



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 38 113 T2** 2009.02.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 177 211 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 38 113.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA00/00496**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 922 396.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/066623**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.05.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.02.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/18** (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

132360 P 04.05.1999 US

(73) Patentinhaber:

**Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd., Laval,
Quebec, CA**

(74) Vertreter:

**Kompter, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
64560 Riedstadt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PELLERIN, Charles, Laval, Quebec H7S 1X3, CA;
LAMARRE, Daniel, Terrebonne, Quebec J6W 3M8,
CA**

(54) Bezeichnung: **ZELLEN-INTERNES SYSTEM UND VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT DER HE-
PATITIS C VIRUS NS3 PROTEASE**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Säugetier-Zellkultursystem und ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Hepatitis C-Virus (HCV)-NS3-Protease und deren Hemmung. Insbesondere betrifft die Erfindung ein rekombinantes Molekül, ein transfiziertes Wirtssäugetier-Zelltestsystem und ein Verfahren zur Messung der NS3-Protease-Aktivität und deren Hemmung durch als in Frage kommende anti-HCV-Verbindungen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Hepatitis C-Virus (HCV) ist weltweit der hauptsächliche Erreger von durch Transfusion und Ansteckung erworbener Nicht-A-Nicht-B-Hepatitis. Man schätzt, dass mehr als 100 Millionen Personen weltweit mit dem Virus infiziert sind. Ein hoher prozentualer Anteil der Virusträger erleidet eine chronische Infektion, wobei sich bei zahlreichen Personen eine chronische Lebererkrankung, die sogenannte chronische Hepatitis C, entwickelt. Bei dieser Gruppe besteht wiederum ein hohes Risiko für ernste Leberkrankheiten, wie Leberzirrhose, hepatozelluläres Karzinom und zum Tode führende terminale Leberkrankheiten. Der Mechanismus, gemäß dem HCV die virale Persistenz ermöglicht und einen hohen Anteil von chronischen Leberkrankheiten verursacht, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist nicht bekannt, wie HCV mit dem Wirtsimmunsystem in Wechselwirkung tritt und diesem entkommt. Ferner müssen die Rollen von zellulären und humoralen Immunantworten beim Schutz gegen HCV-Infektionen und -Krankheiten noch ermittelt werden.

[0003] Es wurden verschiedene klinische Studien mit dem Ziel durchgeführt, pharmazeutische Verbindungen zu identifizieren, die zur wirksamen Behandlung von HCV-Infektionen bei Patienten, die von chronischer Hepatitis C betroffen sind, befähigt sind. Diese Studien beinhalteten die Verwendung von Interferon-alpha allein und in Kombination mit anderen antiviralen Mitteln, wie Ribavirin. Derartige Studien haben gezeigt, dass eine wesentliche Anzahl der Teilnehmer auf diese Therapien nicht reagiert und dass unter den Personen, die eine günstige Reaktion zeigen, ein großer Anteil nach Beendigung der Behandlung einen Rückfall erleidet. Bisher gibt es keine breit wirksamen antiviralen Verbindungen zur Behandlung einer HCV-Infektion.

[0004] HCV ist ein mit einer Hülle versehenes positiv-strängiges RNA-Virus der Familie Flaviviridae.

[0005] Das einzelsträngige HCV-RNA-Genom weist eine Länge von annähernd 9 500 Nucleotiden auf und besitzt einen einzigen offenen Leseraster (ORF), der für ein einziges, großes Polyprotein mit etwa 3 000 Aminosäuren kodiert. In infizierten Zellen wird dieses Polyprotein an zahlreichen Stellen durch zelluläre und virale Proteasen zu strukturellen und nicht-strukturellen (NS)-Proteinen gespalten.

[0006] Die strukturellen Proteine (C, E1, E2 und E2-p7) umfassen Polypeptide, die das Virus-Teilchen darstellen. Die nicht-strukturellen Proteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) kodieren für Enzyme und akzessorische Faktoren, die die Replikation des HCV-RNA-Genoms katalysieren und regulieren. Die Prozessierung der strukturellen Proteine wird durch Wirtszellproteasen katalysiert. Die Erzeugung der reifen, nicht-strukturellen Proteine wird durch zwei viral kodierte Proteasen katalysiert. Beim ersten handelt es sich um die von Zink abhängige NS2-3-Metalloprotease, die die Freisetzung des NS3-Proteins aus dem Polyprotein autokatalysiert. Das freigesetzte NS3 enthält eine Serinprotease-Domäne am N-Terminus und katalysiert die übrigen Spaltungen vom Polyprotein. Das freigesetzte NS4A-Protein übt mindestens zwei Funktionen aus. Erstens bildet es einen stabilen Komplex mit dem NS3-Protein und unterstützt die Membranlokalisierung des NS3/NS4A-Komplexes (Kim et al., 1999) und zweitens wirkt es als Kofaktor für die NS3-Protease-Aktivität. Dieser membranassoziierte Komplex katalysiert wiederum die Spaltung der übrigen Stellen am Polyprotein, wodurch es die Freisetzung von NS4B, NS5A und NS5B bewirkt. Das C-terminale Segment des NS3-Proteins besitzt auch Nucleosid-triphosphatase- und RNA-Helicase-Aktivität. NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die an der Replikation von HCV beteiligt ist.

[0007] Die N-terminalen 180 Aminosäuren des NS3-Proteins stellen eine trypsinartige Serinprotease dar, die als ersten Schritt die Selbstspaltung von NS3/4A vermittelt. Der membranassoziierte NS3/4A-Komplex spaltet ferner die NS4A/4B-, NS4B/5A-, und NS5A/NS5B-Verbindungsstellen unter Freisetzung der viralen Enzyme, die als wesentlich für die virale Replikation gelten. Die Komplexbildung von NS3/NS4A stellt einen wichtigen Schritt in der anschließenden Folgeprozessierung des Polyproteins dar. Das NS3-Protein stellt das am gründlichsten charakterisierte HCV-Protein dar. Es wurden kinetische Parameter für die Spaltung sämtlicher Prozessierungsstellen beschrieben. Sowohl die N-terminale Protease-Domäne als auch die C-terminale Helicase-Domäne wurden unabhängig voneinander kristallisiert und es existieren für diese Strukturen hochauflösende drei-

dimensionale Modelle.

[0008] Die NS3-Protease-Aktivität stellt ein attraktives Ziel für die Auffindung von Arzneistoffen dar. Enzymatische Studien haben gezeigt, dass Peptide auf der Basis des N-terminalen Produkts der NS5A/5B-Spaltungsstelle kompetitive Inhibitoren des Enzyms darstellen. Diese Peptide dienen als wertvoller Ausgangspunkt bei Bemühungen der medizinischen Chemie zur rationalen Konstruktion von NS3-Protease-Inhibitoren als klinisch wirksamen anti-HCV-Verbindungen.

[0009] Aufgrund des starken Auftretens von HCV und der Folgen von HCV-Infektionen stellt das Auffinden von therapeutischen Verbindungen gegen HCV einen wichtigen Schritt dar. Zu diesem Zweck ist es bei Bemühungen zum Auffinden von Verbindungen gegen HCV notwendig, Testsysteme zum Screening und zur Auswahl von anti-HCV-Verbindungen zu entwickeln.

[0010] Bisher steht kein zweckmäßiges Zellkultur-Replikationssystem für das HCV-Virus zur Verfügung. Dieser Mangel hat das HCV-Inhibitor-Screening weitgehend auf enzymatische in vitro-Tests und einen indirekten zellbasierten Surrogattest beschränkt (Lohmann et al., (1999)). Dies bedeutete erhebliche Beschränkungen bei der Bewertung von potentiellen anti-HCV-Verbindungen in Zellkultur.

[0011] Hirowatari et al. (1995) beschreiben die Kotransfektion eines ersten Plasmids, das die NS2/NS3-Domäne in Fusion mit der NS5A/NS5B-Spaltungsstelle (Substrat für NS3) und den Transaktivator Tax 1 enthält, und eines zweiten Plasmids, das ein Reportergen enthält, dessen Expression von der Tax 1-Transaktivierung abhängig ist. Die NS5A/5B-Stelle wird durch die exprimierte NS2- oder NS3-Protease-Aktivität gespalten, wodurch Tax 1 zur Transaktivierung des Reportergens am zweiten Plasmid freigesetzt wird. Somit stellt die Menge des exprimierten Reportergens ein Maß für die proteolytische NS2- oder NS3-Aktivität dar. Einer der Nachteile besteht darin, dass dieses System nicht zwischen den Aktivitäten der NS2-Metalloprotease und der NS3-Protease unterscheidet. Ferner ermöglicht dieses System nicht das Messen der Protease-Aktivität des NS3-Proteins, wenn dieses mit der NS4A-Domäne komplexiert ist, einem Komplex, der die Spezifität der Protease verstärkt. Dieser Test ermöglicht auch nicht die Messung der Protease-Aktivität in einem System, das der natürlichen Umgebung der Polyprotein-Prozessierung sehr nahe kommt. Ein weiterer Nachteil besteht schließlich in der Tatsache, dass dieses System halbquantitativ ist und sich daher nicht für ein quantitatives Screening mit hohem Durchsatz eignet.

[0012] H. Overton et al. (1995) berichtet über eine durch Baculovirus exprimierte HCV-NS3-Aktivität in Insektenzellen. Eine Reihe von Baculovirus-Konstrukten, die zur Expression von NS3-Protease-Aktivität und verschiedenen Substraten konzipiert sind, wird beschrieben. Konstrukte, die für partielles NS2/NS3 und NS3/NS4A/NS4B kodieren, werden in eine Insektenzelllinie transfiziert. Zusätzliche virale Konstrukte, die für NS3 bis NS5A und NS5A/5B kodieren, werden allein oder zusammen mit einem der vorgenannten Konstrukte transfiziert. Die exprimierten und gespaltenen Produkte werden immunologisch durch Western-Analyse sichtbar gemacht. Einer der Mängel in diesem System betrifft die Verwendung einer Insekten-Zelllinie anstelle einer Säugetier-Zelllinie, sowie das Erfordernis einer viralen Infektion, ein Ereignis, das die normalen Funktionen der Zelle zusätzlich stören kann. Dieses System verwendet ferner das T7-Polymerase-Expressionssystem, ein System, das für das erfindungsgemäße System nicht notwendig ist. Außerdem erweist sich das Verfahren zum Nachweis der Spaltungsprodukte als langwierig, schwierig bezüglich einer genauen quantitativen Aussage und für einen hohen Durchsatz nicht geeignet.

[0013] Song et al. (1996) beschreiben ein Protease-Testsystem unter Verwendung eines lexA-GAL4-Fusionsproteins in Hefe. Die Autoren beschreiben das Inserieren der NS3-Protease und einer Spaltungsstelle zwischen die lexA-DNA-Bindungsdomäne und die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von GAL4. Die Spaltung dieser Stelle durch NS3-Protease macht GAL4 transkriptionell inaktiv, was dazu führt, dass die transformierte Hefe nicht nur zur Synthese von β -Galactosidase befähigt ist. Diesem System fehlt das NS4A und es reproduziert nicht die Prozessierung im Zusammenhang mit dem HCV-Polyprotein.

[0014] Y. G. Cho et al. (1997) beschreiben einen Test unter Verwendung des viralen Sindbis-Replikationssystems. Dieses hybride Viruskonstrukt kodiert für die HCV-NS3/NS4A-Proteaseregion, die mit SIN-Kernproteinen durch die NS4A/NS4B-Spaltungssequenz verknüpft ist. Ein Zusammenbau von viralen Partikeln in einer Säugetier-Zelllinie ist von der Prozessierung der NS4A/4B-Spaltungsstelle abhängig. Ein Hauptnachteil dieses Systems besteht in der Tatsache, dass die HCV-Protease-Aktivität ein chimäres Virus erzeugt, das zytopathische morphologische Veränderungen in den Zellen herbeiführt. Die Messung der pH-Veränderung der Medien stellt bestenfalls einen halbquantitativen Weg zur Messung dieser Veränderungen dar. Ein weiterer Nachteil in diesem System besteht darin, dass das Sindbis-Kernprotein eine natürliche Serinprotease-Spaltungsstelle ent-

hält, die ähnlich der NS3-Stelle ist, was eine begrenzte Verwendung dieses Systems zum Screening von potentiellen Protease-Inhibitoren bedeutet.

[0015] Y. G. Cho et al. (1998) beschreiben einen Expressionsvektor, der für die NS3/NS4A-Region und die NS4A/4B-Spaltungsstelle in Fusion mit dem SEAP-Gen (SEAP = sezernierte alkalische Phosphatase) kodiert, und zwar bei Transfektion in eine Säugetier-Zelllinie. Die Spaltung der NS4A/4B-Stelle durch NS3-Protease setzt SEAP-Protein in das Medium frei. Die Menge des SEAP-Proteins im Medium stellt ein Maß für die NS3-Protease-Aktivität dar. Ein Nachteil dieses Systems beruht in der Tatsache, dass das Reportermolekül direkt mit dem Substratprotein fusioniert ist und somit die natürliche Konformation viraler komplexer Proteine beeinflussen kann (NS3/NS4A). Ein weiterer Nachteil besteht in der Tatsache, dass die Menge des sezernierten Reporterproteins direkt proportional zur Menge des im System exprimierten und gespaltenen Systems ist (1 gespaltenes Substratmolekül = 1 sezerniertes Reportermolekül). Da das HCV-Polyprotein ein System darstellt, das in sehr geringen Konzentrationen exprimiert wird (selbst in seiner natürlichen Umgebung), ist das beobachtete Signal zu gering, um ein Screening im Großmaßstab durchführen zu können.

[0016] WO-98/00548 beschreibt hybride Viren, die ein Picornavirus, vorzugsweise Poliovirus, die HCV-NS3-Protease-Domäne und eine einzelne NS3-Protease-Zielstelle umfassen. Diese chimären Viren werden so konstruiert, dass die proteolytische Prozessierungsaktivität von HCV-NS3 wesentlich für die virale Lebensfähigkeit und die Proliferation ist. Verschiedene Hybride, die jeweils eine unterschiedliche NS3-Spaltungsstelle (NS5A/NS5B, NS4A/NS4B oder NS4B/NS5A) aufweisen, werden beschrieben. Die Lebensfähigkeit wird durch den viralen Titer unter Verwendung des Plaquetests an HeLa-Monolayerzellen gemessen. Auch dieses System liefert keine quantifizierbaren Mittel zum Screening einer großen Anzahl von potentiellen Inhibitoren unter hohem Durchsatz und ermöglicht nicht das Screening der NS3-Protease-Aktivität im natürlichen Zusammenhang mit dem Polyproteinsegment.

[0017] Das US-Patent 5 861 267 (Vertex) beschreibt ein Verfahren zum Testen von HCV-NS3-Protease, das sich der Expression der NS3/NS4A-Region und der NS4A/NS4B-Spaltungsstelle in Fusion mit dem sezernierten IL-1 β -Reporter (Interleukin-1 β) bedient. Die Spaltung der NS4A/4B-Stelle durch die NS3-Protease setzt IL-1 β in das Medium frei, was eine direkte Messung der NS3-Protease-Aktivität ermöglicht. Dieses System prüft die Hemmung der NS3-Spaltung an einer Spaltungsstelle neben dem NS3/NS4A-Komplex, eine Situation, die nicht die authentischen Bedingungen mehrfacher Stellen der Polyprotein-Prozessierung, die in infizierten Zellen vorliegen, repräsentiert oder nachbildet. Ferner ergibt dieses System ein Reportersystem, bei dem das gemessene Signal direkt proportional zur Menge des im System exprimierten Proteins und zur Menge des gespaltenen Proteins ist, was auch hier dazu führt, dass das Signal zu klein ist, um eine Durchführung eines Screenings im Großmaßstab zu ermöglichen.

[0018] WO-00/08469 (Agouron) beschreibt ein weiteres System, das ein Protease-Reporter-Konstrukt umfasst, das aus der NS2-Metalloprotease, der NS3-Protease, dem NS4A-Kofaktor und verschiedenen Variationen von geschnittenem NS4B und 5A, die der NS5A/5B Spaltungsstelle vorausgehen, besteht. Dieses System beschreibt jedoch nicht die Bedeutung des Vorliegens eines vollständigen Polyproteins zur Optimierung der Aktivität/Spezifität der NS3-Protease. Ferner erfordert dieses System eine Infektion durch einen Vaccinia-Virus-Vektor, ein Faktor, der den Bestand der Wirtszellen schwächt und den Mechanismus der cis- oder trans-Proteasespaltung während Polyprotein-Prozessierungsereignissen im Test beeinflussen kann. Ein weiterer Nachteil der Verwendung der Vaccinia-Expression besteht in der Tatsache, dass die Zellen im Test nach etwa 24 Stunden nekrotisch werden, wodurch die Verwendung dieses Tests für kinetische Tests von längerer Dauer eingeschränkt wird.

[0019] WO-00/12727 (Vertex) beschreibt ein System mit einem eine Ligandenbindungsdomäne und eine DNA-Bindungsdomäne umfassenden Fusionsprotein, das an ein Liganden-Reaktionselement binden kann, das die VP16-Aktivierungsdomäne zur Regulierung der Expression eines Reportergens veranlasst. Eine NS5A/5B-Spaltungsstelle ist in dieses Fusionsprotein inseriert und moduliert die Expression des Reportergens bei Spaltung durch die NS3/4A-Protease, die aus einem separaten Konstrukt exprimiert wird. Auch bei diesem System wird nicht die Bedeutung eines vollständigen Proteins zur Optimierung der NS3-Protease-Aktivität/Spezifität beschrieben.

[0020] Es ist daher wichtig, ein Testsystem zum Screening einer großen Anzahl von anti-HCV-Verbindungen zu entwickeln, das zu einem System mit hohem Durchsatz erweitert werden kann.

[0021] Erfindungsgemäß wird daher ein Testsystem bereitgestellt, das leicht durchführbar, zuverlässig, empfindlich und im Großmaßstab reproduzierbar ist.

[0022] Die Aufgabe der Erfindung besteht daher darin, ein zellbasiertes System und einen Test mit verbesserter Empfindlichkeit zur Messung der Hemmung der HCV-NS3-Protease-Aktivität bereitzustellen, wobei dieser Test so konzipiert ist, dass gleichzeitig die Protease-Aktivität in einem Konstrukt getestet wird, das so weit wie möglich die NS3-Polypeptid-Prozessierungsereignisse, die in infizierten Zellen im Verlauf einer HCV-Erkrankung ablaufen, reproduziert.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0023] Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Entwicklung eines zellbasierten Testsystems mit verbesserter Empfindlichkeit gegenüber HCV-NS3-Protease-Aktivität, verglichen mit bekannten Tests, wobei dieses System zum Screening von Testverbindungen geeignet ist, die zur Modulation (insbesondere Hemmung) der HCV-NS3-Protease-Aktivität befähigt sind.

[0024] Die Erfindung stellt ein erstes Konstrukt bereit, das eine Transaktivator-domäne umfasst, die strangabwärts von den NS3-5-Domänen von HCV unter der Kontrolle eines nicht-zytopathischen viralen Promotorsystems verbunden ist. Ferner wird ein zweites Konstrukt bereitgestellt, das ein Reportergen unter der Kontrolle eines Operators, der gegenüber der Bindung des Transaktivators empfindlich ist, umfasst.

[0025] Die NS3-5-Domänen kodieren für das NS3-Polypeptid, das folgendes umfasst: die NS3-Protease, gefolgt vom NS4A-Kofaktor, die NS4B- und NS5A-Proteine (einschließlich beliebiger Derivate, Varianten oder Fragmente davon), die ausreichen, eine NS5A/5B-Spaltungsstelle darzustellen. Der Transaktivator initiiert bei seiner Expression und Freisetzung aus dem Polypeptid die Transkription und Expression des Reportergens, das messbar ist.

[0026] Das System bietet zahlreiche Vorteile, einschließlich der Tatsache, dass die NS4A-Kofaktordomäne bei der Expression in der Membran des endoplasmatischen Retikulums eingebettet bleibt, wodurch die NS3-Protease bei der Komplexbildung mit NS4A verankert wird und ein Hintergrundsignal (durch Verhinderung einer nicht-spezifischen Translokation) verringert wird, wenn keine der strangabwärtigen Spaltungsstellen des Polypeptids prozessiert wird.

[0027] Die Vorteile dieses Systems liegen auch in mehreren Amplifikationsniveaus des gemessenen Signals. Die Anmelderin nimmt an, dass ein erstes Amplifikationsniveau in der Tatsache besteht, dass das Polypeptid in empfindlicher Weise die native Konformation des Polypeptids und natürliche Prozessierungsereignisse, die während einer humanen Infektion ablaufen, reproduziert. Dies verstärkt die Aktivität der NS3-Protease-Spaltung sowie deren Spezifität. Die Signaltranslokation zum Nucleus und die Reporterexpression sind daher spezifischer und das Hintergrundgeräusch wird auf ein Minimum beschränkt, das für Screeningtests mit hohem Durchsatz akzeptabel ist.

[0028] Die Verwendung eines Transaktivatorsystems sorgt auch für ein zweites Amplifikationsniveau, das die Signalausgabe weiter verstärkt.

[0029] Schließlich sorgt dieses Transaktivatorsystem, das gegenüber dem Vorliegen eines Antibiotikums empfindlich ist, für eine interne "eingebaute" negative Kontrolle, die die Messung eines naturgegebenen Hintergrundgeräusches des Tests ermöglicht, wodurch die Spezifität sowohl des Tests als auch der Testverbindungen gewährleistet wird.

[0030] Somit stellt die vorliegende Erfindung einen zellbasierten Test bereit, der die Fähigkeit zur Messung der NS3-Protease-Hemmung in einem System ermöglicht, das in enger Weise die Prozessierung von nicht-strukturellen HCV-Proteinen in einer Umgebung nachahmt, die im Wesentlichen den natürlichen Infektionsvorgang reproduziert. Das auf Säugetierzellen basierte System der vorliegenden Erfindung ist im Vergleich zu anderen bekannten Tests hochgradig empfindlich und zeigt ein erhöhtes Signal/Rausch-Verhältnis. Daher kann der Test unter Verwendung dieses Systems leicht im Maßstab auf ein Screeningsystem mit hohem Durchsatz vergrößert werden.

[0031] Somit stellt die vorliegende Erfindung ein zellbasiertes Surrogatsystem zur Bewertung der Protease-Aktivität von Hepatitis C-Virus-NS3-Protease bereit, das folgendes umfasst:

- a) ein erstes chimäres DNA-Molekül, umfassend:
 - i) ein nicht-zytopathisches Expressionssystem, das bei Transfektion in eine Säugetierzelle zur Induktion der Expression der ersten Chimäre befähigt ist; und
 - ii) ein rekombinantes HCV-DNA-Molekül in funktioneller Verknüpfung mit dem Expressionssystem, wobei

das HCV-DNA-Molekül für das NS3-5-Polypeptid kodiert, das folgendes umfasst:

- eine aktive NS3-Proteasedomäne,
 - eine NS4A-Domäne, die ausreichend ist, bei Translation die Einbettung in die ER-Membran zu ermöglichen und als Kofaktor für die NS3-Protease-Aktivität zu wirken,
 - NS4B- und NS5A-Domänen und
 - ein NS5B-Protein, das ausreicht, eine NS5A/5B-Spaltungsstelle für die NS3-Protease bereitzustellen, wobei das HCV-DNA-Molekül durch die Nucleotide 1 bis 4206 gemäß SEQ ID NO: 1 definiert ist;
 - iii) und eine Transaktivatordomäne, die strangabwärts vom HCV-DNA-Molekül fusioniert ist, wobei die Transaktivatordomäne für ein Transaktivatormolekül kodiert, das zur Initiation der Expression eines Reportergens befähigt ist, wobei es sich bei dem Transaktivator um den durch die Nucleotide 4207 bis 5 211 von SEQ ID NO: 1 definierten Tetracyclin-Transaktivator (tTA) handelt;
 - b) und ein zweites chimäres DNA-Molekül, das für ein Reportergen kodiert, das gemeinsam mit einem Operator, das auf das Transaktivatormolekül antwortet, verbunden ist;
- wobei die Expression des ersten rekombinanten Moleküls zur Erzeugung eines Fusionspolypeptids führt, das am endoplasmatischen Retikulum der Säugertierzelle verankert ist, wobei das verankerte Protein durch die Protease gespalten werden kann, wodurch die Translokation der Transaktivatordomäne zur Induktion der Expression des Reportergens als Mittel zur Bewertung der Protease-Aktivität ermöglicht wird.

[0032] Ferner beschreibt die vorliegende Erfindung rekombinante Proteine, die aus den erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekülen erzeugt worden sind, diese rekombinanten DNA-Moleküle, die mit diesen Vektoren transfiziert sind, und ein Verfahren zum Testen der NS3-Protease-Aktivität unter Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Moleküle und transfizierten Wirtszellen, wobei dieses Verfahren auch zur Identifizierung von potentiellen Inhibitoren davon geeignet ist.

[0033] Weitere Ziele, Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung ergeben sich beim Studium der folgenden, nicht-beschränkenden Beschreibung unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen. Diese Ausführungen sind nur als Beispiele und nicht als eine Beschränkung des Schutzzumfangs der Erfindung anzusehen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0034] [Fig. 1](#) gibt einen schematischen Überblick über einen Test auf der Basis von zwei Plasmiden, wobei die NS3-Protease-Aktivität die Aktivierung von Luciferase vermittelt. Das Schema zeigt das rekombinante, nicht-strukturelle HCV-Vorläuferpolypeptid in gemeinsamer Verknüpfung mit einer Tetracyclin-Transaktivatordomäne (tTA) über die 5A/5B-Zielspaltungsstelle. In einer anfänglichen Prozessierungsstufe wird NS4A durch NS3 "in cis" gespalten, wodurch ein Komplex gebildet wird, der durch die überlappenden Kreise von NS3/NS4A dargestellt ist. Dieser Komplex, der mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert ist, katalysiert die Spaltung der strangabwärtigen Zielstellen (4A/4B, 4B/5A und 5A/5B) wodurch die tTA-Domäne aus dem rekombinanten Molekül freigesetzt wird. Nach der Freisetzung wandert die tTA-Domäne zum Nucleus und transaktiviert die Expression des Reportergens, in diesem Fall Luciferase. Somit sind die NS3-Protease-Aktivität und die Spaltung strangabwärts von der NS3/4A-Spaltungsstelle für die Expression von Luciferase essentiell.

[0035] Der Mittelteil zeigt, dass die Luciferase-Transaktivierung in Abwesenheit von freigesetzter tTA-Domäne nicht erfolgt. Mögliche Mechanismen für die Nichtfreisetzung von tTA können ein Fehlen von NS3-Protease-Aktivität (durch Mutation, wie in diesem Fall) oder eine Blockierung an den strangabwärtigen Zielspaltungsstellen sein.

[0036] Der untere Bereich zeigt, dass die Luciferase-Transaktivierung nicht in Gegenwart von Tetracyclin erfolgt. Obgleich das NS3-Polypeptid gespalten wird und die tTA-Domäne zum Nucleus transloziert wird, bindet Tetracyclin an tTA und verhindert die DNA-Bindung und Expression des Reportergens, wodurch eine zuverlässige interne Kontrolle zur Messung der Hintergrundaktivität von Luciferase bereitgestellt wird.

[0037] [Fig. 2](#) zeigt in schematischer Weise drei verschiedene Familien von Chimären, umfassend verschiedene Bereiche des HCV-Polypeptids in Fusion mit dem Tetracyclin-Transaktivator (tTA) mit deren entsprechenden Kontrollen. Die DNA, die für das HCV-Segment dieser Chimären kodiert, wurde als ein Xba 1-Fragment in die Nhe 1- und Xba 1-Stellen von pUHD15-1 kloniert, um die tTA-Chimären zu erzeugen.

[0038] [Fig. 2A](#) zeigt die erste Chimäre in der ersten Familie (Konstrukt A), wobei das rekombinante Molekül das HCV-NS3-Protein von voller Länge (einschließlich sowohl der Protease- als auch der Helicase-Domänen),

NS4A von voller Länge (einschließlich der letzten sechs Aminosäuren mit den Bezeichnungen P6 bis P1) und die ersten sechs Aminosäuren von NS4B mit der Bezeichnung P1' bis P6' in Fusion mit dem tTA-Protein umfasst. Die Aminosäuren P6 bis P1 sowie P1' bis P6' überspannen die 4A/4B-Spaltungsstelle, die mit einem dunklen Pfeil angegeben ist.

[0039] [Fig. 2B](#) zeigt die zweite Chimäre in der ersten Familie (Konstrukt B), wobei es sich um das gleiche rekombinante Molekül wie in 2A handelt, mit der Ausnahme, dass das NS3-Protein an der Aminosäure 1165 von Serin zu Alanin mutiert ist (S1165A). Dieses Konstrukt dient als Kontrolle, da die Mutation die NS3-Protease-Aktivität vollkommen verhindert.

[0040] [Fig. 2C](#) zeigt die dritte Chimäre in der ersten Familie (Konstrukt C), wobei es sich um die gleiche Chimäre wie in 2A handelt, mit der Ausnahme, dass die beiden mit P1 und P1' bezeichneten Aminosäuren, die die NS4A/4B-Spaltungsstelle flankieren, von Cystein und Alanin zu Arginin bzw. Prolin abgeändert sind. Diese Veränderungen verhindern die Spaltung an dieser Stelle. Dieses Konstrukt dient als Kontrolle für die Spaltungsstelle.

[0041] [Fig. 2D](#) zeigt die erste Chimäre in der zweiten Familie (Konstrukt D), wobei es sich um das gleiche Konstrukt wie bei der Chimäre in 2A handelt, wobei aber die Aminosäuresequenz (P6–P6'), die die NS4A/NS4B-Spaltungsstelle überspannt, durch die Aminosäuresequenz (P6–P6'), die die NS5A/NS5B-Spaltungsstelle definiert, ersetzt ist.

[0042] [Fig. 2E](#) zeigt die zweite Chimäre in der zweiten Familie (Konstrukt E), wobei es sich um das gleiche Konstrukt wie in 2D handelt, mit der Ausnahme, dass die NS3-Protease durch Mutation der Aminosäure Serin zu Alanin (S1165A) inaktiviert ist. Dieses Konstrukt dient als Kontrolle für die zweite Chimäre.

[0043] [Fig. 2F](#) zeigt die dritte Chimäre in der zweiten Familie (Konstrukt F), wobei es sich um das gleiche Konstrukt wie in 2D handelt, mit der Ausnahme, dass die beiden Aminosäuren mit der Bezeichnung P1 und P1', die die NS5A/5B-Spaltungsstelle flankieren, von Cystein und Serin zu Arginin bzw. Prolin abgeändert sind. Diese Veränderungen verhindern die Spaltung an dieser Stelle. Dieses Konstrukt dient als Kontrolle für die 5A/5B-Spaltungsstelle.

[0044] [Fig. 2G](#) zeigt die erste Chimäre in der dritten Familie (Konstrukt G), wobei das rekombinante Molekül folgendes umfasst: die Region zwischen dem NS3-Protein von voller Länge, NS4A-Protein von voller Länge, NS4B- und NS5A-Proteine und ein partielles NS5B-Protein (bestehend aus den ersten sechs Aminosäuren mit den Bezeichnungen P1' bis P6') in Fusion mit dem tTA-Protein. Das NS5A von voller Länge und P1' bis P6' von 5B überspannen die 5A/5B-Spaltungsstelle, wie durch den dunklen Pfeil dargestellt ist.

[0045] [Fig. 2H](#) zeigt die zweite Chimäre in der dritten Familie (Konstrukt H), wobei es sich um das gleiche rekombinante Molekül wie in 2G handelt, mit der Ausnahme, dass die NS3-Protease durch Mutation der Aminosäure Serin zu Alanin (S1165A) inaktiviert ist. Dieses Konstrukt dient als eine negative Kontrolle für die NS3-Protease-Aktivität.

[0046] [Fig. 2I](#) zeigt die dritte Chimäre in der dritten Familie (Konstrukt I), wobei es sich um das gleiche rekombinante Molekül wie in 2G handelt, mit der Ausnahme, dass die beiden Aminosäuren mit der Bezeichnung P1 und P1', die die NS5A/5B-Spaltungsstelle flankieren, von Cystein und Serin zu Arginin bzw. Prolin abgeändert sind. Diese Änderungen verhindern die Spaltung an dieser Stelle. Dieses Konstrukt dient als eine Kontrolle für die 5A/5B-Zielspaltungsstelle.

[0047] [Fig. 3](#) zeigt die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen. Die in den [Fig. 2A](#), [Fig. 2B](#) und [Fig. 2C](#) beschriebenen Chimären, die in das Expressionsplasmid pCR3.1 durch PCR-Amplifikation und TA-Klonierung (Invitrogen, CA, USA) inseriert worden sind, werden vorübergehend in die humane embryonale Nierenzelllinie 293 zusammen mit dem rekombinanten T7-Vaccinia-Virus (vvT7-3), das die T7-RNA-Polymerase beherbergt, transfiziert. Die transfizierten und infizierten Zellen wurden gezüchtet und zelluläres Protein wurde extrahiert, der Elektrophorese unterzogen, geblottet und untersucht.

[0048] [Fig. 3A](#) zeigt die Ergebnisse bei Untersuchung des Blots mit einem polyklonalen Antikörper gegen NS3-Protein. Die Bahnen A, B und C entsprechen den in 2A, 2B bzw. 2C beschriebenen Konstrukten. Die Bahn "—" bezeichnet eine Kontrolle von scheintransfizierten 293-Zellen. Die Bahnen A und C belegen die Anwesenheit von reifem NS3-Protein (NS3), während die Bahn B das Konstrukt mit der S1165A-Mutation wiedergibt und die Anwesenheit von präprozessiertem NS3 (pre) belegt, offensichtlich aber kein reifes NS3-Protein aufweist.

[0049] [Fig. 3B](#) zeigt die Ergebnisse bei Untersuchung des Blots mit einem polyklonalen Antikörper gegen NS4A. Die Bahn A belegt die Anwesenheit von reifem NS4A-Protein (NS4A). Die Bahn B, die das Konstrukt 2B mit der S1165A-Mutation repräsentiert, weist offensichtlich kein reifes NS4A-Protein auf. Gleichmaßen weist die Bahn C, die das Konstrukt C mit der mutierten Spaltungsstelle repräsentiert, kein reifes NS4A-Protein auf. Um reifes NS4A-Protein, das aus 54 Aminosäuren besteht, sichtbar zu machen, wurden zelluläre Extrakte an 16,5% SDS-PAGE-Tricine-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit polyklonalem NS4A-Antikörper untersucht. Die erhaltene Bande ist im unteren Feld dargestellt.

[0050] [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen. Die in den [Fig. 2D](#), [Fig. 2E](#) und [Fig. 2F](#) beschriebenen Chimären, die in das Expressionsplasmid pCR3.1 durch direkte TA-Klonierung von PCR-Produkten inseriert worden sind, werden vorübergehend in die Säugetier-Wirtszelllinie 293 zusammen mit dem rekombinanten T7-Vaccinia-Virus (vvT7-3), das die T7-RNA-Polymerase beherbergt, transfiziert. Die transfizierten Zellen werden gezüchtet und zelluläres Protein wird extrahiert, der Elektrophorese unterzogen, geblottet und untersucht. Die Ergebnisse zeigen den mit einem polyklonalen Antikörper gegen NS3-Protein untersuchten Blot. Die Bahnen D, E und F entsprechen den in 2D, 2E bzw. 2F beschriebenen Konstrukten. Die Bahn "—" bezeichnet eine Kontrolle von scheintransfizierten 293-Zellen. Die Bahnen D und F belegen die Anwesenheit von reifem NS3-Protein (NS3), während die Bahn E, die das Konstrukt mit der S1165A-Mutation repräsentiert, die Anwesenheit von präprozessiertem NS3 (pre) belegt, offensichtlich aber kein reifes NS3-Protein aufweist.

[0051] [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen. Die in den [Fig. 2G](#), [Fig. 2H](#) und [Fig. 2I](#) beschriebenen Chimären, die in das Expressionsplasmid pCR3.1 durch direkte TA-Klonierung von PCR-Produkten inseriert worden sind, werden vorübergehend in die Säugetier-Wirtszelllinie 293 zusammen mit dem rekombinanten T7-Vaccinia-Virus (vvT7-3), das die T7-RNA-Polymerase beherbergt, transfiziert. Die transfizierten Zellen werden gezüchtet und zelluläres Protein wird extrahiert, der Elektrophorese unterzogen, geblottet und untersucht.

[0052] [Fig. 5A](#) zeigt die Ergebnisse des mit einem polyklonalen Antikörper gegen NS3-Protein untersuchten Blots. Die Bahnen G, H und I entsprechen den in 2G, 2H bzw. 2I beschriebenen Konstrukten. Die Bahn "—" bezeichnet eine Kontrolle von scheintransfizierten 293-Zellen. Die Bahnen G und I belegen die Anwesenheit von reifem NS3-Protein (NS3), während die Bahn H, die das Konstrukt mit der S1165A-Mutation repräsentiert, offensichtlich kein reifes NS3-Protein aufweist.

[0053] [Fig. 5B](#) zeigt die Ergebnisse des Western-Blots bei Untersuchung mit einem polyklonalen Antikörper gegen NS4A-Protein. Die Bahnen G, H und I entsprechen den in 2G, 2H bzw. 2I beschriebenen Konstrukten. Die Bahn "—" bezeichnet eine Kontrolle von scheintransfizierten 293-Zellen. Die Bahnen G und I belegen die Anwesenheit von reifem NS4A-Protein (NS4A), während die Bahn H, die das Konstrukt mit der S1165A-Mutation repräsentiert, offensichtlich kein reifes NS4A aufweist.

[0054] [Fig. 5C](#) zeigt die Ergebnisse des Western-Blots bei Untersuchung mit einem polyklonalen Antikörper gegen NS5A-Protein. Die Bahnen G, H und I entsprechen den Konstrukten G, H bzw. I. Die Bahn bezeichnet eine Kontrolle von scheintransfizierten 293-Zellen. Die Bahn G belegt die Anwesenheit von reifem NS5A-Protein (NS5A), während die Bahn H, die das Konstrukt mit der S1165A-Mutation repräsentiert, offensichtlich kein reifes NS5A-Protein aufweist. Gleichmaßen weist die Bahn I, die das Konstrukt I mit der mutierten NS5A/5B-Spaltungsstelle repräsentiert, kein reifes NS5A-Protein auf und das unprozessierte NS5A-tTA-Fusionsprotein wird als ein ~90 kDa-Produkt nachgewiesen.

[0055] [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse des Luciferase-Tests, der an Extrakten von 293-Zellen durchgeführt worden ist, die mit einem der Konstrukte A bis I und dem pUHC13-3-Reporterplasmid kotransfiziert worden sind. Die Luciferase-Aktivität wird als Photonen-Zählergebnis pro Sekunde gemessen. Die Bezeichnungen A bis I entsprechen den in den [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2I](#) beschriebenen Konstrukten. Bei den Kontrollen B, E und H fehlt die aktive Protease-Stelle, während bei den Kontrollen C, F und I eine Spaltungsstelle fehlt. Die Ergebnisse dieses Tests zeigen, dass die Luciferase-Aktivität sowohl von aktiver NS3-Protease als auch von einer funktionellen Spaltungsstelle abhängt. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass das Konstrukt G eine höhere Luciferase-Aktivität zeigt als die Konstrukte A oder D. Diese Werte stellen einen Mittelwert von zwei Experimenten dar.

[0056] [Fig. 7](#) zeigt das Verhältnis der Luciferase-Aktivität, die von den Konstrukten A, D und G erzeugt wird, gegenüber den entsprechenden Mutanten des aktiven Zentrums B, E und H unter Verwendung der in [Fig. 6](#) dargestellten Werte. Die Ergebnisse zeigen, dass das Verhältnis G/H etwa 9- bzw. 2-fach größer als A/B bzw. D/E ist. Das Konstrukt G mit der längsten Strecke des nicht-strukturellen HCV-Bereiches, der die volle Länge von NS3, NS4A, NS4B und NS5A und partiell NS5B umfasst, erzeugt die stärkste NS3-abhängige Luciferase-

se-Reaktion. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von n Experimenten.

[0057] Fig. 8 zeigt den Einfluss von Tetracyclin auf den Tetracyclin-reaktiven, transkriptionellen Transaktivator. Die Expression des Luciferase-Reportergens wird durch NS3 gesteuert, das einen Tetracyclin-reaktiven, transkriptionellen Transaktivator prozessiert. Ein Luciferase-Test wurde an Extrakten von 293-Zellen, die mit dem Konstrukt G oder H oder dem positiven, tTA-erzeugenden Kontrollplasmid (pUHD15-1) und dem pUHC13-3-Plasmid mit einem Gehalt an dem Luciferase-Reporter kotransfiziert waren, durchgeführt. Ausgefüllte und offene Balken zeigen die Abwesenheit bzw. Gegenwart von Tetracyclin. Es ist darauf hinzuweisen, dass das Konstrukt G ein Tetracyclin-kontrolliertes Signal erzeugt. Durch Inaktivierung der NS3-Protease-Aktivität (im Konstrukt H) wird dieses Signal beseitigt.

[0058] Fig. 9 zeigt die Ergebnisse des Luciferase-Tests, der an Extrakten der Leberzelllinie WRL68, die mit einem der Konstrukte A bis I und dem pUHC13-3-Reporter-Plasmid kotransfiziert worden sind, durchgeführt worden ist. Die Luciferase-Aktivität wird als Photoneu-Zählergebnis pro Sekunde gemessen. Bei den Kontrollen B, E und H fehlt das aktive Zentrum von Protease. Bei den Kontrollen C, F und I fehlt eine Spaltungsstelle, die somit keine funktionelle (spaltbare) NS3-Protease-Spaltungsstelle aufweisen. Die Ergebnisse dieses Tests zeigen, dass die Luciferase-Aktivität sowohl von aktiver NS3-Protease als auch von einer funktionsfähigen Spaltungsstelle abhängig ist. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass das Konstrukt G eine höhere Luciferase-Aktivität aufweist als die Konstrukte A oder D.

[0059] Fig. 10 zeigt das Verhältnis der von den Konstrukten A, D und G erzeugten Luciferase-Aktivität zur Aktivität der entsprechenden Mutanten des aktiven Zentrums B, E und H. Der Luciferase-Test wurde an Extrakten der Leberzelllinie WRL 68, die mit einem der Konstrukte A, B, D, E, G oder H und dem Reporterplasmid pUHC13-3 kotransfiziert worden waren, durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität wird als Photoneu-Zählergebnis pro Sekunde gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Verhältnis von G/H etwa das 5- bzw. 3,5-fache des Verhältnisses von A/B bzw. D/E beträgt. Das Konstrukt G mit der längsten Strecke einer nicht-strukturellen HCV-Region, die die partielle oder vollständige Länge von NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B umfasst, erzeugt offensichtlich auch die stärkste NS3-abhängige Luciferase-Reaktion in der WRL68-Zelllinie.

[0060] Fig. 11 zeigt die Ergebnisse der Optimierung der Menge von Plasmid-DNA zur Transformation der 293-Zelllinie. Unterschiedliche Mengen an DNA von Konstrukt G oder dem entsprechenden Kontrollkonstrukt H mit Mangel an NS3 wurden mit einer konstanten Menge an pUHC13-3 (0,2 µg) kotransfiziert. Zellen wurden in 6-Muldenplatten bei 50% Konfluenz verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Menge an NS3-kodierender Plasmid-DNA, die etwa 3-fach größer (0,6 µg) als die Menge von pUHC13-3 (0,2 µg) ist, ein optimales NS3-abhängiges Luciferase-Signal in 293-Zellen erzeugt.

[0061] Fig. 12 zeigt die Ergebnisse der Optimierung der Menge von Plasmid-DNA zur Transformation der Leberzelllinie WRL68. Verschiedene DNA-Mengen des Konstrukts G oder des entsprechenden Kontrollkonstrukts H mit Mangel an NS3 wurden mit einer konstanten Menge an pUHC13-3 (0,2 µg) kotransfiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Menge, die etwa 2,5-fach größer (0,5 µg) als die Menge an pUHC13-3 (0,2 µg) ist, ein optimales NS3-abhängiges Luciferase-Signal in der Leberzelllinie WRL68 erzeugt.

[0062] Fig. 13 zeigt, dass das aus dem Konstrukt I exprimierte NS3-Protein das nicht-strukturelle HCV-Polyprotein in "trans" in 293-Zellen spalten kann. Das Experiment umfasste die Kotransfektion des pUHC13-3 Reporters mit einem der Konstrukte G, H oder I. Die Konstrukte H und I wurden ferner gleichzeitig zusammen mit dem pUHC13-3-Reporter-Plasmid kotransfiziert. Eine Transfektion nur des Konstrukts G mit dem Reporter führt zu einem starken Luciferase-Aktivitätssignal, während eine Transfektion von Konstrukt H mit dem Reporter (Mutante mit dem aktiven Zentrum der NS3-Protease) oder dem Konstrukt I mit dem Reporter (Mutante mit der Spaltungsstelle) zu einer schwachen Luciferase-Aktivität führt. Eine 3-fache Kotransfektion mit den Konstrukten H und I zusammen mit dem Reporter-Plasmid stellt das Luciferase-Aktivitätssignal wieder her. Das funktionelle NS3-Protein, das aus dem Konstrukt I exprimiert worden ist, kann die unmodifizierte Spaltungsstelle, die vom Konstrukt H exprimiert wird, prozessieren, wodurch der Tetracyclin-Transaktivator zur Initiation der Expression von Luciferase des Tetracyclin-Operons freigesetzt wird. Die verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA, die bei den Transfektionen verwendet wurden, sind angegeben.

[0063] Fig. 14 zeigt die Ergebnisse eines ähnlichen Experiments wie in **Fig. 13** unter Verwendung der Leberzelllinie WRL68. Gleichmaßen zeigen die Ergebnisse, dass das NS3-Protein, das aus dem Konstrukt I erzeugt worden ist, das nicht-strukturelle HCV-Protein in "trans" in der WRL68-Zelle spalten kann. Wie angegeben, werden verschiedene Mengen an Plasmid-DNA bei der Transfektion verwendet.

[0064] **Fig. 15:** Ausgefüllte Quadrate zeigen die prozentuale Hemmung der HCV-NS3-Protease-Aktivität bei tTA-Transaktivierung der SEAP-Expression in Wirtszellen, die mit dem Konstrukt G und dem pUHC13-3-Reporter-Plasmid, das sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) exprimiert, kotransfiziert worden sind. Leere Quadrate zeigen die prozentuale Hemmung von Kontroll-tTA-Aktivität (unabhängig von HCV-NS3) bei der Transaktivierung von SEAP in Wirtszellen, die mit Kontroll-pUHD15-1- und pUHC13-3-Plasmiden kotransfiziert worden sind. Die Zellen wurden nach der Transfektion in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors A gezüchtet. Die SEAP-Aktivität wurde gemessen und die EC_{50} - und TC_{50} -Werte wurden bestimmt.

Ausführliche Beschreibung der vorliegenden Erfindung

Definitionen

[0065] Sofern nichts anderes angegeben ist, haben die wissenschaftlichen und technischen Bezeichnungen sowie die Nomenklatur, wie sie hier verwendet werden, die gleiche Bedeutung, die der Fachmann auf dem einschlägigen Gebiet kennt. Im allgemeinen handelt es sich bei den Vorgängen der Zellkultur, der Infektion, den molekularbiologischen Verfahren und dergl. um Verfahren, die gemäß dem Stand der Technik gebräuchlich sind. Derartige standardmäßige Techniken werden in Handbüchern, z. B. bei Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1994), beschrieben.

[0066] Nucleotidsequenzen werden hier einzelsträngig in 5'- → 3'-Richtung von links nach rechts angegeben, wobei die im Stand der Technik üblichen Einbuchstaben-Nucleotidsymbole gemäß den Empfehlungen der IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission (1972) verwendet werden.

[0067] Die vorliegende Beschreibung bezieht sich auf eine Anzahl von routinemäßig verwendeten Ausdrücken der rekombinanten DNA-Technik (rDNA-Technik). Dennoch werden hier Definitionen von ausgewählten Beispielen derartiger rDNA-Ausdrücke aus Gründen der Klarheit und leichteren Verständlichkeit vorgelegt.

[0068] Die Ausdrücke "rekombinante DNA", "rekombinantes Nucleinsäuremolekül" oder "rekombinantes Plasmid" beziehen sich gemäß dem Stand der Technik auf ein DNA-Molekül, das sich durch Verbindung von DNA-Segmenten ergibt. Dieser Vorgang wird häufig als gentechnische Manipulation bezeichnet.

[0069] Die Ausdrücke "DNA-Segment oder -Molekül oder -Sequenz", die hier verwendet werden, beziehen sich auf Moleküle, die aus den Desoxyribonucleotiden Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und/oder Cytosin (C) bestehen. Diese Segmente, Moleküle oder Sequenzen lassen sich in der Natur auffinden oder ergeben sich durch Synthese. Werden sie in Übereinstimmung mit dem genetischen Code gelesen, können diese Sequenzen für eine lineare Strecke oder Sequenz von Aminosäuren kodieren, die als Polypeptid, Protein, Proteinfragment oder dergl. bezeichnet werden können.

[0070] Der hier verwendete Ausdruck "Gen" ist aus dem Stand der Technik bekannt und bezieht sich auf eine Nucleinsäuresequenz, die ein einzelnes Protein oder Polypeptid definiert. Das Polypeptid kann durch eine Sequenz von voller Länge oder durch einen beliebigen Teil der Kodierungssequenz kodiert werden, sofern die funktionelle Aktivität des Proteins aufrechterhalten bleibt.

[0071] Ein "Strukturgen" definiert eine DNA-Sequenz, die in RNA transkribiert und in ein Protein mit einer speziellen Aminosäuresequenz translatiert wird, wodurch ein spezifisches Polypeptid oder Protein entsteht. "Strukturproteine" definieren die HCV-Proteine, die in die Viruspartikel eingebaut sind, nämlich Core "C", E1, E2 und E2-p7. "Nicht-Strukturproteine" definieren die HCV-Proteine, die in viralen Teilchen nicht enthalten sind, nämlich NS2, NS3, NS4A, NS5A und NS5B.

[0072] Bei einer "Restriktionsendonuclease" oder einem "Restriktionsenzym" handelt es sich um ein Enzym, das die Fähigkeit besitzt, eine spezifische Basensequenz (üblicherweise mit einer Länge von 4, 5 oder 6 Basenpaaren) in einem DNA-Molekül zu erkennen und das DNA-Molekül an jeder Stelle, wo diese Sequenz auftritt, zu spalten. Ein Beispiel für ein derartiges Enzym ist EcoRI, das die Basensequenz G↓AATTC erkennt und ein DNA-Molekül an dieser Erkennungsstelle spaltet.

[0073] "Restriktionsfragmente" sind DNA-Moleküle, die durch den Verdau von DNA mit einer Restriktionsendonuclease entstehen. Beliebige vorgegebene Genome oder DNA-Segmente können mit einer bestimmten Restriktionsendonuclease in mindestens zwei diskrete Moleküle von Restriktionsfragmenten gespalten werden.

[0074] "Agarose-Gelelektrophorese" ist ein analytisches Verfahren zur Fraktionierung von doppelsträngigen DNA-Molekülen aufgrund der Größe der DNA. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass DNA-Moleküle durch ein Gel wie durch ein Sieb wandern, wobei das kleinste DNA-Molekül die größte Beweglichkeit besitzt und am weitesten durch das Gel wandert. Durch die Siebeigenschaften des Gels wird die Wanderung der größten DNA-Moleküle verzögert, so dass diese die geringste Beweglichkeit besitzen. Die fraktionierte DNA kann durch Färben des Gels unter Anwendung bekannter Verfahren, durch Nucleinsäure-Hybridisierung oder durch Markieren der fraktionierten DNA-Moleküle mit einer nachweisbaren Markierung sichtbar gemacht werden. Alle diese Verfahren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Spezielle Verfahren finden sich bei Ausubel et al. (a.a.O.).

[0075] Ein "Oligonucleotid" oder "Oligomer" ist ein Molekül, das aus zwei oder mehr Desoxyribonucleotiden oder Ribonucleotiden und vorzugsweise aus mehr als drei Bestandteilen besteht. Die genaue Größe des Moleküls hängt von zahlreichen Faktoren ab, die wiederum von der letztendlichen Funktion oder Verwendung des Oligonucleotids abhängen. Ein Oligonucleotid lässt sich synthetisch durch Klonieren oder Amplifizieren ableiten.

[0076] Die "Sequenzamplifikation" ist ein Verfahren zur Erzeugung großer Mengen einer Zielsequenz. Im allgemeinen werden ein oder mehr Amplifikationsprimer an eine Nucleinsäuresequenz angelagert. Unter Verwendung geeigneter Enzyme, werden Sequenzen, die sich in Nachbarschaft zu den Primern oder zwischen diesen befinden, amplifiziert. Ein hier angewandtes Amplifikationsverfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

[0077] Der Ausdruck "Amplifikationsprimer" bezieht sich auf ein Oligonucleotid, das zur Anlagerung an eine DNA-Region neben einer Zielsequenz befähigt ist und als Initiationsprimer für die DNA-Synthese unter geeigneten Bedingungen, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, dienen kann. Das synthetisierte Primererweiterungsprodukt ist mit der Zielsequenz komplementär.

[0078] Die Ausdrücke "Domäne" oder "Region" beziehen sich auf eine bestimmte Aminosäuresequenz, die entweder eine bestimmte Funktion oder Struktur innerhalb eines Proteins festlegt. Ein Beispiel hierfür ist die NS3-Protease-Domäne, die innerhalb des HCV-Nicht-Strukturpolyproteins enthalten ist.

[0079] Der Ausdruck "Reporterogen" bezieht sich auf eine Nucleotidsequenz, die für ein "Reporterprotein" kodiert. Das Reporterprotein ergibt ein Nachweismittel zur Bewertung der Genexpression. Das Reporterogen ist innerhalb eines "Reporterplasmids" enthalten. Einige geeignete Beispiele für Reporterogene für die Zwecke der Erfindung sind: sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP), Luciferase, Chloramphenicol-aminotransferase (CAT), β -Galactosidase, grün fluoreszierendes Protein (GFP) und dergl.

[0080] Der Ausdruck "Reportersystem" bezieht sich auf die Kombination von zwei oder mehr Reportern. Ein nicht-beschränkendes Beispiel für ein Reportersystem, das für die Zwecke der vorliegenden Anmeldung geeignet ist, ist ein erster Reporter, bei dem es sich um einen genetischen Aktivator, wie tTA, handelt, der die Expression eines zweiten Reporters, z. B. Luciferase oder sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP), dirigiert.

[0081] Die Ausdrücke "Aktivator" und "Operon" beziehen sich auf ein System, bei dem ein "Aktivator"-Molekül an den Operator, der sich in einem Operon befindet, bindet, um die Expression des "Operons" zu stimulieren. Zu Beispielen für derartige Systeme gehören der Tetracyclin-Transaktivator (tTA), der HIV-1-tat-Transaktivator, der GAL-4-Transaktivator, NF κ B und dergl.

[0082] Die hier verwendeten Ausdrücke "chimäres Molekül" oder "Chimäre" beziehen sich auf mindestens zwei Nucleinsäuredomänen, die in der Natur nicht miteinander verbunden sind. Zu nicht-beschränkenden Beispielen für derartige erfindungsgemäße Chimäre gehören das HCV-NS3-4A-4B-5A-5B-tTA-Domänenkonstrukt. Derartige Chimären ergeben bei der Expression "Fusionsproteine".

[0083] Der Ausdruck "Fusionsprotein" bezieht sich gemäß der hier verwendeten Definition auf mindestens zwei Polypeptidsegmente, die in der Natur nicht miteinander verbunden sind. Zu nicht-beschränkenden Beispielen derartiger "Fusionsproteine" gehören erfindungsgemäß die Teile des HCV-Polyproteins, die mit einem Protein mit direkten oder indirekten Reporterfähigkeiten, wie tTA und SEAP, verbunden sind.

[0084] Bei den Ausdrücken "Plasmid", "Vektor" oder "DNA-Konstrukt" handelt es sich um im Stand der Technik gebräuchliche Ausdrücke, die sich auf beliebige genetische Elemente beziehen, einschließlich (ohne Be-

schränkung hierauf), Plasmid-DNA, Phagen-DNA, virale DNA und dergl., in die die Oligonucleotidsequenzen oder Sequenzen der vorliegenden Erfindung eingebaut sein können und die als ein DNA-Vehikel dienen können, in die die erfindungsgemäße DNA kloniert werden kann. Zahlreiche Typen von Vektoren existieren und sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0085] Der Ausdruck "Expressionsvektor" definiert einen Vektor gemäß den vorstehenden Ausführungen, der aber dazu bestimmt ist, die Expression einer inserierten Sequenz nach einer Transformation oder Transfektion in einem Wirt zu ermöglichen. Das klonierte Gen (inserierte Sequenz) wird üblicherweise unter der Kontrolle von Kontrollelementsequenzen, wie Promotorsequenzen, platziert. Derartige Expressionskontrollsequenzen variieren je nachdem, ob der Vektor zur Expression des funktionsfähig verknüpften Gens in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirt oder in beide (Shuttle-Vektoren) vorgesehen ist. Zusätzlich können Transkriptionselemente, wie Enhancer-Elemente, Terminationssequenzen, Gewebespezifitätselemente und/oder Translationsinitiationsstellen und Translationsterminationsstellen, enthalten sein.

[0086] Der Ausdruck "nicht-zytopathisches" Expressionssystem definiert ein System, das keine zytopathischen Veränderungen im Zellsystem, in dem es exprimiert wird, hervorruft. Dieses Expressionssystem benötigt keine Koinfektion mit einem Virus und verursacht keine Expression von viralen Nicht-HCV-Komponenten, die letztlich Zellpathologie und Zelltod herbeiführen könnten. Zu Beispielen für nicht-zytopathische Promotoren gehören: das CMV-Promotorsystem, das frühe SV40-Promotorsystem oder RSV(Rous Sarcoma-Virus)-LTR Promotorsystem.

[0087] Unter einem "eukaryontischen Expressionssystem" ist die Kombination eines geeigneten Expressionsvektors und einer eukaryontischen Zelllinie zu verstehen, die zur Expression eines Gens von Interesse verwendet werden können. Plasmidvektoren, die das erwünschte Gen enthalten, können ebenfalls verwendet werden. In sämtlichen Fällen enthält der Vektor geeignete Kontrollelemente (Promotoren), um das Gen im Zelltyp von Interesse zu exprimieren. Üblicherweise verwendete eukaryontische Zelltypen sind Hefe (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), die mit einem Plasmidvektor transfiziert ist; und Säugetierzellen, die mit DNA-Vektoren für eine vorübergehende oder konstitutive Expression transfiziert sind. Eine bevorzugte Zelllinie, die für die Zwecke der Erfindung geeignet ist, leitet sich von Lebergewebe ab.

[0088] Eine Wirtszelle oder eine Indikatorzelle ist durch exogene oder heterologe DNA (z. B. ein DNA-Konstrukt) "transfiziert" worden, wenn eine derartige DNA in die Zelle eingeführt worden ist. Die transfizierende DNA kann in chromosomale DNA integriert (kovalent gebunden) sein oder nicht, um das Genom der Zelle zu bilden. In Prokaryonten, Hefen und Säugetierzellen kann beispielsweise die transfizierende/transformierende DNA an einem episomalen Element, z. B. einem Plasmid, gehalten werden. In Bezug auf eukaryontische Zellen handelt es sich bei einem Beispiel für eine stabil transfizierte Zelle um eine Zelle, bei der die transfizierende DNA in ein Chromosom integriert worden ist und auf Tochterzellen durch Chromosomenreplikation vererbt wird. Diese Stabilität wird durch die Fähigkeit der eukaryontischen Zelle, Zelllinie oder Klon, die aus einer Population von Tochterzellen mit einem Gehalt an der transfizierenden DNA bestehen, belegt. Transfektionsmethoden sind aus dem Stand der Technik bekannt (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994).

[0089] Die zur praktischen Ausübung der Erfindung geeigneten Nucleotidsequenzen und Polypeptide umfassen (ohne Beschränkung hierauf), Mutanten, Homologe, Untertypen, die Quasispezies, Allelen und dergl. Es ist ersichtlich, dass im allgemeinen die erfindungsgemäßen Sequenzen für ein Polyprotein kodieren. Für einen Fachmann ist es ersichtlich, dass das erfindungsgemäße Polyprotein und beliebige Varianten, Derivate oder Fragmente davon zu einer aktiven Protease autoprozessiert werden.

[0090] Die hier verwendete Bezeichnung "Variante" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenz (entweder ein Nucleinsäure- oder Aminosäuremolekül, das seine biologische Aktivität (entweder funktionell oder strukturell) behält, die im Wesentlichen ähnlich mit der der ursprünglichen Sequenz ist. Diese Variante kann von der gleichen oder einer unterschiedlichen Spezies stammen, wobei es sich um eine natürliche Variante oder um eine synthetisch hergestellte Variante handeln kann. Zu derartigen Varianten gehören Aminosäuresequenzen mit Substitutionen, Deletionen oder Additionen von einer oder mehreren Aminosäuren, vorausgesetzt, dass die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt. Gleiches gilt für Varianten von Nucleinsäuresequenzen, die Substitutionen, Deletionen oder Additionen von einem oder mehreren Nucleotiden aufweisen können, vorausgesetzt, dass die biologische Aktivität der Sequenz im Allgemeinen aufrechterhalten wird.

[0091] Der Ausdruck "Derivat" soll beliebige der vorstehend beschriebenen Varianten umfassen, wenn zusätzliche chemische Einheiten, die normalerweise nicht Bestandteil dieser Moleküle sind, enthalten sind. Diese

chemischen Einheiten können verschiedene Zwecke haben, einschließlich einer Verbesserung der Löslichkeit des Moleküls, der Resorption, der biologischen Halbwertszeit, einer Verringerung der Toxizität und einer Beseitigung oder Verringerung von unerwünschten Nebenwirkungen. Ferner können diese Einheiten zu Markierungs- oder Bindungszwecken verwendet werden oder sie können in Fusionsprodukten enthalten sein. Verschiedene Einheiten, die zur Vermittlung der vorstehend beschriebenen Wirkungen befähigt sind, finden sich in Remington's The Science and Practice of Pharmacy (1995).

[0092] Methoden zur Kupplung derartiger Einheiten an ein Molekül sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0093] Der Ausdruck "Fragment" bezieht sich auf beliebige Segmente einer identifizierten DNA-, RNA- oder Aminosäuresequenz und/oder eines beliebigen Segments von beliebigen Varianten oder Derivaten, die vorstehend beschrieben wurden, wobei die biologische Aktivität (funktionell oder strukturell), die erfindungsgemäß erforderlich ist, im Wesentlichen erhalten bleibt.

[0094] Die erfindungsgemäß verwendeten Ausdrücke "Variante", "Derivat" und "Fragment" beziehen sich auf Proteine oder Nucleinsäuremoleküle, die isoliert/gereinigt, chemisch synthetisiert oder durch rekombinante DNA-Technik erzeugt werden können. Alle diese Verfahren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Wie nachstehend durch Beispiele belegt ist, können die erfindungsgemäßen Nucleotidsequenzen und Polypeptide z. B. durch in vitro-Mutagenese modifiziert werden.

[0095] Beispielsweise muss gemäß der erfindungsgemäßen Definition ein erwünschtes Fragment von NS3-Protein seine Protease-Aktivität behalten. Ein erwünschtes Fragment des NS4A-Proteins behält seine Protease-Kofaktor-Aktivität (funktionelle Aktivität) und behält auch seinen hydrophoben Bereich, der die Einbettung in die ER-Membran ermöglicht (strukturelle Aktivität). Ein erwünschtes Fragment des NS4B-Proteins behält seine strukturelle Aktivität in einem Ausmaß, das die Polyprotein-Prozessierung in möglichst enger Anlehnung an das native Produkt ermöglicht. Ein erwünschtes Fragment des NS5A-Proteins behält seine strukturelle Aktivität, um die Polyprotein-Prozessierung in möglichst naher Anlehnung an das native Produkt zu ermöglichen, während auch seine funktionelle Aktivität erhalten bleibt, um eine funktionelle NS5A/5B-Spaltungsstelle bereitzustellen. Ein erwünschtes Fragment des NS5B-Proteins muss ausreichend sein, um eine funktionelle NS5A/5B-Spaltungsstelle aufrechtzuerhalten. Beispielsweise reichen die ersten sechs Aminosäuren des NS5B-Proteins für diesen Zweck aus. Eine derartige funktionelle oder strukturelle Aktivität für die jeweiligen Domänen lässt sich vom Fachmann leicht ohne unzumutbaren experimentellen Aufwand ermitteln.

[0096] Der hier verwendete Ausdruck "Spaltungsstelle" bezieht sich auf ein Polypeptid, das zur "cis"- oder "trans"-Spaltung durch die HCV-NS3-Protease befähigt ist.

[0097] Die Ausdrücke "Zielspaltungsstelle" oder "Zielstelle", die hier verwendet werden, beziehen sich auf eine Spaltungsstelle strangabwärts von der NS3/4A-Spaltungsstelle. Mindestens eine Zielstelle der NS3-Protease muss gespalten werden, um eine Translokation des Transaktivators und eine Expression des Reportergens zu erreichen und die Messung des Reportergenprodukts zu ermöglichen. Die NS3/4A-Spaltungsstelle wird hier nicht als "Ziel"-Stelle angesehen, da deren Spaltung nicht von selbst das Reportergenprodukt freisetzt.

[0098] Der Ausdruck "funktionelle Spaltungsstelle", der hier verwendet wird, bedeutet eine Spaltungsstelle des Vorläufer-Polypeptids, das modifiziert worden ist (durch Mutation oder durch andere chemische Maßnahmen), aber immer noch durch die NS3-Protease spaltbar bleibt. Nicht-beschränkende Beispiele für derartige Modifikationen sind eine konservative Substitution des Nucleinsäure-Codons oder von Aminosäuren.

Zellbasierter Test

[0099] Die vorliegende Erfindung stellt ein zellbasiertes Surrogatsystem zur Bewertung der Protease-Aktivität von Hepatitis C-Virus-NS3-Protease bereit, das folgendes umfasst:

- a) ein erstes chimäres DNA-Molekül, umfassend:
 - i) ein nicht-zytopathisches Expressionssystem, das bei Transfektion in eine Säugetierzelle zur Induktion der Expression der ersten Chimäre befähigt ist; und
 - ii) ein rekombinantes HCV-DNA-Molekül in funktioneller Verknüpfung mit dem Expressionssystem, wobei das HCV-DNA-Molekül für das NS3-5-Polypeptid kodiert, das folgendes umfasst:
 - eine aktive NS3-Proteasedomäne,
 - eine NS4A-Domäne, die ausreichend ist, bei Translation die Einbettung in die ER-Membran zu ermöglichen und als Kofaktor für die NS3-Protease-Aktivität zu wirken,

- NS4B- und NS5A-Domänen, einschließlich beliebiger Derivate, Varianten oder Fragmente davon, und
- ein NS5B-Protein, einschließlich beliebiger Derivate, Varianten oder Fragmente davon, die ausreichen, eine NS5A/5B-Spaltungsstelle für die NS3-Protease bereitzustellen,
- iii) und eine Transaktivator-domäne, die strangabwärts vom HCV-DNA-Molekül fusioniert ist, wobei die Transaktivator-domäne für ein Transaktivatormolekül kodiert, das zur Initiation der Expression eines Reportergens befähigt ist,;
- b) und ein zweites chimäres DNA-Molekül, das für ein Reportergen kodiert, das gemeinsam mit einem Operator, das auf das Transaktivatormolekül antwortet, verbunden ist;

wobei die Expression des ersten rekombinanten Moleküls zur Erzeugung eines Fusionspolyproteins führt, das am endoplasmatischen Retikulum der Säugetierzelle verankert ist, wobei das verankerte Protein durch die Protease gespalten werden kann, wodurch die Translokation der Transaktivator-domäne zur Induktion der Expression des Reportergens als Mittel zur Bewertung der Protease-Aktivität ermöglicht wird.

[0100] Das chimäre Molekül umfasst eine Nucleotidsequenz, die zur Expression des HCV-Polyproteins mit der NS3-Domäne befähigt ist, sowie Varianten, Derivate oder Fragmente davon, die nach Translation zur Bereitstellung in der aktiven Protease ausreichen. Dies umfasst ein NS3-Protein, das so geschnitten ist, dass die Helicase-Domäne ausgeschlossen ist, oder ein NS3-Protein, bei dem die Helicase-Domäne inaktiviert ist.

[0101] Bei der für das zellbasierte Surrogatsystem notwendigen NS4A-Domäne ist es erforderlich, dass das translatierte NS4A-Protein, Varianten, Derivate oder Fragmente davon ausreichend sind, um bei Translation eine Einbettung des Polyproteins in die ER-Membran zu ermöglichen und somit als Kofaktor für die NS3-Protease-Aktivität zu wirken.

[0102] Bei der für das zellbasierte Surrogatsystem erforderlichen NS4B-Domäne ist es notwendig, dass das translatierte Protein eine ausreichende Länge aufweist, um eine korrekte strukturelle Orientierung der NS3-Protease im Hinblick auf die NS5A/5B-Zielspaltungsstelle zu ermöglichen. Varianten, Derivate oder Fragmente des NS4B-Proteins können daher an ihren Spaltungsstellen (4A/4B oder 4B/5A) mutiert werden oder sie können so mutiert werden, dass die native biologische Aktivität beseitigt wird, ohne dass die Orientierungswirkung auf das Polyprotein beeinträchtigt wird.

[0103] Bei der für das zellbasierte Surrogatsystem erforderlichen NS5A-Domäne ist es notwendig, dass das translatierte Protein eine ausreichende Länge aufweist, um die korrekte strukturelle Orientierung der NS3-Protease im Hinblick auf die NS5A/5B-Zielspaltungsstelle zu ermöglichen. Varianten, Derivate oder Fragmente des NS5A-Proteins können daher an ihrer strangaufwärtigen Spaltungsstelle (4B/5A) mutiert werden oder sie können so mutiert werden, dass ihre entsprechende biologische Aktivität beseitigt wird, ohne ihre Orientierungswirkung auf das Polyprotein und die NS5A/5B-Spaltungsstelle zu beeinträchtigen. Schließlich muss die erfindungsgemäß notwendige NS5A/5B-Spaltungsstelle funktionell sein, d. h. sie muss von der NS3-Protease erkannt und durch diese gespalten werden. Derartige funktionelle Zielspaltungsstellen umfassen Derivate, Varianten oder Fragmente davon, sofern sie durch die NS3-Protease gespalten werden können. Eine bevorzugte NS5A/5B-Spaltungsstelle umfasst die ersten sechs Aminosäuren der NS5B-Domäne.

[0104] Gemäß einem alternativen Aspekt wird die Nucleotidsequenz bereitgestellt, die für das NS3-Polyprotein von voller Länge kodiert. Alternativ wird eine partielle Nucleotidsequenz bereitgestellt, die für ein partielles Polyprotein kodiert, das Varianten der erforderlichen Domänen gemäß der vorstehenden Definition umfasst.

[0105] Alternativ umfasst das chimäre Molekül eine Nucleotidsequenz, die zur Expression von Derivaten, Varianten oder Fragmenten des Vorläufer-Polyproteins befähigt ist, das sämtliche funktionellen Spaltungsstellen umfasst: NS3/4A; 4A/4B; 4B/5A; und 5A/5B. Alternativ handelt es sich zumindest bei NS5A/5B um eine funktionelle Spaltungsstelle, während die anderen Spaltungsstellen so modifiziert sein können, dass sie nicht-funktionell sind.

[0106] Das nicht-zytopathische Promotorsystem umfasst den CMV-Promotor, das frühe SV40-Promotorsystem oder das RSV(Rous Sarcoma-Virus)-LTR-Promotorsystem.

[0107] Das Reportersystem umfasst eine Transaktivator-Domäne, die mit dem ersten rekombinanten Nucleinsäuremolekül verbunden ist, wobei der Transaktivator bei Abspaltung vom exprimierten Fusionsprotein zum Nucleus wandert, um wiederum die Expression eines Reportergens zu aktivieren, dessen Produkt als Mittel zur Bewertung der NS3-Protease-Aktivität gemessen werden kann. Die Fusion einer Transaktivator-Domäne ergibt ein Amplifikationsniveau zur Steigerung der Testempfindlichkeit. Gemäß einem speziellen Aspekt kann

die Aktivierung des Reportersystems durch den Transaktivator spezifisch gehemmt werden, als Maßnahme zur Sicherstellung, dass die Spaltung des Vorläufer-Polypeptids spezifisch ist (eingebaute negative Kontrolle). Ein derartiger spezieller Aspekt umfasst ein System, das aus dem Verfahren von M. Gossen und H. Bujard (1992) entwickelt worden ist. Dieses Verfahren betrifft die Bereitstellung und potentielle Verwendung eines durch Tetracyclin kontrollierten Transaktivators in einer Säugetierzelllinie. Bei diesem Verfahren wird der tet-Repressor mit der Aktivierungsdomäne des Herpes-simplex-Virus-Proteins 16 (VP16) fusioniert, wodurch ein von Tetracyclin abhängiger Transaktivator (tTA) entsteht. Dieser tTA initiiert die Transkription/Expression eines Reporters unter der Kontrolle eines kombinierten tet-Operon/Viruspromotors. Das Produkt des Reporters stellt einen Hinweis für die Genaktivierung und Proteinexpression dar. Der Transaktivator kann sich an einer beliebigen Stelle am chimären Molekül oder Fusionsprotein befinden, so lange er sich strangabwärts von den Zielspaltungsstellen befindet und daher bei der Spaltung freigesetzt wird. Insbesondere befindet sich der Transaktivator am 3'-Ende des rekombinanten Moleküls. Zu nicht-beschränkenden Beispielen des Transaktivators gehören der Tetracyclin-Transaktivator (tTA), NFκB, HIV-1-tat und GAL-4. Insbesondere handelt es sich beim Transaktivator um tTA. Zu nicht-beschränkenden Beispielen für das Reportermolekül gehören sezernierte alkalische Phosphatase, β-Galactosidase, Luciferase, Chloramphenicol-aminotransferase und grün fluoreszierendes Protein. Vorzugsweise handelt es sich beim Reportermolekül um SEAP oder Luciferase. Insbesondere handelt es sich beim Reportermolekül um SEAP.

[0108] Gemäß einem bevorzugten Aspekt handelt es sich beim Reportersystem um eine Kombination aus tTA und Luciferase (US-5 464 758); oder um eine Kombination aus tTA und SEAP. Ganz besonders handelt es sich beim Reportersystem um eine Kombination aus tTA und SEAP.

[0109] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass verschiedene Permutationen eines Transaktivators und eines Reportersystems unter Anwendung von aus dem Stand der Technik bekannten Methoden kombiniert werden können, wobei alle diese Permutationen unter den Umfang der Erfindung fallen.

[0110] Da für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verschiedene Reportermoleküle geeignet sind, korrespondiert demzufolge der Nachweis des Reporterprodukts mit der Anwendung bekannter Verfahren. Beispielsweise kann Luciferase durch eine Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung von Coenzym A als Luciferase-Substrat (Luciferase-Testsystem der Fa. Promega, WI, USA) gemessen werden und SEAP kann durch eine Chemilumineszenzreaktion unter Beteiligung eines CSPD-Substrats und eines Enhancers gemessen werden (Tropix, Inc., MA, USA).

Rekombinante DNA-Moleküle und Proteine

[0111] Die Erfindung stellt rekombinante DNA-Moleküle bereit, die bei diesem Test geeignet sind. Demzufolge wird ein Nucleinsäuremolekül gemäß der Definition in SEQ ID NO: 1 bereitgestellt.

[0112] Die Erfindung umfasst rekombinante Proteine, die aus den erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekülen hergestellt worden sind.

[0113] Gemäß einem speziellen Aspekt dieser Ausführungsform wird eine Aminosäuresequenz gemäß der Definition in SEQ ID NO: 2 bereitgestellt.

[0114] Bezüglich der vorstehend angegebenen Aminosäure- und Nucleotidsequenzen fallen sämtliche Varianten, Derivate und Fragmente davon, die funktionell mit den hier angegebenen Sequenzen gleichwertig sind, unter den Umfang der Erfindung.

Vektoren

[0115] Die Erfindung umfasst auch Vektoren, die beliebige dieser rekombinanten DNA-Moleküle umfassen. Gemäß einem speziellen Aspekt der vorliegenden Erfindung kann das Nucleinsäuremolekül von SEQ ID NO: 1 in ein Expressionsplasmid zur Transfektion in eine Wirtszelllinie inseriert werden. Gemäß einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung umfassen verschiedene Plasmide, Vektoren oder Viren, die für die Zwecke der Erfindung geeignet sind, Säugetierexpressionsplasmide, Vektoren oder Viren, die dazu befähigt sind, eine Säugetierwirtszelle in stabiler oder vorübergehender Weise zu transformieren. Diese Produkte sind bekannt und fallen unter den Umfang der Erfindung. Insbesondere werden die Plasmide aus folgender Gruppe ausgewählt: das Plasmid auf der Basis des pUHD15-1-CMV-Promotors, der das tTA-Gen beinhaltet, und das pUHC13-3-tTA-steuerbare Luciferase- oder SEAP-Reporterplasmid. Gemäß einem besonders bevorzugten Aspekt dieser vierten Ausführungsform wird die Nucleinsäure von SEQ ID NO: 1 in das

pUHD15-1-Plasmid inseriert.

Transfektion

[0116] Die Transfektion der vorerwähnten Vektoren in Wirtszellen kann gleichzeitig (Kotransfektion) oder sequentiell erfolgen. Als eine Alternative kann zuerst die Transfektion des Reportersystems durchgeführt werden, um stabile Transfektanten zu erhalten, die dann später für eine zweite Transfektion des die HCV-Domäne enthaltenden Vektors verwendet werden, um für die vorliegende Erfindung geeignete doppelte Transfektanten (vorübergehend oder stabil) zu erhalten.

Wirtszellen

[0117] Die vorliegende Erfindung umfasst eukaryontische Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transfiziert sind. Daher wird gemäß einem speziellen Aspekt der Erfindung eine Wirtszelle bereitgestellt, die mit einem Expressionsplasmid transfiziert ist, das das chimäre Molekül gemäß der vorstehenden Definition umfasst. Insbesondere wird eine Säugetierzelllinie bereitgestellt, die mit dem Nucleinsäuremolekül von SEQ ID NO: 1 transfiziert ist. Gemäß einem bevorzugten Aspekt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Säugetierzelle, die in stabiler oder vorübergehender Weise transformiert ist. Zu nicht-beschränkenden Beispielen für Säugetierwirtszellen und -zelllinien gehören primäre Hepatozyten, Leberzelllinien, Fibroblasten, Lymphozyten, Nierenzellen und dergl. Insbesondere wird eine humane Zelllinie bereitgestellt, die vorübergehend mit dem chimären Molekül transfiziert ist. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich bei der humanen Zelllinie um eine Leber- oder Nierenzelllinie. Insbesondere kann die Wirtszelle aus folgender Gruppe ausgewählt werden: 293-, Huh-7-, WRL68-, HepG2- und Chang-Zellen.

Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren

[0118] Die Erfindung umfasst ein Verfahren zur Bewertung der NS3-Protease-Aktivität unter Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Moleküle und transfizierten Wirtszellen. Gemäß einem speziellen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Screening auf einen anti-HCV-Inhibitor unter Verwendung des vorstehend definierten Systems bereitgestellt. Gemäß einem speziellen Aspekt dieser sechsten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Bestimmung der HCV-NS3-Protease-Aktivität bereitgestellt, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) zunächst das Inkubieren von transfizierten Wirtszellen gemäß den vorstehenden Ausführungen unter Bedingungen, die bewirken, dass das HCV-NS3-5-Polypeptid und das Reportergenprodukt exprimiert werden; und
- b) das Messen der Menge des exprimierten Genprodukts. Gemäß einem weiteren speziellen Aspekt wird zum Identifizieren einer Verbindung als Inhibitor der HCV-NS3-Protease bereitgestellt, das die folgenden Schritte umfasst:
 - a, b) Testen der Aktivität der Protease in Abwesenheit der Verbindung gemäß dem vorstehend definierten Verfahren; und
 - c) das Bestimmen der Aktivität der Protease in Gegenwart der Verbindung durch das vorstehend beschriebene Verfahren, wobei die Verbindung in Wirtszellen nach der ersten Inkubation zugesetzt wird und die Wirtszellen ferner vor dem Testen der Aktivität inkubiert werden; und
 - d) das Vergleichen der Ergebnisse von Schritt c) mit den Ergebnissen von Schritt b).

[0119] Die Tests und die Verfahren der vorliegenden Erfindung werden unter Bedingungen des Wachstums von Säugetierzellen durchgeführt, die dem Fachmann geläufig sind, d. h. bei physiologischem pH-Wert und physiologischen Salzkonzentrationen unter Verwendung von Puffern, wie PBS, bei Temperaturen von 30 bis 42°C und in geeigneten Zellkulturmedien und unter Einhaltung einer ausreichenden Zeitspanne für das Zellwachstum.

[0120] Gemäß einem bevorzugten Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die transfizierten Wirtszellen für eine ausreichende Zeitspanne inkubiert, um die Expression und Prozessierung der kodierten Vorläufer-Aminosäuresequenz und die Expression des Reportermoleküls zu ermöglichen. Insbesondere werden die Zellen für mindestens 1 Stunde und ganz besonders für mindestens 18 Stunden inkubiert und die Menge des Reportergenprodukts wird mit einem Standard verglichen. Unter einem Standard sind dabei entweder Wirtszellen, die nicht transfiziert worden sind oder die mit einem Vehikel (einem Vektor oder Plasmid, die nicht das rekombinante Nucleinsäuremolekül, das für die Vorläufer-Aminosäuresequenz kodiert, tragen) transfiziert sind, zu verstehen.

[0121] Gemäß einem bevorzugten Aspekt werden die transfizierten Wirtszellen ferner in Gegenwart oder Abwesenheit von Testverbindungen etwa 30 Stunden, insbesondere etwa 20 Stunden und ganz besonders etwa 10 Stunden inkubiert und die Menge des Reportergerätsprodukts wird verglichen.

Beispiele

Materialien

[0122] Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von der Fa. Pharmacia Biotech Inc. (Quebec, Kanada) bezogen. Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit sicherer ID-Polymerase der Fa. ID Labs (ON, Kanada) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Thermostabile alkalische Phosphatase wurde von der Fa. Gibco-BRL (MD, USA) bezogen. Ligationsreaktionen wurden unter Verwendung von T4-DNA-Ligase der Fa. Pharmacia Biotech Inc. (Quebec, Kanada) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die HCV-tTA-Chimären wurden unter Verwendung des Vektors pUHD15-1 konstruiert, der für das tTA-Gen kodiert, das durch den CMV-Promotor exprimiert wird (Display Systems Biotechnology, Inc., CA, USA), wobei die für HCV-Proteine kodierende Nucleotidsequenz unter Verwendung der Restriktionsstellen für Xba 1 inseriert werden. Das Luciferase-Reporterplasmid pUHC13-3 wurde ebenfalls von der Fa. Display Systems Biotechnology bezogen. Das Plasmid pCR3.1 wurde von der Fa. Invitrogen bezogen und das rekombinante Vaccinia-Virus, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert, wurde von Bernard Moss (NIH, MD, USA) erhalten. Die virale HCV1b-cDNA wurde durch RT-PCR einer humanen Serumprobe, die mit dem Virus infiziert war, unter Verwendung der von der HCV-1b-Sequenz von HCV-J4/83 (Genebank Hinterlegungsnummer D13558) abgeleiteten Primer erzeugt und die für die Amplifikation des 3'-Endes verwendeten Primer waren von dem Produkt mit der Genebank-Hinterlegungsnummer D36922 abgeleitet. Diese HCV-cDNA wurde sequenziert (partielle Sequenz in SEQ ID NO: 1) und diente als Matrize bei den Amplifikationsreaktionen der spezifischen HCV-Segmente, die bei der Konstruktion der in den [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2I](#) dargestellten rekombinanten Moleküle verwendet wurden. Übliche Verfahren wurden für sämtliche Vorgänge der Amplifikationsreaktionen, des Restriktionsenzymverbaus, der positionsgerechten Oligonucleotid-Mutagenese, der Klonierung, der Isolierung von Plasmid-DNA, der Zellkultur, der Transfektionen und der Western-Blotting-Analysen angewandt (Sambrook et al., 1989). Amplifikationsprodukte, die mit dem vorstehend beschriebenen Primerpaaren erzeugt worden waren, wurden mit den Restriktionsenzymen Nhe 1 und Xba 1 verdaut und in das Xba 1-Restriktionsplasmid pUHD15-1, das in E. coli transformiert war, kloniert. Die Transformanten wurden durch Restriktionsenzymanalyse einem Screening auf die Direktionalität unterzogen. Die ausgewählten, im Raster befindlichen HCV-tTA-Chimären sind in den [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2I](#) dargestellt. Jede dieser HCV-tTA-Chimären wurde zusätzlich in das Plasmid pCR3.1 durch TA-Klonierung (Invitrogen, CA, USA) subkloniert, wodurch man die HCV-tTA-Chimären unter die Kontrolle eines T7-Promotors stellte.

Beispiel 1: RT-PCR von HCV-1b und Sequenzierung des Amplifikationsprodukts

[0123] Eine Humanserumprobe, die HCV-1b-RNA aufwies, wurde unter Verwendung der sense- und antisense-Primer, die die HCV-1b-cDNA-Sequenz überspannen (HCV J4/83; Hinterlegungsnummer D13558), revers transkribiert und amplifiziert. Die 3'-Endsequenz wurde unter Verwendung der von Kolykhalov et al. (1996) beschriebenen, von HCV-abgeleiteten Primer (Hinterlegungsnummer D63922) amplifiziert. RT-PCR-Reaktionen erzeugten 4 überlappende Fragmente, die das gesamte HCV-1b überspannten. Die Fragmente wurden durch Verdau an einzigen Restriktionsenzymstellen zusammengesetzt und zur Bildung von HCV-cDNA von voller Länge ligiert. Die erhaltene cDNA wurde vollständig sequenziert und als Matrize bei sämtlichen Amplifikationsreaktionen verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden bei der Konstruktion der in dieser Anmeldung beschriebenen Chimären verwendet. Die sequenzierte Polyproteinregion, die mit tTA fusioniert ist, ist in SEQ ID NO: 1 dargestellt und die translatierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO: 2 dargestellt.

Beispiel 2: Amplifikation der bei der Konstruktion der Chimären verwendeten HCV-Fragmente

[0124] Der Vowärtprimer GGCGCTAGCGCGCCCATCACGGCCTAC (SEQ ID NO: 3), der komplementär zum 5'-Ende des NS3-Gens ist und eine Nhe 1-Stelle enthält, wurde bei sämtlichen Amplifikationsreaktionen verwendet. Alle hier verwendeten, zum 3'-Ende komplementären Primer enthalten eine Xba 1-Stelle. Der reverse Primer GGCTCTAGAGTAAGGGAGGTGTGAGGC (SEQ ID NO: 4) wurde zur Amplifikation der Sequenzen für die Chimären A und B verwendet. Er enthält die NS4B-P1'- bis P6'-Spaltungsstelle. Der reverse Primer GGCTCTAGAGTAAGGGAGGTGTGAGGGGCGCTCTTCC (SEQ ID NO: 5) wurde zur Amplifikation der HCV-Sequenz für die Chimäre C verwendet und entspricht der NS4B-P1'- bis P6'-Spaltungsstelle, wobei Substitutionen in den NS4A/NS4B-P1-P1'-Resten eingeführt sind.

[0125] Die beiden überlappenden reversen Primer GCAGCAGACGACGTCCTCGAATTCCCGGTAG AG GAC (SEQ ID NO: 6) und GGCTCTAGACCATGTGTAGGACATCGAGCAGCAGACGACGTCCTC (SEQ ID NO: 7) wurden zur Amplifikation der HCV-Sequenzen für die Chimären D und E verwendet, wobei die NS4A/NS4B-Spaltungsstelle der entsprechenden Klone A und B durch die NS5A/NS5B-Spaltungsstelle ersetzt ist.

[0126] Zwei überlappende reverse Primer GCAGCAGACGACGTCCTCGAATTCCCGGTAGAGGAC (SEQ ID NO: 6) und GGCTCTAGACCATGTGTAGGACATAGGCCTGCAGACGACGTCCTC (SEQ ID NO: 8) wurden zur Amplifikation der HCV-Sequenz für die Chimäre F verwendet. Sie entsprechen der NS5B-P1'- bis P6'-Spaltungsstelle, wobei Substitutionen in die NS5A/NS5B-P1-P1'-Reste eingeführt sind.

[0127] Die HCV-Sequenz für die Chimäre G wurde durch Amplifikation der HCV-cDNA von voller Länge mit den Primern von SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 7 erzeugt. Dies ergab eine Sequenz, die das HCV-NS3- bis einschließlich NS5B-P6'-Codon überspannte.

[0128] Gleichermaßen wurde die HCV-Sequenz für die Chimäre I durch Amplifikation der HCV-cDNA-Matrize von voller Länge mit den Primern von SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 8 erzeugt. Dadurch entstand eine Sequenz, die das HCV-NS3- bis einschließlich NS5B-P6'-Codon überspannte und eine P1-P1'-Spaltungsstellen-substitution enthielt.

[0129] Die Klone B, E und H wurden unter Verwendung einer HCV-cDNA-Matrize amplifiziert, die durch positionsgerichtete Mutagenese mit dem Oligonucleotid CCCCCGGGTGCACACAGCTGCCCGGAAGATGCCCA-CAACGGCCCCGAAGG GCAGAGCAGTGGGCCACCCGCAGAGCC (SEQ ID NO: 9) modifiziert war, wobei eine Mutation von Serin zu Alanin am Rest 1165 eingeführt war, wodurch ein mutantes NS3-aktives Zentrum gebildet wurde.

[0130] Die nicht-strukturellen Regionen des HCV-Polypeptids, die in den Konstrukten A bis I enthalten sind, werden durch NS3-Protease-Spaltung prozessiert, wobei die Spezifität durch die Aminosäuresequenz, die die Verbindungsstellen der einzelnen Proteine überspannt, bestimmt wird. Diese Bevorzugung von Spaltungsstellen wurde vorher in vitro mit Peptidsubstraten und gereinigter NS3-Protease reproduziert (Übersichtsartikel von Kwong et al., 1998).

[0131] Gemäß der vorliegenden Anmeldung wird die in vivo-Spaltung geprüft. Die Expression des Polypeptids in einer Vielzahl von heterologen Expressionssystemen und das Auftreten von reifen HCV-Proteinen wird durch eine indirekte Prüfung der prozessierten Produkte durch Western-Blot-Analysen überwacht. In dem Bemühen, einen optimalen reporterbasierten Test auf NS3-Protease-Aktivität mit hohem Durchsatz bereitzustellen, wurden verschiedene Konstrukte von HCV-Polypeptidsegmenten in Fusion mit einem Aktivator/Reporter gemäß Darstellung in [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2I](#) bewertet.

[0132] Drei verschiedene Familien von HCV-tTA-Fusionen wurden konstruiert und der Wirkungsgrad einer in vivo-Spaltung wurde geprüft. Die Ergebnisse belegen, dass die Wirksamkeit der NS3-Spaltung nicht nur von der Sequenz, die die Spaltungsstelle überspannt, festgelegt wird, sondern auch durch den Positionszusammenhang der Stelle, bezogen auf übrige Bereiche oder Domänen im HCV-Polypeptid.

[0133] Die drei Familien von HCV-tTA-Fusionen, die zur Demonstration dieses Befunds verwendet werden, sind: die Klone A, B und C, die NS3 bis NS4A überspannen, weisen den tTA-Aktivator in Fusion mit der 6. Aminosäure von NS4B auf, so dass eine Spaltung des tTA die Prozessierung des NS4B-Proteins nachahmt; die Klone D, E und F sind ähnlich wie (i), mit der Ausnahme, dass das Segment mit 12 Aminosäuren, das die NS4A/NS4B-Verbindungsstelle überspannt (DEMEEC ↓ ASHLPY), zu der Sequenz, die die NS5A/NS5B-Verbindungsstelle überspannt (EDVVCC ↓ SMSYTW), abgeändert wurde. Diese Variante bringt den tTA in Positionsverbindung mit NS4B, enthält aber eine wirksamere Spaltungsstelle (NS5A/NS5B); und die Klone G, H und I umfassen die nicht-strukturelle HCV-Region, die am NS3-Aminoterminus beginnt und bei der 6. Aminosäure von NS5B endet, in Fusion mit dem tTA, so dass eine Spaltung des tTA die Prozessierung des NS5B-Proteins in seinem Positionszusammenhang nachahmt.

[0134] Die Varianten (Klone B, E und H) enthalten eine Mutation des aktiven NS3-Protease-Zentrums (Serin 1165 in Alanin, wobei sich der Aminosäurerest in der 1165. Position vom Start des HCV-Polypeptids aus befindet). Diese Varianten werden als Kontrollen zum Nachweis dafür verwendet, dass die tTA-Spaltung von einer aktiven NS3-Protease abhängig ist.

[0135] Die Varianten (Klone C, F, I) enthalten die P1-P1'-Spaltungsstelle, die zu einem R-P-Diaminosäuremotiv mutiert ist. Diese dienen als Kontrollen zum Nachweis dafür, dass die tTA-Prozessierung ausschließlich von einer funktionellen NS3-Spaltungssequenzstelle an der manipulierten Verbindungsstelle mit dem tTA-Aktivator abhängt.

Beispiel 3: Sichtbarmachung der HCV-tTA-Fusionen in transfizierten/T7-Vaccinia-Virus (vvT7-3)-infizierten Zellen

[0136] Da die Expression der HCV-NS3-Protease mit dem CMV-Promotor für eine Sichtbarmachung durch Western-Analyse zu gering war, verifizierten wir die Aktivität der Proteasen in jeder dieser Chimären durch die Expression der Fusionsproteine in 293-Zellen unter Verwendung des Vaccinia-Virus T7 (vvT7-3)-Expressions-systems (O. Elroy-Stein und B. Moss, 1998).

[0137] Bis zu einer Konfluenz von 60% in 6-Muldenplatten in DMEM-10% FBS gezüchtete Zellen wurden mit vvT7-3 (moi-Wert 10–15) infiziert und unter Anwendung des Calciumphosphatverfahrens mit 5 µg pCR3.1-HCV-tTA-Konstrukten A, B und C transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und Proteine aus dem Lysat von vollständigen Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Die Membran wurde mit HCV-spezifischen polyklonalen Antikörpern geprüft.

[0138] Das Plasmid pCR3.1, das die Chimären A, B, C, D, E, F, G, H oder I enthielt, wurde in die vvT7-infizierten 293-Zellen transfiziert und die HCV-Protein-Prozessierung wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines HCV-spezifischen polyklonalen Antiserums geprüft. Von der Chimäre A wird gezeigt, dass sie mit reifem NS3- und NS4A-Protein reaktive Banden erzeugt ([Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#), Bahnen A). Da das NS4A-Protein nur 54 Aminosäuren umfasst, ist es erforderlich, ein Gel unter Bedingungen laufen zu lassen, die den Nachweis eines Moleküls mit geringerem Molekulargewicht ermöglichen ([Fig. 3B](#), unteres Feld). Die Chimäre B, die für die inaktive S1165A-Mutation von NS3 kodiert, prozessiert den Polyprotein-Vorläufer nicht, wie durch das Fehlen von NS3- und NS4A-reaktiven Banden gezeigt wird ([Fig. 3A](#) bzw. [Fig. 3B](#), Bahnen B). Die Chimäre C mit einer NS4A/NS4B-Spaltungsstellenmutation erzeugt eine reaktive Bande, die reifem NS3 entspricht ([Fig. 3A](#), Bahn C), jedoch keine reife NS4A-reaktive Bande. Das Fehlen einer Spaltung an der NS4A-tTA-Spaltungsstelle ([Fig. 3B](#), Bahn C) wird durch den Nachweis der NS4A-tTA-Fusion beim anti-NS4A-Western-Blot bestätigt.

[0139] In den Chimären D, E und F war die NS4A/4B-Spaltungsstelle durch die NS5A/5B-Spaltungsstelle ersetzt. Eine Expression der transfizierten Wirtszellen mit einem Gehalt an der Chimäre D erzeugt eine reaktive Bande, die reifem NS3-Protein entspricht ([Fig. 4](#), Bahn D). Die Chimäre E, die die S1165A-Mutation trägt, weist keine offensichtlich NS3-reaktive Bande auf ([Fig. 4](#), Bahn E), was zeigt, dass der Polyprotein-Vorläufer nicht prozessiert worden ist. Die Chimäre F mit einer aktiven NS3-Protease erzeugt ein reifes NS3, weist aber eine Spaltungsstellenmutation auf, die vermutlich die Spaltung an der NS4A-tTA-Spaltungsstelle blockiert ([Fig. 4](#), Bahn F).

[0140] Das verfügbare anti-NS4A-Antiserum erkennt ein Epitop am C-Terminus des NS4A-Proteins. Bei den Chimären D, E und F war dieses Segment zur Bereitstellung der NS5A/NS5B-Spaltungsstelle modifiziert worden. Daher konnten Western-Blot-Analysen unter Verwendung von anti-NS4A-Antiserum als Sonde für diese Chimären nicht das modifizierte NS4A nachweisen. Die Chimären G, H und I enthalten den Großteil des HCV-Polyproteins. Die Expression der Transfektanten mit einem Gehalt an der Chimäre G führt zu einer Prozessierung des Vorläufer-Polyproteins zu den erwarteten reifen Proteinen NS3, NS4A und NS5A. Diese Produkte wurden durch Western-Analysen unter Prüfung mit den entsprechenden Antiseren sichtbar gemacht ([Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#), Bahnen G). Die Chimäre H, die die S1165A-Mutation unter Inaktivierung von NS3 aufweist, prozessiert den Polyprotein-Vorläufer nicht und bildet keines der reifen Proteine ([Fig. 5](#), Bahn H). Die Chimäre I, die eine NS5A/5B-Spaltungsstellenmutation trägt, erzeugt reife NS3- und NS4A-Proteine ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#), Bahnen I) und spaltet nicht an der NS5A/tTA-Spaltungsstelle ([Fig. 5C](#), Bahn I).

Beispiel 4: Luciferase-Test

[0141] Die drei Familien (Klone A, D und G) von HCV-tTA-Chimären und ihre Varianten mit Mutation des aktiven Zentrums und der Spaltungsstellen wurden mit dem pUHC13-3-Reporter in 293-Zellen kotransfiziert, um das Ausmaß der NS3-abhängigen Luciferase-Expression zu bestimmen ([Fig. 6](#)). Zellen in 35 mm-Mulden wurden mit den einzelnen Konstrukten gemäß den [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2I](#) und dem pUHC13-3-Reporterplasmid unter Anwendung des Calciumphosphatverfahrens kotransfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion

tion geerntet und 2-mal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Die geernteten Zellen wurden in 200 µl Lysispuffer (25 mM Tris-Phosphat, pH-Wert 7,8, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 10% Glycerin und 1% Triton X-100) lysiert und 5 Minuten bei 12 000 g zentrifugiert. Ein Aliquotanteil von 10 ml des Überstands wurde mit 50 µl Luciferase-Testreagenz (Promega) in einer Platte mit 96 Mulden vermischt und die erzeugte Lichtmenge wurde unter Verwendung eines Digene-Luminometers oder eines Packard-Topcount-Szintillationszählers gemessen.

[0142] Die Chimäre A erzeugte ~1 200 000 cps Luciferase-Aktivität. Dieses Signal ist 2- bis 3-fach höher als die von der Chimäre B (inaktive NS3-Protease) und der Chimäre C (Spaltungsstellenmutation) erzeugte Luciferase (500 000 cps).

[0143] Die HCV-tTA-Fusionsfamilie, die durch die Chimäre D repräsentiert wird, erzeugte ~1 300 000 cps Luciferase-Aktivität in 293-Zellen. Die NS3-Abhängigkeit dieses Signals wird durch die signifikant geringere Menge an Luciferase (100 000–300 000 cps), die durch die Chimäre E (inaktive NS3-Protease) und die Chimäre F (Spaltungsstellenmutation) erzeugt wird. Die längste HCV-tTA-Fusion, die durch die Chimäre G repräsentiert wird, erzeugte das höchste Luciferase-Signal (~2 200 000 cps). Die NS3-Abhängigkeit dieses Signals wird durch die geringe Menge an Luciferase (100 000–300 000 cps), die durch die Chimäre H (inaktive NS3-Protease) und die Chimäre I (Spaltungsstellenmutation) erzeugt wird, bestätigt.

[0144] Das in transfizierten 293-Zellen erzeugte NS3-abhängige Luciferase-Signal kann als ein Verhältnis des Signals, das aus Wildtyp/Mutante des aktiven Zentrums erhalten wird, angegeben werden ([Fig. 7](#)). Das Verhältnis von A/B, D/E und G/H ergibt eine 3-, 15,4- bzw. 28,1-fache Aktivierung von Luciferase.

[0145] Diese Ergebnisse zeigen, dass das Konstrukt G, das sämtliche Domänen des HCV-NS3-5-Polypeptids aufweist (einschließlich der Region aus NS3 bis zur 6. Aminosäure von NS5B) und die NS5A/NS5B-Spaltungsstelle, die ihre "natürliche" Umgebung vorausgeht, enthält, die höchste Aktivierung von Luciferase bewirkte.

Beispiel 5: Interne Tetracyclin-Kontrollvalidierung

[0146] Aus den HCV-tTA-Chimären exprimiertes reifes tTA funktioniert in einer Tetracyclin-kontrollierbaren Art und Weise. Beispielsweise belegt [Fig. 8](#), dass Lysate aus Zellen, die mit der aus dem pUD15-1- und dem pUHC13-3-Reporter exprimierten Chimären G transfiziert wurden, eine Tetracyclin-empfindliche Luciferase-Aktivität zeigen. Zellen, die die Chimäre G in Abwesenheit von Tetracyclin exprimieren, bilden mehr als 2 000 000 cps Luciferase-Aktivität. In Gegenwart von Tetracyclin wird die Aktivität des reifen tTA-Aktivators gehemmt, was zu einer Luciferase-Aktivität von 40 000 cps führt. In Abwesenheit von Tetracyclin liegt die Menge der von den G-Chimären-Transfektanten erzeugten Luciferase in der gleichen Größenordnung wie die Menge der aus Kontroll-pUHD15-1 erzeugten Luciferase. Außerdem belegt die Kotransfektion mit der Chimären H und pUHC13-3, dass die tTA-Aktivierung von Luciferase eine aktive NS3-Protease erfordert. Chimäre H-Transfektanten, die für eine inaktive Protease kodieren, können keinen reifen tTA erzeugen, wobei sich eine Luciferase-Aktivität von nur 90 000 cps ergibt.

Beispiel 6: Luciferase-Test in transfizierten Leberzellen (WRL68)

[0147] Da HCV in Leberzellen auftritt, war es wichtig zu verifizieren, dass dieser Test gleichermaßen in Leberzellen funktioniert. Daher wurde die Luciferase-Aktivierung in der Leberzelllinie WRL68 für jede der Chimären geprüft ([Fig. 9](#)). Es wurde festgestellt, dass die Aktivierung in dieser Zelllinie von NS3 abhängig ist und dass der Wirkungsgrad der Aktivierung der Luciferase-Expression in unterschiedlichen Chimären ([Fig. 10](#)) analog zum Wirkungsgrad der Chimären in 293-Zellen ist.

Beispiel 7: Optimierung der Luciferase-Aktivierung relativ zur Menge an DNA

[0148] Ein kritischer Aspekt von Kotransfektionsexperimenten ist die Menge der in Zellen eingeführten Plasmid-DNA. Dieses Zweikomponentensystem erforderte eine Optimierung der relativen Mengen des HCV-tTA-Plasmids und des Luciferase-Reporterplasmids. Ein Bereich von 0,1 bis 1 µg an HCV-tTA-Plasmid G wurde in 293-Zellen (50% Konfluenz in Platten mit 6 Mulden) mit 0,2 µg des pUHC13-3-Luciferase-Reporterplasmids kotransfiziert ([Fig. 11](#)). Eine optimale Luciferase-Aktivierung in diesen Transfektanten wurde mit 0,4 bis 0,7 µg HCV-tTA-Plasmid erreicht. Gleichermaßen war eine optimale Luciferase-Aktivierung mit 0,4 bis 0,7 µg der HCV-tTA-Chimären G in WRL68-Zellen ersichtlich ([Fig. 12](#)).

Beispiel 8: NS3-traps-Spaltungsaktivität

[0149] Aus dem Polyprotein von voller Länge erzeugte NS3-Protease kann die NS5A/5B-Verbindungsstelle in trans-Stellung spalten (Tomei et al., 1993; Gartenschlager et al., 1994; Lin et al., 1994). Die Eignung von HCV-tTA-Chimären wurde dazu herangezogen, die NS3-trans-Spaltungsaktivität zu belegen. [Fig. 13](#) zeigt, dass die Chimäre G die Expression von Luciferase unter Erzeugung von ~2 000 000 cps aktivieren kann. Die Chimären H und I, die eine inaktive Protease bzw. eine Spaltungsstellenmutation an der tTA-Verbindungsstelle enthalten, aktivieren Luciferase in signifikant geringerem Maße (vergl. [Fig. 5](#)). Eine 3-fache Transfektion der Chimären H und I und des pUHC13-3-Reporters in 293-Zellen stellt die Luciferase-Aktivität wieder her (~2 000 000 cps), was zeigt, dass die aus der Chimären I exprimierte aktive NS3-Protease die "native" (unmodifizierte) NS5A/5B-Verbindungsstelle, die in der Chimären H kodiert wird, spalten kann. Eine ähnliche 3-fache Transfektion der Leberzelllinie WRL68 stellte partiell die Luciferase-Aktivität wieder her ([Fig. 14](#)).

Beispiel 9: SEAP-Test (System mit hohem Durchsatz)

[0150] In CHO-SFMII-Medium (GIBCO BRL), das mit 10% fötalem Kälberserum ergänzt war, gezüchtete Leberzellen Huh-7 wurden mit der Chimären G und einem pUHC13-3-SEAP-Reporterplasmid (modifiziertes pUHC13-3) unter Verwendung von FuGene6 (Boehringer Mannheim, Deutschland) kotransfiziert. Das pUHC13-3-Reporterplasmid wurde unter Ersetzen der Luciferase durch SEAP modifiziert. Nach einer 5-stündigen Inkubation wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und in einer Menge von 80 000 Zellen pro Mulde in einer Kulturplatte mit 96 Mulden, die unterschiedliche Konzentrationen der Verbindung enthielt, ausgestrichen und 24 Stunden inkubiert. Die Menge an SEAP, die in das Medium sezerniert wurde, wurde mit dem Phospha-Light-Substrat (Tropix Inc., MA, USA) gemessen.

Beispiel 10: Validierung mit einem spezifischen NS3-Inhibitor

[0151] Der hier beschriebene Test wurde mit einer Verbindung validiert, von der gezeigt worden war, dass sie NS3-Protease mit einem IC_{50} -Wert von 40 nM in dem in WO-00/09543 beschriebenen enzymatischen Test hemmte. [Fig. 15](#) zeigt, dass die Menge der gemessenen sezernierten SEAP in dosisabhängiger Weise verringert wird. Dieses Ergebnis zeigt ferner, dass diese Verbindung zellpermeabel ist und seine Hemmwirkung in einem zellbasierten Test behält. Der EC_{50} -Wert dieser Verbindung beträgt bei Bestimmung im erfindungsgemäßen Test 75 nM. Eine Erhöhung der Konzentration der Verbindung führte in dosisabhängiger Weise zu einer Verringerung der Menge der sezernierten SEAP, entsprechend einer verstärkten Hemmung der Spaltung an einer oder mehreren Stellen durch NS3-Protease-Aktivität. Außerdem hemmte im Kontrollexperiment ([Fig. 15](#), offene Quadrate) die Verbindung nicht in signifikanter Weise die Kontroll-tTA-Aktivität in Konzentrationen unter 1 μ M. Diese Verbindung bestätigt die Eignung und die Spezifität des erfindungsgemäßen Tests.

[0152] Ein überraschendes und vorteilhaftes Merkmal der Erfindung besteht darin, dass das chimäre HCV-Molekül, das sämtliche Spaltungsstellen des nativen NS3-Polyproteins bis etwa zur 6. Aminosäure von NS5B umfasst, das wirksamste Konstrukt zur Bewertung der HCV-NS3-Protease-Aktivität in einer Säugetierzelle darstellt. Diese Chimäre ahmt die Prozessierung der nicht-strukturellen Region von HCV von voller Länge nach, die den heterodimeren NS3-NS4A-Protease-Komplex bildet, wodurch die Aktivität der NS3-Protease verbessert wird. Die verbesserte Wirksamkeit dieses rekombinanten Moleküls schuf die Basis für ein neues System zum Testen der NS3-Protease-Aktivität, das spezifischer und empfindlicher als andere bekannte Tests ist. Ferner eignet sich dieses verbesserte neue System zur Bereitstellung eines Testsystems zum Screening von Inhibitoren der Protease-Aktivität, das einer Maßstabvergrößerung zu einem Screeningsystem mit hohem Durchsatz zugänglich ist.

Diskussion

[0153] Wie aus den [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) ersichtlich ist, hat die Anmelderin repräsentative Konstrukte des Stands der Technik reproduziert (Konstrukte A und D) und versucht, dieses System in einem Test mit hohem Durchsatz zu verwenden, ohne dabei zu optimalen Ergebnissen zu gelangen. Das erhaltene Signal und das Signal/Rausch-Verhältnis waren nicht so optimal, dass eine Automatisierung des Tests möglich gewesen wäre.

[0154] Ein Weg zur Verbesserung der Empfindlichkeit des Tests besteht in der Bereitstellung eines Konstrukts, das im wesentlichen Umfang die authentische Konformation des reifen NS3-5-Polyproteins reproduziert und dabei die NS3-Protease-Aktivität im nativen Zusammenhang nachahmt. Überraschenderweise ergibt das erfindungsgemäße Konstrukt im Vergleich zu herkömmlichen Systemen eine Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses um den Faktor 2 bis 6.

[0155] Die Anmelderin hat daher ein neues und verbessertes zellbasiertes System und einen Test zur Messung der Protease-Aktivität in zuverlässiger und reproduzierbarer Weise entwickelt. Nach Durchführung der Experimente gemäß den [Fig. 7](#) und [Fig. 9](#) hat die Anmelderin überraschenderweise festgestellt, dass zusätzliche Spaltungsstellen am Protease-Substrat das erhaltene Signal verbessern. Dies ist insofern überraschend, als nur ein einziges Transaktivator-Molekül freigesetzt wird, unabhängig davon, ob das Substrat an einer, zwei oder drei Stellen gespalten wird. Die Tatsache, dass das Signal zunimmt, ist unerwartet und für dieses System günstig. Speziell zeigen die [Fig. 7](#) und [Fig. 9](#) die Zunahme des erhaltenen Signals bei Verwendung des Konstrukts A (1 Spaltungsstelle gemäß dem Stand der Technik) im Vergleich zum Konstrukt D (1 weitere Spaltungsstelle) und im Vergleich zum Konstrukt G (natives Polyprotein). Die Anmelderin konnte keine Vorhersage darüber treffen, dass das Konstrukt G eine Steigerung der Aktivität in ausreichend hoher und reproduzierbarer Weise ergeben würde, um einen Test mit hohem Durchsatz bereitzustellen.

[0156] Die [Fig. 8](#) und [Fig. 10](#) zeigen, dass in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie jede zusätzliche Spaltungsstelle ein 2- bis 6-fach stärkeres Signal liefert, ohne dass das Hintergrundsignal zunimmt, was zeigt, dass die Hinzufügung von weiteren Spaltungsstellen dem System eine erhöhte Aktivität verleiht, verglichen mit dem Zustand, der erwartet werden konnte. Dieser Befund konnte auf der Grundlage des Stands der Technik nicht vorhergesehen werden und wurde durch den Stand der Technik nicht nahegelegt.

[0157] Zusätzlich zur Steigerung der Aktivität scheint sich eine Erhöhung der Spezifität der sequentiellen Spaltungen durch die NS3-Protease zu ergeben. Eine kürzlich aufgetauchte Theorie, die auf in vitro-Strukturstudien der HCV-NS3-Protease beruht, besagt, dass die katalytische Tätigkeit von NS3-Protease durch spezifische Substrate stabilisiert wird, die zur Enzymaktivierung über einen induzierten Mechanismus beitragen (Barbato et al., EMBO J., Bd. 19 (2000), S. 1195–1206). Der beanspruchte Erfindungsgegenstand, dass ein zellbasierter in vivo-Test, bei dem mehrfache Substrate, wie sie im Zusammenhang mit einem Polyprotein präsentiert werden, einverleibt sind, zu einer NS3-Protease mit einer höheren spezifischen zellbasierten Aktivität führt, liefert eine biologische Stütze für diese Theorie.

[0158] Ferner ist der Expressionsgrad des Polyproteins mit nicht-zytopathischen Expressionssystemen, wie dem CMV-Promotor, so gering, dass man das exprimierte Protein nicht sichtbar machen kann (es sei denn, es wird das Vaccinia-Virus-Expressionssystem verwendet). Es ist daher um so überraschender, dass ein derartiger niedriger Expressionsgrad zu einem guten Nachweis von Luciferase oder SEAP führt.

Literaturverzeichnis:

- Ausubel et al., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York.
 Barbato et al., 2000. EMBO J., 19, 1195–1206
 Bartenschlager, R. et al., 1993, J. Virol., 67, 3835–3844.
 Bartenschlager, R. et al., 1994, J. Virol., 68, 8147–8157.
 Cho, Y. G. et al., 1997, J. Vir. Meth., 65, 201–207.
 Cho, Y. G. et al., 1998, J. Vir. Meth., 72, 109–115.
 Elroy-Stein, O. and Moss, B. 1998, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York.
 Griffiths and Page, 1994, Methods in Molec. Biol., 75, 427–440.
 Gossen, M. and Bujard, H., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 5547–5551.
 Grakoui, A. et al., 1993(a), J. Virol. 67, 1385–1395.
 Grakoui A, et al., 1993(b), Proc Natl Acad Sci USA, 90, 10583–7
 Hijikata, M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 5547–5551.
 Hijikata, M. et al., 1993, J. Virol. 67, 4665–4675.
 Hirowatari, Y. et al., 1995, Anal. Biochem., 225, 113–220.
 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, 1972, Biochemistry, 11, 1726–1732.
 Kim, D. W. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Comm., 215, 160–166.
 Kim et al., 1999, Arch. Virol., 144, 329–343.
 Kolykhalov et al., 1996, J. Virol., 70, 3363–3371,
 Kwong AD. et al., 1998, Antiviral Res., 40, 1–18.
 Lin, C. et al., 1994, J. Virol., 68, 8147–8157.
 Llinas-Brunet, M. et al., 1998, Bioorganic & Med. Chem. Letters, 8, 2719–2724.
 Lohmann et al., 1999, Science, 285, 110–113.
 Love, R. A. et. al., 1996. Cell, 87, 331–342.
 Luckow, V. A., 1993, Curr. Op. Biotech., 4, 564–572.
 Merrington et al., 1997, Molec. Biotech., 8(3), 283–297.
 Overton, H. et al., 1995, J. Gen. Virol., 76, 3009–3019

Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs.
 Song et al., 1996, Mol. Cells, 6, 183–189.
 Steinkuhler, C. et al., 1998, Biochemistry, 37, 8899–8905.
 Tomei, L. et al., 1993, J. Virol., 67, 4017–4026.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BOEHRINGER INGELHEIM (KANADA) LTD.

<120> Zellbasiertes Surrogatsystem und Verfahren zum Testen der Aktivität
 von Hepatitis C-Virus-NS3-Protease

<130> Sequenz

<140>

<141>

<150> 60/132,360

<151> 1999-05-04

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5211

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: partielle cDNA-Sequenz von
 HCV (NS3-5B') in Fusion mit tTA-Transaktivator

<400> 1

```

atgtctagcg cgcccatcac ggcctactcc caacagacac ggggcctact tgggtgcatc 60
atcaccagcc tcacaggccg ggacaagaac cagggtcgagg gggagggttca agtgggtttcc 120
accgcaacac aatcttttctt ggcgacctgc gtcaacggcg tgtgttggac tgtcttccat 180
ggcgccgggt caaagacctt ggccggcccc aaaggccccga tcaccagat gtacactaat 240
gtggaccagg acctcgtcgg ctggcaggcg cccctgggg cgcgctccat gacaccatgc 300
acctgcggca gctcggacct ctatttggtc acgagacatg ccgacgtcat tccggtgcgc 360
cggcgggggcg acagtagggg gagcctgctc tccccaggc ctgtctccta cttgaagggc 420
tcttcgggtg gcccactgct ctgcccttcg gggcacgctg tgggcatctt cggggtgct 480
gtgtgcaccc ggggggttgc aaaagcgggtg gacttcatac ctgttgagtc tatggaaact 540
actatgcggt ctccggtctt cacagacaac tcatacccc cagccgtacc gcagacattc 600
caagtggccc atctacacgc tcctactggc agcggcaaga gcactaaagt gccggctgct 660
tatgcagccc aagggtacaa ggtacttgtc ttgaacctgt ccgttgccgc caccttaggt 720
tttggggcgt atatgtcaaa ggcacgtggc accgacccta acatcagaac tggggtaagg 780
accatcacca caggcgcccc catcacgtac tccacctatg gcaagttcct tgccgacggg 840
ggttgctctg ggggcgctta tgacatcata atgtgtgacg agtgccactc aactgactcg 900

```

actaccatct tgggcatcgg cacagtcctg gaccaagcgg agacggctgg agcgcggtt 960
 gtcgtgctcg ccaccgctac gcctccggga tcggtcaccg tgccacaccc caatatcgag 1020
 gaggtggccc tgtccaacac tggagagatc cccttctatg gcaaagccat ccccatcgag 1080
 gtcatacaagg ggggaaggca tctcattttc tgccattcca aaaagaagtg tgatgagctc 1140
 gccgcaaagc tgtcgggcct cggactcaac gccgtagcgt attaccgggg ccttgatgtg 1200
 tccgtcatac cgaccagcgg agacgtcgtt gttgtggcaa cagacgcctt aatgaccggc 1260
 tttaccggcg actttgattc agtgatcgac tgcaatacgt gtgttaccca gacagtcgat 1320
 ttcagcttgg accccacctt caccattgag acgacgaccg tgcctcaaga cgcggtgtcg 1380
 cgctcgcagc ggcggggtag gactggcagg ggtaggagag gcattctacag gtttgtgact 1440
 ccaggagaac ggccttcggg catgttcgat tcctcgggtc tatgtgagtg ctatgacgcg 1500
 ggctgtgctt ggtatgagct cacgcccgt gagaccacgg tcagattgag ggcttaccta 1560
 aacacaccag ggttgcccg tctgcaggac catctggagt tctgggaggg cgtcttcacg 1620
 ggcctcacc acatagatgc ccacttcttg tcccagacta agcaggcagg agacaacttc 1680
 ccctacctgg tagcgtacca agccacagtg tgcgctagag ctgaggcccc acctccatcg 1740
 tgggatcaaa tgtggaagtg tctcatacgg ctaaaaccta cgctgcacgg gccaacaccc 1800
 ctgctgtata ggctaggagc cgtccaaaat gagatcacc ctcacacacc cgtgaccaa 1860
 tacatcatga catgcatgtc ggccgacctg gaggtcgta ctagcacctg ggtgctagta 1920
 ggcggggtcc ttgcagcttt ggccgcatat tgcctgacaa caggcagtggt ggtcattgtg 1980
 ggtaggatca tcttatccgg gagggcggca gtgggtcccc acaggggaagt cctctaccgg 2040
 gagttcgatg aaatggaaga gtgcgcctca cacctccctt acatcgaaca gggaatgcag 2100
 cttgccgagc aattcaagca gaaggcgctc gggttgctgc agacagccac caagcaagcg 2160
 gaggtgctg ctcccgtggt ggagtccaag tggcgagccc tcgagacctt ctgggcgaag 2220
 cacatgtgga acttcatcag cgggatacag tacttagcag gcttgtccac tctgcctgga 2280
 aaccccgca tagcatcatt gatggcattt acagcctcta tcaccagccc gctcactacc 2340
 caaaataccc tcctgtttaa tatcttggga ggatgggtgg ctgcccact cgccgcccc 2400
 ggtgctgctt cggtttcgt gggcgccggc atcgctcgggtg cggtgttgg cagcataggc 2460
 cttgggaagg tgctcgtgga cattctggcg ggctatgggg caggggtggc tggcgactc 2520
 gtggctttta agatcatgag cggcgagggt ccctccaccg aggacctggt taatttactc 2580
 cctgccattc tttctcctgg cgccctggtt gtcggggctg tgtgcgcagc aatactgcgt 2640
 cggcacgtgg gcccggggga gggggctgtg cagtggatga accggctgat agcgttcgct 2700
 tcgcggggca accacgttc cccacgcac tatgtgcctg agagcgacgc cgcagcgct 2760

gttacccaga tctctccgg ccttaccatc actcagctgc tgaagaggct tcatcagtgg 2820
 atcaatgagg actgctccac gccatgctcc ggttcgtggc taagggatgt ttgggactgg 2880
 atatgcacgg tggttggtga tttcaagacc tggctccagt ccaagctcct accgcggtta 2940
 ccgggagtc ccttctctc atgccaacga ggggtataagg gagtctggcg gggggatgg 3000
 atcatgcaca ccacctgccc ctgtggagca caaatcaccg gacatgtcaa aaacggttcc 3060
 atgcggatcg tcgggcctag gacctgcagc aacacgtggc acggaacatt ccccatcaac 3120
 gcgtacacca cgggcccctg cacaccctcc cgggcgcga attacaccag ggcgctatgg 3180
 cgggtagctg ctgaggagta cgtggaggtc acgcggtgg gggatttcca ctacgtgacg 3240
 ggcatgacca ccgacaacgt aaagtgccca tgccagggtc cggccccga gttcttcacg 3300
 gaagttgatg gggtagcgtt gcacaggtag gctccggtgt gcagacctct cctacgggag 3360
 gaggtcgat tccaggctcg gctcaaccaa tacctggttg gatcacagct cccatgcgag 3420
 cccgaaccgg atgtggcagt gctcacttcc atgctcaccg accctccca cattacagca 3480
 gagacggcta agcgtaggct ggccaggggg tcaccccct ccttggccag ctcttctgcc 3540
 agccagttat ctgcgccttc cttgaaggcg acatgcacta ctcatcatga ctccccggac 3600
 gccgacctca tcgaggccaa cctcctgttg cggcaggaga tgggcgggaa catcacccgc 3660
 gtggagtcag agaataaggt agtaattctg gactcttctg attcgcttcg agcggaggag 3720
 gatgagaggg aaatatccgt tgaggcggaa atcctgcgga gatccaagaa gttccccca 3780
 gcgatgcca tatgggcacg cccggattac aacctccac tgctagagtc ctggaaggac 3840
 ccggactacg tccctccgtt ggtacacggg tgcccattgc cacctaccaa ggeccctcca 3900
 ataccacctc cacggaggaa aaagacggtt gtcctaacag agtccacct ctcttctgcc 3960
 ttggcagagc ttgcttctaa gacctttggc agctctggat cgtcggccgt cgacagcggc 4020
 acggcgaccg ctctcccgga ccaggcctcc gacgacggcg acaaagaatc cgacgttgag 4080
 tcgtactcct ccatgcccc tcttgagggg gagccggggg accccgatct tagcgacggg 4140
 tcttggctca ccgtgagtga ggaggccggt gaggacgtcg tctgctgctc gatgtcctac 4200
 acatggtcta gattagataa aagtaaagtg attaacagcg cattagagct gcttaatgac 4260
 gtcggaatcg aaggtttaac aaccgtaaa ctgcgccaga agctagggtg agagcagcct 4320
 acattgtatt ggcattgaaa aaataagcgg gctttgctcg acgccttagc cattgagatg 4380
 ttagataggc accatactca cttttgccct ttagaagggg aaagctggca agatttttta 4440
 cgtaataacg ctaaaagttt tagatgtgct ttactaagtc atcgcgatgg agcaaaagta 4500
 catttaggta cacggcctac agaaaaacag tatgaaactc tcgaaaatca attagccttt 4560
 ttatgccaac aaggtttttc actagagaat gcattatatg cactcagcgc tgtggggcat 4620

```

tttacttttag gttgcgtatt ggaagatcaa gagcatcaag tgcgtaaaga agaaagggaa 4680
acacctacta ctgatagtat gccgccatta ttacgacaag ctatcgaatt atttgatcac 4740
caagggtgcag agccagcctt cttattcggc cttgaattga tcatatgcgg attagaaaaa 4800
caacttaa at gtgaaagtgg gtccgcgtac agccgcgcgc gtacgaaaaa caattacggg 4860
tctaccatcg agggcctgct cgatctcccg gacgacgacg cccccgaaga ggcggggctg 4920
ggcgctccgc gcctgtcctt tctccccgcg ggacacacgc gcagactgtc gacggcccc 4980
ccgaccgatg tcagcctggg ggacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg 5040
catgccgacg cgctagacga tttcgatctg gacatgttgg gggacgggga ttccccgggt 5100
ccgggattta cccccacga ctccgcccc tacggcgctc tggatatggc cgacttcgag 5160
tttgagcaga tgtttaccga tgcccttggg attgacgagt acggtgggta g 5211

```

<210> 2

<211> 1736

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: partielle HCV-Polyprotein-
Region (NS3-5B') in Fusion mit tTA-Transaktivator

<400> 2

```

Met Ser Ser Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu
 1          5          10          15
Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val
          20          25          30
Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala
          35          40          45
Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Phe His Gly Ala Gly Ser
          50          55          60
Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn
          65          70          75          80
Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser
          85          90          95
Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg
          100          105          110
His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser
          115          120          125
Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly
          130          135          140
Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala
          145          150          155          160

```

Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu
 165 170 175
 Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser
 180 185 190
 Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro
 195 200 205
 Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln
 210 215 220
 Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly
 225 230 235 240
 Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala Arg Gly Thr Asp Pro Asn Ile Arg
 245 250 255
 Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Ile Thr Tyr Ser Thr
 260 265 270
 Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp
 275 280 285
 Ile Ile Met Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser Thr Thr Ile Leu
 290 295 300
 Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu
 305 310 315 320
 Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His
 325 330 335
 Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe
 340 345 350
 Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Ile Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu
 355 360 365
 Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu
 370 375 380
 Ser Gly Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala
 405 410 415
 Leu Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn
 420 425 430
 Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr
 435 440 445
 Ile Glu Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg
 450 455 460
 Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Arg Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr
 465 470 475 480

Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu
 485 490 495
 Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr
 500 505 510
 Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys
 515 520 525
 Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His
 530 535 540
 Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe
 545 550 555 560
 Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala
 565 570 575
 Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys
 580 585 590
 Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val
 595 600 605
 Gln Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr
 610 615 620
 Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val
 625 630 635 640
 Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser
 645 650 655
 Val Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val
 660 665 670
 Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 675 680 685
 Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln
 690 695 700
 Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala
 705 710 715 720
 Glu Ala Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala Leu Glu Thr
 725 730 735
 Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu
 740 745 750
 Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met
 755 760 765
 Ala Phe Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Asn Thr Leu
 770 775 780
 Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro
 785 790 795 800
 Gly Ala Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Val Gly Ala Ala Val
 805 810 815

Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr
 820 825 830
 Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly
 835 840 845
 Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu
 850 855 860
 Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg
 865 870 875 880
 Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu
 885 890 895
 Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val
 900 905 910
 Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Gly Leu
 915 920 925
 Thr Ile Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp
 930 935 940
 Cys Ser Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp
 945 950 955 960
 Ile Cys Thr Val Leu Ala Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu
 965 970 975
 Leu Pro Arg Leu Pro Gly Val Pro Phe Leu Ser Cys Gln Arg Gly Tyr
 980 985 990
 Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met His Thr Thr Cys Pro Cys
 995 1000 1005
 Gly Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val
 1010 1015 1020
 Gly Pro Arg Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn
 1025 1030 1035 1040
 Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Thr
 1045 1050 1055
 Arg Ala Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg
 1060 1065 1070
 Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys
 1075 1080 1085
 Cys Pro Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly
 1090 1095 1100
 Val Arg Leu His Arg Tyr Ala Pro Val Cys Arg Pro Leu Leu Arg Glu
 1105 1110 1115 1120
 Glu Val Val Phe Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln
 1125 1130 1135

Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu
 1140 1145 1150
 Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala
 1155 1160 1165
 Arg Gly Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser
 1170 1175 1180
 Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp
 1185 1190 1195 1200
 Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly
 1205 1210 1215
 Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser
 1220 1225 1230
 Phe Asp Ser Leu Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Ile Ser Val Glu
 1235 1240 1245
 Ala Glu Ile Leu Arg Arg Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Met Pro Ile
 1250 1255 1260
 Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Asp
 1265 1270 1275 1280
 Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr
 1285 1290 1295
 Lys Ala Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg Arg Lys Lys Thr Val Val Leu
 1300 1305 1310
 Thr Glu Ser Thr Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ser Lys Thr
 1315 1320 1325
 Phe Gly Ser Ser Gly Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala
 1330 1335 1340
 Pro Pro Asp Gln Ala Ser Asp Asp Gly Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu
 1345 1350 1355 1360
 Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp
 1365 1370 1375
 Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Gly Glu Asp
 1380 1385 1390
 Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Ser Arg Leu Asp Lys Ser
 1395 1400 1405
 Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asn Asp Val Gly Ile Glu
 1410 1415 1420
 Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro
 1425 1430 1435 1440
 Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu
 1445 1450 1455
 Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu
 1460 1465 1470

Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg
 1475 1480 1485
 Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr
 1490 1495 1500
 Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe
 1505 1510 1515 1520
 Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser
 1525 1530 1535
 Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His
 1540 1545 1550
 Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro
 1555 1560 1565
 Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu
 1570 1575 1580
 Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys
 1585 1590 1595 1600
 Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys
 1605 1610 1615
 Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp
 1620 1625 1630
 Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu
 1635 1640 1645
 Pro Ala Gly His Thr Arg Arg Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val
 1650 1655 1660
 Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala
 1665 1670 1675 1680
 His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly
 1685 1690 1695
 Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly
 1700 1705 1710
 Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala
 1715 1720 1725
 Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
 1730 1735

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vorwärtsprimer,
 komplementär mit dem 5'-Ende des HCV NS3-Gens

<400> 3

ggcgctagcg cgcccatcac ggcctac

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: reverser Primer,
komplementär mit dem 3'-Ende der NS4A-Domäne einschließlich der
NS4A/4B-Spaltungsstelle

<400> 4

ggctctagag taagggaggt gtgaggc

27

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: reverser Primer,
komplementär mit dem 3'-Ende der NS4A-Domäne einschließlich der
NS4A/4B-Spaltungsstelle

<400> 5

ggctctagag taagggaggt gtgaggggacg ctcttc

37

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: reverser Primer,
komplementär mit dem 3'-Ende der NS4A-Domäne einschließlich der
letzten 6 Codons von NS5A

<400> 6

gcagcagacg acgtcctcga attcccggtg gaggac

36

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: reverser Primer,
komplementär mit der NS5A/5B-Spaltungsstelle

<400> 7

ggctctagac catgtgtagg acatcgagca gcagacgacg tcctc

45

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: reverser Primer,
komplementär zur mutierten 5A/5B-Spaltungsstelle

<400> 8

ggctctagac catgtgtagg acataggcct gcagacgacg tcctc

45

<210> 9

<211> 77

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: reverser Primer für die NS3
S1165A-Mutante

<400> 9

cccccggtg cacacagctg cccggaagat gccacaacg gccccgaagg gcagagcagt

60

gggccacccg cagagcc

77

Patentansprüche

1. Zellbasiertes Surrogatsystem zur Bewertung der Protease-Aktivität von Hepatitis C-Virus-NS3-Protease, umfassend:

a) ein erstes chimäres DNA-Molekül, umfassend:

i) ein nicht-zytopathisches Promotorsystem, das bei Transfektion in eine Säugetierzelle zur Induktion der Expression einer ersten Chimäre befähigt ist;

ii) ein HCV-DNA-Molekül in funktioneller Verknüpfung mit dem Expressionssystem, wobei das HCV-DNA-Molekül durch die Nucleotide 1 bis 4206 von SEQ ID NO: 1 definiert ist; und

iii) eine Transaktivator-domäne, die strangabwärts vom HCV-DNA-Molekül fusioniert ist, wobei die Transaktivator-domäne für ein Transaktivator-molekül kodiert, das zur Initiation der Expression eines Reportergens befähigt ist, wobei es sich bei dem Transaktivator um den durch die Nucleotide 4207 bis 5211 von SEQ ID NO: 1 definierten Tetracyclin-Transaktivator (tTA) handelt; und

b) ein zweites chimäres DNA-Molekül, das für ein Reportergen kodiert, das gemeinsam mit einem Operon, das auf das Transaktivator-molekül antwortet, verbunden ist;

wobei die Expression des ersten chimären DNA-Moleküls zur Erzeugung eines Fusionspolypeptids führt, das am endoplasmatischen Reticulum der Säugetierzelle verankert ist, wobei das verankerte Protein durch die

Protease gespalten werden kann, wodurch die Translokation der Transaktivator-domäne zur Induktion der Expression des Reportergens als Mittel zur Bewertung der Protease-Aktivität ermöglicht wird.

2. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 1, wobei das HCV-DNA-Molekül für ein Protein kodiert, das durch die Aminosäuren 1-1402 von SEQ ID NO: 2 definiert ist.

3. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 1, wobei das nicht-zytopathische Promotorsystem ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: CMV-Promotor, frühes SV40-Promotorsystem oder RSV(Rous-Sarcoma-Virus)-LTR-Promotorsystem.

4. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 1, wobei in iii) der Transaktivator bei Spaltung vom Fusionsprotein zum Kern wandert, um die Expression eines Reportergens zu aktivieren, dessen Produkt als ein Mittel zur Bewertung der NS3-Protease-Aktivität gemessen werden kann.

5. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 1, wobei ii) und iii) des ersten chimären DNA-Moleküls für ein Polyprotein mit der Sequenz von SEQ ID NO: 2 kodieren.

6. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 1, wobei das Reportergen für ein Reporter-Molekül kodiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP), β -Galactosidase, Luciferase, Chloramphenicol-aminotransferase und grün fluoreszierendes Protein.

7. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Reporter-Molekül um SEAP oder Luciferase handelt.

8. Zellbasiertes Surrogatsystem nach Anspruch 7, wobei es sich bei dem Reporter-Molekül um SEAP handelt.

9. Rekombinantes DNA-Molekül, wie in SEQ ID NO: 1 definiert.

10. Rekombinantes Protein, wie in SEQ ID NO: 2 definiert.

11. Eukaryontische Wirtszelle, die mit dem Expressionsplasmid gemäß Anspruch 11 und mit einem weiteren Expressionsplasmid, das das zweite chimäre DNA-Molekül gemäß Anspruch 1 umfasst, kotransfiziert ist.

12. Säugetierzelllinie, die mit dem Expressionsplasmid gemäß Anspruch 11 transfiziert ist.

13. Säugetierzelllinie nach Anspruch 13, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: primäre Hepatozyten, Leberzelllinien, Fibroblasten, Lymphozyten und Nierenzellen.

14. Säugetierzelllinie nach Anspruch 14, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 293-, Huh-7-, WRL68-, HepG2- und Chang-Leber-Zellen.

15. Verfahren zur Bewertung der NS3-Protease-Aktivität, umfassend die folgenden Schritte:

- a) zunächst das Inkubieren einer transfizierten Wirtszelle gemäß der Definition in Anspruch 13 unter Bedingungen, die bewirken, dass das HCV-Protease-Polyprotein und das Reportergenprodukt exprimiert werden; und
- b) das Messen der Menge des exprimierten Genprodukts.

16. Verfahren nach Anspruch 16, wobei in Schritt a) die Zellen für mindestens eine Stunde inkubiert werden.

17. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Zellen etwa 18 Stunden inkubiert werden.

18. Verfahren zum Identifizieren von potentiellen Inhibitoren der HCV-NS3-Protease-Aktivität, umfassend das Verfahren gemäß Anspruch 16 und ferner umfassend die folgenden Schritte:

- c) das Bestimmen der Aktivität der Protease in Gegenwart des potentiellen Inhibitors durch das Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei die Verbindung den Wirtszellen nach der Schritt a) zugesetzt werden und die Wirtszellen ferner vor dem Testen der Aktivität in Schritt b) inkubiert werden; und
- d) das Vergleichen der Ergebnisse von Schritt b) mit den Ergebnissen von Schritt c).

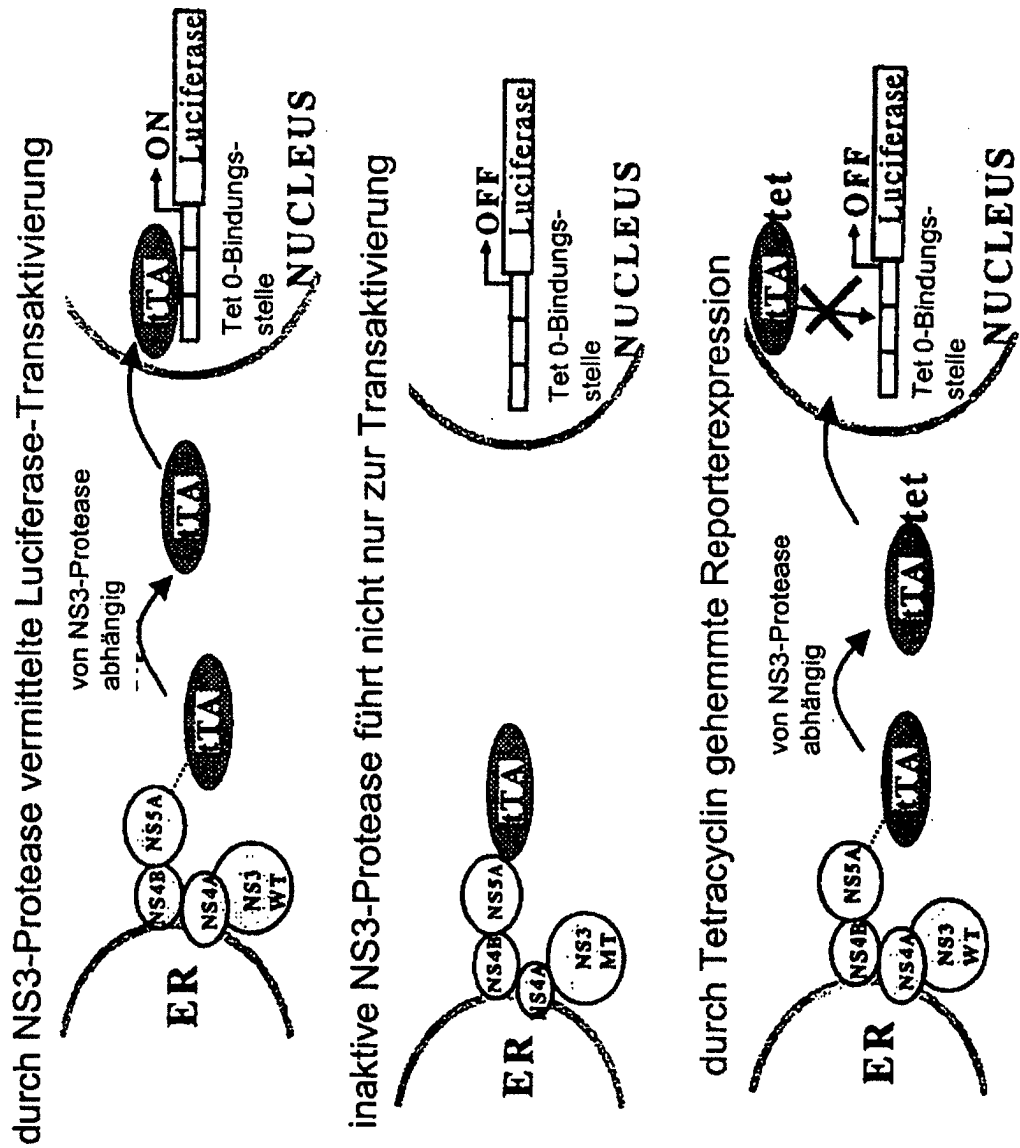
19. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die transfizierten Wirtszellen ferner in Gegenwart oder Abwesen-

heit eines potentiellen Inhibitors etwa 30 Stunden inkubiert werden.

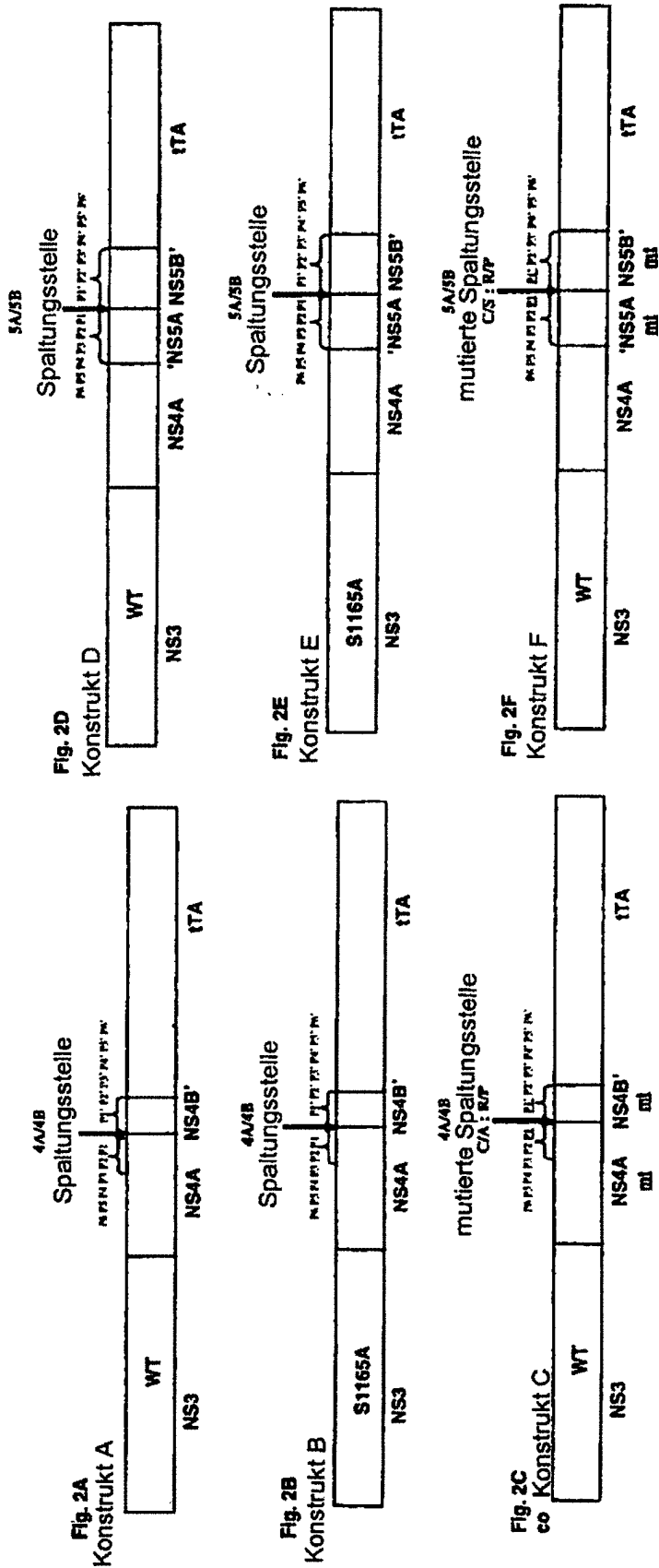
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Zellen etwa 20 Stunden inkubiert werden.

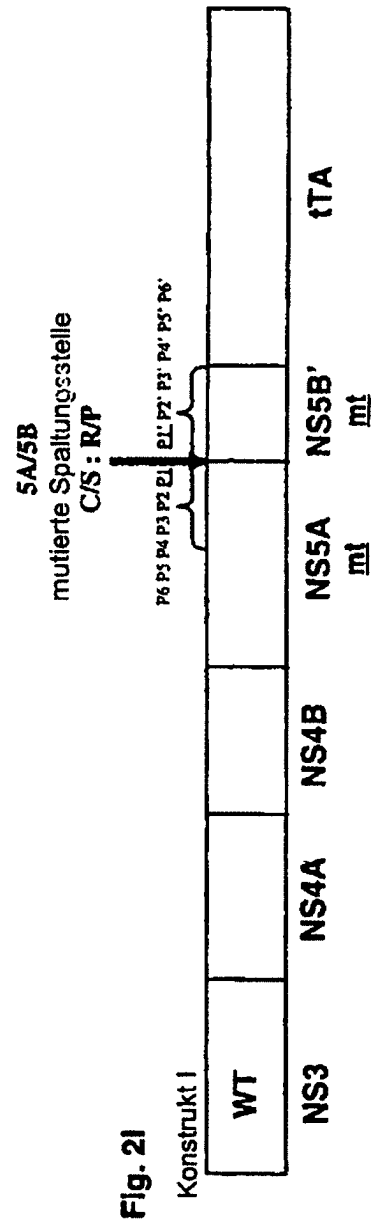
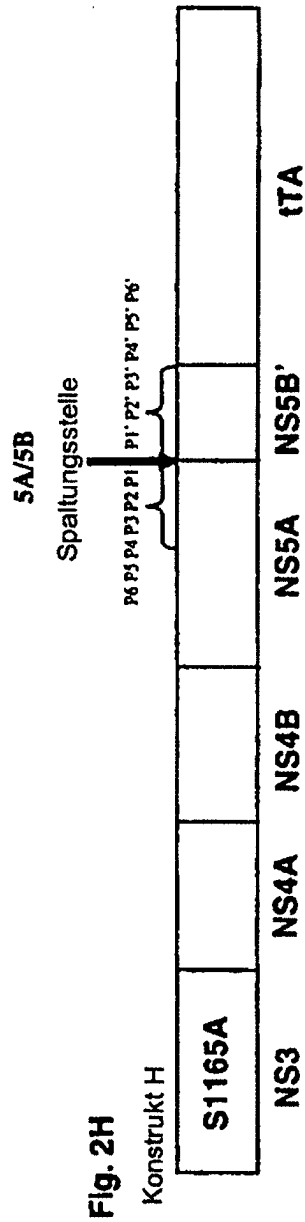
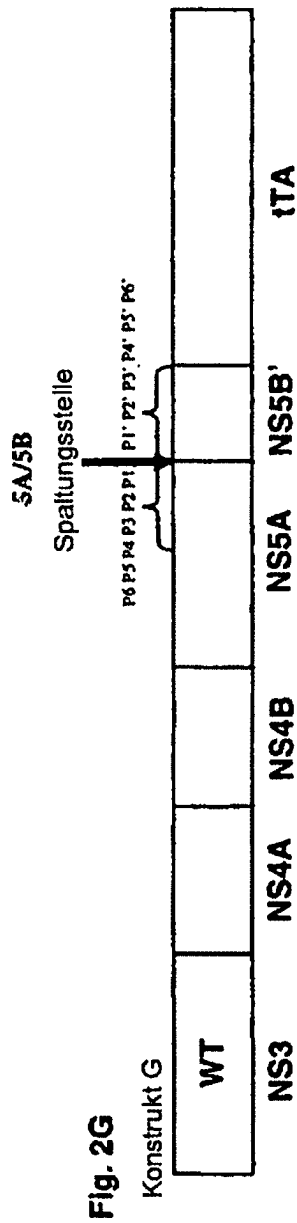
21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Zellen etwa 10 Stunden inkubiert werden.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1

FIGUR 2





FIGUR 3

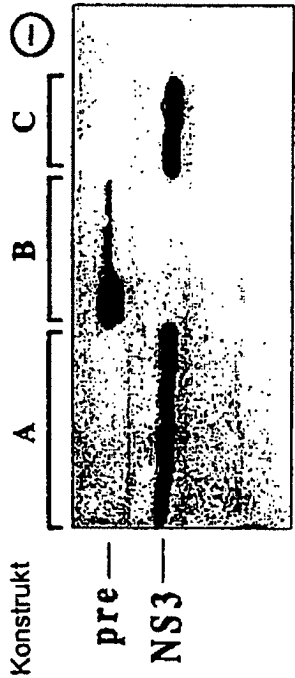


Fig. 3A

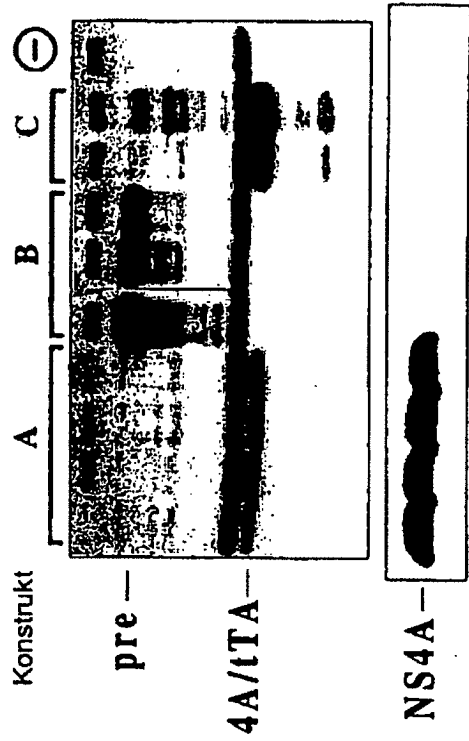
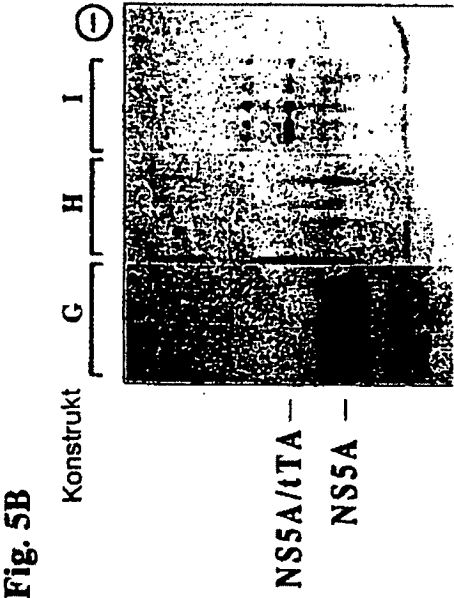
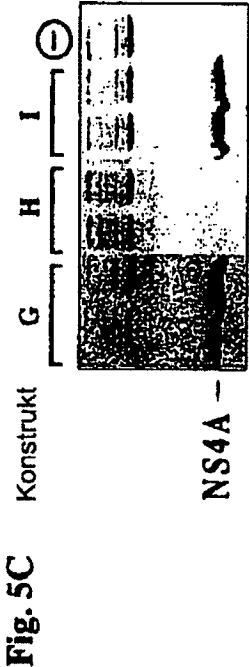
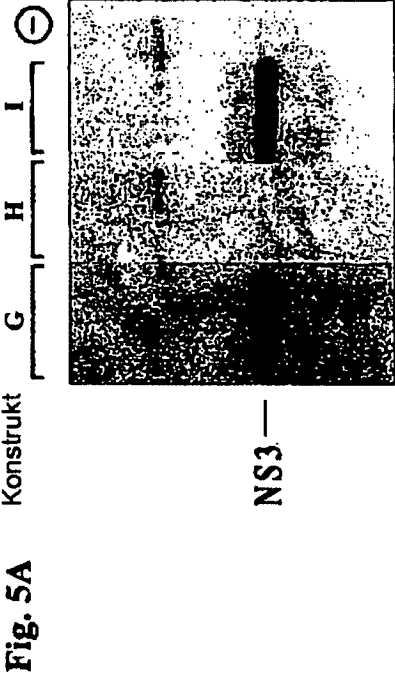


Fig. 3B

FIGUR 4



FIGUR 5

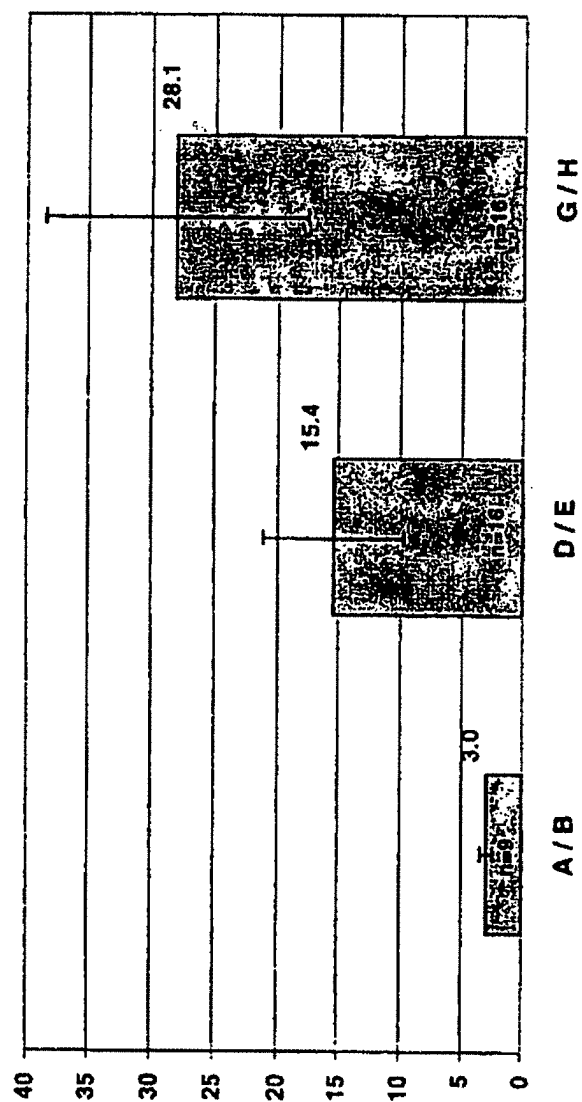


FIGUR 6
Luciferase-Aktivität (293-Zellen)



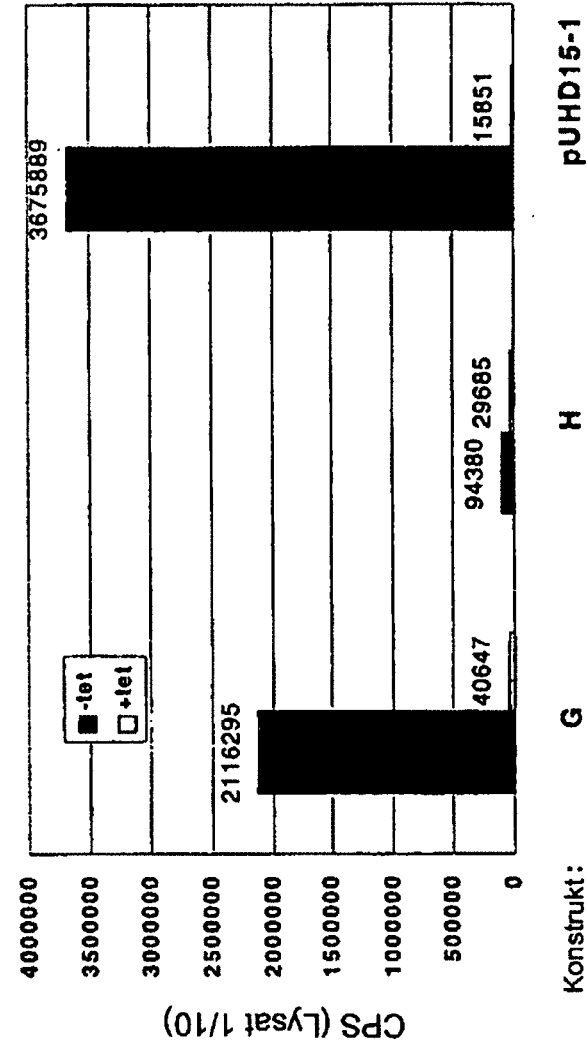
FIGUR 7

Verhältnis NS3 WT/NS3 S1165A (293-Zellen)



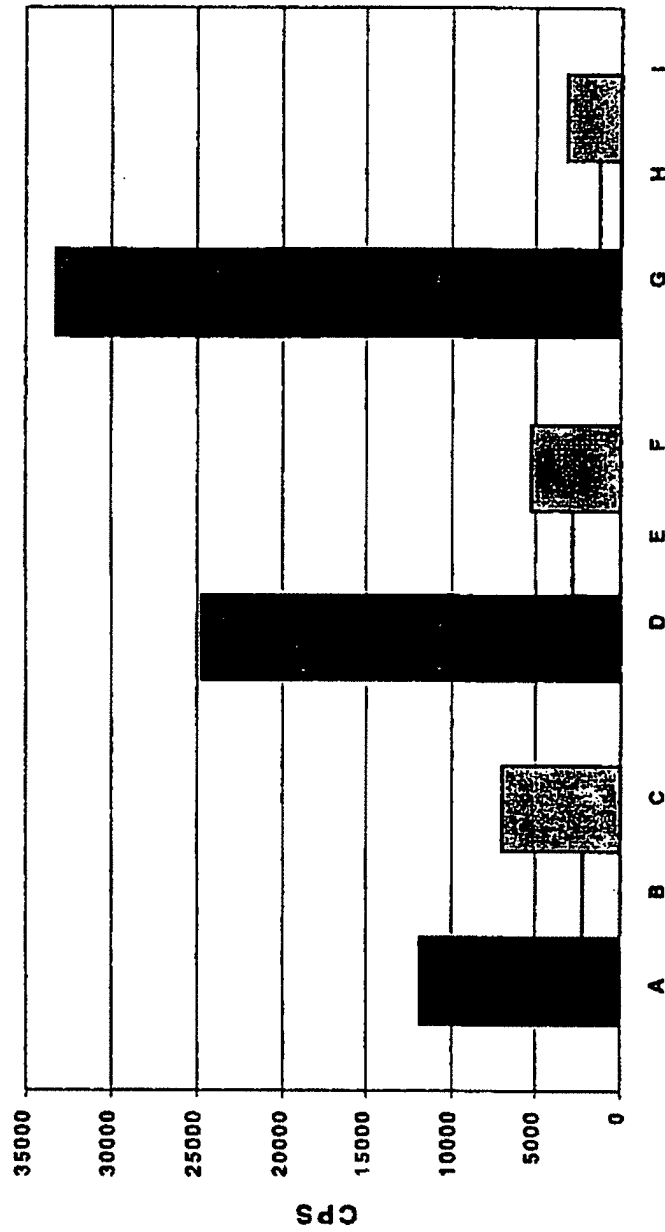
FIGUR 8

Einfluss von Tetracyclin auf die Transaktivierung



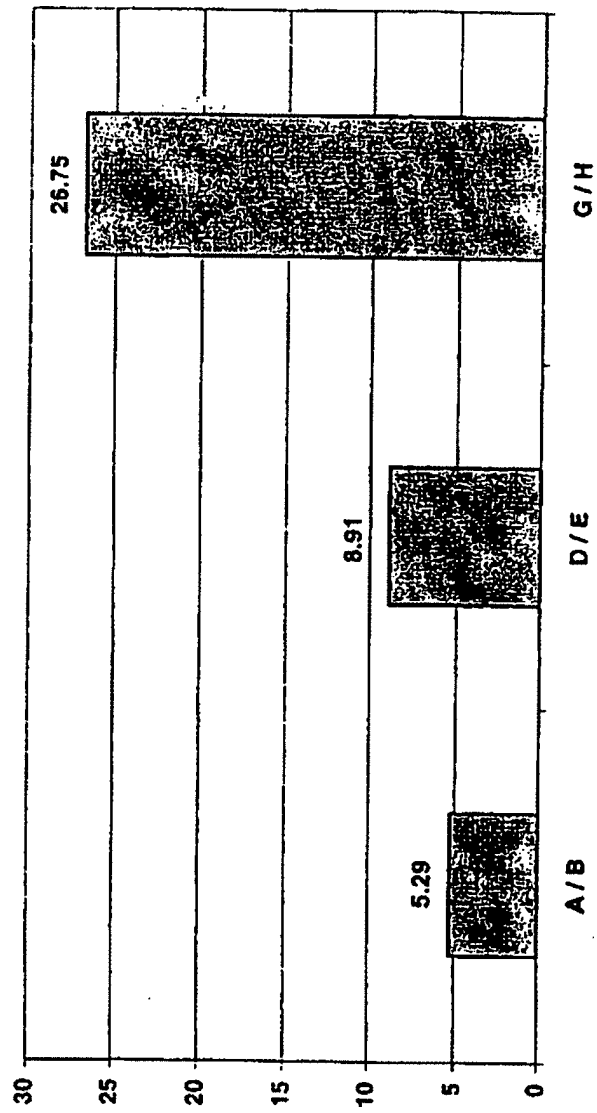
FIGUR 9

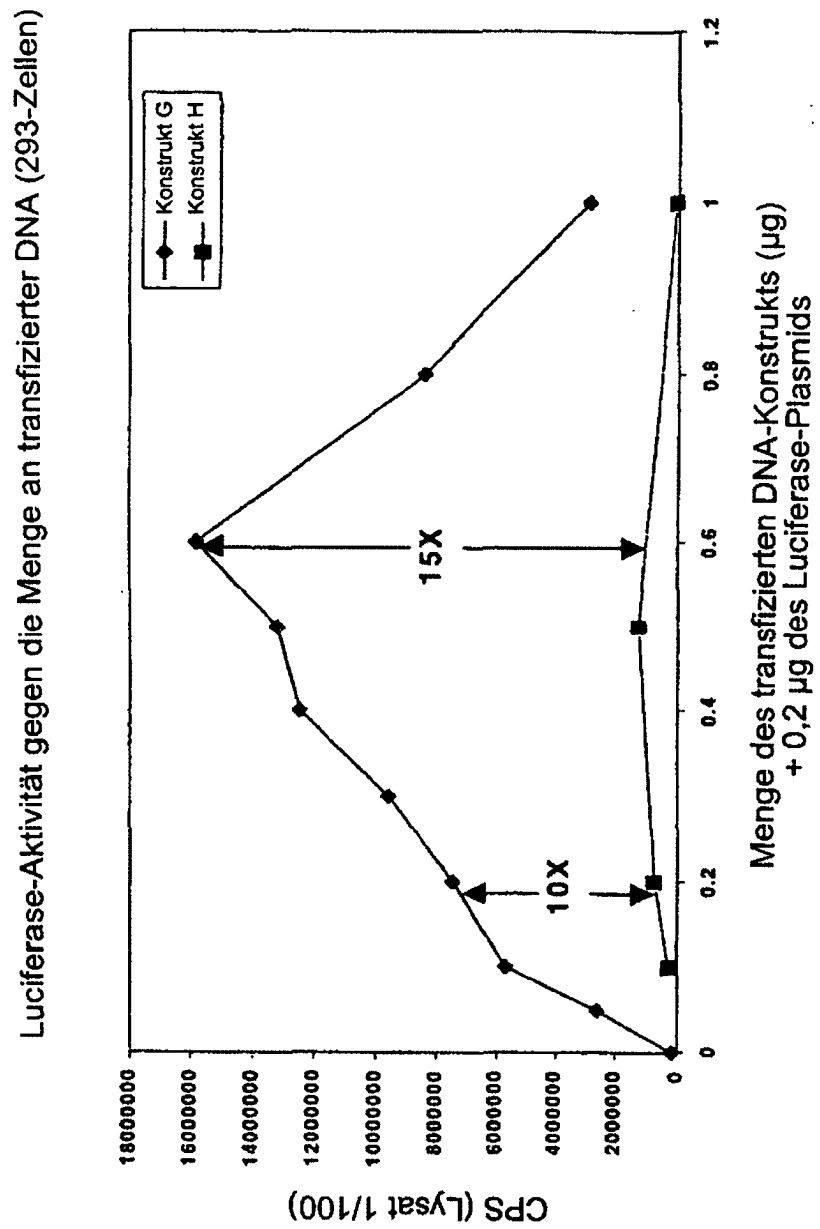
Luciferase-Aktivität (W RL68-Zellen)



FIGUR 10

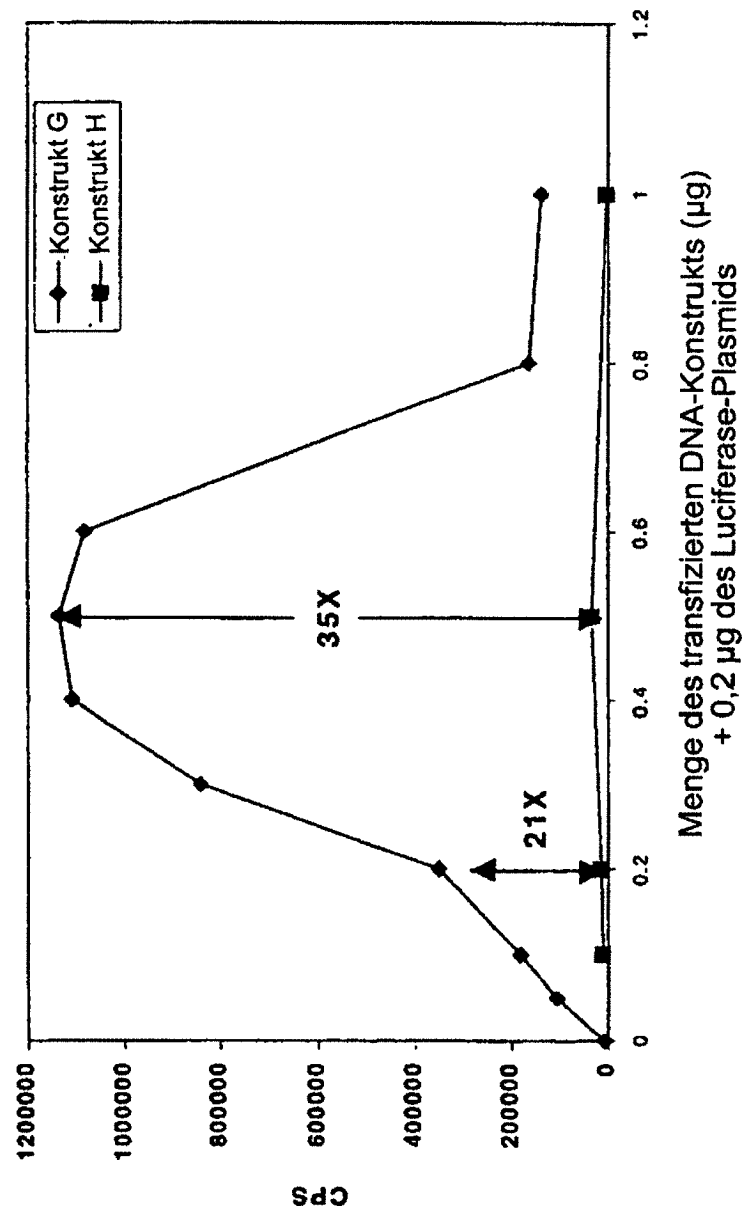
Verhältnis NS3^{WT/NS3 S1165A} (WRL68-Zellen)



FIGUR 11

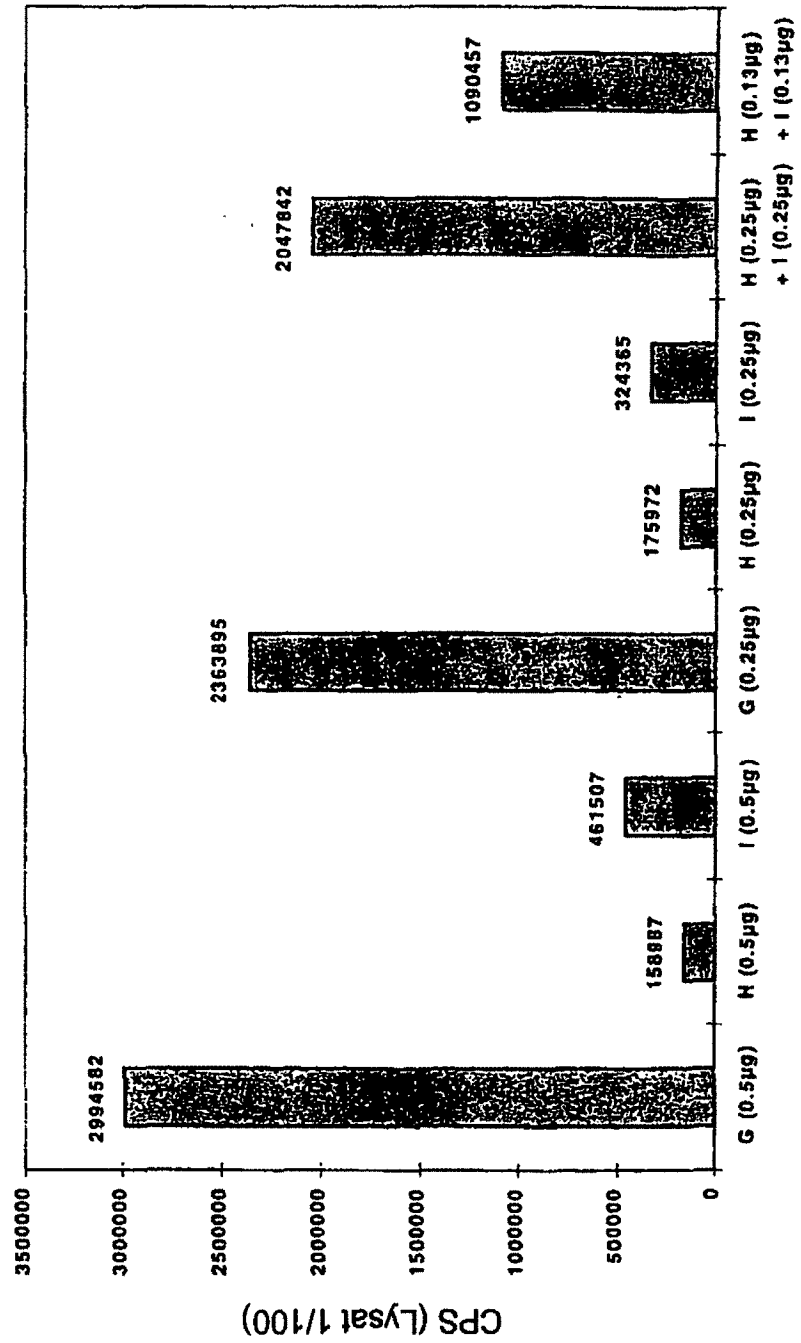
FIGUR 12

Luciferase-Aktivität gegen die Menge an transfizierter DNA (W RL68-Zellen)



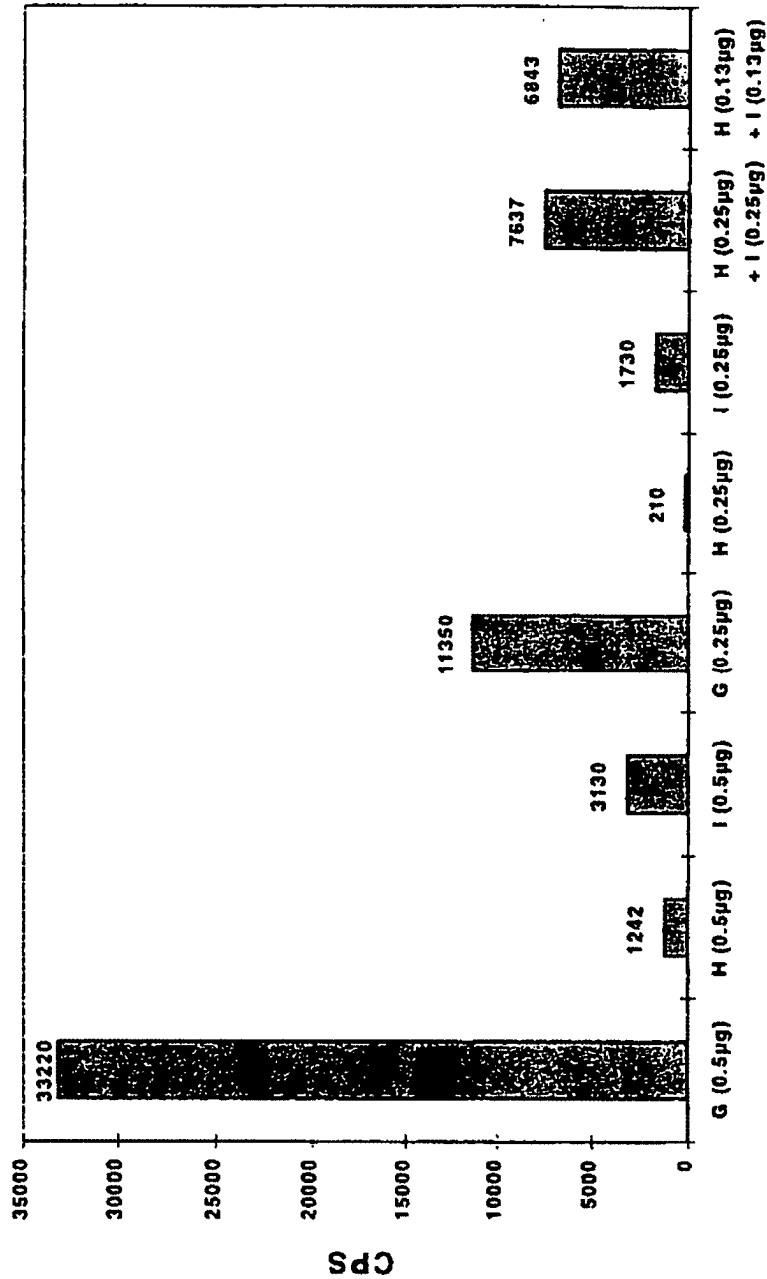
FIGUR 13

Trans-Spaltung (293-Zellen)



FIGUR 14

Trans-Spaltung (W RL68-Zellen)



FIGUR 15

Einfluss des Inhibitors A auf NS3-Protease und tTA-Kontrolle

