigungsschritt (oder Substitution für den FPLC Gel Filtrationsschritt) ist ein Mono-S Kationenaustausch Chromatographieschritt bei pH 6,0 mit einem MES Puffer (der isoelektrische Punkt des Enzyms ist ungefähr 8,8). Alle Reinigungsschritte werden für Enzym Aktivität unter Verwendung des RDRP Assays, des Gesamtproteins überwacht und durch SDS-PAGE analysiert.

**[0040]** Kaninchen anti-HCV RDRP Serum – RDRP, gelöst aus der Pellet Fraktion wie oben beschrieben, wurde durch präparative SDS-PAGE getrennt und verwendet, um Kaninchen zu immunisieren. Die Tiere wurden in 4–5 Wochen Intervallen, wie kürzlich im Detail beschrieben, immunisiert. (Harlow, E. und D. Lane (1988) Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, S: 553–611).

**[0041]** Immunblot Analyse – Immunblots wurden durchgeführt unter Verwendung von kürzlich beschriebenen Verfahren mit der Modifikation, dass die sekundären HRP konjugierten Antikörper mit dem verstärkten Chemilumineszenz System (ECL, Amersham) verwendet wurden. Wenn Kaninchenserum der primäre Antikörper war, war der sekundäre Antikörper Anti-Kaninchen Immunglobulin. Wenn humanes Serum gescreent wurde, war der sekundäre Antikörper Anti-human Immunglobulin. Serum von Patienten mit dokumentierten chronischen Hepatitis C Infektionen wurde von Dr. Michael Beach vom Center for Disease Control and Prevention (Atlanta) zur Verfügung gestellt.

**[0042]** Poly(U) Polymerase Assay – Die Enzym Aktivität in löslichen Fraktionen wurde unter Verwendung eines poly(U) Polymerase Assays mit poly(A) als Matrize und oligo(U) als einem Primer gemessen (Hey, T.D. et al. (1986) J. Virol. 58:790–796). Die Proben (für gewöhnlich 2 µl) wurden in 50 µl Inkubationen enthaltend 50 mM HEPES (pH 8,0), 500 µM jeweils von ATP, CTP und GTP; 4 mM DTT, 3 mM MgAc<sub>2</sub>; und 60 µM ZnCl<sub>2</sub> untersucht. [<sup>3</sup>H]UTP in einer Konzentration von 15 µM (spezifische Aktivität: 27 Ci/mol) war ebenfalls anwesend. Jede Inkubation enthielt 1 µg poly(A) und 0,5 µg oligo(U) als einen Primer.

**[0043]** Die Inkubation waren bei 30°C für 30–60 min, [<sup>3</sup>H]poly(U) wurde mit TCA in der Anwesenheit von Träger DNA präzipitiert und auf Whatman GF/C Filtern gesammelt. Die Filter wurden mit jeweils 0,1 µl Natriumpyrophosphat/1 N Salzsäure und 95% Ethanol gewaschen. [<sup>3</sup>H]poly(U) wurde durch flüssige Szintillationspektrometrie (LKB 1218 RackBeta) quantifiziert.

Stabile Transfektion von Baby Hamster. Nieren (BHK) Zellen unter Verwendung von Lipofectin

Tag 1 (Nachmittag)

**[0044]** Splitten der BHK Zellen in 6 Vertiefungsplatten, die auf 50% Konfluenz für die Transfektion abzielen.

Tag 2 (nach 16.00 Uhr)

**[0045]** Herstellen der folgenden Lösungen in sterilen Gefäßen:

- (A) 50 µl Miniprep DNA + 50 µl Medium ohne Serum (DMEM/F12) (je 2)
- (B) 6,25 µl Lipofectin (Life Technologies, Gaithersburg, MD) + 93,75 µl Medium
- (C) 12,5 µl Lipofectin + 87,5 µl Medium
- (D) 6,25 µl Lipofectin + 193,75 µl Medium (Mock Transfektion)
- (E) 12,5 µl Lipofectin + 187,5 µl Medium (Mock Transfektion)

**[0046]** Vorsichtiges Mischen von A & B und A & C und Umsetzen der DNA und des Lipofectins für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit werden die Zellen zweimal mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen. Hinzufügen von 1,8 ml DMEM/F12 zu dem DNA/Lipofectin Komplex und sein Hinzufügen zu den Zellen mit vorsichtigem Schwenken. Stehenlassen der Zellen im Inkubator über Nacht.

Tag 3 (9.00 Uhr)

**[0047]** Entfernen der/des DNA/Lipofectins und Hinzufügen von 3 ml Medium + Serum zu den Zellen. Inkubieren der Zellen für 30–48 Stunden. Splitten der Zellen 1:20, 1:50 und 1:100 in 10 cm Schalen in 10 ml Medium + Serum enthaltend 600 µg/ml Geneticin. Stehen lassen für 3–7 Tage für die Selektion und 10–14 Tage für die Koloniebildung. Dasselbe Protokoll kann angepasst werden, um Starbust Dendrimer (Life Technologies, Gaithersburg, MD) anstelle von Lipofectin, um die Transfektionseffizienz zu verstärken, zu verwenden.

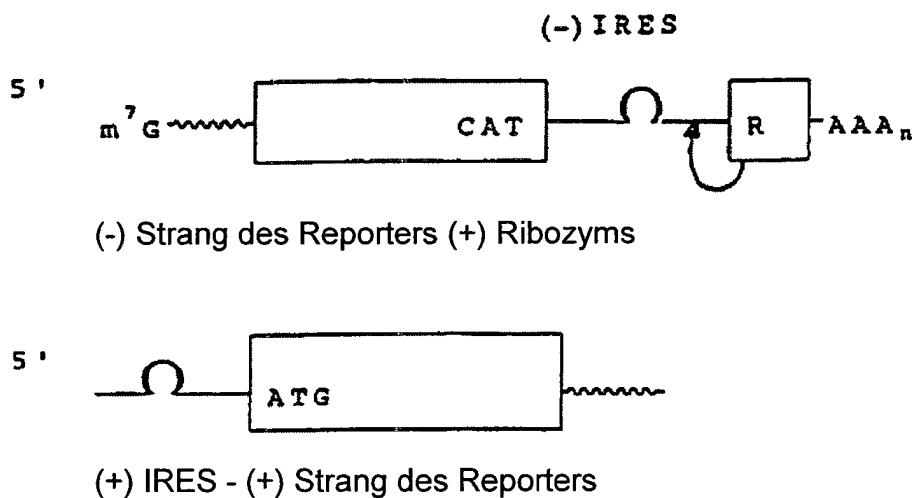
**[0048]** Nach der Selektion, Anordnen von Klonkolonien in 24 Vertiefungsplatten und Untersuchen von Medium von konfluenten Vertiefungen hinsichtlich RDRP Aktivität. Halten der Zellen in 600 µg/ml Geneticin.

Verwendung von stabil transfizierten Zellen, die HCV-RDRP exprimieren, um Verbindungen zu identifizieren, die in intakte Zellen eintreten und HCV-RDRP inhibieren

**[0049]** Der direkteste Ansatz, um die Wirkung von potenziellen Inhibitoren von HCV-RDRP in transformierten Zellen zu untersuchen ist die direkte Messung der RDRP Aktivität in Zellextrakten, nachdem die Zellen mit Verbindungen inkubiert und intensiv gewaschen wurden. Dies kann durchgeführt werden, indem der hier beschriebene RDRP Assay verwendet wird (mit einer HCV Matrize), und er benötigt keine andere neue Entwicklung mit Ausnahme der Zelllinie. In Kürze wurden die Zellen unter Bedingungen inkubiert, unter denen aktives Enzym maximal und in ausreichenden Mengen für die folgenden Enzym Assays exprimiert wird. Testverbindungen werden zu den Inkubationen hinzugefügt, das Medium wird zu der gewünschten Zeit entfernt und die Zellen werden extensiv gewaschen, um extrazelluläre Testverbindungen zu entfernen. Es werden Extrakte von Zellen für die RDRP Assays nach den allgemeinen hier beschriebenen Verfahren hergestellt. Dieser Ansatz geht relativ schnell und benötigt nur moderate Änderungen in unseren gegenwärtigen Verfahren (neue Zelllinien). Doppelte Inkubationen wurden durchgeführt, wenn kinetische Studien für die Inhibitoren in intakten Zellen durchgeführt werden mussten (wie schnell findet die Inhibition in Zellen statt). Das einzige potenzielle Problem bei diesem Ansatz kann die Kontamination von Zelllysaten mit einer Verbindung sein, die nicht in die Zellen eintritt, sondern die Lysate während ihrer Herstellung kontaminiert. Es wurden Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, um dieses Problem zu vermeiden, und es wurden Studien eingeschlossen, um zu bestimmen, was das optimale "Wasch" Verfahren sein wird. Der Hauptvorteil dieses Systems ist es, dass Verbindungen, die arbeitsintensive Modifikationen (Phosphorylierung von Nukleosiden) benötigen zum Testen mit gereinigter RDRP schnell gescreent werden können. Ein noch schnelleres Screenen kann erreicht werden, indem Zellen transient transfiziert werden, die mit dem potenziellen Inhibitor mit einem Plasmid inkubiert wurden, das verändert ist, um eine HCV RNA Matrize zu exprimieren, das auch ein einfach zu messendes Reporter Molekül (wie sekretierte alkalische Phosphatase oder Luciferase) kodiert. Ein solches System misst die HCV-RDRP Aktivität in intakten Zellen (Konzentrationen von Inhibitoren würden nicht durch das Lysieren der Zellen, etc. verdünnt). Zellen, in denen die RDRP Aktivität inhibiert ist, können schnell gescreent werden, so dass große Zahlen von Kandidaten Inhibitoren schnell gescreent werden können.

**[0050]** Ein Reporter System ist vorgesehen, wofür die Aktivität von r-HCV-RDRP, die in einer Wirtszelle expri-

miert wird, für die Expression eines Reporter Gens benötigt wird. Die Wirtszelle wird mit einem Konstrukt transfiguriert, das die Reporter kodierende Sequenz in Antisense Form in einer Struktur trägt, welche die HCV replikativen Zwischenprodukte, wenn sie als mRNA exprimiert werden, nachahmt. Die mRNA besitzt, ausgehend vom 5'-Ende, eine Cap Stelle, eine Reporter kodierende Region in der Antisense, (-) Strang, Form, ein HCV interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) Element, ebenfalls in (-) Strang Form, eine Ribozym Sequenz in (+) Strang Form und eine Polyadenylierungsstelle in (+) Strang Form. Eine solche mRNA, wenn translatiert, würde zu einem Nonsense Protein führen, das von dem (-) Strang des Reporter Gens kodiert wird. Wenn jedoch der komplementäre Strang durch r-HCV-RDRP synthetisiert wird, ist die kodierende Sequenz des (+) Strangs als das Reporter Protein translatierbar (z.B. Luciferase, fluoreszierendes grünes Protein, sekretierte alkalische Phosphatase, etc.). Dem Komplement, hergestellt durch RDRP, fehlt ein mit einem cap versehenes 5'-Ende, weil die Komplementsynthese im Cytoplasma stattfindet und das Capping im Kern der Wirtszelle stattfindet. Jedoch erlaubt die Anwesenheit des HCV-IRES Elements eine Cap unabhängige Translation. (Das IRES Element ist 5' zu der (+) Strang kodierenden Sequenz im komplementären Strang angeordnet). Die Funktion des Ribozym Motivs ist es, den polyA Schwanz von dem 3'-Ende des (-) Strangs zu entfernen und gleichzeitig sich selbst vor der komplementären Strangsynthese durch RDRP zu entfernen. Ein geeignetes Ribozym Motiv wird zum Beispiel durch das R<sub>289cc</sub> Ribozym des Hepatitis Delta Virus bereitgestellt. Wie von einer integrierten DNA transkribiert, kann der Reporter in RNA wie folgt dargestellt werden



**[0051]** Hinzufügungen zu der zuvor gezeigten Struktur schließen das Bereitstellen einer Sequenz der HCV 3' nicht translatierten Region ein, welche eine sekundäre Struktur bereitstellt, welche die r-HCV-RDRP Aktivität regulieren oder verstärken kann. Die Wirkung von r-HCV-RDRP erlaubt die Expression des Reporter Gens, wie ein einfach identifizierbares Reaktionsprodukt wie Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder Farbstoff Bildungsreaktion. Die Anwesenheit eines solchen Reaktionsprodukts zeigt indirekt die Aktivität der r-HCV-RDRP, die in der Wirtszelle exprimiert wird und stellt damit ein Mittel zum Beobachten der Wirkungen einer Testverbindung auf die r-HCV-RDRP Aktivität in vivo bereit. Inhibitoren der in vivo r-HCV-RDRP Aktivität sind potenzielle antivirale Mittel gegen HCV.

**[0052]** Während die Erfindung detailliert bezüglich bestimmter spezifischer Ausführungsformen und Beispiele offenbart wurde, wird verstanden, dass weitere Ausführungsformen, Beispiele und Modifikationen an einem oder mehreren der Lehren, Prinzipien und Ergebnisse, die hier offenbart sind, gemacht werden können, kombiniert mit dem Wissen des Standes der Technik, das vom Fachmann angewendet wird, die alle innerhalb des Schutzzumfangs der Erfindung fallen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: Hagedorn, Curt H.  
Al, Reinoldus H.
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Rekombinante Hepatitis C Virus RNA  
Replikase
- (iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 10
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
  - (A) ANSCHRIFT: Greenlee, Winner and Sullivan, P.C.
  - (B) STRASSE: 5370 Manhattan Circle, Suite 201
  - (C) STADT: Boulder
  - (D) STAAT: Colorado
  - (E) LAND: USA
  - (F) PLZ: 80303
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
  - (A) MEDIUMTYP: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
  - (C) AUSFÜHRENDES SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) GEGENWÄRTIGE ANMELDUNGSDATEN:
  - (A) ANMELDENUMMER: US
  - (B) ANMELDETAG: 27. September 1996
  - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (vii) VORHERIGE ANMELDUNGSDATEN:
  - (A) ANMELDENUMMER: US 60/004383
  - (B) ANMELDETAG: 27. September 1995
- (viii) ANWALT/VERTRETERINFORMATION:
  - (A) NAME: Greenlee, Lorange L.
  - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 27.894
  - (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 76-95US
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
  - (A) TELEFON: (303) 499-8080
  - (B) TELEFAX: (303) 499-8089

(2) INFORMATION FÜR SEO ID NR: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1788 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) STRANG: doppelt

(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKULARER TYP: cDNA bis mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..1782

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1

ATG GCT AGC ATG TCT TAC TCT TGG ACA GGC GCA CTC GTC ACC CCG TGC 48  
Met Ala Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys  
1 5 10 15

GCC GCG GAA GAA CAG AAA CTG CCC ATC AAT GCA CTA AGC AAC TCG TTG 96  
Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu  
20 25 30

CTA CGT CAC CAC AAT TTG GTG TAT TCC ACC ACC TCA CGC AGT GCT TGC 144  
Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys  
35 40 45

CAA AGG CAG AAG AAA GTC ACA TTT GAC AGA CTG CAA GTT CTG GAC AGC 192  
Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser  
50 55 60

CAT TAC CAG GAC GTA CTC AAG GAG GTT AAA GCA GCG GCG TCA AAA GTG 240  
His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val  
65 70 75 80

AAG GCT AAC TTG CTA TCC GTA GAG GAA GCT TGC AGC CTG ACG CCC CCA 288  
Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr Pro Pro  
85 90 95



CAC TCA GCC AAA TCC AAG TTT GGT TAT GGG GCA AAA GAC GTC CGT TGC	336
His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys	
100 105 110	
CAT GCC AGA AAG GCC GTA ACC CAC ATC AAC TCC GTG TGG AAA GAC CTT	384
His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu	
115 120 125	
CTG GAA GAC AAT GTA ACA CCA ATA GAC ACT ACC ATC ATG GCT AAG AAC	432
Leu Glu Asp Asn Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn	
130 135 140	
GAG GTT TTC TGC GTT CAG CCT GAG AAG GGG GGT CGT AAG CCA GCT CGT	480
Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg	
145 150 155 160	
CTC ATC GTG TTC CCC GAT CTG GGC GTG CGC GTG TGC GAA AAG ATG GCT	528
Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala	
165 170 175	
TTG TAC GAC GTG GTT ACC AAG CTC CCC TTG GCC GTG ATG GGA AGC TCC	576
Leu Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser	
180 185 190	
TAC GGA TTC CAA TAC TCA CCA GGA CAG CGG GTT GAA TTC CTC GTG CAA	624
Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln	
195 200 205	
GCG TGG AAG TCC AAG AAA ACC CCA ATG GGG TTC TCG TAT GAT ACC CGC	672
Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg	
210 215 220	
TGC TTT GAC TCC ACA GTC ACT GAG AGC GAC ATC CGT ACG GAG GAG GCA	720
Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala	
225 230 235 240	
ATC TAC CAA TGT TGT GAC CTC GAC CCC CAA GCC CGC GTG GCC ATC AAG	768
Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys	
245 250 255	
TCC CTC ACC GAG AGG CTT TAT GTT GGG GGC CCT CTT ACC AAT TCA AGG	816
Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg	
260 265 270	

GGG GAG AAC TGC GGC TAT CGC AGG TGC CGC GCG AGC GGC GTA CTG ACA	864
Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr	
275 280 285	
ACT AGC TGC GGT AAC ACC CTC ACT TGC TAC ATC AAG GCC CGG GCA GCC	912
Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala	
290 295 300	
TGT CGA GCC GCA GGG CTC CAG GAC TGC ACC ATG CTC GTG TGT GGC GAC	960
Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp	
305 310 315 320	
GAC TTA GTC GTT ATC TGT GAA AGC GCG GGG GTC CAG GAG GAC GCG GCG	1008
Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala	
325 330 335	
AGC CTG AGA GCC TTC ACG GAG GCT ATG ACC AGG TAC TCC GCC CCC CCC	1056
Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro	
340 345 350	
GGG GAC CCC CCA CAA CCA GAA TAC GAC TTG GAG CTC ATA ACA TCA TGC	1104
Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys	
355 360 365	
TCC TCC AAC GTG TCA GTC GCC CAC GAC GGC GCT GGA AAG AGG GTC TAC	1152
Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr	
370 375 380	
TAC CTC ACC CGT GAC CCT ACA ACC CCC CTC GCG AGA GCT GCG TGG GAG	1200
Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu	
385 390 395 400	
ACA GCA AGA CAC ACT CCA GTC AAT TCC TGG CTA GGC AAC ATA ATC ATG	1248
Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met	
405 410 415	
TTT GCC CCC ACA CTG TGG GCG AGG ATG ATA CTG ATG ACC CAT TTC TTT	1296
Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe	
420 425 430	
AGC GTC CTT ATA GCC AGG GAC CAG CTT GAA CAG GCC CTC GAT TGC GAG	1344
Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp Cys Glu	
435 440 445	

ATC TAC GGG GCC TGC TAC TCC ATA GAA CCA CTT GAT CTA CCT CCA ATC Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile 450 455 460	1392
ATT CAA AGA CTC CAT GGC CTC AGC GCA TTT TCA CTC CAC AGT TAC TCT Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser 465 470 475 480	1440
CCA GGT GAA ATT AAT AGG GTG GCC GCA TGC CTC AGA AAA CTT GGG GTA Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val 485 490 495	1488
CCG CCC TTG CGA GCT TGG AGA CAC CGG GCC CGG AGC GTC CGC GCT AGG Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg 500 505 510	1536
CTT CTG GCC AGA GGA GGC AGG GCT GCC ATA TGT GGC AAG TAC CTC TTC Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe 515 520 525	1584
AAC TGG GCA GTA AGA ACA AAG CTC AAA CTC ACT CCA ATA GCG GCC GCT Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala Ala Ala 530 535 540	1632
GGC CAG CTG GAC TTG TCC GGC TGG TTC ACG GCT GGC TAC AGC GGG GGA Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly 545 550 555 560	1680
GAC ATT TAT CAC AGC GTG TCT CAT GCC CGG CCC CGC TGG ATC TGG TTT Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile Trp Phe 565 570 575	1728
TGC CTA CTC CTG CTT GCT GCA GGG GTA GGC ATC TAC CTC CTC CCC AAC Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn 580 585 590	1776
CGA TGA GGATCC Arg *	1788

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 594 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARER TYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2

Met Ala Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys  
 1 5 10 15

Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu  
 20 25 30

Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys  
 35 40 45

Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser  
 50 55 60

His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val  
 65 70 75 80

Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr Pro Pro  
 85 90 95

His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys  
 100 105 110

His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu  
 115 120 125

Leu Glu Asp Asn Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn  
 130 135 140

Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg  
 145 150 155 160

Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala  
 165 170 175

Leu Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser		
180	185	190
Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln		
195	200	205
Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg		
210	215	220
Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala		
225	230	235 240
Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys		
245	250	255
Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg		
260	265	270
Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr		
275	280	285
Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala		
290	295	300
Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp		
305	310	315 320
Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala		
325	330	335
Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro		
340	345	350
Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys		
355	360	365
Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr		
370	375	380
Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu		
385	390	395 400
Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met		
405	410	415

Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe  
 420 425 430  
 Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp Cys Glu  
 435 440 445  
 Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile  
 450 455 460  
 Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val  
 485 490 495  
 Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg  
 500 505 510  
 Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe  
 515 520 525  
 Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala Ala Ala  
 530 535 540  
 Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly  
 545 550 555 560  
 Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile Trp Phe  
 565 570 575  
 Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn  
 580 585 590

Arg \*

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 3:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
  - (B) Typ: Nukleinsäure
  - (C) STRANG: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKULARER TYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

ATAGCTAGCA TGTCTTACTC TTGGAGAGG

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 4:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
  - (B) Typ: Nukleinsäure
  - (C) STRANG: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKULARER TYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

ATAGGATCCT CATCGGTTGG GGAGGAGG

28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 5:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) Typ: Aminosäure
  - (C) STRANG: nicht relevant
  - (D) TOPOLOGIE: unbekannt
- (ii) MOLEKULARER TYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (v) FRAGMENT TYP: N-terminal



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

Ala Ser Met Ser Tyr

1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) STRANG: nicht relevant
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKULARER TYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENT TYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

Met Ala Ser Met Ser Tyr

1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) STRANG: nicht relevant
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKULARER TYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENT TYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

Ser Met Ser Tyr

1

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 8:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) STRANG: nicht relevant
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) MOLEKULARER TYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

Ala Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr

1

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 9:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 104 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) STRANG: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKULARER TYP: andere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 63..104

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

GGAGACCACA ACGGTTTCCC TCTAGAAATA ATTTGTTTA ACTTTAAGAA GGAGATATAC 60

AT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGC GGA TCC 104

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser

1

5

10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 10:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren  
 (B) Typ: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARER TYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser  
 1 5 10

### Patentansprüche

1. Rekombinante HCV-RDRP, umfassend die Aminosäuresequenz MA(S)(M)(S)(Y)(S)(W)(T)(G)(A)-[ $\Delta^{\circ}$ NS5B], wobei keine der Aminosäuren in Klammern deletiert ist, beliebige 0–5 Aminosäuren in Klammern gegebenenfalls durch eine Aminosäure ersetzt sind, und  $\Delta^{\circ}$ NS5B die Aminosäuresequenz der Aminosäuren 12–593 der SEQ ID NR:2 ist.
2. Rekombinante HCV-RDRP nach Anspruch 1 in gereinigter Form.
3. Rekombinante HCV-RDRP nach Anspruch 1, wobei 1–5 Aminosäuren in Klammern durch Histidin ersetzt sind.
4. Rekombinante HCV-RDRP nach Anspruch 1, wobei  $\Delta^{\circ}$ NS5B einen Aminosäure-Austausch enthält, ausgewählt aus der Gruppe Arg<sub>570</sub>→His, Arg<sub>572</sub>→His oder Trp<sub>573</sub>→His, numeriert gemäß SEQ ID NR: 2.
5. Exprimierbare kodierende Sequenz, welche für die rekombinante HCV-RDRP von Anspruch 1 kodiert, wobei das  $\Delta^{\circ}$ NS5B durch die Nukleotidsequenz von 34–1779 der SEQ ID NR:1 kodiert wird.
6. Verfahren zur Herstellung löslichen RDRP-Enzyms von einer Wirtszelle, transformiert mit einer exprimierbaren kodierenden Sequenz nach Anspruch 5, umfassend die Schritte des Beschallens konzentrierter Wirtszellen in einem Lysis-Puffer, welcher ein nicht-ionisches Detergenz, einen Protease-Hemmer und ein Wirtszellwandhydrolysierendes Enzym in einem Enzym-kompatiblen Puffer umfasst, des Einfrierens und Auftauens beschallter Zellen zum Herstellen eines Zell-Lysats und des Entferns von Teilchen von dem Lysat, wobei die Teilchen durch Zentrifugation bei 10.000–25.000 × g entfernbar sind, wodurch das RDRP-Enzym in der überstehenden Fraktion zurückgehalten wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Wirtszelle E. coli ist.
8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Wirtszelle E. coli ist und das Wirtszellwand-hydrolysierende Enzym Lysozym ist.
9. Verwendung der rekombinanten HCV-RDRP von Anspruch 1 zur Herstellung eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers gegen HCV-RDRP.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Antikörper die Fähigkeit besitzt, die enzymische Aktivität von HCV-RDRP zu hemmen.
11. Säuger-Zelllinie, welche zur Expression aktiver HCV-RDRP befähigt ist, umfassend eine exprimierbare kodierende Sequenz nach Anspruch 5.
12. Säuger-Zelllinie nach Anspruch 11, wobei die Zelllinie aus der Gruppe U937, hepG2 oder PK15 ausgewählt ist.

13. Säuger-Zelllinie nach Anspruch 11, wobei die r-HCV-RDRP die Aminosäuresequenz MA[NS5B] aufweist, wobei [NS5B] die Aminosäuresequenz der Aminosäuren 2–593 der SEQ ID NR:2 ist.

14. Säuger-Zelllinie nach Anspruch 11, weiter umfassend ein Reporter-Gen, dessen Translation von der Gegenwart einer aktiven r-HCV-RDRP in der gleichen Zelle abhängt.

15. Säuger-Zelllinie nach Anspruch 14, wobei das Reporter-Gen Boten-RNA exprimiert, umfassend den Antisense von RNA, welche für den Reporter kodiert.

16. Verfahren zum Testen einer Verbindung auf hemmende Aktivität gegen HCV-RDRP, umfassend das Messen von RNA-Produkt in einer in vitro RNA Synthese-Reaktion, welche katalysiert wird durch r-HCV-RDRP gemäß Anspruch 1, und das Vergleichen der Mengen von RNA, synthetisiert in der Gegenwart und Abwesenheit der Verbindung, wodurch vergleichende Reduktion der Menge von RNA, synthetisiert in der Gegenwart der Verbindung, anzeigt, dass die Verbindung hemmende Aktivität gegen HCV-RDRP aufweist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, weiter umfassend das Vergleichen der Aktivität eines Kontroll-Enzyms in der Gegenwart und Abwesenheit der Testverbindung, wodurch die Hemmung des Kontroll-Enzyms durch die Testverbindung die Abwesenheit eines spezifischen Effekts auf r-HCV-RDRP anzeigt.

18. Verfahren zum Testen einer Verbindung auf hemmende Aktivität gegen r-HCV-RDRP, umfassend die Herstellung einer Säuger-Zelllinie, welche zur Expression aktiver HCV-RDRP, umfassend eine exprimierbare kodierende Sequenz nach Anspruch 5, befähigt ist, die Transfektion der Zelllinie mit einem Reporter-Gen, dessen Translation von der Gegenwart von aktiver r-HCV-RDRP in der gleichen Zelle abhängt, wodurch eine Reporter-Zelllinie hergestellt wird, das Inkubieren der Reporter-Zelllinie in der Gegenwart oder Abwesenheit einer Testverbindung, wodurch die Hemmung von r-HCV-RDRP durch die Testverbindung in der Hemmung der Translation des Reporter-Gens resultiert.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Reporter-Gen aus der Gruppe Luciferase, sekretierte alkalische Phosphatase oder grün-fluoreszierendes Protein ausgewählt ist.

20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Reporter-Gen transkribiert wird, um eine für den Antisense des Reporters kodierende Boten-RNA zu erhalten, wodurch die Synthese einer dazu komplementären RNA durch r-HCV-RDRP eine Sense-Boten-RNA erzeugt, welche translatierbar ist, um aktiven Reporter zu erhalten.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die transkribierte Boten-RNA des Reporters weiter eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle von HCV umfasst, welche 3' von dem Reporter Antisense kodierenden Bereich angeordnet ist, wodurch die Synthese einer dazu komplementären RNA durch r-HCV-RDRP eine Boten-RNA erzeugt, mit der internen Ribosomen-Eintrittsstelle 5' von dem Sense-Boten-RNA kodierenden Bereich gelegen, und dadurch eine Cap-unabhängige Translation des Reporters bereitgestellt wird.

22. In vitro Verfahren zur Messung oder zum Nachweis von Antikörper zu HCV-RDRP im Serum eines infizierten Patienten, umfassend  
das Inkontaktbringen des Antikörpers mit r-HCV-RDRP nach Anspruch 1, wodurch ein Antigen-Antikörper-Komplex gebildet wird,  
das Trennen des Antigen-Antikörper-Komplexes von ungebundenem Antikörper oder ungebundener r-HCV-RDRP und das Messen oder Nachweisen des Antigen-Antikörper-Komplexes.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei r-HCV-RDRP durch Gel-Elektrophorese lokalisiert wird, das Gel mit Serum, welches Antikörper gegen HCV-RDRP enthält, in Kontakt gebracht wird, und der Antigen-Antikörper-Komplex durch markierten Antihuman-Antikörper nachgewiesen oder gemessen wird.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

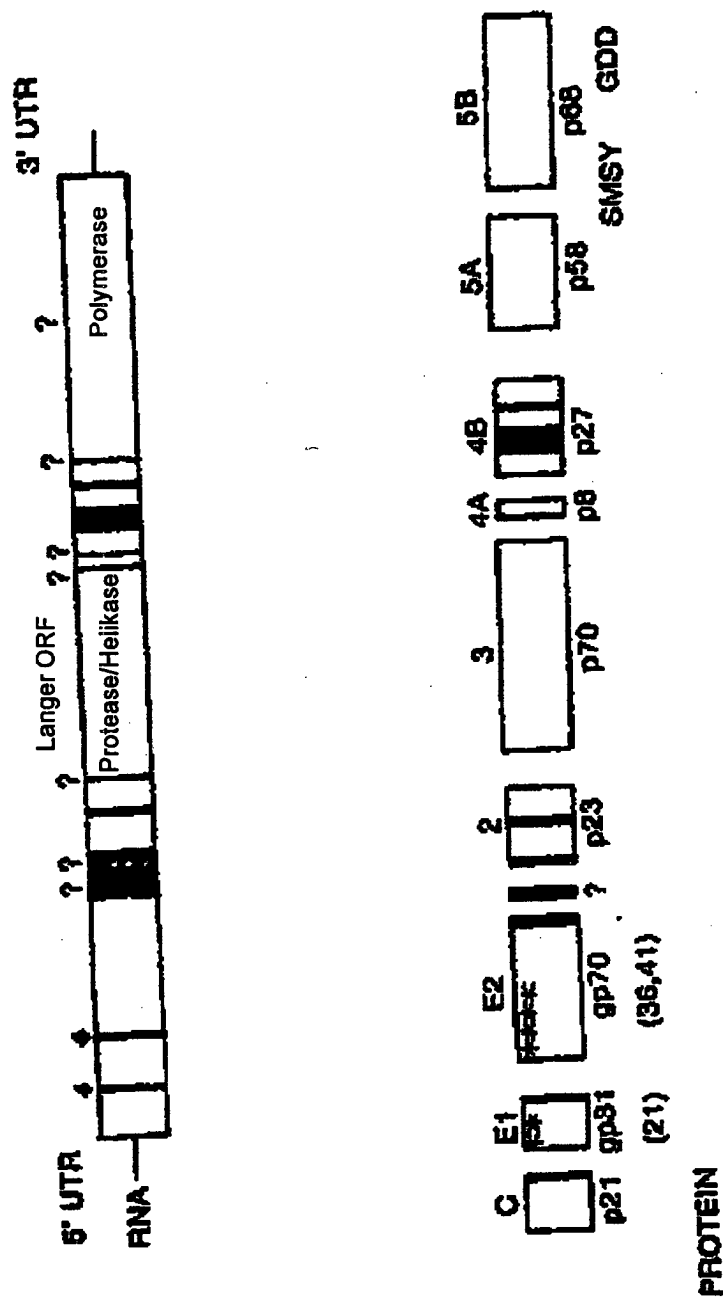
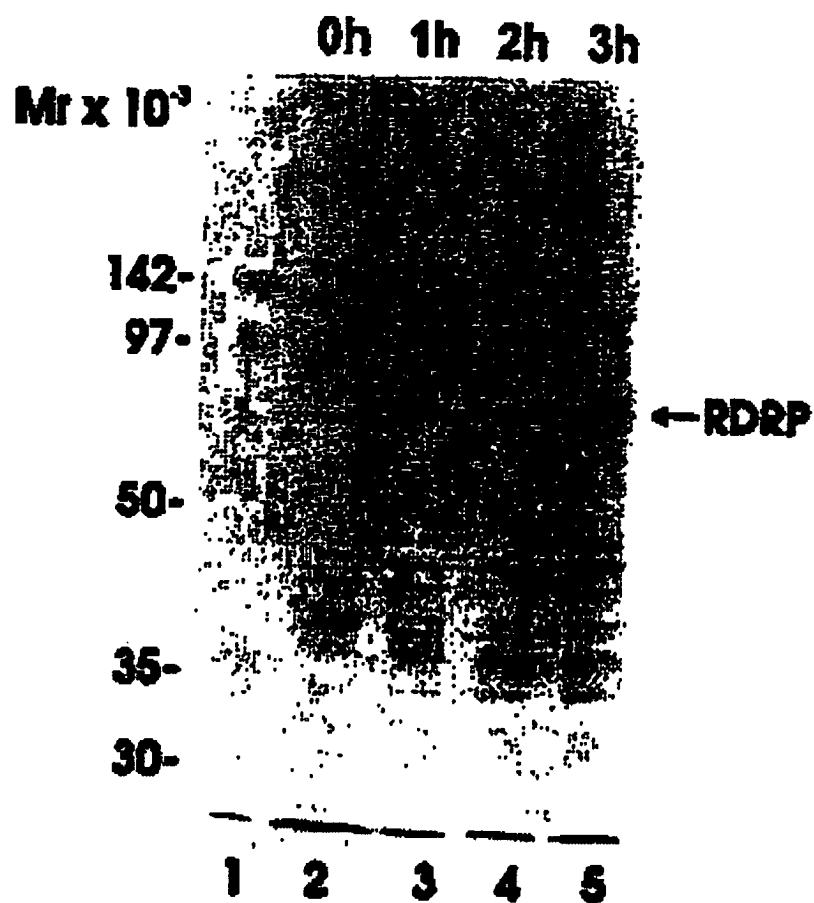
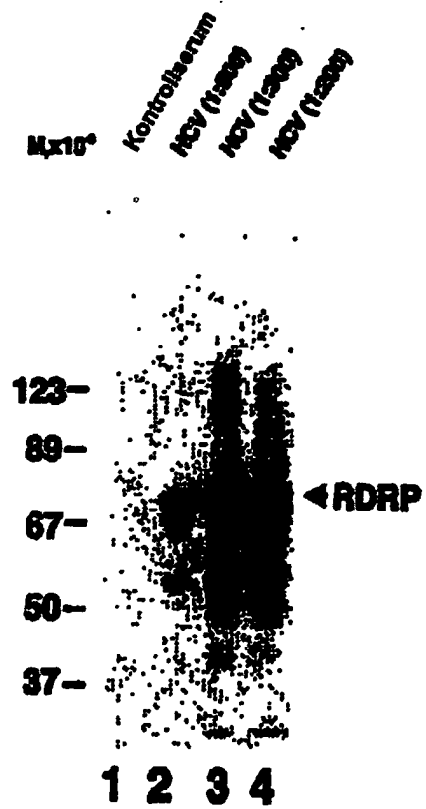


FIG. 1

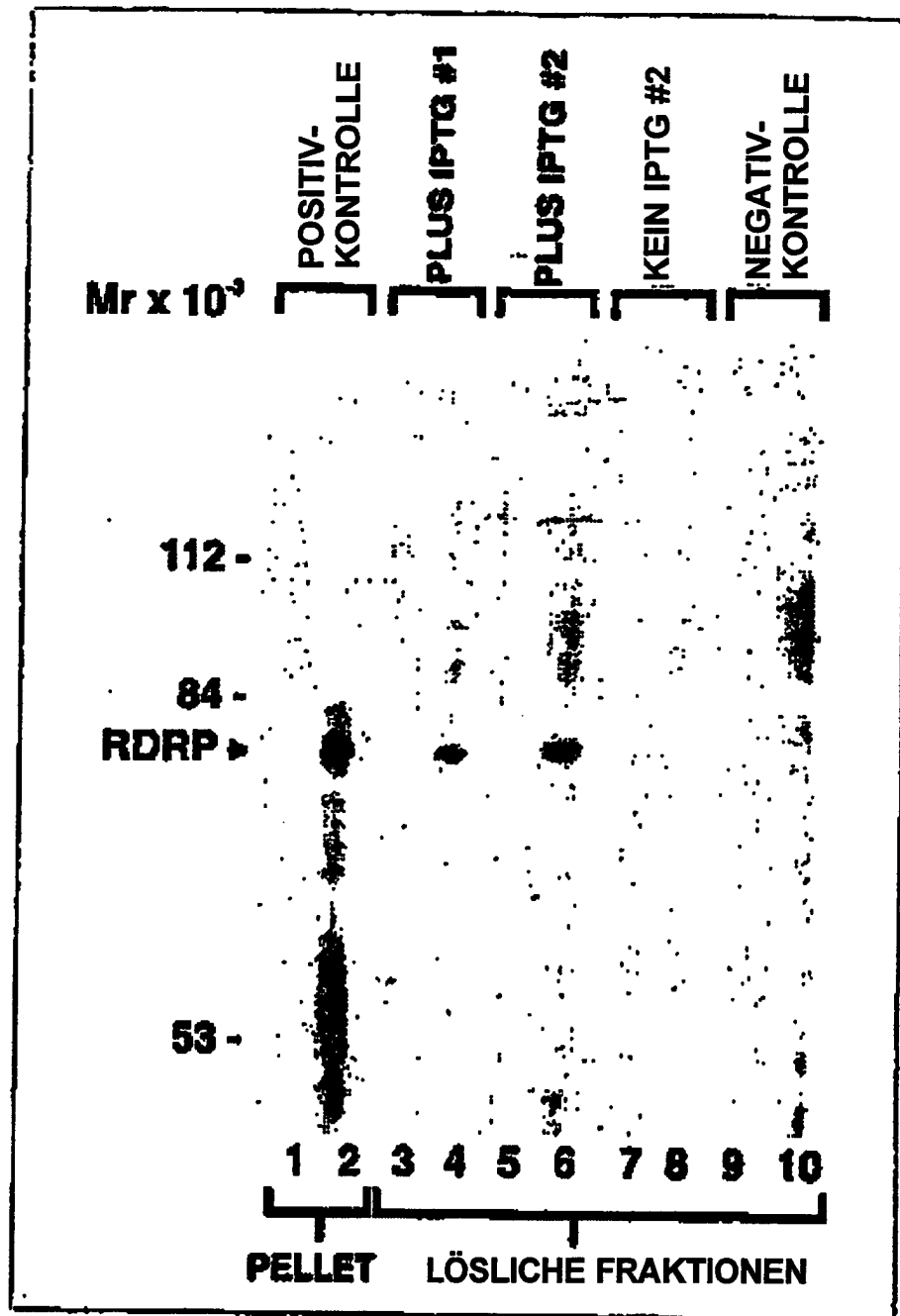


**FIG. 2**

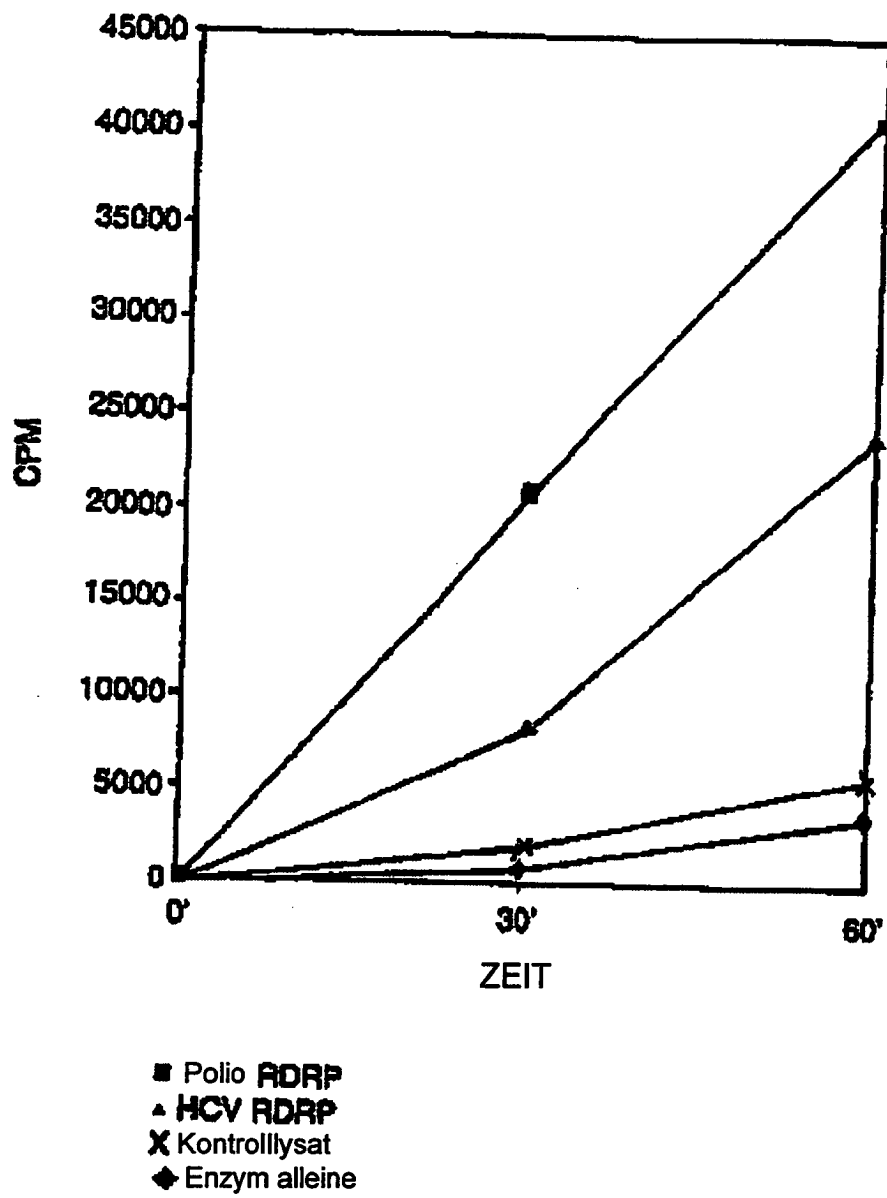


**FIG. 3**

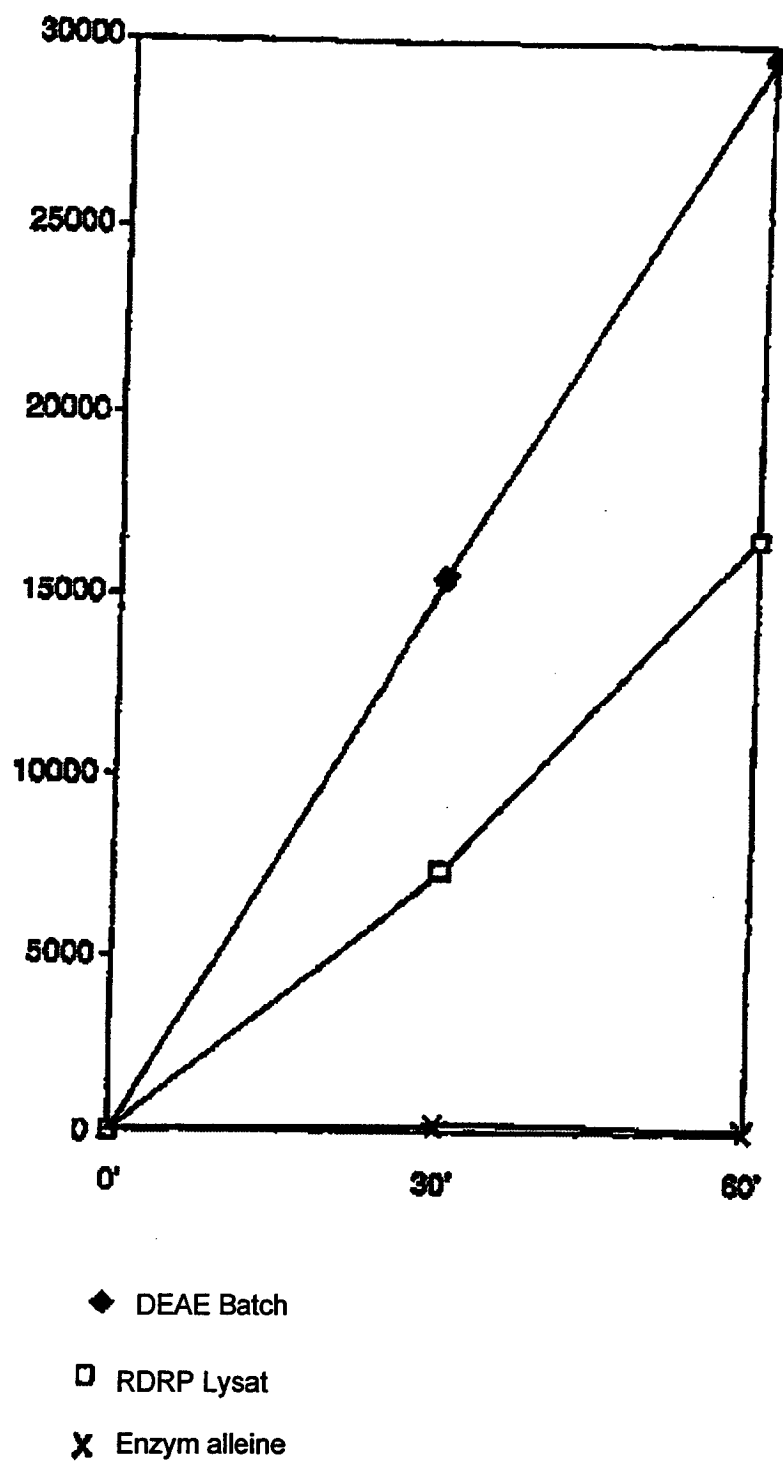




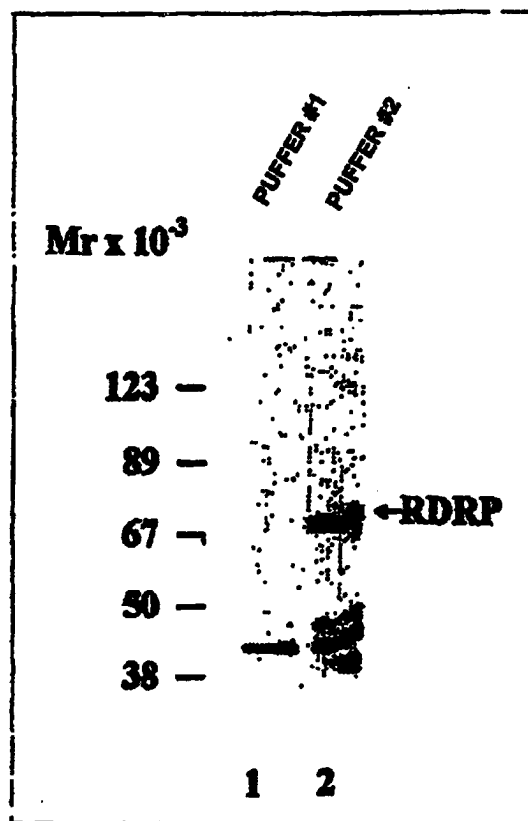
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**