

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年6月21日(2007.6.21)

【公表番号】特表2002-542812(P2002-542812A)

【公表日】平成14年12月17日(2002.12.17)

【出願番号】特願2000-615652(P2000-615652)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 9/99 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/50

C 1 2 N 9/99

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】

【提出日】平成19年4月25日(2007.4.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下を含むC型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼのプロテアーゼ活性を評価するための代理細胞ベースシステムであって、

a) 以下を含む第一キメラDNA分子：

i) 哺乳類の細胞のトランスフェクションにより前記第一キメラの発現を含むことができる非細胞変性発現システム；及び

ii) 前記発現システムと作用可能に結合されたHCV組換えDNA分子；ここで、前記HCV DNA分子は以下を含むNS3-5ポリタンパク質をコードする：

- 活性NS3プロテアーゼ領域、

- 翻訳によりER膜に包埋させ、NS3プロテアーゼ活性の補助因子として作用させるのに十分なNS4A領域、

- 任意のその誘導体、変異体又はフラグメントを含むNS4B及びNS5A領域、及び

- 前記NS3プロテアーゼにNS5A/5B切断部位を提供するのに十分な、任意のその誘導体、変異体又はフラグメントを含むNS5Bタンパク質；

iii) 及び前記HCV DNA分子の下流を融合したトランス活性化因子領域、ここで、前記トランス活性化因子領域はレポーター遺伝子の発現を開始できるトランス活性化因子分子をコードする；

b) 及び前記トランス活性化因子分子に反応するオペロンと結合した前記レポーター遺伝子をコードする第二キメラDNA分子；

それによって、前記第一組換え分子の発現は前記哺乳類の細胞の小胞体に固定された融合ポリタンパク質の産生を導き、前記固定したタンパク質は前記プロテアーゼによって切断することができ、その結果前記プロテアーゼ活性を評価する方法として前記レポーター遺

伝子の発現を含むための前記トランス活性化因子領域のトランスロケーションを与える前記代理細胞ベースシステム。

【請求項2】 前記第一キメラDNA分子がSEQ ID NO.1で定義される請求項1記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項3】 前記第一キメラDNA分子がSEQ ID NO.2のポリタンパク質をコードする請求項1記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項4】 前記非細胞変性プロモーターシステムが、CMVプロモーター、SV40初期プロモーターシステム又はRSV(ラウス肉腫ウイルス)LTRプロモーターシステムからなる群から選択される請求項1記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項5】 前記トランス活性化因子がテトラサイクリントランス活性化因子(tTA)、NFκB、HIV-1 tat及びGAL-4からなる群から選択される請求項1記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項6】 前記トランス活性化因子がtTAである請求項5記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項7】 前記レポーター分子が分泌アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアミノトランスフェラーゼ及び緑色蛍光タンパク質からなる群から選択される請求項1記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項8】 前記レポーター分子がSEAP又はルシフェラーゼである請求項7記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項9】 前記レポーター分子がSEAPである請求項8記載の代理細胞ベースシステム。

【請求項10】 SEQ ID NO.1で定義される組換えDNA分子。

【請求項11】 SEQ ID NO.2で定義される組換えタンパク質。

【請求項12】 哺乳類の宿主細胞へのトランスフェクションのための発現プラスミドであって、請求項1記載の第一キメラDNA分子を含む前記プラスミド。

【請求項13】 請求項12記載の発現プラスミドで同時トランスフェクションされる真核生物の宿主細胞。

【請求項14】 SEQ ID NO.1の核酸分子を含む発現プラスミドでトランスフェクションされる哺乳類の細胞株。

【請求項15】 一次肝細胞、肝細胞株、繊維芽細胞、リンパ球、腎細胞からなる群から選択される請求項14記載の哺乳類の細胞株。

【請求項16】 293、Huh-7、WRL68、HepG2及びチャング肝細胞からなる群から選択される請求項15記載の哺乳類の細胞株。

【請求項17】 NS3プロテアーゼ活性の評価方法であって、

a) 最初に、HCVプロテアーゼポリタンパク質及び発現される前記レポーター遺伝子産物を生じる条件下で、請求項13で定義されるトランスフェクションされた宿主細胞をインキュベートし、

b) 発現された前記遺伝子産物の量を測定する工程を含む前記NS3プロテアーゼ活性の評価方法。

【請求項18】 工程a)において、細胞を少なくとも1時間インキュベートする請求項17項記載の方法。

【請求項19】 細胞を約18時間インキュベートする請求項18記載の方法。

【請求項20】 請求項17項記載の方法を含む、HCV NS3プロテアーゼ活性の阻害剤としての可能性を同定する方法であって、

c) 請求項17記載の方法によって、前記阻害剤としての可能性を有する化合物の存在下で前記プロテアーゼの活性をアッセイし、ここで前記化合物は工程a)の後、宿主細胞に加えられ、工程b)において、前記活性をアッセイする前に、宿主細胞をさらにインキュベートし、

d) 工程c)の結果と工程b)の結果を比較する工程をさらに含む前記HCV NS3プロテアーゼの阻害剤としての可能性を同定する方法。

【請求項 2 1】 阻害剤としての可能性を有する化合物の存在下、又は非存在下で、トランスフェクションされた宿主細胞を約30時間さらにインキュベートする請求項 2 0記載の方法。

【請求項 2 2】 細胞を約20時間インキュベートする請求項 2 0記載の方法。

【請求項 2 3】 細胞を約10時間インキュベートする請求項 2 0記載の方法。