(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 914 T2** 2006.08.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 662 128 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 914.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/09200**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 922 414.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/008002**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.09.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.04.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **23.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/11*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
952799 **28.09.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Chiron Corp., Emeryville, Calif., US

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
HANG, Jan H., Lafayette, US; SPAETE, Richard R., Belmont, US; YOO, Byoung J., Puk-ku Puhnag, KP; SUH, Byung S., Duk-Ku Dohang, KR; SELBY, Mark J., San Francisco, US; HOUGHTON, Michael, Danville, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR KONTROLLE DER ÜBERSETZUNG DER HCV-PROTEINE**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen und Verfahren zur Kontrolle der Translation von Proteinen des Hepatitis C Virus (HCV). HCV wurde als durch Blut übertragene nicht-A, nicht-B Hepatitis Virus (NANBV)-Infektion bezeichnet. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen Zusammensetzungen und Verfahren zur Kontrolle und Regulation der HCV-Translation in vivo bereit. Die Zusammensetzungen und Verfahren finden Anwendung bei der Verringerung oder Erhöhung der HCV-Replikation und bei der Verringerung oder Erhöhung der Expression von HCV-Proteinen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das Prototyp-Isolat von HCV wurde in EP Veröffentlichungsnummern 318,216; 388,232 charakterisiert. Wie vorliegend verwendet umfasst die Bezeichnung "HCV" neue Gruppen, Genotypen und Isolate derselben Virusart. Die Bezeichnung "HCV-1" wird in der gleichen Bedeutung wie in EP Veröffentlichungsnummer 318,216 verwendet.

[0003] HCV ist eine übertragbare Erkrankung, die man von anderen Arten Virus-assoziierter Lebererkrankungen unterscheiden kann, einschließlich von denjenigen, die von den bekannten Hepatitis Viren verursacht werden, d.h. Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV) und Delta-Hepatitis-Virus (HDV), sowie von Hepatitis, die vom Cytomegalovirus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV) verursacht wird. HCV wurde zuerst in Individuen identifiziert, die Bluttransfusionen erhalten hatten. Posttransfusions-Hepatitis (PTH) tritt in etwa 10% der Patienten auf, die eine Transfusion erhalten haben, und HCV macht bis zu 90% dieser Fälle aus. Die Erkrankung schreitet häufig zu einem chronischen Leberschaden fort (25–55%).

[0004] Es besteht im Moment ein großer Bedarf, den Translationsprozess in Bezug auf virale Nukleinsäuren zu kontrollieren. Die Kontrolle des Translationsprozesses kann eine effektive Therapie für Viruserkrankungen darstellen. Beispielsweise (ohne Beschränkung darauf) kann die Fähigkeit, die Expression viraler Proteine zu verringern, die Erkrankung begrenzen. Die Fähigkeit, die Expression viraler Proteine in vivo zu erhöhen, kann starke Immunstimulation verursachen. Die Fähigkeit, die Expression viraler Proteine zu erhöhen, kann auch zur Herstellung größerer Mengen viraler Proteine führen, die leichter aufgereinigt werden können.

[0005] Das HCV Genom besteht aus einem einzelnen positiven RNA Strang. Eine schematische Darstellung des HCV-Genoms ist in **Fig. 1** abgebildet. Das HCV-Genom besitzt einen fortlaufenden, translationalen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF), der für ein Polyprotein von etwa 3000 Aminosäuren kodiert. In dem ORF scheinen das strukturelle Protein/die strukturellen Proteine etwa im ersten Viertel der N-terminalen Region kodiert zu sein, wobei der Rest des Polyproteins für die Kodierung der nicht strukturellen Proteine verantwortlich ist.

[0006] Das HCV-Genom weist an dem 5'-Ende eine Region auf, von der nicht bekannt ist, dass sie irgendwelche Proteine oder Polypeptide translatiert. Die Region wird als die 5'-untranslantierte Region (5'UT-Region oder 5'UTR) oder 5'-Leader-Region bezeichnet.

[0007] Die 5'UT-Region enthält bis zu fünf stromaufwärts liegende ORFs, von denen die ersten vier bei HCV-1, dem Prototyp-HCV-Isolat, überlappen (Choo et al., "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451–2455; Han et al., "Characterization of terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end", Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) (1991) 88: 1711–1715). Die 5'UT-Region ist in Bezug auf ihre Nukleotidsequenz homolog zu Pestiviren (Han et al.).

[0008] Eine Untersuchung durch Verlängerung von Primern (primer extension analysis) zeigte, dass zwei vorherrschende Arten von HCV-RNA in Proben von infizierten Patienten existieren (Han et al.). Eine dieser Arten ist länger, und es wird angenommen, dass es sich um genomische RNA vollständiger Länge handelt. Die längere genomische RNA vollständiger Länge weist einen 5'-Terminus auf, von dem vorhergesagt wird, dass er eine Haarnadelstruktur ausbildet (Han et al; Inchauspe et al., Abstract, Third International Symposium on HCV, V. 19, Strasbourg, France, 1991; Okamoto et al., "Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: Comparison with reported isolates for conserved and divergent regions", J. Gen Virol. (1991) 72: 2697–2704). Die andere Art ist kleiner, wahrscheinlich eine 5'-subgenomische RNA, deren 5'-Terminus 145 Nukleotide entfernt von dem 5'-Terminus der längeren RNA beginnt (Han et al.). Antisense-Po-

lynukleotid-Moleküle für HCV sind allgemein in EP Veröffentlichungsnummer 388,232 offenbart.

Offenbarung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen und Verfahren zur Kontrolle der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure bereit. Die Erfindung basiert auf der Nutzung von Nukleinsäuren, die komplementär zu einer kleiner Region vom 5'-Ende der HCV-RNA sind. Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zum Kontrollieren der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure bereit, bei dem man eine nicht natürlich vorkommende erste Nukleinsäure unter Hybridisierungs-Bedingungen mit HCV-Nukleinsäure in Kontakt bringt. Die erste Nukleinsäure ist eine Antisense-Nukleinsäure: sie weist eine Sequenz auf, die im Wesentlichen komplementär zu einer Sequenz des Sinnstrangs in der 5'UT-Region von HCV-Nukleinsäure ist, welche die Basen 277–300 umfasst. Der Sinnstrang ist der Strang von genomischer RNA oder Boten-RNA, der dem Translationsprozess unterliegt. Die erste Nukleinsäure wird mit der HCV-Nukleinsäure unter Bedingungen in Kontakt gebracht, bei denen die zwei Nukleinsäuren in der Lage sind, ein Hybridisierungsprodukt zu bilden, wobei das Hybridisierungsprodukt das Ausmaß der Translation der HCV-Nukleinsäure verändert.

[0010] Das Verfahren kann innerhalb von Zellen verwendet werden, um virale Proteine von Interesse in vitro herzustellen.

[0011] Dementsprechend wird in einem Aspekt der Erfindung ein in vitro-Verfahren zum Kontrollieren der Translation von Hepatitis-C-Virus (HCV)-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure bereitgestellt, bei dem man: (a) eine nicht natürlich vorkommende erste Nukleinsäure bereitstellt, wobei die erste Nukleinsäure eine Sequenz umfasst, die komplementär zu einem Sinnstrang in der 5'UT-Region der HCV-Nukleinsäure ist, welche die Basen 277–300 bezogen auf SEQ ID NO: 1 umfasst; und (b) die HCV-Nukleinsäure mit der ersten Nukleinsäure unter Bedingungen in Kontakt bringt, bei denen die erste Nukleinsäure und die HCV-Nukleinsäure in der Lage sind, ein Hybridisierungsprodukt zu bilden, wobei das Hybridisierungsprodukt das Ausmaß der Translation der HCV-Nukleinsäure verändert.

[0012] In einem anderen Aspekt bezieht sich diese Erfindung auf eine Zusammensetzung und ihre Verwendung zur Kontrolle der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure, wobei die Zusammensetzung eine erste Nukleinsäure oder Mittel zur Herstellung einer ersten Nukleinsäure umfasst, die eine Sequenz aufweist, welche komplementär zu einer Sequenz des Sinnstrangs in der 5'UT-Region von HCV-Nukleinsäure ist, welche die Basen 277–300 bezogen auf SEQ ID NO: 1 umfasst. Vorzugsweise ist die Sequenz der ersten Nukleinsäure SEQ ID NO: 2.

[0013] In einem weiteren Aspekt dieser Erfindung wird ein in vitro-Verfahren zum Kontrollieren der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure zur Verfügung gestellt, bei dem man (a) eine nicht natürlich vorkommende erste Nukleinsäure mit einer Sequenz bereitstellt, die komplementär zu der Sequenz in der 5'UT-Region von HCV ist, welche die Basen 277–300 bezogen auf SEQ ID NO: 1 umfasst; und (b) die HCV-Nukleinsäure mit der ersten Nukleinsäure unter Bedingungen in Kontakt bringt, bei denen die erste Nukleinsäure und die HCV-Nukleinsäure in der Lage sind, ein Hybridisierungsprodukt zu bilden, wobei das Hybridisierungsprodukt das Ausmaß der Translation der HCV-Nukleinsäure verändert. In einem anderen Aspekt umfasst das Verfahren ferner das Transkribieren einer nicht natürlich vorkommenden zweiten Nukleinsäure, die einen Promoter umfasst, der in funktionsfähigerweise mit einer Sequenz verbunden ist, welche komplementär zu der ersten Nukleinsäure ist. Das Verfahren kann auch verwendet werden, um die Expression von HCV-Proteinen in Zellen zu verhindern, die nicht mit HCV infiziert sind, aber zu einem zukünftigen Zeitpunkt einer Infektion unterliegen könnten ("empfängliche" Zellen; susceptible cells).

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung des viralen Genoms von HCV;

[0015] Fig. 2 ist eine schematische Darstellung des viralen RNA-Genoms von HCV, wobei das virale RNA-Genom so verändert ist, dass es mRNA-Sequenzen für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) umfasst;

[0016] Fig. 3 ist eine schematische Darstellung des veränderten viralen RNA-Genoms von HCV mit weiteren Deletionen und Modifikationen;

[0017] Fig. 4 ist eine schematische Darstellung von fünf RNA-Konstrukten, pSV_2, CAT, SVCAT, SVACAT, pT7EMCAT und EMCVCAT;

[0018] Fig. 5 ist eine schematische Darstellung von drei RNA-Konstrukten, pCMV (CAT/SV40/LacZ), pCMV (CAT/HCV/LacZ) und pCMV (CAT/polio/LacZ);

[0019] Fig. 6 stellt die Aktivität der LacZ- und LacZ/CAT-Konstrukte von Fig. 5 graphisch dar; und

[0020] Fig. 7 zeigt die Ergebnisse der Wirkungen der AS5-Antisense-Moleküle auf die R6-Transkription.

Ausführungsarten der Erfindung

[0021] Die vorliegende Erfindung wird im Detail als Verfahren und Zusammensetzungen zum Kontrollieren der Translation von HCV-Nukleinsäuren beschrieben werden. Die Zusammensetzungen und Verfahren werden im Detail in Bezug auf HCV-Nukleinsäure beschrieben werden.

[0022] Die Durchführung der vorliegenden Erfindung wird, sofern nicht anderweitig angegeben, konventionelle Methoden der Chemie, Molekularbiologie, Mikrobiologie, Gentechnik und Immunologie nutzen, die zum Fachwissen gehören. Solche Methoden werden in der Literatur vollständig erläutert. Siehe z.B. Sambrook, Fitsch & Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N Glover Hrsg. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait Hrsg., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. 1984); die Serien Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), insbesondere Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, Hrsg.).

[0023] Definitionen: Definitionen für ausgewählte in der Anmeldung verwendete Bezeichnungen werden unten wiedergegeben, um das Verständnis der Erfindung zu erleichtern. Die Bezeichnung "entsprechend" bedeutet homolog zu oder komplementär zu einer bestimmten Sequenz einer Nukleinsäure. Zwischen Nukleinsäuren und Peptiden bezieht sich „entsprechend" auf Aminosäuren eines Peptids in einer Reihenfolge, die von der Sequenz einer Nukleinsäure oder ihrer komplementären Nukleinsäure abgeleitet ist.

[0024] Die Bezeichnung "nicht natürlich vorkommende Nukleinsäure" bezieht sich auf einen Teil einer genomischen Nukleinsäure, cDNA, semisynthetischen Nukleinsäure oder Nukleinsäure synthetischen Ursprungs, welche aufgrund ihres Ursprungs oder durch Manipulation: (1) nicht mit einer ganzen Nukleinsäure assoziiert ist, mit der sie in der Natur assoziiert ist, (2) mit einer Nukleinsäure oder einem anderen chemischen Agens verbunden ist, die/das sich von denen unterscheidet, mit denen sie in der Natur verbunden ist, oder (3) in der Natur nicht vorkommt.

[0025] Wie vorliegend verwendet beziehen sich die Bezeichnungen "Polynukleotid", "Oligonukleotid" und "Nukleinsäure" allgemein auf Polydesoxyribonukleotide (welche 2-Desoxy-D-Ribose enthalten), auf Polyribonukleotide (welche D-Ribose enthalten), auf jegliche andere Art von Polynukleotid, die ein N-Glykosid einer Purin- oder Pyrimidin-Base ist, und auf andere Polymere, die ein nicht-Nukleotid-Rückgrat (z.B. Proteinnukleinsäuren und synthetische sequenzspezifische Nukleinsäurepolymere, die kommerziell von der Anti-Gene Development Group, Corvallis, Oregon, als Neugene™ Polymere erhältlich sind) oder nicht Standardverknüpfungen enthalten, solange die Polymere Nukleobasen in einer Konfiguration enthalten, die eine Basenpaarung und Basenstapelung ermöglichen, wie sie in DNA und RNA vorgefunden wird. Es gibt keine beabsichtigte Unterscheidung bezüglich der Länge zwischen der Bezeichnung "Polynukleotid" und "Oligonukleotid", und diese Bezeichnungen werden austauschbar verwendet werden. Diese Bezeichnungen beziehen sich lediglich auf die Primärstruktur des Moleküls. Damit umfassen diese Bezeichnungen doppel- und einzelsträngige DNA, sowie doppel- und einzelsträngige RNA und DNA:RNA-Hybride, und sie umfassen ferner bekannte Arten von Modifikationen, z.B. Markierungen, die im Stand der Technik bekannt sind, Methylierung, "Caps", Substitutionen von einem oder mehreren der natürlich vorkommenden Nukleotide mit einem Analog, Internukleotid-Modifikationen, wie z.B. solche mit nicht geladenen Verknüpfungen (z.B. Methylphosphonate, Phosphotriester, Phosphoramidate, Carbamate, etc.) und mit geladenen Verknüpfungen (z.B. Phosphorthioate, Phosphordithioate, etc.), solche die angehängte Einheiten enthalten, wie zum Beispiel Proteine (einschließlich Nukleasen, Toxine, Antikörper, Signalpeptide, Poly-L-Lysine, etc.), solche mit Interkalatoren (z.B. Akridin, Psoralen, etc.), solche, die Chelat-bildende Substanzen enthalten (z.B. Metalle, radioaktive Metalle, Bor, oxidative Metalle, etc.), solche die Alkylierungsmittel enthalten, solche mit veränderten Verknüpfungen (z.B. alpha-anomere Nukleinsäuren, etc.) sowie unmodifizierte Formen des Polynukleotids oder Oligonukleotids.

[0026] Es sollte verständlich sein, dass die Bezeichnungen "Nukleosid", "Nukleotid" und "Nukleinsäure" wie

vorliegend verwendet diejenigen Reste einschließen, die nicht nur die bekannten Purin- und Pyrimidinbasen enthalten, sondern auch andere heterozyklische Basen, die modifiziert wurden. Solche Modifizierungen umfassen methylierte Purine oder Pyrimidine, acylierte Purine oder Pyrimidine oder andere Heterozyklen. Modifizierte Nukleotide oder Nukleotide werden darüber hinaus Modifikationen des Zucker-Rests umfassen, z.B. solche, bei denen eine oder mehrere der Hydroxylgruppen gegen ein Halogen oder aliphatische Gruppen ersetzt sind, oder als Äther, Amine oder ähnliches funktionalisiert sind.

[0027] Organisation des HCV-Genomes: cDNA-Bibliotheken von HCV sind von Nukleinsäuresequenzen abgeleitet, die im Plasma eines HCV-infizierten Schimpansen oder Menschen vorliegen. Die Konstruktion einer dieser Bibliotheken, der "c"-Bibliothek (ATCC Nr. 40394) wird in PCT Veröffentlichungsnummer WO90/14436 beschrieben. Die entsprechenden, für die vorliegende Erfindung relevanten DNA-Sequenzen sind vorliegend als (SEQ ID NO: 1) angegeben.

[0028] Die 5'UT-Region ist etwa 341 Nukleotide lang und basiert auf mindestens fünf mutmaßlichen HCV-Klonen vollständiger Länge, die bisher beschrieben sind (Han et al.; Inchauspe et al.; Okamoto et al.). Anders als die Polyprotein-Region ist die 5'UT-Region der HCV-Isolate stark konserviert. Wie in **Fig. 2** ersichtlich, enthält die 5'UT-Region bis zu fünf stromaufwärts gelegene ORFs, von denen die ersten vier bei HCV-1, dem Prototyp-HCV-Isolat, überlappen (Choo et al.; Han et al.). Die 5'UT-Region ist bezüglich ihrer Nukleotidsequenz im Wesentlichen homolog zu Pestivieren (Han et al.). Damit ist die Diskussion bezüglich der Regulation der Translation von HCV-Nukleinsäure auf andere Pestiviren anwendbar.

[0029] Untersuchung mit Verlängerung von Primern (primer extension analysis) hat zwei vorherrschende Arten von HCV-RNA offenbart (Han et al.). Eine Art ist länger, und es wird angenommen, dass es sich um genomische RNA vollständiger Länge handelt. Es wird vorhergesagt, dass der 5'-Terminus der längeren, genomischen RNA vollständiger Länge eine Haarnadelstruktur ausbildet (Han et al.; Inchauspe et al.; Okamoto et al.). Der 5'-Terminus der kürzeren 5'-subgenomischen RNA beginnt 145 Nukleotide entfernt vom 5'-Terminus der längeren RNA (Han et al.).

[0030] Nukleinsäuren: Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen Nukleinsäuren bereit, die mit einzelnen cis-wirkenden Kontrollelementen von HCV interagieren können und damit die Translation von HCV-Nukleinsäure blockieren, unterdrücken oder verstärken können.

[0031] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zum Kontrollieren der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure bereit, bei dem man eine nicht natürlich vorkommende erste Nukleinsäure mit einer HCV-Nukleinsäure in Kontakt bringt. Die erste Nukleinsäure weist eine Sequenz auf, die komplementär zu einer Sequenz des Sinnstranges in der 5'UT-Region von HCV-Nukleinsäure ist, welche die Basen 277–300 bezogen auf SEQ ID NO: 1 umfasst. Die erste Nukleinsäure wird mit der HCV-Nukleinsäure unter Bedingungen zusammengebracht, bei denen die erste Nukleinsäure in der Lage ist, ein Hybridisierungsprodukt zu bilden und das Ausmaß der Translation der HCV-Nukleinsäure zu ändern.

[0032] Vorzugsweise ist die Antisense-Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung RNA, DNA oder eine modifizierte Nukleinsäure. Beispiele für modifizierte Nukleinsäuren sind (ohne Einschränkung) gegen Abbau widerstandsfähige Derivate, mit Schwefel behandelte (sulfurized) Derivate und Thiophosphat-Derivate von Nukleinsäuren sowie Polynukleosid-Amide (PCT Veröffentlichungsnummer WO 91/16331 von Stec et al.; PCT Veröffentlichungsnummer WO 88/07544 von Zon et al.; P. E. Nelsen et al., Science (1991) 254: 1497–1500; M. Engholm, JACS, (1992) 114: 1895–1897). Besonders bevorzugte Gestaltungs-Modifikationen der Antisense-Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung sind Modifikationen, die entworfen werden um: (1) die intrazelluläre Stabilität der Nukleinsäure zu erhöhen; (2) die zelluläre Permeabilität der Nukleinsäure zu erhöhen; (3) die Affinität der Nukleinsäure zum Sinnstrang zu erhöhen oder (4) die Toxizität (sofern vorhanden) der Nukleinsäure zu verringern. Viele solcher Modifikationen sind im Stand der Technik bekannt, wie in ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS (S. T. Crooke and B. Lebleu, Hrsg., CRC Press, 1993) beschrieben. Damit können die Nukleinsäuren veränderte oder modifizierte Basen, Zucker oder Verknüpfungen enthalten, in spezialisierten Systemen wie Liposomen oder durch Gentherapie verabreicht werden, oder sie können angehängte Reste aufweisen. Solche angehängten Reste umfassen hydrophobe Reste wie Lipide, die eine Interaktion mit Zellmembranen verbessern, oder polykationische Reste wie Polylysin, die als Neutralisierungsmittel der Ladung des Phosphatrückgrats wirken. Besonders bevorzugte Lipide, die angehängt sein können, sind Cholesterole. Die Reste können am 3'- oder 5'-Ende der Nukleinsäuren angehängt sein, und können darüber hinaus über eine Base, einen Zucker oder eine Internukleosidverknüpfung angehängt sein.

[0033] Andere Reste können Gruppen zum Capping sein, die spezifisch am 3'- oder 5'-Ende der Nukleinsäu-

ren angebracht werden können, um den Abbau durch Exonuklease zu verhindern. Solche Gruppen zum Capping umfassen (sind aber nicht beschränkt auf) Hydroxylschutzgruppen, die im Stand der Technik bekannt sind, einschließlich Glykole, wie Polyethylenglykole, Tetraethylenglykole und ähnliches.

[0034] Die bevorzugte Nukleinsäure wird als "AS5" bezeichnet und ist in der Lage, an eine Region zu binden, welche mit der Pestivirus-Homologiebox IV überlappt, welche die Basen 277–300 von SEQ ID NO: 1 umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist die AS5 Nukleinsäure vollständig mit Phosphorthioaten versehen, d.h. enthält nur Phosphorthioatverknüpfungen anstelle der natürlichen Phosphodiestherverknüpfungen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist die AS5-Nukleinsäure kovalent mit einem Cholesteryl-Rest verbunden, vorzugsweise über das 3'-Ende des Nukleosids.

[0035] Verabreichung der Nukleinsäure: Die Nukleinsäure kann in die Zelle durch eine Vielzahl der im Stand der Technik bekannten Verfahren eingebracht werden. Die Zellen können mit einer zweiten Nukleinsäure transfiziert werden, die in der Lage ist, die erste Nukleinsäure als ein Transkriptionsprodukt herzustellen; z.B. durch Einschluss der zweiten Nukleinsäure in einem viralen Träger wie in Dulbecco, U.S. Patent Nr. 4,593,002 gezeigt; oder durch Gentheraphie-Verfahren, wie durch Einbringen der zweiten Nukleinsäure in einen retroviralen Vektor. Ein Beispiel einer Antisense-Gentherapie ist in einem Artikel von Mukhopadhyay et al. "Specific Inhibition of K-RAS Expression and Tumorgenicity of Lung Cancer Cell by Antisense RNA" Cancer Research, 51: 1744–1748 (1991) beschrieben.

[0036] Die vorliegende Erfindung zieht auch Vehikel zum Einbringen der ersten Nukleinsäure oder der zweiten Nukleinsäure in mit HCV infizierten Zellen oder in Zellen, die vor HCV-Infektion geschützt werden sollen, in Betracht. Beispiele solcher Vehikel umfassen Vektoren, Liposome oder Lipidsuspensionen wie N-(1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N,-trimethylammoniummethylsulfat (DOTAP), N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA), und ähnliches. Alternativ dazu kann das Lipid direkt mit der ersten Nukleinsäure verbunden sein.

[0037] Die Antisense-Nukleinsäure kann auch mit Resten verbunden sein, die eine zelluläre Aufnahme der Nukleinsäure verstärken. Diese Reste können hydrophob sein, z.B. Phosphorlipide oder Lipide wie Steroide (z.B. Cholesterol), oder sie können polykationisch sein (z.B. Polylysin). Die hydrophoben oder polykationischen Reste sind an einer beliebigen Stelle an die Antisense-Nukleinsäure angehängt, einschließlich des 3'- und 5'-Endes, der Base, der Zuckerhydroxyle und der Verknüpfungen zwischen den Nukleosiden.

[0038] Ein besonders bevorzugter Rest, um die Aufnahme zu erhöhen, ist eine Cholestrylgruppe. Cholesterylartige Gruppen können z.B. über ein aktiviertes Cholesterylchloroformat oder über Cholsäure durch im Stand der Technik bekannte Mittel angehängt werden, wie in ANTISENSE RESEARCH AND APLICATIONS, siehe oben, beschrieben wird. In einem Beispiel (S. 318) kann ein Cholesterol-Rest an eine 2'-Hydroxylgruppe konjugiert werden, indem ein Amino-Linker und eine funktionelle Gruppe auf dem Cholesterol verwendet werden, die mit einem Amin reagiert. In einem anderen Verfahren wird eine Cholesterylgruppe mit dem 3'-Phosphat unter Verwendung von CCl_4 und Cholesteryloxycarbonylaminoethylamin verknüpft, wie in R. L. Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1989) 86: 6553–6556 beschrieben wird.

[0039] Pharmazeutische Formulierungen: Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können zur pharmazeutischen Verabreichung hergestellt werden. Zubereitungen zur Injektion und Zäpfchen können normalerweise 1–10 mg der Nukleinsäure oder des Nukleinsäureanalogs pro Ampulle oder Kapsel enthalten. Bei menschlichen Patienten ist die tägliche Dosis etwa 0,1–1000 mg, vorzugsweise 1–100 mg (von 10–20 mg/kg bis 1000–2000 mg/kg Körpergewicht). Die jeweilige Dosis hängt jedoch bei jedem Patienten von einer Vielzahl von Faktoren ab, z.B. von der Wirksamkeit der verwendeten betreffenden Nukleinsäure oder des Nukleinsäureanalogs, vom Alter, Gewicht, allgemeinen Gesundheitsstatus, Geschlecht, von der Ernährung, von der Zeit und Art der Verabreichung, von der Geschwindigkeit der Eliminierung, der Kombination mit anderen Medikamenten, die gemeinsam verwendet werden, und der Schwere der besonderen Erkrankung, für die die Therapie angewendet wird.

[0040] Pharmazeutische Herstellungsartikel im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen Artikel, deren Wirkstoffe in einerwirksamen Menge enthalten sind, um ihren beabsichtigten Zweck zu erreichen. Ein bevorzugter Bereich wurde oben beschrieben und die Bestimmung der wirksamsten Mengen für die Behandlung von jeder HCV-Infektion liegt im Rahmen der Kenntnisse des Fachmanns.

[0041] Zusätzlich zu der erfindungsgemäßen Nukleinsäure und ihren mit Schwefel und Phosphorthioat versehenen Analoga können pharmazeutische Zusammensetzungen, geeignete Träger- und Hilfsstoffe enthal-

ten, die die Verarbeitung der aktiven Verbindungen erleichtern. Die Zusammensetzungen, insbesondere solche, die oral verabreicht werden können, und die für die bevorzugte Art der Verabreichung verwendet werden können (wie Tabletten, Dragees und Kapseln) und Zubereitungen, die rektal verabreicht werden können (wie Zäpfchen) und geeignete Lösungen zur parenteralen oder oralen Verabreichung sowie Zusammensetzungen, die bukkal oder sublingual verabreicht werden können, können von 0,1–99 Gewichtsprozent an Wirkstoffen zusammen mit dem Trägerstoff enthalten. Ein bevorzugtes Verfahren der Verabreichung ist die parenterale, insbesondere die intravenöse Verabreichung.

[0042] Geeignete Formulierungen zur parenteralen Verabreichung umfassen wässrige Lösungen der Wirkstoffe in wasserlöslicher oder wasserdispergierbarer Form. Zusätzlich können Suspensionen der Wirkstoffe als geeignete ölige Suspensionen zur Injektion verabreicht werden. Geeignete lipophile Lösungsmittel oder Vehikel umfassen fettige Öle, z.B. Sesamöl oder synthetische Fettsäureester, z.B. Ethyloleat oder Triglyceride. Wässrige Suspensionen zur Injektion können Substanzen enthalten, welche die Viskosität der Suspension erhöhen, z.B. Natriumcarboxymethylzellulose, Sorbitol und/oder Dextran. Gegebenenfalls kann die Suspension auch Stabilisierungsmittel enthalten.

[0043] Darüber hinaus können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung auch eingekapselt in Liposomen verabreicht werden, pharmazeutische Zusammensetzungen, in denen der Wirkstoff entweder dispergiert oder verschiedenartig in Körperchen vorliegend enthalten ist, die aus wässrigen konzentrischen Schichten bestehen, welche an Lipidschichten grenzen. Der Wirkstoff kann, abhängig von seiner Löslichkeit, sowohl in der wässrigen Schicht als auch in der Lipidschicht vorliegen, oder in dem, was im Allgemeinen als liposomische Suspension bezeichnet wird. Die hydrophobe Schicht umfasst im allgemeinen, aber nicht ausschließlich, Phospholipide wie Lezithin und Sphingomyelin, Steroide wie Cholesterol, mehr oder weniger ionische oberflächenaktive Stoffe, wie Dicetylphosphat, Stearylamin oder phosphorige Säure und/oder andere Materialien hydrophoben Ursprungs. Die Durchmesser der Liposomen befinden sich im Allgemeinen in einem Bereich von etwa 15 nm bis 5 Mikrometer. Besonders bevorzugte Lipide zur Herstellung von Liposomen und/oder Lipidsuspensionen sind DOTMA und DOTAP.

[0044] DOTAP ist kommerziell von Boehringer Mannheim erhältlich oder kann unter Befolgung der von L. Stamatatos et al., Biochem 27: 3917–25 (1988); H. Eibl et al., Biophys Chem 10: 261–71 (1979) beschriebenen Verfahren hergestellt werden. DOTMA ist kommerziell unter dem Namen Lipofectin* erhältlich (erhältlich von BRL, Gaithersburg, MD) und wird von P. L. Felgner et al. Proc Nat Acad Sci USA 84: 7413–17 (1987) beschrieben.

[0045] Die vorliegende Erfindung wird nunmehr durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele illustriert, welche besonders vorteilhafte Ausführungsformen darstellen. Es sollte jedoch zur Kenntnis genommen werden, dass diese Ausführungsformen beispielhaft sind und nicht so ausgelegt werden sollten, dass sie die Erfindung in irgendeiner Weise beschränken.

BEISPIELE

I. MATERIAL UND METHODEN

A. Zellen, Bakterienstämme und Plasmide. HUH7, HeLa und HepG2 Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium kultiviert, das mit 10% bovinem Kälberserum (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) supplementiert war. Die Zellen wurden in Gegenwart von 7% CO_2 angezüchet. Alle Plasmide wurden in Escherichia coli HB101, erhalten von Gibco-BRL, angezüchet.
B. Enzyme. Restriktionsenzyme und T4 DNA-Ligase wurden von Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), Taq-Polymerase von Perkin Elmer (Norwalk, CT), T7 RNA-Polymerase und RNasin von Promega (Madison, WI) erhalten.
C. Konstruktion von Expressionsplasmiden. Die Konstruktion der Plasmide pT7EMCAT und pSV_2CAT wurde beschrieben (Ellroy-Stein et al., "Cap-dependent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1989) 86: 6126–6130; Gorman et al., "Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells", Mol. Cell Biol. (1989) 2: 1044–1051). Das Plasmid cHCVCAT wurde durch Anhängen von HindIII-Schnittstellen an beide Enden der 5'UT-Region der HCV-cDNA (Han et al.) mittels PCR (Saiki et al., "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", Science (1988) 230: 1350–1354) und Klonierung des sich ergebenden Fragments in die HindIII Stelle des pSV_2CAT konstruiert .

[0046] Das Plasmid pEQ355 wurde konstruiert, indem die 341 bp 5'UT-Region von HCV-1 in die HindIII/Asp718 Schnittstellen eingefügt wurde, die in der Multiple Cloning Site des Beta-Galactosidase (β gal)-Expressionsplasmids, pEQ176 (Schleiss et al., "Translational control of human cytomegalovirus gp48 expression," J. Virol (1991) 65: 6782–6789) vorhanden sind. Die 5'UT-Region von HCV-1 wurde als HindIII/718-PCR Fragment unter Verwendung von B114, einem EcoRI Fragment aus einem Lambdavektor, als Matrize hergestellt.

[0047] Das Plasmid pEQ391 [pCMV(CAT/HCV/LacZ)] wurde hergestellt, indem ein 716 bp HindIII/BanI Fragment, das für das CAT-Gen kodierte und aus dem Plasmid pSV_2CAT (Gorman et al.) isoliert worden war, an der HindIII-Schnittstelle in das Plasmid pEQ355 ligiert wurde. Die HindIII-Schnittstelle wurden ligiert, und die BanI-Schnittstelle und die unligierte HindIII-Schnittstelle in pEQ355 wurden mit Klenow stumpf gemacht und religiert.

[0048] Das Plasmid pEQ416 [pCMV(CAT/polio/LacZ)], wurde konstruiert, indem ein 716 bp HindIII/BamHI PCR-Fragment, das für ein CAT Gen kodiert, und das unter Verwendung von pSV_2CAT als Matrize hergestellt worden war, mit einem 995 bp BamHI/XhoI Fragment, das für die 5'UT-Region des Poliovirus kodiert, und mit dem β gal-Expressionsplasmid pEQl76, das an der HindIII/XhoI-Schnittstelle im Polylinker geschnitten worden war, ligiert wurde.

[0049] pEQ396 ist ein β gal Expressionsplasmid, das konstruiert wurde, indem die Sequenz der 5'UT-Region des Poliovirus, welche aus pLNPOZ (Adam et al., "Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions", J. Virol (1991) 65: 4985–4990) als XhoI/PstI Fragment genommen wurde und unter Verwendung von Klenow stumpf gemacht wurde, in pEQ377 kloniert wurde, der an den XbaI/SnaBI Schnittstellen im Polylinker verdaut worden war. Die XbaI Schnittstelle wurde ebenfalls mit Klenow aufgefüllt, um stumpfe Enden herzustellen. Die Transkription von β gal in pEQ377 wird durch den T7 Bakteriophagen-Promoter gesteuert.

[0050] Das Plasmid p(CAT/SV40/LacZ) wurde konstruiert, indem das oben beschriebene 716 bp HindIII/BamHI PCR Fragment, welches für das CAT Gen kodiert, mit SV40 Polyadenylierungssignalen und dem β gal Expressionsplasmid pEQl76, welches mit HindIII/BglII verdaut worden war, ligiert wurde. Die Authentizität aller PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung von jedem der resultierenden Segmente in den Plasmiden verifiziert (Chen und Seeburg, "Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA", DNA (1985) 4: 165–170).

D. Konstruktion von hybriden CAT RNAs. Segmente der pSV_2CAT Vektoren wurden wie beschrieben mittels PCR amplifiziert (Saiki et al.; Shyamala und Ames, "Use of exonuclease for rapid polymerase chain reaction based In vitro mutagenesis," Gene (1991) 97: 1–6). Jedes Segment ist in den **Fig. 2** und **Fig. 3** gezeigt. Jeder Sinn-Primer (PSV oder P1 bis P9) wurde so gestaltet, dass er einen Bakteriophagen T7-Promoter (TAA-TACGACTCACTATAG) am 5'-Ende und eine SV40- oder HCV-Sequenz von 16 bis 18 Basen am 3'-Ende aufweist. Ein Antisense-Primer wies eine Folge von 40 Ts am 5'-Ende und eine komplementäre SV40-Sequenz (GGAGGAGTAG) am 3'-Ende auf. Diese Sequenz bindet an Vektoren, 350 Basenpaaren nach einen Stop-Codon in dem CAT Gen aufgrund einer perfekten Übereinstimmung von 10 Nukleotiden und einem zusätzlichen Poly A-Track, der in der Matrizen-DNA vorliegt. Ein Segment von pT7EMCAT wurde mit den Primern T7 und T30 amplifiziert.
Jedes PCR Produkt wurde mit T7 Polymerase mit oder ohne Cap-Analog (Promega, p2010) transkribiert, mit DNase behandelt, mit Phenol-Chloroform extrahiert und zweimal mit Ethanol in Gegenwart von 2,5 M Ammoniumacetat gefällt. Die Konzentration jeder Poly(A)+ RNA wurde durch UV-Absorption geschätzt und wie beschrieben durch Northern- und Dot-Blot-Hybridisierung bestätigt (Han et al., "Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1986) 83: 110–114), wobei JHC271 als Sonde verwendet wurde. Bei SV*CAT, R11, R13 und R14 wurden Sequenzen mittels eines überlappenden PCR-Verfahrens (Shyamala und Ames) intern eingefügt oder gelöscht. Es wurde bestätigt, dass die PCR-Produkte korrekt waren, indem sie sequenziert wurde.
E. Translation von hybriden CAT RNAs in vitro. Synthetische RNAs wurden in mit Nuklease behandeltem Retikulozyten-Lysat von Kaninchen (Gibco-BRL) wie vom Hersteller vorgeschlagen in Gegenwart von 140 mM Kaliumacetat translatiert. Zusätzliche Untersuchungen, die den Einfluss der K^+ Ionenkonzentration auf die Cap-Abhängigkeit untersuchten, wurden in Gegenwart von 50, 100, 150 und 200 mM Kaliumacetat ausgeführt. Aliquots des mit [^{35}S]-Methionin markierten Translationsprodukts wurden wie zuvor beschrieben (Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature (1970) 227: 680–685) durch Elektrophorese in einem 12%igen Polyacrylamidgel analysiert.
F. Transfektion von hybriden CAT RNAs in Säugetierzellen für einen CAT Assay. Zwei Mikrogramm jeder

der synthetischen RNAs wurden unter Verwendung von 15 mg Lipofektin (Gibco-BRL) gemäß dem Verfahren von Felgner et al. "Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1987) 84: 7413–7417, modifiziert durch den Hersteller, auf einer 3,5 cm großen Costar-Platte (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) in 1 × 10^6 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und wie zuvor beschrieben (Gorman et al.) für den CAT Assay geerntet. Es wurde gezeigt, dass die relative CAT-Aktivität zwischen 0,5 mg und 5 mg transfizierter RNA linear war. Eine nach der Transfektion erfolgende Inkubation zwischen 6 Stunden und über Nacht beeinflusste die CAT-Aktivität nicht signifikant.

Zur Translation von RNAs in mit Poliovirus infizierte Zellen wurden HUH7-Zellen mit Poliovirus (Mahoney Stamm, ATCC VR-59) bei einer MOI (multiplicity of infection) von 100 infiziert. Die Zellen wurden zwei Stunden nach der Infektion mit RNAs transfiziert und wurden vier Stunden nach der Transfektion geerntet. Die Zellen bewahrten während der sechsstündigen Infektion eine normale Morphologie; danach begannen sie ihre Morphologie zu ändern und sich von der Kulturschale abzulösen.

G. Transfektion von dicistronischen DNA-Konstrukten in Zellen. Zwanzig Mikrogramm jeder Plasmid-DNA, die durch Bildung von Banden in einem CsCl-Gradienten gereinigt worden waren, wurden mit dem Kalziumphosphatverfahren (Gorman et al.) in 2 × 10^6 HUH7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet, und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurde ein Zellextrakt hergestellt. Der CAT Assay wurde wie beschrieben durchgeführt (Gorman et al.). Der LacZ Assay erfolgte nach Miller (Miller, Assay of beta-galactosidase. In "Experiments in Molecular Genetics", S. 352–355, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1972).

BEISPIEL 1

Herstellung von RNAs mit Deletion in der 5'UT-Region des HCV-Genoms und Prinzip des Verfahrens.

[0051] Um ein cis-wirkendes Element/cis-wirkende Elemente zu kartieren, welches/welche die Translation im HCV-Genom kontrolliert/kontrollieren, wurden Versionen vollständige Länge (von Nukleotid 1 bis 341) oder deletierte Versionen der 5'UT-Region von HCV-1 RNA mit der kodierenden Region der Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-mRNA verbunden. Die Konstruktionen sind in **Fig. 3** illustriert und nachfolgend in Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1

ID des Konstrukts	Seq. der 5'UT-Region	Deletion oder anderes Merkmal
R1	1-341	
R2	23-341	1-22 entfernt
R3	35-341	1-34 entfernt
R4	83-341	1-82 entfernt
R5	99-341	1-98 entfernt
R6	145-341	1-144 entfernt
R6.hp	145-341	1-144 entfernt mit Haarnadel Basen 1-23 am 5'-Ende hinzugefügt
R7	218-341	1-217 entfernt
R8	255-341	1-254 entfernt
R8.hp	255-341	1-254 entfernt mit Haarnadel Basen 1-23 am 5'-Ende hinzugefügt
R9	322-341	1-321 entfernt
R11	1-322	323-341 entfernt
R13	1-205	206-341 entfernt
R14	1-145	146-341 entfernt
R17	145-322	1-144 und 323-341 entfernt
R18	145-294	1-144 und 295-341 entfernt

[0052] Jede RNA wurde durch Transkription eines DNA-Fragments mit T7 Polymerase synthetisiert, wobei diese zunächst mittels PCR derart amplifiziert wurde, dass sie eine spezifische 5'- oder 3'-Deletion enthielt. Jede RNA wurde derart gestaltet, dass ein sie ein Cap am 5'-Ende und einen Poly A-Schwanz (A40) am 3'-Ende aufwies, um die Stabilität in Zellen zu erhöhen. Dieser Ansatz erlaubt eine effiziente Herstellung einer großen Menge an RNA mit gleichmäßig definierten 5'- und 3'-Enden. Anders als bei konventionellen DNA-Transfektionsstrategien umgeht die RNA-Transfektion von Zellen unter Verwendung dieses Ansatzes mögliche Probleme beim Splicing und beim Transport, die bei bestimmten RNA-Molekülen im Nucleus auftreten können.

[0053] Mit dem gleichen Verfahren wurden zwei zusätzliche RNAs synthetisiert: 1) der SVCAT mit dem 5'-Leader der frühen SV40-mRNA (SV40 early mRNA), der als Positiv-Kontrolle für eine konventionelle Cap-abhängige Translation diente (Kozak, "The scanning model for translation: An update", J. Cell Biol. (1989) 108: 229–241), und der EMCVCAT mit dem 5'-Leader von EMCV, der als Positiv-Kontrolle für eine Cap-unabhängige interne Initiationen diente (Jang et al., "Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of Encephalomyocarditis virus RNA In vivo", J. Virol, (1989) 63: 1651–1660).

BEISPIEL 2

Translation von hybriden CAT RNAs in vitro.

[0054] Um zu bestätigen, dass synthetische RNAs biologisch aktiv waren, und um ihr Translationsprofil in vitro festzustellen, wurden die RNAs von Beispiel 1 in Retikoluzyten-Lysat von Kaninchen translatiert. Alle RNAs, einschließlich SVCAT, führten zu einem CAT Protein der erwarteten Größe.

[0055] Die in vitro Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden: 1) Bei den HCVCAT-Konstrukten produzierten R1 bis R5 CAT Protein, jedoch nur in einem kaum nachweisbaren Ausmaß. Dieses Ausmaß der Translation nahm stufenweise bei R6 und R7 zu, und erreichte eine maximale 12-fache Zunahme bei R8. 2) Bei KCl-Konzentration von 140 mM war die in vitro-Translation von mit Cap versehenen SVCAT- und HCV-CAT-RNAs (R7, R8) effizienter als die der nicht mit Cap versehenen RNAs, durchschnittlich 20-fach. 3) Bei ge-

ringeren Konzentrationen an KCl (50 bis 100 mM) führte die Translation von nicht mit Cap versehenen R1-Matrizen zu CAT Protein in einem vergleichbaren Ausmaß zu der mit Cap versehenen R1-Matrize, was möglicherweise auf das Auftreten einer schwachen internen Initiation hinweist.

[0056] Überraschenderweise und unerwarteterweise stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu kürzlich erhaltenen Daten von Tsukiyama-Kohara et al. "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA", J. Virol, (1992) 66: 1476–1483, die den Nachweis einer internen Ribosomeneintrittsstelle in der 5'UT-Region von HCV-RNA unter Verwendung von Retikulozyten-Lysat von Kaninchen und HeLa-Zellextrakten berichteten. Eine in vitro-Proteinsynthese unter Verwendung von Zell-Lysaten stellt nicht immer verlässlich die Translationsbedingungen in vivo dar (Kozak, "Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organcells", Microbiol. Rev. (1983) 47: 1–45). Es wurde ein alternativer Ansatz verwendet.

BEISPIEL 3

Translation von hybriden CAT RNAs in vivo und Identifizierung von Kontrollelementen.

[0057] Um das Translationsprofil der monocistronischen Konstrukte in vivo festzustellen, wurden RNAs (R1 bis R18) gemeinsam mit der Kontroll-RNA, SVCAT, unter Verwendung von Lipofectin (Felgner et al.) in eine humane Hepotozyten-Zelllinie (HUH7) transfiziert. Die CAT-Aktivitäten wurden beobachtet, und die Daten wurden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

ID des Konstrukts	Seq. der 5'UT-Region	Deletion oder anderes Merkmal	CAT-Aktivität
R1	1-341		nicht detektiert
R2	23-341	1-22 entfernt	0,5
R3	35-341	1-34 entfernt	2,0
R4	83-341	1-82 entfernt	2,1
R5	99-341	1-98 entfernt	2,5
R6	145-341	1-144 entfernt	2,1
R6.hp	145-341	1-144 entfernt mit Haarnadel Basen 1-23 am 5'-Ende hinzugefügt	0,1
R7	218-341	1-217 entfernt	5,2
R8	255-341	1-254 entfernt	7,9
R8.hp	255-341	1-254 entfernt mit Haarnadel Basen 1-23 am 5'-Ende hinzugefügt	0,1
R9	322-341	1-321 entfernt	0,6
R11	1-322	323-341 entfernt	nicht detektiert
R13	1-205	206-341 entfernt	nicht detektiert
R14	1-145	146-341 entfernt	nicht detektiert
R17	145-322	1-144 und 323-341 entfernt	1,5
R18	145-294	1-144 und 295-341 entfernt	0,6

[0058] Bei dem Konstrukt vollständiger Länge R1, war die CAT-Aktivität wiederholt nicht nachweisbar, es sei denn die Menge an RNA wurde 10-fach erhöht und mehr Zellextrakt wurde verwendet. Dieses Ergebnis legt

nahe, dass die HCV-RNA vollständiger Länge keine effiziente Translationsmatrize in vivo ist.

[0059] Eine Folge von 5'-Deletions-Konstrukten, die in Beispiel 1 beschrieben sind, wurde analysiert. CAT-Aktivität wurde zunächst bei R2 nachgewiesen, in dem die 5'-terminale Haarnadel aus 23 Nukleotiden entfernt wurde. Diese Aktivität steigerte sich bei R3 um das 4-fache, und ein ähnliches Ausmaß an Aktivität wurde in R4, R5 und R6 nachgewiesen, die systematisch in Bezug auf ORF 1 bis 4 deletiert wurden.

[0060] Die 5'UT-Sequenz in R6 war identisch zu der Sequenz der 5'-subgenomischen RNA, die in vivo nachgewiesen wurde (Han et al., 1991). Die CAT-Aktivität nahm bei R7, in dem das AUG-Codon von ORF 5 entfernt worden war, weiter um das 2-fache zu und zusätzlich um ein weiteres 1,5-faches bei R8, welches nur 86 Nukleotide der 3'-proximalen Sequenz enhielt. Das Konstrukt R8 führt zu einer maximalen CAT-Aktivität. Diese Daten legen nahe, dass Sequenzen stromaufwärts vom Nukleotid 255, einschließlich der kleinen ORFs, inhibitorisch auf die Translation des Haupt-Initiations-Codons des Polyproteins wirken.

[0061] Die maximale bei R8 beobachtete CAT-Aktivität nahm mit einer weiteren Deletion von 67 Nukleotiden im R9 Konstrukt stark ab. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ein wirksames positives Kontrollelement, das eine Translation stimuliert, stromabwärts vom Nukleotid 255 vorliegen könnte. Diese Region von 86 Nukleotiden enthält eine Sequenz von 28 Nukleotiden mit 90% Identität zu Pestiviren und wird als Pestivirus-Homologiebox IV bezeichnet, in **Fig. 2** und **Fig. 3** PEST-IV genannt (Han et al., 1991). Um zu bestimmen, ob das PEST-IV Element für die beobachtete Stimulation der Translation allein verantwortlich ist, wurde das RNA Konstrukt R6 einer Deletionsanalyse unterworfen.

[0062] Das Konstrukt R6 weist eine Deletion der Sequenz 1–145 der 5'UT-Region auf, welche den Teil des 5'-Terminus der HCV-RNA entfernt, der mit inaktiven Konstrukten assoziiert ist. R6 wurde für die Deletionsanalyse R8 vorgezogen. Eine 3'-Deletion in R8 würde zu RNA mit einer kurzen 5'UT-Region führen.

[0063] Nach Transfektion wurde die in R6 beobachtete CAT-Aktivität durch eine Deletion von 20 Nukleotiden vom 3' Ende von R6 um das 1,5-fache reduziert (im Konstrukt R17), und eine weitere 2,5-fache Abnahme wurde durch eine zusätzliche Deletion von 28 Nukleotiden beobachtet (im Konstrukt R18).

[0064] Diese Daten wiesen darauf hin, dass zusätzliche stromaufwärts und stromabwärts gelegene Sequenzen von der PEST-IV für eine maximale Translations-Verstärkung notwendig waren. Die PEST-IV Sequenz scheint Teil eines positiven cis-wirkenden Elements zu sein, das zu einem heterologen 5'-Leader transferiert werden kann. Wie in **Fig. 4** gezeigt, wurde diese Sequenz aus 28 Basen in SVCAT eingefügt, um SV*CAT herzustellen, und dieser vermittelte eine Steigerung der CAT-Aktivität um das 3-fache.

[0065] Andere RNA-Konstrukte mit 3'-Deletionen wurden hergestellt. Keine CAT-Aktivität wurde in R11 und R14 sowie in R13 nachgewiesen, die alle die 5'-Haarnadel enthielten. Diese Daten sind konsistent mit der Auffassung, dass die 5' Haarnadel inhibitorisch auf die Translation von HCV-RNA wirkt.

BEISPIEL 4

Die Wirkung der 5'-Haarnadel von HCV auf die Translation von CAT RNAs.

[0066] Da RNAs mit intaktem 5'-Terminus unabhängig von den stromabwärts gelegenen Sequenzen alle inaktiv waren, wurde eine mögliche 5' Haarnadelstruktur, die in den am meisten distal gelegenen 23 Nukleotiden vorlag, in Bezug auf die beobachtete Translations-Inhibierung beurteilt. Dementsprechend wurde die 5'-Haarnadel mit dem 5'-Terminus der zwei aktiven RNAs, R6 und R8, verbunden. Diese RNRs, R6hp, R8hp, wurden in HUH7-Zellen transfiziert und die CAT-Aktivität wurde gemessen.

[0067] Wie in Tabelle 2 gezeigt, hob die Nebeneinanderstellung der Haarnadel auf diesen Konstrukten die Translation fast auf, wie durch die relative CAT-Aktivität gezeigt wird. Die Daten legen nahe, dass die 5'-Haarnadel ein starker Translationsinhibitor ist, obwohl eine vollständige Inhibierung mehr Nukleotide als die 23 Nukleotide der Haarnadel benötigt.

BEISPIEL 5

Translation von hybriden CAT RNAs in mit Poliovirus infizierten Zellen.

[0068] Es ist bekannt, dass eine Poliovirus-Infektion die Capabhängige Translation von zellulärer mRNA in-

hibiert und damit die Translation seiner eigenen oder heterologen RNA steigert, welche eine interne Ribosomeneintrittsstelle (internal ribosome entry site, IRES) in der 5'UT-Region enthält (Jang et al., "Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of Encephalomyocarditis virus RNA in vivo", J. Virol, (1989) 63: 1651–1660; Macejak und Sarnow, "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA", Nature (1991) 353: 90–94; Pelletier und Sonenberg, "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from polivirus RNA", Nature (1988) 334: 320–325). Es wird angenommen, dass diese Inhibierung indirekt durch die von Poliovirus kodierte Proteinase 2A vermittelt wird, indem eine nicht identifizierte latente zelluläre Protease aktiviert wird, welche wiederum p220 spaltet, eine Komponente des zellulären Cap-bindenden Proteinkomplexes (eIF-4F) (Sonenberg, "Cap-binding protein of eukaryotic mRNA: functions in initiation and control of translation", Prog. Nucleic Acid Res. Molec. Biol. (1988) 35: 173–297).

[0069] Hybride CAT RNAs mit verschiedenen 5'UT-Regionen wurden in HUH7-Zellen, die mit Poliovirus infiziert waren, transfiziert. Diese Strategie wurde entworfen, um die Cap-Abhängigkeit jeder RNA festzustellen, und um die mögliche Existenz einer schwachen internen Ribosomeneintrittsstelle (Internal Ribosome Entry Site, IRES) nachzuweisen, die in der 5'UT-Region von HCV vorliegen kann.

[0070] Wie erwartet steigerte die Infektion mit Poliovirus die CAT-Aktivität in EMCVCAT gegenüber einer positiven Kontroll-RNA für die interne Initiation (Elroy-Stein et al.) um das 7-fache. Im Gegensatz dazu verringerte die Polio-Infektion die CAT-Aktivität bei SVCAT sowie bei zwei HCV Konstrukten, R6 bzw. R8, wesentlich. Die verringerten CAT-Aktivitäten, die bei mit Poliovirus infizierten Zellen beobachtet wurden, wurden weiter verringert, wenn die infizierten Zellen vor der RNA-Transfektion längere Zeit (2,5 Stunden) inkubiert wurden. Die CAT-Aktivität von R1 blieb unabhängig von einer Infektion mit Poliovirus nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in der 5'UT-Region der HCV-RNA kein IRES vorhanden ist.

[0071] Mit der Ausnahme des R1 Konstrukts enthielten die in dem obigen Experiment getesteten Konstrukte große Deletionen in der 5'UT-Region. Es ist möglich, dass solche Deletionen eine mögliche IRES-Struktur und/oder -Funktion beeinträchtigt haben. Um die Wirkung solcher Deletionen zu beurteilen, wurden Konstrukte mit geringeren Deletionen auf ihre Fähigkeit getestet, CAT-Protein in mit Poliovirus infizierten Zellen zu translatieren. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen blieb die CAT-Aktivität des R1 Konstrukts in Gegenwart oder in Abwesenheit einer Infektion mit Poliovirus nicht nachweisbar. Die Konstrukte R2 bis R5 zeigten ein relatives Ausmaß an CAT-Aktivität ähnlich zu der, die bereits beschrieben wurde, wenn sie in Abwesenheit von Infektion mit Poliovirus getestet wurde. Die CAT-Aktivitäten der HCV-Leader-Matrizen wurden jedoch praktisch in mit Poliovirus infizierten Zellen aufgehoben.

[0072] Zusätzlich wurden die Matrizen SVCAT und R1 bis R3 in einem ähnlichen Protokoll unter Verwendung von nicht mit Cap versehenen Boten-RNAs getestet. Die nicht mit Cap versehenen Matrizen waren in transfizierten Zellen inaktiv, unabhängig davon, ob die Zellen in der Folge mit Poliovirus infiziert wurden. Diese Ergebnisse legen deutlich nahe, dass monocistronische Boten-RNAs mit cis-wirkenden regulatorischen Elementen, die von der 5'UT-Region von HCV abgeleitet sind, durch ein Cap-abhängigen Mechanismus translatiert werden, und dass die 5'-nicht kodierende Region von HCV kein IRES Element aufweist.

BEISPIEL 6

Translation von dicistronischer mRNA in HUH7 Zellen.

[0073] Die mögliche Anwesenheit eines IRES in der 5'UT-Region von HCV wurde ferner durch Transfektion von HUH7 Zellen mit DNA-Konstrukten untersucht, die derart gestaltet wurden, dass sie eine dicistronische mRNA transkribierten. Somit wurde die 5'UT-Region der HCV-RNA als intercistronischer Platzhalter zwischen CAT als erstem Cistron und LacZ als zweitem Cistron angeordnet. Die verbundene DNA wurde in einen Expressionsvektor kloniert, in dem die Transkription durch den starken Enhancer-Promoter des hauptsächlichen, unmittelbaren frühen Gens (major immediate early gene) des Cytomegalovirus (CMV) angetrieben wird. Dicistronische Positiv- und Negativ-Kontrallvektoren, bei denen die 5'UT-Region von HCV durch die 5'UT-Region von Poliovirus und die 3'UT-Region des frühen Gens von SV40 (SV40 early gene) ersetzt wurden, wurden wie in **Fig. 5** dargestellt konstruiert.

[0074] Nach Transfektion in HUH7 Zellen führten alle drei Konstrukte zur Translation des ersten CAT-Cistrons in vergleichbarem Ausmaß. In **Fig. 6** sind die Enzymaktivitäten der drei Konstrukte in Form einer Balkengrafik zusammengefasst. Das dicistronische Konstrukt mit dem HCV-Leader führte nicht zur Translation des zweiten LacZ-Cistrons in einem Ausmaß, das vergleichbar mit dem des dicistronischen Kontrollkonstrukts war, welches

einen Poliovirus-Leader verwendete. Diese Daten unterstützen die früheren unter Verwendung von monocistronischen Konstrukten erhaltenen Belege, dass die 5'UT-Region vollständiger Länge des HCV-Genoms kein IRES enthält.

BEISPIEL 7

Translation von HCV-RNA Konstrukten in HeLa und HepG2 Zellen.

[0075] Transiente Transfektionsassays können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, die von der Zelllinie abhängig sind. Um sich zu versichern, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht auf HUH7 Zellen beschränkt waren, wurden die R1-, R7- und R8-Konstrukte in HeLa und HepG2 Zellen transfiziert. Die sich ergebenden Muster der CAT-Aktivität waren qualitativ ähnlich zu denen, die in HUH7 Zellen beobachtet wurden.

BEISPIEL 8

Die Kontrolle der Kontrollelemente der 5'UT-Region von HCV mit Antisense-Molekülen.

[0076] Verfahren zur Herstellung von Oligonukleotid-Analoga und Oligonukleotid-Derivaten sowie ihre Verwendung als antivirale Mittel werden unter anderem in PCT WO 88/07544 und PCT WO 91/16331 beschrieben.

[0077] Mit Schwefel behandelte (sulfurized) Oligonukleotid-Analoga werden gemäß der Lehre von PCT WO91/16331 zur Verwendung als Antisense-Mittel hergestellt. Ein Phosphorthioat-Oligonukleotid aus 23 Basen, das dem Antisense der Basen 1–23 von (SEQ ID NO: 1) entspricht, wird mittels des Phosphoramiditverfahrens mit einem automatisierten Synthesizer synthetisiert (Model 380B Applied Biosystems, Foster City, California). Es wird dem Standard-Syntheseprotokoll gefolgt, außer dass anstelle des Oxidationsschrittes ein Sulfurisierungsschritt ausgetauscht wird, wobei der Sulfurisierungsschritt dem Schritt des Einfügens des Caps vorangeht. Somit besteht die Synthese aus wiederholten Zyklen der Detritylierung, Kopplung, Sulfurisierung und Cap-Anbringung. Die Trennung des Endproduktes von der Synthesesäule und die Aufreinigung wird durch Standardverfahren erreicht.

[0078] Der Sulfurisierens-Schritt wird durchgeführt, indem man die wachsende Kette für eine Minute bei Raumtemperatur einer 0,2 M Lösung von O,O-Diisopropylphosphordithiosäure-Disulfid in Pyridin aussetzt. Es wird angenommen, dass die Ausbeute an Trityl-Kation, das während der Detritylierungsschritte freigesetzt wird, durchschnittlich 99% beträgt. Die Trityl-Ausbeute ist sowohl ein Maß für die Kopplungseffizienz als auch ein Maß für die Sulfurisierung, da nicht sulfurisierte oder oxidierte trivalente phosphorartige Verknüpfungen im Oligonukleotid labil gegenüber einer Spaltung während der Detritylierung sind.

[0079] Das dem Antisense der Basen 1–23 von (SEQ ID NO: 1) entsprechende 23mer wird von dem Träger abgespalten, und die Schutzgruppe wird bei 55°C 6 Stunden mit konzentriertem Ammoniumhydroxid entfernt. Das tritylierte Oligonukleotid wird mit mittels HPLC isoliert, detrityliert und als Natriumsalz gefällt. Das Phosphorthioat-Analog ist gegenüber normalerweise in Zellen vorliegenden Nukleasen resistent.

[0080] Es wird angenommen, dass mit Konzentrationen des Phosphorthioat-Oligomers kultivierte Zellen gegenüber viraler Infektion mit HCV bei einer Konzentration von bis zu 0,5 mM resistent sind.

[0081] Es wird angenommen, dass das 23mer Oligonukleotid-Analog, das komplementär zu den Sequenzen 1–23 der Sense-RNA ist, die Translation von HCV-Boten-RNA durch Bindung an die Haarnadelkonfiguration und Stabilisierung derselben verringert.

BEISPIEL 9

Kontrolle der 5'UT-Region unter Verwendung eines Phosphorthioat-Oligonukleotid-Analogs, das komplementär zu der Pestivirus-Homologiebox IV ist.

[0082] Dieses Beispiel nutzt eine Sequenz aus 28 Nukleotiden, die den Sequenzen der Pestivirus-Homologiebox IV entspricht. In Übereinstimmung mit der internationalen Patentanmeldung PCT WO88/07544 wird ein Phosphorthioat-Oligonukleotid-Analog synthetisiert, das komplementär zu den Basen 291 bis 318 von (SEQ ID NO: 1) ist.

[0083] Die Phosphorthioate der vorliegenden Erfindung werden in einem Applied Biosystems 380-B DNA-Synthesizer auf eine Art synthetisiert, die dem Synthesezyklus für normale Phosphat-Oligonukleotide unter Verwendung von O-Mathylphosphoramidit ähnelt. Der Hauptunterschied liegt in den Reagenzien, die während des Oxidationsschrittes verwendet werden.

[0084] Eine 5%ige Schwefellösung, die aus 7,5 Gramm elementaren S_8 Schwefel besteht, der zunächst in 71 ml Kohlenstoffdisulfid und 71 ml Pyridin und 7,5 ml Triethylamin gelöst wurde, wird als Oxidierungsreagenz verwendet. Das Gesamtvolumen reicht für eine Synthese eines 30mers auf 3 Säulen aus.

[0085] Vor und nach dem Oxidationsschritt wird die Säule wiederholt mit einer 1:1 Lösung von Kohlenstoffdisulfid und Pyridin gewaschen, um jeglichen restlichen Schwefel zu entfernen, der sich in den Zuführungen absetzen könnte. Für eine Synthese eines 30mers auf 3 Säulen sollte ein Gesamtvolumen von 380 ml dieser Lösung ausreichend sein. Die Lösungen sollten so wasserfrei wie möglich sein und sollten für jede neue Synthese neu hergestellt werden.

[0086] Die Schwefel-Oxidation verläuft nicht so schnell wie die Jod-Oxidation und bedarf daher eines Warteschrittes von 450 Sekunden während des Synthesezyklus, im Vergleich zu 30 Sekunden für den Warteschritt bei der Jod-Oxidation. Zusätzlich wird die Endbehandlung leicht verändert, indem das reverse Spülen 5 Sekunden länger als normal (insgesamt für 10 Sekunden) beibehalten wird, um die Entfernung jeglicher resultierender Salze, die in Methanol gelöst sind, nachdem Thiophenol auf die Säule gegeben wurde, zu gewärleisten.

[0087] Das Phosphorthioat-Nukleinsäure-Analog aus 28 Nukleotiden wird synthetisiert, indem man den Oxidationszyklus an der notwendigen Stelle automatisch ändert. Nach Abspaltung von der Säule und Deblockierung in wässrigem Ammonium (60°, 10 Stunden) werden Phosphorthioat-Oligomere und Block-Copolymere mittels Reverse-Phase-HPLC (PRP-1 Säule, 1% Triethylammoniumacetat-Puffer, pH 7-Acetonitril (20%, auf 40% bei 20 Minuten erhöht)) gereinigt, und die Lösung wird mit zwei gleichen Volumina Ethylacetat extrahiert, in Trockeneis gefroren und lyophilisiert.

[0088] Die Feststoffe werden in 0,3 ml 1 M NaCl gelöst, und das Produkt wird durch Hinzufügung von 3,5 Volumen reinem Ethanol gefällt. Die Acetatsalze einiger Phosphorthioat-Oligomere, insbesondere des Homopolymers dC_{28}, sind extrem unlöslich in 1 M NaCl. Die Einführung einer kleinen Menge Ammoniumdampf (nicht wässrigem Ammonium) mit einer Pasteur-Pipette löst alle Feststoffe auf.

[0089] Es wird angenommen, dass Zellen, die in Kontakt mit Lösungen gebracht werden, die 0,5 mM Konzentrationen des 28-Nukleotid-Analogs enthalten, eine Resistenz gegenüber einer HCV-Infektion oder einer HCV-Expression von Virusproteinen zeigen.

BEISPIEL 10

Kontrolle der 5'UT-Region unter Verwendung von AS5-Antisense Molekülen.

[0090] Ein 24mer-Antisense-Oligonukleotid, das als AS5 bezeichnet wurde, und das an die Nukleotide 277–300 der 5'UT-Region der HCV-Region bindet, wurde wie oben beschrieben mit der folgenden Sequenz synthetisiert:

5' CCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC 3' (SEQ ID NO: 2)

[0091] AS5-PO bezeichnet das AS5-Oligonukleotid, das normale Phosphodiester-Verknüpfungen aufweist. AS5-PS bezeichnet das AS5-Oligonukleotid, in dem alle Verknüpfungen zwischen den Nukleosiden Phosphorthioat-Verknüpfungen sind, und das wie oben in Beispiel 9 beschrieben synthetisiert wird. AS5-3' CHOL-PS und AS5-3' CHOL-PO bezeichnen jeweils die AS5'-PS- und -PO Oligonukleotide, in denen am 3'-Ende des Moleküls ein Cholesterylrest hinzugefügt wird; sie wurden von Lynx Pharmaceuticals (Foster City, CA) synthetisiert. Die Cholesterylgruppe kann auch durch die vorliegend beschriebenen Verfahren am 3'-Ende hinzugefügt werden.

[0092] Die Antisense-Oligonukleotide (ASOs) wurden in dem folgenden Assay getestet, um ihre Fähigkeit zu bestimmen, die durch die 5'UT-Region von HCV kontrollierte Translation zu inhibieren. HUH7 Zellen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben kultiviert. Verschiedene Antisense-Moleküle (AS5-PO, AS5-PS, AS5-3' CHOL-PS und eine von Herpes simplex Virus (HSV) abgeleitete 21-mer-Kontroll-Sequenz in -PO, -PS und 3'-CHOL-Ausführungsformen) wurden dem HUH7-Zellkulturmedium in unterschiedlichen Endkonzentrationen von 0,1 bis 1,0 µM hinzugefügt und 12–24 Stunden inkubiert.

[0093] Nach Inkubation mit dem ASO wurden die Zellen dann mit Test-RNAs (R6- und SVCAT-RNA, wie in Beispiel 5 und in den Fig. 2 und Fig. 3 beschrieben) wie folgt transfiziert: 2–4 µg jeder RNA wurden mit 15 µg Lipofectin (Gibco-BRL) in 200 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung gemischt, 15 Minuten inkubiert und wie oben in Abschnitt F unter Material und Methoden beschrieben zu den Zellen gegeben. Die CAT-Aktivität wurde wie oben in Abschnitt F beschrieben getestet (C. M. Gorman et al., Mol. Cell. Biol. (1982) 2: 1044–1051). Die Ergebnisse sind in Fig. 7 dargestellt.

[0094] Die Spalten 2 und 11–13 enthalten SVCAT-Matrizen-RNA, während Spalten 3–9 und 14–18 R6-Matrizen-RNA enthalten. Spalten 1–3, 10–11 und 14 sind Kontrollen ohne ASO-Inkubation. Die restlichen Spalten enthalten wie angegeben AS5 oder HSV-Kontroll-ASOs. Die Daten zeigen, dass die AS5-3' CHOL-PO und AS5-3' CHOL-PS ASOs die CAT-Transkription und -Translation unter Kontrolle der 5'UT-Region von HCV spezifisch inhibieren und eine solche Transkription und Translation unter Kontrolle der SV40-Promoter-Region nicht inhibieren.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Jang H. Han, Richard R. Spaete, Byoung J. Yoo, Byung S. Suh, Mark J. Selby, Michael Houghton, Michael S. Urdea

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR KONTROLLE DER TRANSLATION VON HCV-PROTEINEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) KORRESPONDENZ-ADRESSE:
- (A) ADRESSAT: Chiron Corporation
- (B) STRASSE: 4560 Horton Street
- (C) STADT: Emeryville
- (D) STAAT: Kalifornien
- (E) LAND: USA
- (F) PLZ: 94608

(v) COMPUTER-LESBARE FORM:
- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette 5,25 Inch
- (B) COMPUTER: IBM kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS Version 3.3
- (D) SOFTWARE: WordPerfect 5.1

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG
- (A) ANMELDUNGSNUMMER: nicht verfügbar.
- (B) ANMELDETAG: nicht verfügbar
- (C) KLASSIFIKATION: nicht verfügbar

(vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG
- (A) ANMELDUNGSNUMMER: 07/952,799
- (B) ANMELDETAG: 28. September 1992

(viii) INFORMATION ZU ANWALT/VERTRETER:
- (A) NAME: Goldman, Kenneth M.
- (B) REGISTRIERUNGSNR: 34,174
- (C) REFERENZ/AKTENNR: 0044.002

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:
- (A) TELEFON: (510) 601-2719
- (B) TELEFAX: (510) 655-3542
- (C) TELEX: nicht verfügbar

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 341 Nukleotide
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANG-EIGENSCHFATEN: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE: (ATCC # 40394)
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: ns5hcv1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1

GCCAGCCCCC TGATGGGGGC GACACTCCAC CATGAATCAC 40
TCCCCTGTGA GGAACTACTG TCTTCACGCA GAAAGCGTCT 80
AGCCATGGCG TTAGTATGAG TGTCGTGCAG CCTCCAGGAC 120
CCCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG CGGAACCGGT 160
GAGTACACCG GAATTGCCAG GACGACCGGG TCCTTTCTTG 200
GATCAACCCG CTCAATGCCT GGAGATTTGG GCGTGCCCCC 240
GCAAGACTGC TAGCCGAGTA GTGTTGGGTC GCGAAAGGCC 280
TTGTGGTACT GCCTGATAGG GTGCTTGCGA GTGCCCCGGG 320
AGGTCTCGTA GACCGTGCAC C 360

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 24 Nukleotide
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGEIGENSCHFATEN: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

CCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC

Patentansprüche

1. Verwendung einer nicht natürlich vorkommenden ersten Nukleinsäure mit einer Sequenz, die komplementär zu der Sequenz innerhalb der 5'-untranslatierten (5'UT) Region des Hepatitis C-Virus (HCV) ist, welche die Basen 277 bis 300 bezogen auf SEQ ID NO: 1 umfasst, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer HCV-Infektion durch Kontrollieren der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der die erste Nukleinsäure die Sequenz von SEQ ID NO: 2 hat.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, bei der die Nukleinsäure ein Phosphorthioat-Nukleinsäureanalog

ist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die erste Nukleinsäure ferner einen Cholesterylrest umfasst, der an das 3'-Ende gebunden ist.

5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, die ferner das Transkribieren einer nicht natürlich vorkommenden zweiten Nukleinsäure umfasst, welche einen Promotor umfasst, der in funktionsfähiger Weise mit einer Sequenz verknüpft ist, welche komplementär zu der ersten Nukleinsäure ist.

6. Verfahren zum Kontrollieren der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure in vitro, bei dem man:
eine nicht natürlich vorkommende erste Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 bereitstellt; und
die HCV-Nukleinsäure mit der ersten Nukleinsäure unter Bedingungen in Kontakt bringt, bei denen die erste Nukleinsäure und die HCV-Nukleinsäure in der Lage sind, ein Hybridisierungsprodukt zu bilden, wobei das Hybridisierungsprodukt das Ausmaß der Translation der HCV-Nukleinsäure verändert.

7. Verfahren nach Anspruch 6, das ferner das Transkribieren einer nicht natürlich vorkommenden zweiten Nukleinsäure umfasst, welche einen Promotor umfasst, der in funktionsfähiger Weise mit einer Sequenz verknüpft ist, welche komplementär zu der ersten Nukleinsäure ist.

8. Zusammensetzung zum Kontrollieren der Translation von HCV-Proteinen aus HCV-Nukleinsäure, die die erste Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

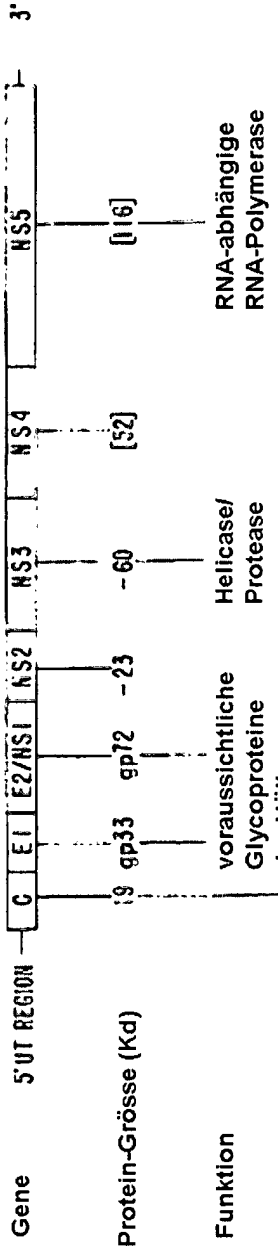


FIG. 1

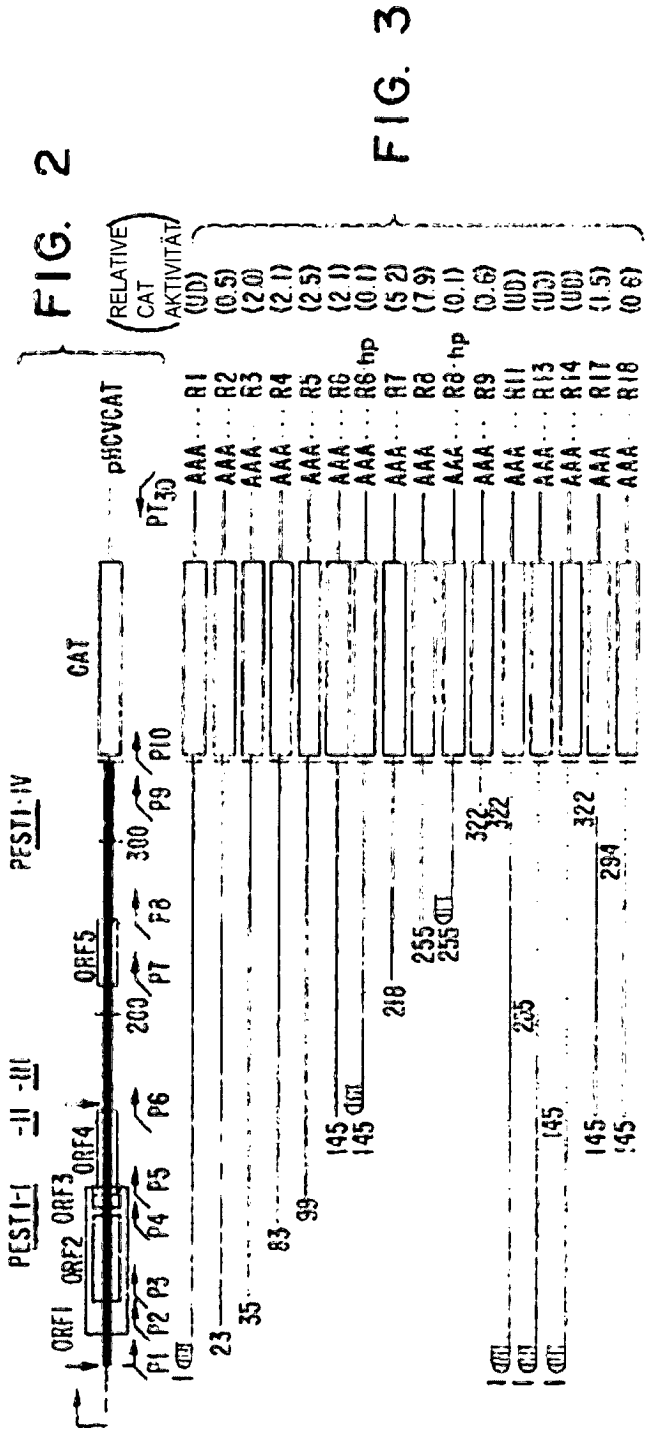


FIG. 2

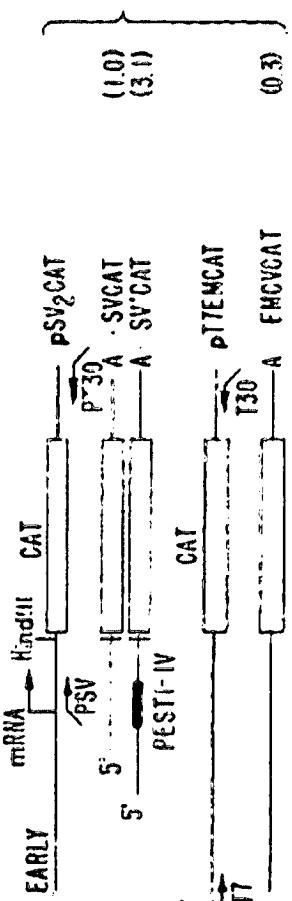


FIG. 3

FIG. 4

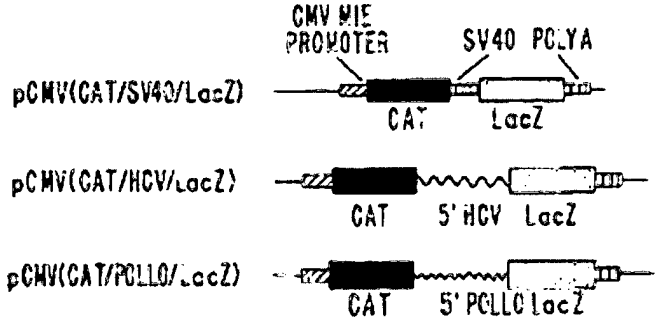

CMV MIE
PROMOTER
SV40 POLYA
pCMV(CAT/SV40/LacZ)
CAT
LacZ
pCMV(CAT/HCV/LacZ)
CAT
5' HCV
LacZ
pCMV(CAT/POLLO/LacZ)
CAT
5' POLLO
LacZ

FIG. 5

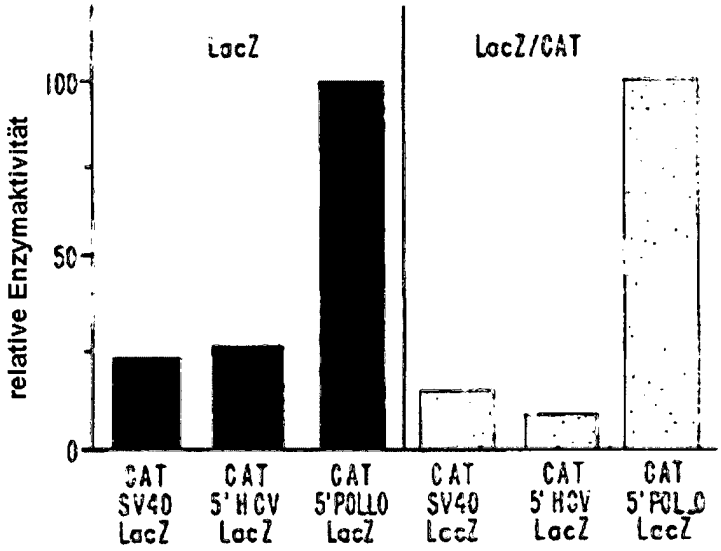
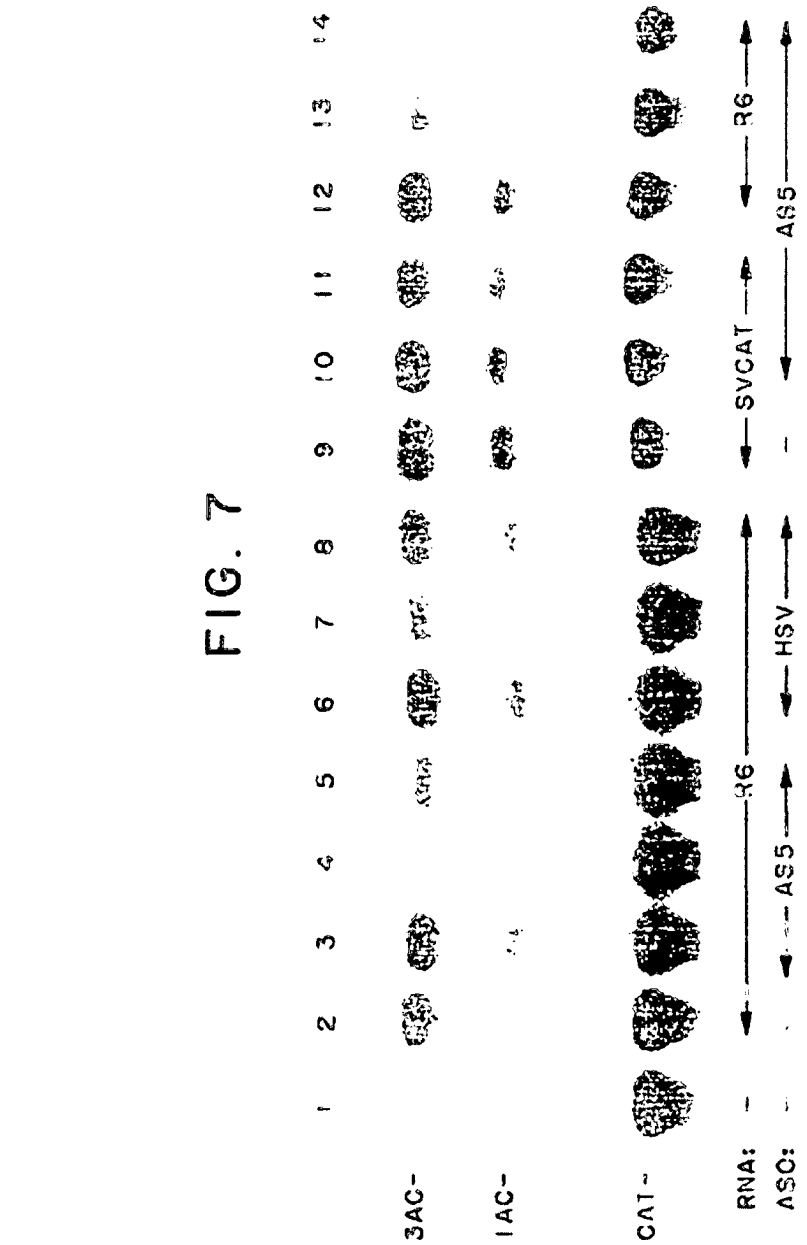

LacZ
LacZ/CAT
relative Enzymaktivität
100
50
0
CAT SV40 LacZ
CAT 5' HCV LacZ
CAT 5'POLLO LacZ
CAT SV40 LacZ
CAT 5' HCV LacZ
CAT 5' POLLO LacZ

FIG. 6

FIG. 7


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
3AC-
1AC-
CAT-
RNA:
ASC:
R6
AS5
HSV
SVCAT
R6
AS5