

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Februar 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/013349 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/37**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007680

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Juli 2003 (16.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 34 418.3 29. Juli 2002 (29.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE];
51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHMIDT, Thorsten**
[DE/DE]; Katernberger Str. 14, 42115 Wuppertal (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING AND EVALUATING VIRUS ENZYMES IN HTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG UND BEURTEILUNG VON VIRUSENZYMEN IM HTS

(57) Abstract: The invention relates to cell culture systems used to examine the activity of viral proteases NS2/3 and NS3/4A of the hepatitis C virus (HCV) and to identify substances in high throughput screening (HTS) which modulate the activity of the proteases. The system has a modular design and makes examination possible for cis-cleavage activity and trans-cleavage activity according to protease type and structure.

(57) Zusammenfassung: Offenbart werden Zellkultursysteme zur Untersuchung der Aktivität der viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A des Hepatitis C Virus (HCV) und zur Identifizierung von Substanzen im Hochdurchsatzscreening (HTS), welche die Aktivität der Proteasen modulieren. Das System ist modular aufgebaut und bietet daher die Möglichkeit, sowohl eine "cis" als auch eine "trans"-Spaltungsaktivität je nach Proteasetyp und Aufbau zu untersuchen.



WO 2004/013349 A2

Verfahren zur Untersuchung und Beurteilung von Virusenzymen im HTS

5 Offenbart werden Zellkultursysteme zur Untersuchung der Aktivität der viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A des Hepatitis C Virus (HCV) und zur Identifizierung von Substanzen im Hochdurchsatzscreening (HTS), welche die Aktivität der Proteasen modulieren. Das System ist modular aufgebaut und bietet daher die Möglichkeit, sowohl eine „cis“ als auch eine „trans“-Spaltungsaktivität je nach Proteasentyp und Aufbau zu untersuchen.

10

Virale Infektionen, beispielsweise verursacht durch das Human Immunodeficiency Virus (HIV), das Hepatitis C Virus (HCV), das Human Cytomegalie Virus (HCMV) und die damit verbundenen Erkrankungen wie AIDS, Hepatitis, Leberzirrhose, Retinitis und Erblindung, Pneumonie, multiples Organversagen, stellen für die
15 Gesundheit der Weltbevölkerung ein sehr großes Problem dar. So sind z.B. über 100 Millionen Menschen weltweit mit dem Hepatitis C Virus infiziert, wobei ein hoher Prozentsatz der infizierten Personen eine chronische Leberinfektion entwickelt und an den Folgen der Erkrankung wie Leberzirrhose, hepatozelluläres Karzinom verstirbt [Zein, N. (2000)]. Die Suche nach neuen antiviralen Wirkstoffen gestaltet
20 sich aufgrund der hohen Pathogenität und Komplexität der Erreger als sehr schwierig. In vielen Fällen ist eine schnelle Identifizierung von Wirksubstanzen nicht möglich, da eine Untersuchung der Vermehrung der Viren im „Hoch Durchsatz Screening“ (High Throughput Screening, HTS) aus sicherheitstechnischen Erwägungen - Erfordernis des L2 oder L3 Standards der Laboratoriumssicherheit- oder
25 experimentellen Gründen nicht möglich ist. So gibt es z.B. zum derzeitigen Zeitpunkt kein verlässliches Zellkultursystem, in welchem die Vermehrung des HCV Virus nachgestellt werden kann. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, besteht darin, die einzelnen enzymatischen Vorgänge wie beispielsweise die DNS-Vermehrung, die Proteinspaltung, die Virusbildung separat zu betrachten und getrennt
30 von einander zu untersuchen. Neben den viralen Polymerasen nehmen bei der Virusvermehrung auch virale Proteasen wie beispielsweise HCV NS2/NS3, NS3,

NS3/4A eine Schlüsselrolle ein, da sie für die virale Replikation essentiell sind und eine hohe virusabhängige Spezifität aufweisen. Virale Proteasen bilden somit einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe [Wang et al., (2000)].

5

Das HCV Virus ist ein umhülltes positiv-Strang RNS-Virus, das zur Familie der Flaviviren gehört. Das RNA Genom hat eine Größe von ca. 9500 Ribonukleotiden und kodiert für ein einzelnes Polyprotein mit ca. 3000 Aminosäuren, das *in vivo* durch zelluläre und virale Proteasen in 10 einzelne Proteine gespalten wird. Dabei unterscheidet man zwischen den Strukturproteinen (C, E1, E2, P7) und den Nicht-
10 strukturproteinen (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b). Die Strukturproteine, welche durch Spaltung von zellulären Proteasen aus dem Polyprotein hervorgehen, bilden die spätere Hülle des Virus. Die Nicht - Strukturproteine, welche die Vermehrung der viralen DNS katalysieren, werden hingegen durch die zwei viralen
15 Proteasen NS2/3 und NS3/4A gespalten. Dabei kommt es in einem ersten Schritt durch die Metalloprotease NS2/NS3 zu einer autokatalytischen Spaltung zwischen den beiden Proteinen NS2 und NS3 („cis“-Spaltung I). In einem weiteren Schritt spaltet sich die nun aminoterminal freiliegende Protease NS3 (Serinprotease) von dem Protein NS4a ab („cis“- Spaltung II). Nachfolgend bildet die Protease NS3 mit
20 dem kleinen NS4a Protein einen Komplex und katalysiert die Spaltung zwischen den restlichen Nicht - Strukturproteinen („trans“-Spaltung III zwischen NS4a/NS4b, NS4b/NS5a und NS5a/NS5b) [Übersicht siehe Bartenschlager, (1999)].

Die zentrale Stellung der Proteasen NS2 und NS3 bzw. NS3/4A im Verlaufe der
25 HCV Virusreplikation macht diese zu einem sehr interessanten Angriffspunkt auf der Suche nach Aktivitätsmodulatoren, die therapeutisch eingesetzt werden könnten. Allerdings ist, wie bereits erwähnt, kein zelluläres Vermehrungsmodell verfügbar, das im Hochdurchsatzverfahren einzusetzen ist, und auch biochemische *in vitro* Assays brachten bisher keinen Erfolg.

30

Obwohl bereits eine Vielzahl an Systemen zur Untersuchung der HCV Proteasen beschrieben sind, weisen diese jedoch verschiedene Limitationen auf, die einen Einsatz im Hochdurchsatzverfahren nicht ermöglichen bzw. aus wissenschaftlichen Gründen nicht für sinnvoll erachten lassen.

5

Ein System zur Messung der NS3/4A Proteaseaktivität unter Verwendung des viralen Sindbis Replikationssystems wird von Cho, Y.G. et al., (1997) beschrieben. Dabei wird ein Hybridkonstrukt, bestehend aus der HCV Protease NS3/4A, der NS4a/4b Spaltstelle und dem Sindbis Core Protein in Zellen eingebracht. Die Bildung von Sindbis Viruspartikeln ist somit von der Spaltung der NS4a/4b Schnittstelle und der Freisetzung des core-Proteins abhängig. Ein sehr großer Nachteil dieses Systems ist, dass die Proteaseaktivität indirekt über den zytopathischen Effekt der entstehenden rekombinanten Sindbis Viren gemessen werden muss, der eine längere Inkubationszeit voraussetzt, dessen Quantifizierung schwierig ist und der im Hochdurchsatzverfahren nur schwer gemessen werden kann. Des weiteren bietet dieses komplexe System eine Vielzahl von Angriffspunkten für unspezifische, d.h. nicht proteaseabhängige Inhibitoren, da auch Wirksubstanzen, die unabhängig von der Proteasefunktion die Virusbildung verhindern, als potentielle Wirksubstanzen auftreten würden. Dadurch wird die Zahl der genauer zu untersuchenden Substanzen stark erhöht, was wiederum eine zeit- und kostenaufwändige Nachtestung der Substanzen erforderlich machte. Außerdem ist eine Messung der NS2/3 Proteaseaktivität in diesem System nicht möglich.

15

20

25

30

Des weiteren beschreiben Cho, Y.G. et al., (1998) einen Proteaseassay unter Verwendung eines Expressionsvektors, bestehend aus der NS3/4A Protease und der NS4a/4b Schnittstelle fusioniert an das Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) Gen. Bringt man dieses Konstrukt in eukaryontische Zellen ein, kommt es durch die NS3/4A vermittelte Spaltung der NS4a/4b Schnittstelle zur Freisetzung der alkalischen Phosphatase, die in den Überstand sezerniert wird und gemessen werden kann. Ein großer Nachteil dieses Systems liegt darin, dass die Menge an freigesetzter Phosphatase linear proportional der Menge exprimierter und gespaltener Fusions-

proteine ist und somit das Signal keine Verstärkung erfährt und zu gering für eine Messung im Hochdurchsatzverfahren ist. Außerdem bietet der notwendige zelluläre Export der Phosphate und die damit verbundenen involvierten zellulären Vorgänge neben der Transkription und Translation einen weiteren Angriffspunkt für unspezifische Inhibitoren, was eine aufwendige Nachtestung erforderlich macht. Auch in
5 diesem Fall ist eine Messung der NS2/3 Proteaseaktivität nicht möglich.

Ein System, in welchem verschiedene Proteasekonstrukte und entsprechend zu spaltende Zielkonstrukte über rekombinate Baculoviren in Insektenzellen eingebracht
10 werden und die Spaltungsprodukte immunologisch im „Westernblot“ nachgewiesen werden können beschreiben Overton, H. et al., (1995). Zum einen hat dieses Verfahren den Nachteil, dass die Proteasereaktion in Insektenzellen und nicht in Säugerzellen nachgestellt wird und somit mögliche wichtige zelluläre Faktoren nicht berücksichtigt werden, zum anderen ist die Nachweismethode nicht für ein Hochdurchsatzscreening (HTS-Screening) geeignet.
15

Hirowatari, Y. et al. (1995) entwickelten eine Methode, bei der zwei Expressionskonstrukte in Säugetierzellen eingebracht werden. Das eine Konstrukt beinhaltet - in Kombination mit dem DHFR Gen - das NS2/3 Proteasegen bzw. Fragmente davon,
20 an das über die NS5a/5b Schnittstellensequenz der Transaktivator Tax (HTLV-1) fusioniert ist. Das zweite Konstrukt enthält ein Reportergen (Cat), welches über einen Tax abhängigen Promotor reguliert wird. *In vivo* führt die Spaltung der NS5a/5b Schnittstelle durch die NS2 oder NS3 Protease zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors Tax, der dann die Expression des Reporters hervorrufen kann. Ein großer
25 Nachteil dieses Systems liegt darin, dass nicht zwischen der Aktivität der NS2 und NS3 Protease zu unterscheiden ist. Darüber hinaus wird in diesem System bei der Untersuchung der NS3 Aktivität nicht die modulatorische Funktion des NS3 Protease-Kofaktors NS4a berücksichtigt, da er in diesem System nicht vorhanden ist und somit wirksame Inhibitoren der NS3/4A vermittelten Transspaltung nicht identifiziert werden können.
30

In WO 98/00548 wird die Generierung von hybriden Picornaviren, deren Replikation abhängig von der Proteaseaktivität von NS3 ist, offenbart. Da die NS3 Aktivität indirekt über die Anzahl gebildeter Viren mittels eines zellulären Plaque-Assays quantifiziert wird, ist auch dieses System nicht im HTS-Verfahren durchführbar.

5

Mit einem System der Firma Agouron Pharma (WO 00/08469) wird die Aktivität der NS3 Protease über die Sekretion der sekretorischen alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Auch hier ist nachteilig, dass beispielsweise intrazelluläre Transportvorgänge neben der Transkription und Translation einen weiteren Angriffspunkt für unspezifische Inhibitoren darstellen, was eine aufwendige Nachtestung zur Aus-

10 sonderung unspezifischer Ergebnisse erforderlich macht.

Die gleichen Nachteile weist auch das System der Firma Vertex auf (US 5861267), welches die Proteaseaktivität von NS3 durch Korrelation mit der Menge von sezerniertem IL-1 quantifiziert. Ein Nachteil dieses Systems ist, dass nur die Protease NS3 nicht aber NS2/3 bzw. NS3/4A nachgewiesen werden können. Zudem ist die

15 Menge des sezernierten IL-1 Proteins linear proportional zur Proteaseaktivität, so dass keine für die Durchführung im HTS-Verfahren ausreichende Verstärkung erzielt wird.

20

Die Schrift WO 00/66623 offenbart ein zelluläres Surrogatsystem bestehend aus einem chimären Protein zwischen NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b und einem tetrazyclinabhängigen Transkriptionsfaktor, der nach einer NS3 abhängigen Spaltung freigesetzt wird und die Expression eines Reporters in den Zellen bewirkt. Auch hier

25 ist ein Nachweis der NS2/3 Proteasereaktion nicht möglich. Außerdem ist durch Zugabe von Tetrazyclin eine zusätzliche Substanz in dem System, welche die Ergebnisse verfälschen kann.

Die aufgeführten Beispiele zeigen die Grenzen der gegenwärtig verfügbaren Systeme und verdeutlichen den Bedarf für die Entwicklung solcher neuen Systeme, die es

30

ermöglichen, eine große Anzahl chemischer und biologischer Substanzen auf ihre Aktivität an HCV Proteasen zu untersuchen.

5 Es besteht deshalb dringender Bedarf, zelluläre Systeme zu entwickeln, die die Untersuchung der Proteasen in ihrem biologischen Umfeld – beispielsweise in Hepatozyten oder Hepatomazellen – ermöglichen, um so den Einfluss zellulärer Faktoren zu berücksichtigen, und die es gleichzeitig erlauben, die verschiedenen Proteaseaktivitäten - NS2/3 und NS3/4A - separat zu betrachten, um aufgrund der verschiedenen enzymatischen Kinetiken der Proteasereaktionen und deren Charakterisierung etwaige Wirksubstanzen einfacher und schneller auffinden zu können.
10 Weiter müssen solche neuen Systeme in ihrer Durchführung und Auswertung einfach, schnell und sicher – also unter S1/L1 Bedingungen durchführbar - sein, um ihre Durchführung im Hochdurchsatzverfahren zu ermöglichen.

15 Die vorliegende Anmeldung betrifft zelluläre Systeme, die es möglich machen, die Wirksamkeit chemischer Substanzen auf die verschiedenen HCV Proteasen separat, schnell und einfach, entsprechend den vorstehend genannten Anforderungen im Hochdurchsatzverfahren, zu untersuchen.

20 Ein Ansatzpunkt bei der Entwicklung der nachfolgend beschriebenen Systeme gründet auf der Überlegung, dass transkriptionelle Regulatoren - transkriptionelle Regulatoren der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine kodieren, die die Expression eines Reportergens regulieren, also die Expression eines Reportergens erhöhen oder erniedrigen - nur dann ihrer natürlichen Funktion nachkommen können, wenn sie betreffend ihre DNA bindende und regulatorische
25 Domäne funktional sind und im richtigen Zellkompartiment, bei Eukaryonten also dem Zellkern, lokalisiert sind. Die enzymatische Wirkweise von Proteasen bietet die Möglichkeit, sowohl die Funktionalität als auch die Lokalisation von Zielproteinen zu modulieren. Ebenso wie bei den Transkriptionsfaktoren ist auch die Funktion und
30 Aktivität der viralen Proteasen von deren zellulärer Lokalisation abhängig, da weitere, beispielsweise gewebsspezifische co-Faktoren, die Reaktion modulieren.

Die nachfolgenden Systeme berücksichtigen die spezifischen Eigenheiten der verschiedenen Proteasen und ermöglichen, den nativen Prozess, der während der viralen Replikation abläuft, so nah wie möglich nachzustellen.

- 5 Dazu werden zwei Nachweissysteme erstellt, die in Abhängigkeit der Proteaseaktivität einen funktionalen Transkriptionsregulator ausbilden. Funktionale Transkriptionsregulatoren der Erfindung sind regulatorisch wirkende Proteine oder Nukleinsäuren, die im Zellkern lokalisiert sind und über die Bindung an ein Reporter-gen die Expression dieses Reportergens modulieren. Es wird ein Expres-
- 10 sionskonstrukt kloniert, das für ein Fusionsprotein kodiert, welches sich aus mindestens drei regulatorischen Komponenten - den Modulen I-III - zusammensetzt. Modul I der Erfindung bewirkt die Delokalisation des Transkriptionsregulators, es ist das Transkriptionsfaktor - inhibitorische Modul. Modul II der Erfindung ist eine proteasespezifische trans-spaltende Schnittstelle oder eine cis-spaltende funktionale
- 15 Protease. Modul III der Erfindung ist ein Transkriptionsregulator, der die Expression des Reportergens moduliert .

- Der Begriff modulieren, wie er in diesem Zusammenhang gebraucht wird, bezieht sich auf das Herbeiführen einer Änderung der Aktivität, der physikochemischen
- 20 Eigenschaften oder der funktionellen biologischen, enzymatischen, immunologischen, regulatorischen Wirkung eines Proteins. Modulation kann herbeigeführt werden durch Einwirkung auf das Protein oder durch Einwirkung auf die das Protein kodierenden Nukleinsäuren. Modulation kann die funktionelle Aktivität eines Proteins erhöhen oder erniedrigen und seine physikochemischen Eigenschaften wie
- 25 beispielsweise die Bindungsstärke gegenüber anderen Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Substanzen, verändern.

- Wesentlich für das Erreichen der für das erfindungsgemäße Verfahren typischen Nachweisempfindlichkeit ist, dass durch die richtige Auswahl der für Modul I
- 30 geeigneten Bausteine eine Delokalisation des Moduls III in den Zellkern nur nach spezifischer Aktivierung – der Spaltung von Modul II - erfolgen kann. Erfin-

5 dungsgemäß geeignete Bausteine für Modul I sind z.B. Membranlokalisationssignale wie beispielsweise Oberflächenproteine, Proteine mit Rezeptoreigenschaft, Transmembrandomänen, modifizierte, beispielsweise farnisylierte Proteine. Gleichermaßen kann jede Art von Transkriptionsfaktor-inhibitorischem Modul eingesetzt werden, welches die Funktion des Transkriptionsregulators inhibiert bis es vom Transkriptionsregulator abgespalten wird. Dazu eignen sich beispielsweise solche Proteine oder Proteinfragmente, die zwar die Translokation in den Zellkern nicht beeinflussen, die Bindung des Transkriptionsregulators an die Zielsequenz aber unterbinden.

10

Nachweissystem für die NS3/4A vermittelte „Trans“-Spaltung (Abbildung 1/7)

15 Zur Analyse der „Trans“-Spaltungsaktivität wird neben dem vorstehenden modularen Expressionskonstrukt, welches als Modul II die Transspaltungsschnittstelle beinhaltet, und dem Reportergen als drittes Konstrukt, ein Expressionsplasmid der zu untersuchenden Protease benötigt. Bringt man diese Konstrukte zusammen in Zellen ein und werden die verschiedenen Proteine durch ein nicht zytopathisches Expressionssystem in der Zelle gebildet, kommt es infolge der Proteaseaktivität zur Trennung des Transkriptionsfaktor-inhibitorischen Moduls (I) von dem Transkriptionsregulator, welcher dann in den Zellkern gelangen und die Expression des Reportergens modulieren kann, welches wiederum gemessen und quantifiziert werden kann. In Gegenwart einer inhibitorischen Substanz wiederum wird das Fusionsprotein nicht gespalten und der Transkriptionsregulator kann nicht in den Zellkern gelangen.

20

Nachweissystem für die membranassozierte NS2/3 „cis“-Spaltung (Abbildung 2/7)

25 Auch hier kommt das vorstehend beschriebene chimäre Expressionskonstrukt zum Einsatz, wobei in diesem Fall die Transspaltungsschnittstelle (Modul II) durch eine komplette Protease ersetzt wird, die membranlokalisiert eine autokatalytische

30

Enzymfunktion beispielsweise NS2/3 aufweist. Zusammen mit einem Reporter-
konstrukt kommt es nach einer Transduktion der Plasmide in Säugetierzellen zur
Expression des entsprechenden chimären Fusionsproteins, welches sich, an der
Membran assoziiert, autokatalytisch spaltet und somit den Transkriptionsregulator
5 freisetzt, der in den Zellkern translozieren und die Expression des Reportergens
hervorrufen kann.

Die oben aufgeführten erfindungsgemäßen Systeme haben gegenüber den bisher
beschriebenen Entwicklungen zahlreiche Vorteile. Zum einen bietet der einfache und
10 modulare Aufbau die Möglichkeit, die Systeme den spezifischen Fragestellungen je
nach Proteasetyp anzupassen und die Proteasen separat in ihrer spezifischen Um-
gebung zu testen. Die Verwendung eines transkriptionell-regulierten Auslese-
verfahrens führt zur Erhöhung der Signalstärke, da eine durchgeführte Spaltung zu
mehrfacher Aktivierung (oder Repression) des Reportergens führt und die damit
15 verbundene Signalverstärkung die Durchführung im HTS ermöglicht.

Die Delokalisation des Transkriptionsregulators bewirkt eine sehr geringe Hinter-
grundaktivität, was wiederum einen großen Induktionsfaktor zur Folge hat, der
ebenfalls für eine Durchführung im HTS Verfahren notwendig ist, um bei gegebener
20 Streuung der Meßwerte eine Identifizierung wirksamer Substanzen zu ermöglichen.

Außerdem ist in Abhängigkeit von dem verwendeten Transduktionssystem - Trans-
fektion, stabile Zelllinien, virale Infektion - bereits nach kürzester Zeit eine Quanti-
fizierung unter Substanzzugabe möglich. So ist unter Verwendung eines viralen
25 Transfektionssystems wie beispielsweise rekombinanten Baculoviren, welche sich
durch eine hohe Infektionsrate in Hepatomazelllinien auszeichnen und der
Sicherheitsstufe S1/L1 zuzuordnen sind, bereits nach wenigen Stunden, im
allgemeinen 6 Stunden nach der Infektion der Zellen, eine Messung und Quanti-
fizierung der Proteaseaktivität im HTS Format möglich. Zusammenfassend ist fest-
30 zustellen, dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Untersuchung
der Aktivität viraler Proteasen im Hochdurchsatzscreening (HTS) an zellulären

Systemen bereitgestellt werden, die dadurch gekennzeichnet sind, dass Nachweissysteme verwendet werden, die in Abhängigkeit der Aktivität der viralen Proteasen einen funktionalen Transskriptionsregulator ausbilden oder die Ausbildung eines funktionalen Transskriptionsregulators ausnutzen, und zur Untersuchung der Aktivität von viralen Proteasen wie beispielsweise der viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A des Hepatitis C Virus (HCV) im Hochdurchsatzscreening (HTS) an zellulären Systemen verwendet werden können, und dadurch gekennzeichnet sind, dass Nachweissysteme verwendet werden, die in Abhängigkeit der Aktivität solcher viralen Proteasen, beispielsweise der viralen Proteasen von NS2/3 und NS3/4A einen funktionalen Transskriptionsregulator ausbilden. Verfahren der Erfindung sind deshalb alle Verfahren, in denen als Transkriptionsregulator ein Expressionskonstrukt verwendet wird, welches sich aus mindestens drei regulatorischen Einheiten zusammensetzt, wobei a) eine der regulatorischen Einheiten ein Membranlokalisationssignal ist und die Delokalisation des Transkriptionsregulators selbst bewirkt, b) eine der regulatorischen Einheiten eine proteasespezifische trans-spaltende Schnittstelle oder eine cis-spaltende funktionale Protease enthält, und c) eine der regulatorischen Einheiten die Expression eines Reportergens moduliert. Verfahren der Erfindung sind weiter alle vorstehend geschilderten Verfahren in denen ein Fusionsprotein enthaltend einen Rezeptor aus der Gruppe der CD-Rezeptoren, eine virale Proteaseschnittstelle der HCV – Protease NS3/4A, und der Transkriptionsregulator GalVP16, eingesetzt wird, sowie Verfahren in denen das Fusionsprotein aus der DNA Sequenz 8 oder einem ihrer Homologen generiert wird, sowie Verfahren, in denen ein Fusionsprotein enthaltend einen Rezeptor aus der Gruppe der CD-Rezeptoren, die virale HCV – NS2/3 Protease, oder den Transkriptionsregulator GalVP16, eingesetzt wird, oder Verfahren, in denen ein Fusionsprotein aus der DNA Sequenz 9 oder einem ihrer Homologen generiert wird sowie die Verwendung von Aktivitätsmodulatoren der Proteasen NS2 und NS3 bzw. NS3/4A die unter Anwendung der vorstehend geschilderten Verfahrens gefunden wurden, zur Herstellung von Arzneimitteln, die in der Prophylaxe und Therapie der HCV-Infektion verwendet werden können.

Kurzbeschreibung der Abbildungen:**Abbildung 1**

5 Schematische Darstellung des Systems zur Messung der NS3/4A vermittelten „Trans“-Spaltung

Abbildung 2

10 Schematische Darstellung des Systems zur Messung der NS2/3 vermittelten „Cis“-Spaltung

Abbildung 3

15 Schematische Darstellung der verschiedenen DNA Konstrukte, die generiert wurden. Die Expression der Proteine (Konstrukte A-F) erfolgt unter der Kontrolle des nicht zytopathischen CMV Promotors. Die schwarzen Kästen stellen Transmembrandomänen dar, und die spezifischen Proteasespaltstellen sind durch einen dicken Strich gekennzeichnet.

20 Abbildung 3a Fusionsprotein bestehend aus dem humanen CD8 Rezeptor (mit Transmembrandomäne, Transkriptionsfaktor-inhibitorischem Modul), der NS3/4A Spaltstelle zwischen NS5a und NS5b und dem Transkriptionsregulator GalVP16, der sich aus der DNA bindenden Domäne des Gal4 Proteins und der transaktivierenden Domäne des VP16 Proteins zusammensetzt.

25 Abbildung 3b HCV Protease NS3-Expressionskonstrukt

Abbildung 3c HCV Protease NS3/4A-Expressionskonstrukt

30 Abbildung 3d HCV Protease NS3/4A-Expressionskonstrukt, welches an der Aminosäureposition 1165 (des HCV Genoms) eine Punkt-

- 12 -

mutation aufweist (Serin zu Alanin), was zu einer Inaktivierung der Protease führt

5 Abbildung 3e Fusionsprotein bestehend aus dem humanen CD8 Rezeptor (mit Transmembrandomäne, Transkriptionsfaktor-inhibitorischem Modul), der NS2/3 Protease und dem Transkriptionsregulator GalVP16, der sich aus der DNA bindenden Domäne des Gal4 Proteins und der transaktivierenden Domäne des VP16 Proteins zusammensetzt.

10 Abbildung 3f Fusionsprotein bestehend aus dem humanen CD8 Rezeptor (mit Transmembrandomäne, Transkriptionsfaktor-inhibitorischem Modul), der NS2/3 Protease und dem Transkriptionsregulator GalVP16. Die Protease trägt an der Aminosäureposition 993 (des HCV Genoms) eine Punktmutation (Cystein zu Alanin), was zu einer Inaktivierung der Protease führt

15

 Abbildung 3g Reporterkonstrukt bestehend aus einem Gal4 abhängigen Promotor und dem Luziferasegen (firefly).

20

Abbildung 4

Nachweis der Funktionalität der Expressionskonstrukte mittels *in vitro* Translation. Das CD8-NS5a/b-GalVP16 Fusionsprotein (Konstrukt A) wurde in einer *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion radioaktiv markiert und danach mit der *in vitro* translatierten Protease (nicht radioaktiv) NS3 (Konstrukt B) bzw. NS3/4A (Konstrukt C) für 60 min inkubiert. Die Proteinansätze wurden durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Die Abbildung zeigt, dass nur in Anwesenheit des co- Faktors NS4a (Konstrukt A+C) eine Transspaltung des Konstruktes erfolgt.

30

Abbildung 5

Nachweis der Funktionalität der Expressionskonstrukte mittels *in vitro* Translation. Das CD8-NS2/3-GalVP16 Fusionsprotein wurde in einer *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion radioaktiv markiert und danach über eine SDS-Gel-

5 elektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Die Abbildung zeigt, dass nur die funktionelle NS2/3 Protease zu einer Spaltung des Fusionsproteins führt (Konstrukt E), wohin gegen die NS2/3 Mutante (Konstrukt F) sich nicht autokatalytisch spaltet (K1, Kontrollplasmid 1, welches für eines der zu erwartenden Spaltprodukte kodiert, hier NS3-GalVP16

10

Abbildung 6

Nachweis der Aktivität der Expressionskonstrukte und somit der Funktionalität der verschiedenen Systeme anhand einer transienten Transfektion der verschiedenen Konstrukte in die Hepatomazelllinie HepG2 und Messung der Luziferaseaktivität.

15

Abbildung 6a NS3/4A vermittelte „Trans“-Spaltung

Die Quantifizierung der Luziferasewerte zeigt, dass nur bei Kotransfektion der funktionellen NS3/4A Protease eine Luziferaseaktivität nachweisbar ist (A+C+G), jedoch nicht bei

20 NS3 (A+B+G) oder der inaktiven NS3/4A Mutante (A+D+G).

Abbildung 6b NS2/3 vermittelte „Cis“-Spaltung

Die Quantifizierung der Luziferasewerte zeigt, dass nur bei Transfektion der funktionellen NS2/3 Protease eine Luziferase-

25 aktivität nachweisbar ist (E+G), jedoch nicht bei der inaktiven NS2/3 Mutante (F+G).

Abbildung 7

Nachweis der Funktionalität der Systeme im Hochdurchsatzverfahren (im Format

30 384).

Die verschiedenen Expressionskonstrukte und das Reporterkonstrukt wurden mittels eines bakteriellen Rekombinationsverfahren in das Genom von Baculoviren eingebracht und somit rekombinante Baculoviren hergestellt (Sicherheitsstufe L1/S1), die nach Infektion mit Säugetierzellen die Expression der Konstrukte hervorrufen. Die
5 Luziferasemessung (30 Sekunden, im Format 384) erfolgte 20 Stunden nach Infektion.

Abbildung 7a NS3/4A vermittelte „Trans“-Spaltung

Die Quantifizierung der Luziferasewerte zeigt, dass nur bei
10 Infektion mit der funktionellen NS3/4A Protease eine Luziferaseaktivität nachweisbar ist (A+C+G), jedoch nicht bei Infektion mit der NS3 Protease (A+B+G). Die Signalstärke und das Signal/Hintergrundverhältnis (Faktor 54) sind HTS
fähig.

15

Abbildung 7b NS2/3 vermittelte „Cis“-Spaltung

Die Quantifizierung der Luziferasewerte zeigt, dass nur bei
Infektion mit der funktionellen NS2/3 Protease eine
Luziferaseaktivität nachweisbar ist (E+G), jedoch nicht bei der
20 inaktiven NS2/3 Mutante (F+G).). Die Signalstärke und das Signal/Hintergrundverhältniss (Faktor 40) sind HTS fähig.

Beispiele

Materialien:

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Gibco BRL/Invitrogen bezogen. Die Polymerasekettenreaktionen wurden mit der Vent DNS Polymerase der
5 Firma New England Biolabs (NEB) durchgeführt, und für die Ligationen wurde die T4 DNS Ligase von Gibco BRL/Invitrogen verwendet.

Molekularbiologische und zellbiologische Experimente wurde nach Standard-
10 protokollen [Ausubel et al., (1994), Sambrook et al., (1989)] durchgeführt.

Die Klonierung der Expressionskonstrukte erfolgte im pcDNA3 Vektor der Firma
Invitrogen. Für die Generierung der Baculoviren wurde das Fast Bac-System der
Firma Gibco BRL/Invitrogen verwendet. In den Vektor pFastBacDual wurden die
15 verschiedenen Expressionskonstrukte inklusive des CMV Promotors des pcDNA3
Vektors kloniert und nach Durchlaufen des Standardprozedurverfahrens rekombinate
Baculoviren generiert.

Ein Fragment der viralen HCV 1b cDNS, die als PCR-Template für die Amplifi-
20 kation der viralen Proteasen und Proteaseschnittstellen diente, wurde von Professor
Roggendorf, Universität Essen, zur Verfügung gestellt (Sequenz Nr.1). Die CD8
cDNS, welche hier beispielhaft als delokalisierendes Transkriptionsregulormodul
verwendet wurde, da es eine Transmembrandomäne beinhaltet, wurde mittels rtPCR
aus primären humanen Lymphozyten generiert (Sequenz Nr.2). Für die Amplifi-
25 kation des GalVP16 Transkriptionsfaktors, welcher hier beispielhaft als Transkrip-
tionsregulator verwendet wurde, diente das Konstrukt pM3-VP16 der Firma Clontech
als Template (Sequenz Nr. 3). Als Reporterplasmid wurde hier beispielhaft der pFR-
Luc Vektor der Firma Stratagene verwendet, welcher ein Luziferasegen unter der
Kontrolle eines Gal-abhängigen Minimalpromotors beinhaltet.

Beispiel 1 Amplifikation und Klonierung der Expressionskonstrukte

Für die Klonierung der trimären Fusionsproteine (Konstrukt A, E, F) wurde in einem ersten Schritt ein Teil des CD8 Rezeptors mit den Primern 5'-cg aag ctt acc atg gcc
5 tta cca gtg acc gcc-3' und 5'-gcg gat cca aac acg tct tcg gtt cct gtg gtt-3' amplifiziert
und über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen der Restriktions-
endonukleasen Hind III und BamHI in den pcDNA3 Vektor kloniert (pcDNA3-
CD8). In einem weiteren Schritt wurde der GalVP16 Transkriptionsfaktor mittels der
Primer 5'-g cgg atc ctg gaa ttc aag cta ctg tct tct atc gaa-3' und 5'-cg tct aga tta ccc
10 acc gta ctc gtc aat tcc-3' amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und XbaI in
den pcDNA3-CD8 Vektor kloniert (pcDNA3-CD8-GalVP16).

Für die Generierung des Konstruktes A (Zielprotein der NS3/4A vermittelten
Transspaltung) wurde die NS3/4A Spaltstelle zwischen NS5a und NS5b mit
15 angrenzenden Sequenzen mit Hilfe der Primer 5'-g cgg atc cag agg acg gtt gtc tta aca
g-3' und 5'-gc gaa ttc gta gtg gtc gtc tag gac ttg-3' amplifiziert (Sequenz Nr. 4) und
über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pcDNA3-CD8-
GalVP16 kloniert.

20 Für die Generierung des Konstruktes E (NS2/3 vermittelten Transspaltung) wurde
die NS2/3 Protease mit den Primern 5'-gc gaa ttc gac cgg gag atg gcc gca-3' und 5'-
gc gaa ttc gga ggt cga gtc agt tga gag-3' amplifiziert (Sequenz Nr. 5) und über die
Restriktionsschnittstelle EcoRI in den Vektor pcDNA3-CD8-GalVP16 kloniert.

25 Für die Generierung des Konstruktes F (mutierte NS2/3 Protease) wurde in das
Konstrukt E über die Primer 5'- a gac act gca gcg gcc ggg gac gtc atc -3' und 5 gat
gac gtc ccc ggc cgc tgc agt gtc -3' mittels PCR eine Punktmutation eingeführt. Der
daraus resultierende Aminosäureaustausch der ursprünglichen HCV Aminosäuren-
position 993 von einem Cystein zu einem Alanin führt zu einer Inaktivierung der
30 Proteasefunktion der NS2/3 Protease.

Für das Konstrukt B (NS3 Protease) wurde eine PCR Reaktion mit den Primern
5'- gc aag ctt acc atg gct ccc atc acg gcc tat tcc -3' und 5'-gcg aat tcc tca ggt gac gac
ctc cag gtc ggc-3' durchgeführt und das Fragment (Sequenz Nr. 6) über die
Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI in den pcDNA3 Vektor kloniert.

5

Für das Konstrukt C (NS3/4A Protease) wurde eine PCR Reaktion mit den Primern
5'- gc aag ctt acc atg gct ccc atc acg gcc tat tcc -3' und 5'-gcg aat tcc tca gca ctc ttc
cat ctc atc gaa-3' durchgeführt und das Fragment (Sequenz Nr. 7) über die
Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI in den pcDNA3 Vektor kloniert.

10

Für die Generierung des Konstruktes D (mutierte NS3/4A Protease) wurde in das
Konstrukt C über die Primer 5'- c ttg aag ggt tcc gcg ggt ggc cca ct -3' und 5'- ag tgg
gcc acc cgc gga acc ctt caa g -3' mittels PCR eine Punktmutation eingeführt. Der
daraus resultierende Aminosäurenaustausch der ursprünglichen HCV Aminosäuren-
position 1165 von einem Serin zu einem Alanin führt zu einer Inaktivierung der
Proteasefunktion der NS 3/4a Protease.

15

Das Konstrukt G entspricht den Angaben des Herstellers der Firma Stratagene.

20 **Beispiel 2 in vitro Funktionalitätsnachweis der NS3/4A vermittelten „trans“- Spaltung**

Zum Nachweis der Funktionalität der generierten Konstrukte A, B und C wurde eine
in vitro Transkriptions- Translationsreaktion unter Verwendung des T7-in vitro
25 Transkriptions- Translationsverfahrens der Firma Promega durchgeführt (siehe Abb.
4/7). Während die Reaktion (nach Standardbedingungen des Herstellers) für das zu
spaltende Konstrukt A in einem radioaktiven Ansatz (³⁵S-Methionin Markierung)
durchgeführt wurde (25 µl Ansatz), wurde die Reaktion für das Konstrukt B und C,
die viralen Proteasen NS3 und NS3/4A, nicht radioaktiv durchgeführt (jeweils 25 µl).
30 Nach einer 90 minütigen Inkubation der einzeln generierten Proben, wurden 5µl des
Konstruktes A mit jeweils 5 µl des Konstruktes B bzw. C vermischt und für weitere

60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von SDS-Gel Probenpuffer zu den Ansätzen wurden die Proteinproben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet (siehe Abb. 4/7). Das in Abbildung 4/7 dargestellte Bild der Radiographie zeigt deutlich, dass nur die durch Konstrukt C
5 exprimierte NS3/4A Protease eine spezifische Spaltung des chimären Fusionsproteins A bewirkt, eine Abspaltung des Transkriptionsregulators GalVP16 von dem transkriptionsfaktor-inhibitorischen Modul (CD8 Rezeptor) herbeiführt und somit ein Nachweis der Proteaseaktivität über das Freisetzen des Transkriptionsregulators möglich ist. Die NS3 Protease (Konstrukt B) führt zu keiner Spaltung.

10

Beispiel 3 in vitro Funktionalitätsnachweis der NS2/3 vermittelten „cis“-Spaltung

Zum Nachweis der Funktionalität der generierten Konstrukte E und F wurde wie
15 bereits in Beispiel 2 beschrieben, eine in vitro Transkriptions- Translationsreaktion unter Verwendung des T7-in vitro Transkriptions- Translationsverfahrens der Firma Promega durchgeführt (siehe Abb. 5/7). Die Reaktionen (nach Standardbedingungen des Herstellers) für das sich selbst spaltende Konstrukt E bzw. dessen inaktive Mutante (Konstrukt F) sowie ein Kontrollplasmid K1, welches für das in Abb. 5/7
20 dargestellte und nach Spaltung zu erwartende NS3-GalVP16 Fusionsprotein kodiert, wurden in einem radioaktiven (³⁵S-Methionin Markierung) Ansatz durchgeführt (25 µl Ansatz). Nach einer 90 minütigen Inkubation der Proben wurden 5µl der Proben nach Zugabe von SDS-Gel Probenpuffer mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet (siehe Abb. 5/7). Das in Abbildung 5/7 darge-
25 stellte Bild der Radiographie zeigt deutlich, dass nur das durch Konstrukt E exprimierte Fusionsprotein, welches eine funktionelle NS2/3 Protease beinhaltet, eine Spaltung des chimären Fusionsproteins nach sich zieht, wohingegen die Mutante nicht autokatalytisch aktiv ist. Darüberhinaus entspricht die Größe der Banden den zu erwartenden Größen nach einer spezifischen Spaltung (Vergleich E zu K1). Auch
30 hier führt somit das Einbringen einer aktiven Protease in das Fusionsprotein aus einem Transkriptionsregulator und einem inhibitorisch wirkenden Modul (I) zur Frei-

setzung des Transkriptionsregulators, wodurch der Nachweis der Spaltungsaktivität ermöglicht wird.

Beispiel 4 in vivo Aktivitätsnachweis der chimären Fusionsproteine

5

Zum Nachweis der spezifischen Aktivität der generierten Fusionsproteine (A, E, F) und Proteasen (B, C, D) in vivo, d.h. im zytoplasmatischen Umfeld einer lebenden Zelle, wurden transiente Transfektionsexperimente in den humanen Heptomazellen HepG2 durchgeführt. Die Zellen wurden zu diesem Zweck auf 48 Well Zellkulturplatten ausplattiert und mit den in Abbildung 6/7 beschriebenen Konstrukten mittels der Lipofectamine 2000 Methode (GibcoBRL/Invitrogen) transient transfiziert. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurde dann zur Messung der Luziferaseaktivität ein Luziferin/Tritonpuffer in gleicher Menge zu den Zellen gegeben und nach Transfer eines Aliquots von 100 µl in eine 96 Well Zellkulturplatte die Lichtausbeute in einem Luminometer gemessen.

15

Die erzielten Ergebnisse der NS3/4A vermittelten Transspaltung, die in der Abbildung 6a dargestellt sind, zeigen deutlich, dass nur die aktive NS3/4A Protease (Konstrukt C) eine Spaltung des chimären Fusionsproteins A bewirkt und somit eine hohe Luziferaseaktivität hervorruft (ca. 140 000 Lichteinheiten), wohingegen die Expression der NS3 Protease (Konstrukt B) bzw. der inaktiven NS3/4A Mutante (Konstrukt D) nur zu einer geringen Luziferaseaktivität führen (ca. 5000 Lichteinheiten). Weiterhin zeigt das geringe Lichtsignal unter Verwendung der inaktiven NS3/4A Mutante (Konstrukt D), dass die Freisetzung des Transkriptionsregulators und die damit verbundene Aktivierung des Reportergenkonstruktes G nicht durch endogene Proteasen der Zelle hervorgerufen wird und somit die gemessene Aktivität spezifisch für die eingebrachte virale NS3/4A Protease ist.

20

25

Auch die Ergebnisse der in Abbildung 6b dargestellten NS2/3 vermittelten cis-Spaltung zeigen, dass nur unter Verwendung des Konstruktes E, der aktiven NS2/3 Protease in dem chimären Fusionsprotein, in Verbindung mit dem Reportergen-

30

konstrukt G, eine spezifische Luziferaseaktivität messbar ist (ca. 24 000 Lichteinheiten), die gegenüber der inaktiven Mutante (Konstrukt F, ca. 2000 Lichteinheiten) eine mehr als 10fach höhere Luziferaseaktivität aufweist.

5 **Beispiel 5 in vivo Aktivitätsnachweis unter HTS-Bedingungen.**

Um eine Durchführung der Proteasetestsysteme in vivo im Hochdurchsatzscreening im 384er Plattenformat zu ermöglichen, wurden in einem ersten Schritt rekombinante Baculoviren von den Konstrukten A, B, C, E, F hergestellt, da eine transiente
10 Transfektion von Zellen unter Hochdurchsatzbedingungen nicht durchführbar ist. Baculoviren hingegen zeichnen sich, ebenso wie andere virale Transfektionssysteme (z.B. retrovirale, adenovirale Systeme) durch Ihre Eigenschaft aus, dass sie sehr effizient verschiedene humane Zelltypen, wie z.B. Hepatomazellen, reproduzierbar infizieren und Ihre DNS in die Zelle abgeben, sich jedoch in diesen Zellen nicht
15 replizieren und keine zytopathischen Effekte hervorrufen [Kost et al., (1999)]. Sie können somit sehr gut als Transferorganismus genutzt werden und führen bereits kurz nach Infektion der Zielzelle zu der Expression des gewünschten Gens, sofern das Gen unter der Kontrolle eines geeigneten eukaryontischen Promotors steht. Des weiteren unterliegen Baculoviren nur dem Sicherheitsstandard S1/L1, was einen
20 weiteren Vorteil für Ihre Verwendung um HTS darstellt.

Die Konstrukte A, B, C, E und F wurden unter der Kontrolle eines CMV Promotors in Baculotransfervektoren der Firma GibcoBRL / Invitrogen kloniert (pFastBacDual). Nach Durchlaufen der Standardprozedur des Herstellers (FastBAC-
25 System) wurden Baculoviren generiert und amplifiziert. Nachdem das Virus durch Zentrifugation und Sterilfiltration (0.45 µM Filter) aufgereinigt und der Virustiter (ca. 1×10^7 Viren /ml) bestimmt wurde, konnte das Virus direkt mit einer Konzentration von ca. 10 Viren pro ausgesäter Zelle (MOI 10) verwendet werden.

30 Für die Infektion der Zellen im 384er Platten-HTS Format, wurden 2000 Zellen pro Well in 40 µl Medium ausplattiert und direkt mit den in Abbildung 7/7

beschriebenen verschiedenen Viren (MOI 10, in 5 µl Sf9 Medium) infiziert. Als Ausgangszelle diente bei diesen Experimenten eine HepG2 Zelllinie (oder Huh7 Zelllinie, Daten nicht aufgeführt), welche eine stabile Integration des Konstruktes G trägt. Nach einer 20 stündigen Inkubation wurde nach Zugabe von 25 µl einer
5 Luziferin/Triton Lösung ein Luziferaseassay durchgeführt und in einem Lumino-
meter ausgewertet.

Die in Abbildung 7/7 dargestellten Ergebnisse für die beiden aufgeführten Systeme der NS3/4A (Abb. 7a) und NS2/3 (Abb. 7b) vermittelten Proteasespaltung des
10 chimären Fusionsproteins zeigen sehr deutlich, dass nur in Anwesenheit einer
vollständigen NS3/4A Protease (A+C+G) jedoch nicht mit der NS3 Protease alleine
(A+B+G) bzw. einer aktiven NS2/3 (E+G) und nicht der inaktiven NS2/3 Protease
(F+G) eine Luziferaseaktivität nachweisbar ist. Darüberhinaus bildet die geringe
Hintergrundaktivität, die Stärke des Signals und das sehr gute Signal/Hinter-
15 grundverhältnis der beiden beispielhaft aufgeführten Systeme optimale Bedingungen
für eine Durchführung im Hochdurchsatzscreening unter Verwendung eines
effizienten und schnellem Transfektionssystem wie z.B. dem hier verwendeten
viralen Baculotransfektionssystem.

Literatur

US 5861267

5

WO 98/00548

WO 00/08469

10

WO 00/66623

Ausubel et al, (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley/NY

Bartenschlager, R. Journal of Viral Hepatitis (1999), 6:165-181

15

Cho Young-Gyu et al. Journal of Virological Methods (1997), 65: 201-207

Cho, Young-Gyu et al. Journal of Virological Methods (1998), 72: 109-115

20

Hirowatari, Yuji et al. Analytical Biochemistry (1995), 225: 113-120

Kost, Thomas A. et al. Current Opinion in Biotechnology (1999), 10: 428-433

Overton, Hilary et al. Journal of General Virology (1995), 76: 3009-3019

25

Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs.

Wang, Q. May et al. Drugs of the Future 2000, 25(9): 933-944

30

Zein, Nizar N. et al. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2000:223-235

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung der Aktivität viraler Proteasen im Hochdurchsatzscreening (HTS) an zellulären Systemen, dadurch gekennzeichnet,
5 dass Nachweissysteme verwendet werden, die in Abhängigkeit der Aktivität der viralen Proteasen einen funktionalen Transskriptionsregulator ausbilden.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Untersuchung der Aktivität der viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A des Hepatitis C Virus (HCV) im Hochdurchsatzscreening (HTS) an zellulären Systemen, dadurch gekennzeichnet, dass
10 Nachweissysteme verwendet werden, die in Abhängigkeit der Aktivität der viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A einen funktionalen Transskriptionsregulator ausbilden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, in dem als Transkriptionsregulator ein Expressionskonstrukt verwendet wird, welches sich aus mindestens drei regulatorischen Einheiten zusammensetzt, wobei
15
 - a) eine der regulatorischen Einheiten ein Membranlokalisierungssignal ist und die Delokalisation des Transkriptionsregulators selbst bewirkt,
20
 - b) eine der regulatorischen Einheiten eine proteasespezifische transspaltenden Schnittstelle oder eine cis-spaltende funktionale Protease enthält,
25
 - c) eine der regulatorischen Einheiten die Expression eines Reportergens moduliert
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, in dem ein Fusionsprotein enthaltend einen
30 Rezeptor aus der Gruppe der CD-Rezeptoren, eine virale Proteaseschnittstelle

der HCV – Protease NS3/4A, und der Transkriptionsregulator GalVP16, eingesetzt wird.

- 5 5. Verfahren nach Anspruch 4 wobei das Fusionsprotein aus der DNA Sequenz:

Sequenz 8

oder einem ihrer Homologen generiert wird.

- 10 6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei ein Fusionsprotein enthaltend einen
Rezeptor aus der Gruppe der CD-Rezeptoren, die virale HCV – NS2/3
Protease, und den Transkriptionsregulator GalVP16, eingesetzt wird.

- 15 7. Verfahren nach Anspruch 4 wobei das Fusionsprotein aus der DNA Sequenz:

Sequenz 9

oder einem ihrer Homologen generiert wird.

- 20 8. Verwendung von Aktivitätsmodulatoren der Proteasen NS2 und NS3 bzw.
NS3/4A die unter Anwendung des Verfahrens gemäss der Ansprüche 1 bis 7
gefunden wurden, zur Herstellung von Arzneimitteln für die Prophylaxe und
Therapie der HCV-Infektion.

Abbildung 1/7

NS3/4A vermittelte „Trans“ Spaltung

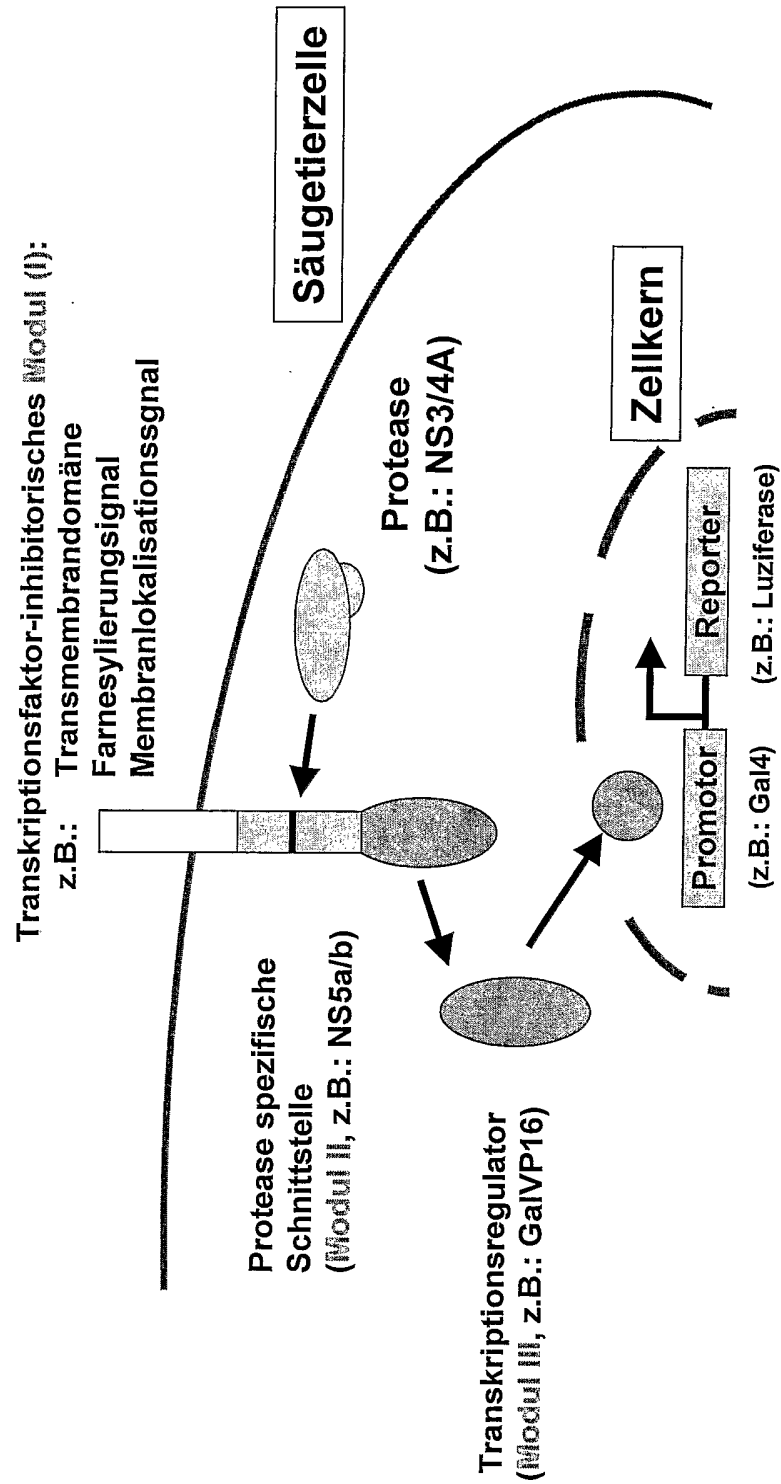


Abbildung 2/7

NS2/3 vermittelte „cis“ Spaltung

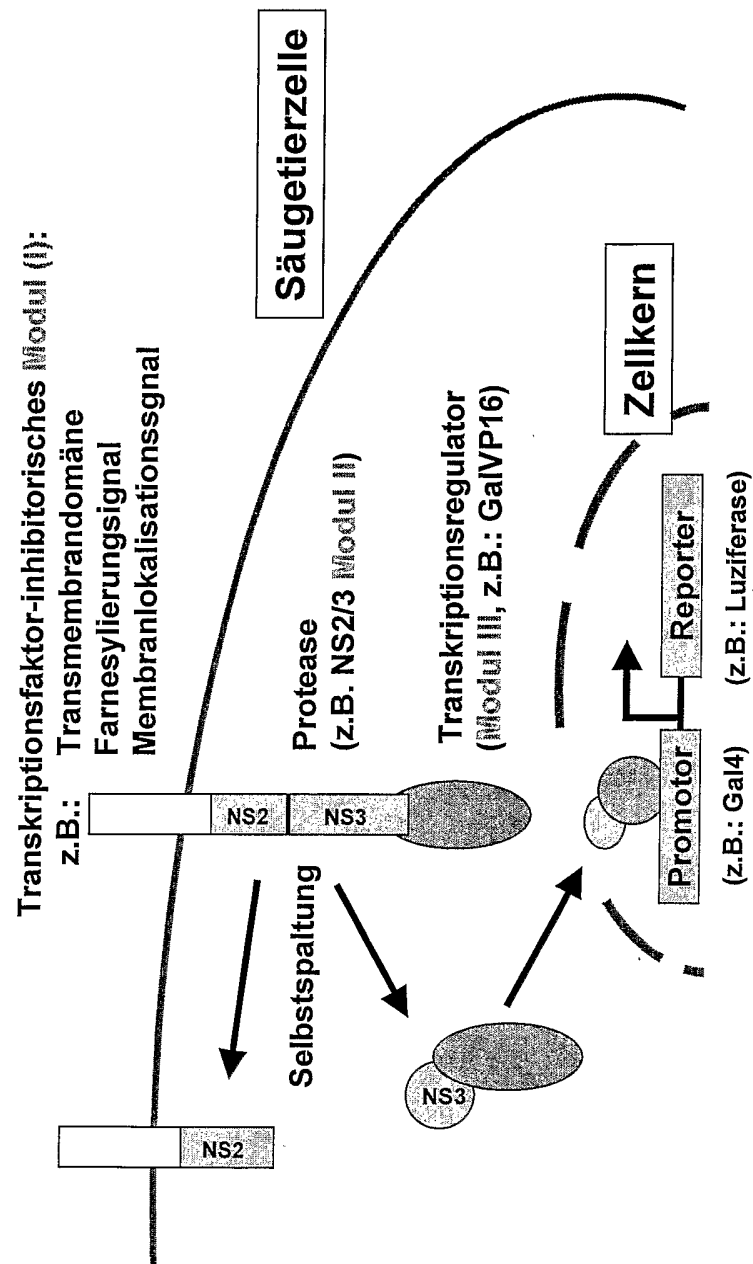


Abbildung 3/7

verwendete Plasmide

Abb. 3 a / Konstrukt A



Abb. 3 b / Konstrukt B



Abb. 3 c / Konstrukt C

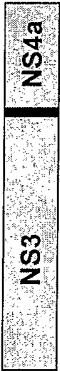


Abb. 3 d / Konstrukt D



Abb. 3 e / Konstrukt E



Abb. 3 f / Konstrukt F

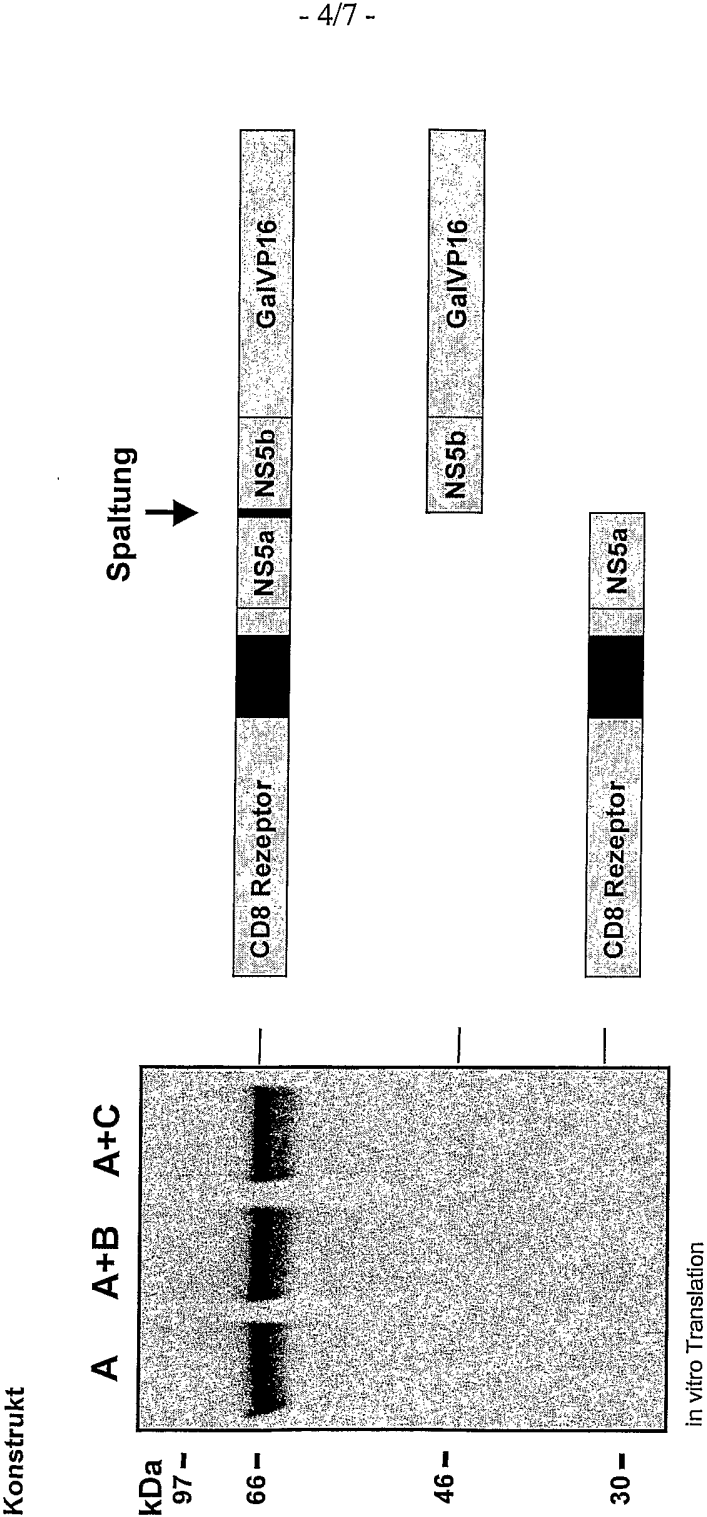


Abb. 3 g / Konstrukt G



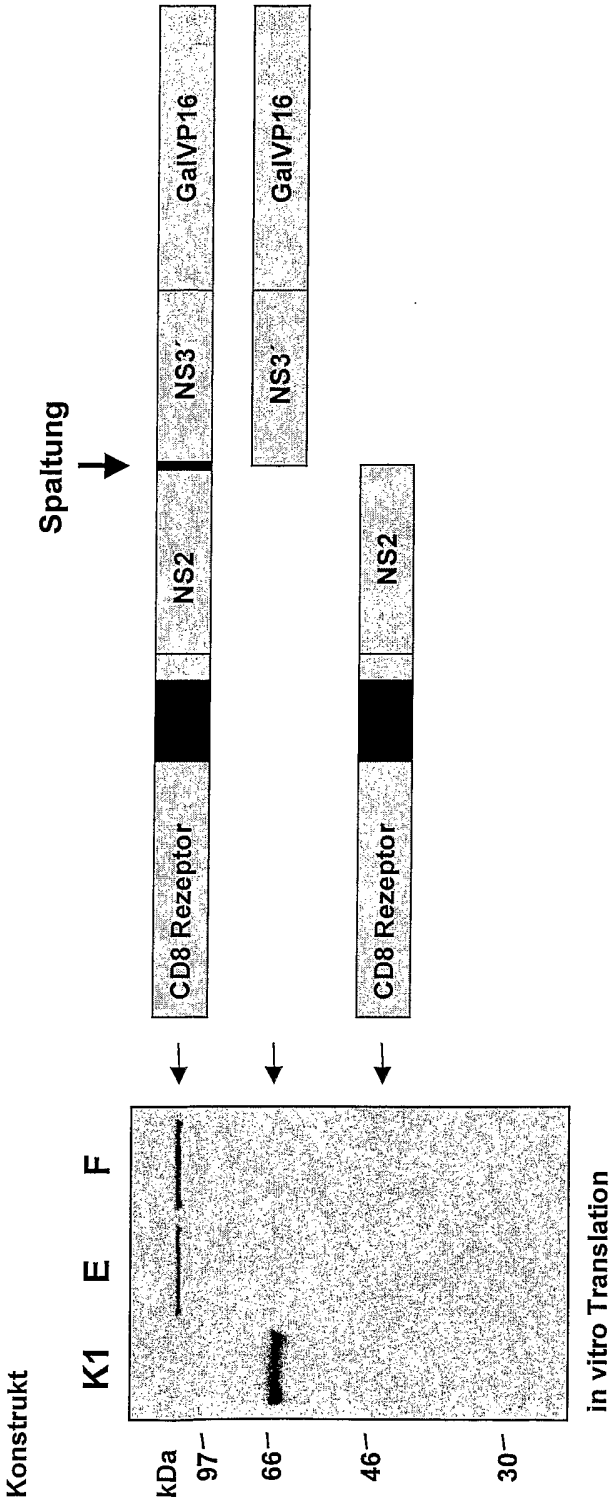
Abbildung 4/7

in vitro NS3/4A vermittelte „trans“-Spaltung



in vitro NS2/3 vermittelte „Cis“Spaltung

Abbildung 5/7



in vivo Aktivität nach transienter Transfektion
in HepG2 Hepatomazellen

Abbildung 6/7

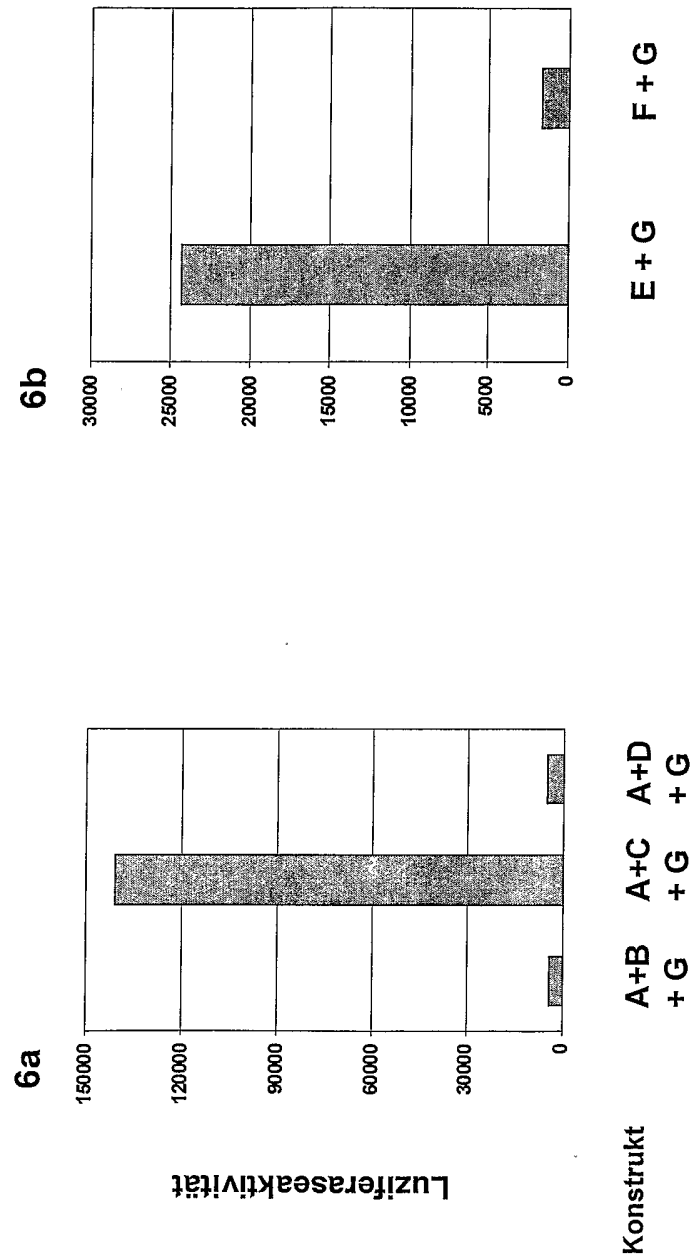
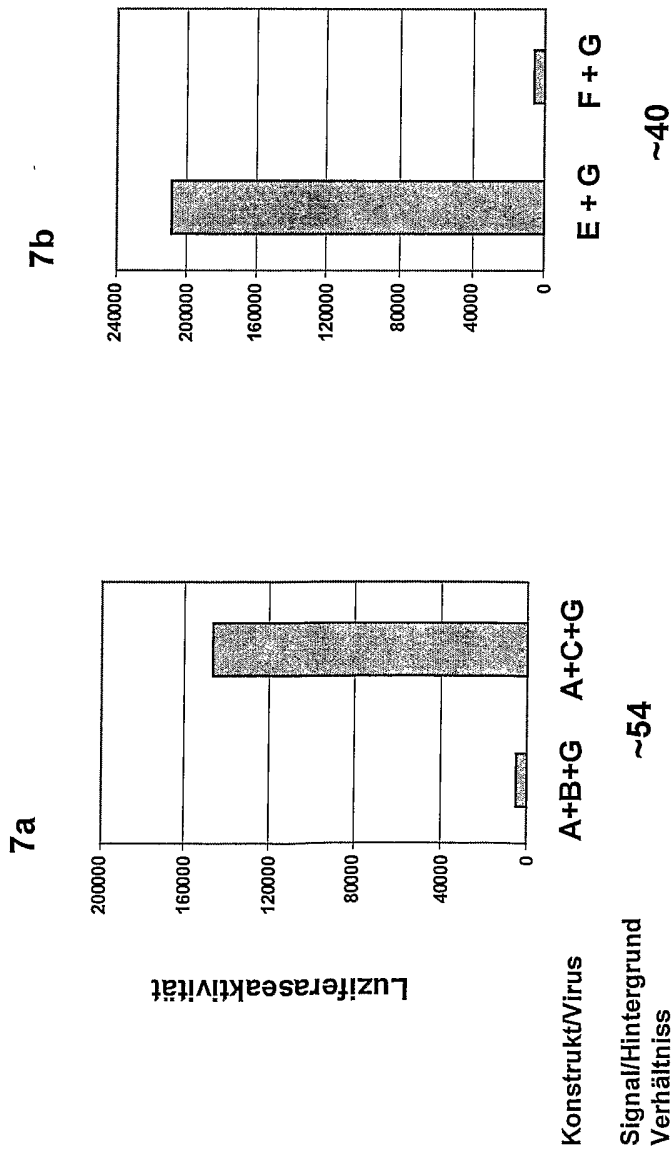


Abbildung 7/7

in vivo Aktivität nach viraler Infektion mit
recombinanten Baculoviren in HepG2
Hepatomazellen (384er HTS Format)



-1-

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> Verfahren zur Untersuchung und Beurteilung von Virusedzymen im HTS

<130> LeA 35804

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8460

<212> DNA

<213> Human cytomegalovirus

<400> 1
tatgaagtgc gcaacgtgtc cgggggtgtac catgtcacga acgactgttc caactcaagc 60
attgtgtatg agacagcgga catgatcatg cacacccccg ggtgcgtgcc ctgcgttcgg 120
gaggataact tcactogctg ctgggtagcg ctcaccccca cgctcgcggc caggaatggc 180
agcgtcccca ctacggcgat acgaagccac gtcgatttgc tcgttggggc ggctgctttc 240
tgctccgcta tgtacgtggg ggatctttgc ggatctgttt tcctcgtctc ccaactgttc 300
accttctctc ctgctggca tgagactgta caggaatgta attgctcaat ttaccccggc 360
cacgtgacag gtcaccgat ggcttgggac atgatgatga actggtcacc tacaacagcc 420
ctagtggat cgcagttact ccggatccca caagctgtcg tggacatggg ggcgggggcc 480
cactggggcg tcctggcggg cctcgcttac tattccatgg tggggaactg ggctaaggtc 540
ttgattgtga cgctactttt cgctggcggt gacggcaaca cccacacgat agggggggaag 600
caagcccagg ccactggcgg ctctgtggcc tggttggcgc gtggcccgtc tcaggaaatc 660

cagcttataa acaccaacgg tagctggcac atcaacagaa ctgccctaaa ctgcaatgac	720
tctotcaaaa ctgggtttat tgccgctctg ttctacgcac ataggttcaa ctcttcogga	780
tgccagagc gcatggccag ctgccgcccc attgacaagt ttgcacaggg gtgggggtccc	840
atcacctatg ctaagcctga cagcttggac cagaggccct actgctggca ctacgcgcct	900
caaccgtgtg gtattgtacc cgcgtcggag gtgtgtggcc cagtgtactg cttcaccocg	960
agccctgttg tagtggggac gaccgatogt tctggcgtcc ctacgtatcg ctggggggag	1020
aatgagacgg acgtgctgct ccttaacaac acgcggccgc cgcagggcaa ctgggttcggc	1080
tgtacatgga tgaacgccac tgggtttacc aagacgtgcg ggggcccccc atgtaaaatc	1140
gggggggctcg gcaacaacac cttgacttgc cccacggact gcttcggaa gcatcccag	1200
gccacctaca ccaaatgcgg ttccggggcct tgggtgacac ccaggtgcat agttgactac	1260
ccatacaggc tttggcacta cccctgcacc gtcaacttta ccatcttcaa ggttaggatg	1320
tatgtggggg gtatagagca caggctcagc gccgcgtgca attggaccocg aggagagcgt	1380
tgcgacctgg aggacagggg taggtcagag ctacgtccgc tgcgtctgc tacaacagag	1440
tggcagatac tgccctgctc cttcactacc ctaccggctc tgtccactgg tttgatccat	1500
cttcactcaga acaccgtgga cgtgcaatac ctgtacggtg tagggtcagt gctcgtctcc	1560
ttcgcaatca agtgggagta tatcctgttg ttcttccttc tccctggcgga cgcgcgtgc	1620
tgtgcctgct tgtggatgat gctgctgata gctcaggccg aggcgcctt ggagaacctg	1680
gtggtcctca atgcggcgtc cttggctcga gcgcattggca ttctotcctt ccttgtgttc	1740
ttctgtgctg cctggtagct caagggcagg ttggttcccg gggcggcata tgccttttat	1800
ggcgtatggc cgtgctcct gctcctgctg gcaactaccac cgcgagcata cgcctatggac	1860
cgggagatgg ccgcctcgtg cggaggcgcg gttttcatag gtctggcact cctgaccttg	1920
tcaccatact ataaagtgtt cctcgccaag ctcatatggt ggttgcaata ctttatcacc	1980
agagccgagg cgcatttgca agtgtggatc cccctcttta atgttogagg gggccoggat	2040
gccatcatcc ttottacgtg cgcggtccac ccagagctaa totttgacat caccaagotc	2100
ttgctogcta tactoggccc actcatggtg ctocaggccg gcataattag agcgcogtac	2160
ttcgtgcgcg ctcaagggct cattogtgca tgcattgttg tgcggaagggt tgcgtggggc	2220
cattatgtcc agatggctct tatgaagctg gcgcactga cgggtacgta cgtctacgac	2280
cacottaacc cactgcggga ctggggccac gggggcctac gagaccttgc ggtggcggtt	2340
gagcccgctg tottttcoga catggagacc aagatcatca cctggggggc agacactgca	2400
gcgtgcgggg acgtcatctt gggcctaccc gtctccgcc gaagggggaa ggagatattt	2460

ctgggaccag ccgatagcct tgaggggcaa ggggtggcgac tcctcgctcc catcacggcc 2520
tattcccaac agacgcgggg cctgcttggc tgtatcatca ccagtottac aggcggggac 2580
aagaaccagg tcgaggggga ggttcaagtg gtttccaccg caacacaatc tttcctggcg 2640
acctgtgtca atggtgtttg ctggactgtc ttocatgggtg ctgggtcaaa gaccctagcc 2700
ggcccaaagg gtccaatcac ccaaattgtac accaatgtag accaggacct cgtcggttgg 2760
cggcgcccc ccggagcgcg ctcccttgaca ccttgcaoct ggggcagctc ggacctctac 2820
ttggtctcga ggcatgctga tgtcatcccg gtgcgcgggc ggggcgacag ccgggggagc 2880
ctactttccc ccaggcccggt ctccctacttg aagggttctc cgggtggccc actgctctgc 2940
ccctcggggc atgtcgcggg catcttcogg gctgctgtgt gcaccggggg ggttgcgaaa 3000
gcggtggact ttgtgcccggt tgagtctatg gaaaccacca cggggtcccc ggtcttcaag 3060
gacaactcat ccccaoctgc tgtaccgcag acatttcaag tggcccatct gcacgcccc 3120
actggcagcg gcaagagcac taagggtgcca gccgcataatg cagcccaagg gtataaggta 3180
cttgtctcga accogtccgt tgccgccaca ttaagttttg gggcgatatat gtctaaggca 3240
catggtgtcg accctagcat cagaactggg acaaggacca tcaccacggg cgcctccatc 3300
acatattoaa cctaaggcaa gttccttgcc gacgggtggtt gctctggggg cgcctatgac 3360
atcataatat gtgatgagtg ccactcaact gactcgacct ccactctggg catcggcaca 3420
gtcctggacc aagcggagac ggtcggagcg cggctcgtcg tgctcgccac cgctacgcct 3480
ccgggatcgg tcaccgtgcc acatoccaa atcgaggagg tggccttgtc caacactgga 3540
gagatccct tctatggcaa agccatcccc atcgaggcca tcagaggggg agggcacctc 3600
atcttctgcc actccaagaa gaaatgtgac gagctcgccg cacagttgtc gagcctcggg 3660
gtcaatgctg tagcatatta ccggggcctt gatgtgtcgg tcataccaac cagcggagac 3720
gtcgttgtcg tggcaacaga cgtctaatg acgggcttta ccggcgactt tgactcagt 3780
atcgactgta atacgtgtgt caccagaca gttgatttca gcttgatcc taccttcacc 3840
attgagacga cgaccgtacc ccaagatgcg gtgtcgcgct cgcagcggcg aggcaggact 3900
ggtaggggca agaggggtat ttacaggttt gtgactccag gagaacggcc ttcgggcatg 3960
tttgattcct cggctcgtg cgagtgtat gacgcaggct gtgcttggtg tgagctcacg 4020
cccgccgaga cctcggtcag actgcgggct tacctaaata caccagggtt gccgtctgc 4080
caggaccatc tagagttctg ggagagcgtc ttcacaggcc tcaccacat agatgctcac 4140
ttcttgtccc agaccaaaca ggcaggagac aacttccct acctggtagc ataccaggct 4200

-4-

aoggtgtgog ccagagctca ggctccacct ccatogtggg atcaaattgtg gaagtgcctc	4260
atacggctga agoctacgtt gcaogggcog aacccctgc tgtacaggct aggagccgtc	4320
caaaacgagg ttaccctcac ccaccccgta accaaatata tcatggcatg catgtcggct	4380
gacctggagg tcgtcaccag cacctgggtg ctggtaggog gggtccttgc agctctggcc	4440
gcgtattgcc taacaacggg cagcgtggtc attgtgggca ggatcatctt gtccgggagg	4500
coggccatta ttcccgatag ggaagttctc taccgagagt tcgatgagat ggaagagtgc	4560
gcctcacacc tcccctacat cgaacaggga atgcaactcg ccgagcaatt caagcagaaa	4620
gcgctcgggt tgctgcaaac agccaccaag caagcggagg ctgctgcccc cgtgggtggag	4680
tccaagtggc aagcccttga ggccttctgg gcgaagcaca tgtggaattt catcagcggg	4740
atacaatacc tagcaggctt gtccactctg cctggaaacc ccgcaatagc gtcactgatg	4800
gcattcacag cttctatcac cagcccgctt accaccaaac ataccctcct gtttaacatc	4860
ttaggggggt ggggtggcgc ccagctcgcc ccccccagcg ctgcttcggc cttogtgggc	4920
gccggcatcg ccggtgcagc tgttggcagc ataggccttg ggaaagtgtc cgtggacatc	4980
ctggcgggct atggagcagg ggtggcaggc gcactcgtgg cctttaaggt catgagcggc	5040
gagatgccct ccactgagga tctggtcaac ttactccctg ccatcctctc cccaggcgcc	5100
ctggtcgtcg gggtcgtgtg cgcagcaata ctgcgtcgcc atgtgggccc gggggagggg	5160
gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg ttccgttcgc ggggcaacca tgtttcccc	5220
acgcactatg tgctgagag cgacgtgca gcgcgctca cccaaatcct ctocagcctt	5280
accatcactc agctgttaaa gaggtccac cagtggatca atgaggactg ctctacgca	5340
tgtcttggt cgtggctaag ggatgtctgg gactggatat gcaoggtgtt gacggacttc	5400
aagacctggc tcagtcaca gctcctgcg cggttacogg gagtcccttt cttctcatgt	5460
caacgtgggtt acaaggaggt ctggcgggga gaoggcata tgcagaccac ctgccatgt	5520
ggggcacaaa tcacgggaca tgtcaaaaaa ggttccatga ggatogttgg gccagaacc	5580
tgcagcaaca cgtggcatgg aacattcccc atcaacgcat acaccacggg tccctgcaca	5640
ccctcccggg cgcacaatta ctctagggcg ctgtggcggg tggctgcaga ggagtacgtg	5700
gaggttacgc ggggtgggga tttccactac gtaacgggca tgaccaccga caacgtaaag	5760
tgcccatgcc aggtcccggc ccccgaaatc ttcacggaag tggatggggg acggctgcac	5820
aggtaacgtc cggcatgcag acctctcctt cgagacgagg tcacgttcca ggtcgggctc	5880
aaccaatata tggctcgggtc acaactcccc tgcgagcccg agccggacgt aacagtgtc	5940
acttccatgc tcaccgaccc ctcccacatt acagcagagg cggctaagcg taggttggcc	6000

aggggggtctc cccctccctt ggccagctct tcagctagtc agctgtctgc gccttccttg 6060
 aaggcaacat gcaactaccg toatgactcc ccagatgctg acctcatcga ggccaacctc 6120
 ctgtggcggc aggagatggg cgggaacatc accgcgtgg agtcagagaa taaggtagta 6180
 attctggact ctttogatcc gctccgagcg gaggaggatg agagggaat atccgtcccc 6240
 ggggagatcc tgcggaaatc caggagcttc ccccgggcga tgcccatatg ggcgcgccc 6300
 gattacaacc ctccgtgtt ggagtcctgg aaggaccag actacgtccc tccgtggtta 6360
 cacgggtgcc cattgccacc taccagggcc cctccaatac caccaccacg gaaaaagagg 6420
 acggttgtct taacagaatc caccgtgtca tctgccttgg cagagctggc cacaagacc 6480
 ttccggcagct ccgggtcgtc ggccgtcgac agcggcacag cgaccgtcc tctgaccaa 6540
 ccctccgacg gcggcgacac aggatccgac gttgagtcgt actcctccat gccccctctt 6600
 gaggagagc cgggggaccc cgatctcagc gacgggtctt ggtctaccgt aagcgaggag 6660
 gccagtgagg acgtcgtctg ctgctcgatg tctacacat ggacaggtgc cctgatcacg 6720
 ccatgcgctg cggaggaaag caagctgcc atcaatgcgt tgagcaactc tttgtgcgc 6780
 caccataaca tggtttatgc cacaacatcc cgcagtcaa gccagcgga gaagaagggt 6840
 acttttgata ggctgcaggt cctggatgat cactaccggg acgtgctcaa ggagatgaag 6900
 gcgaaggcgt ccacagttaa ggccaggctt ctatccgtgg aagaagcctg caagctgacg 6960
 cccccacatt cggccaaaatc taagtttggc tatggggcaa aggacgtccg gaacctgtcc 7020
 agcaaggcca ttaaccacat caactccgtg tgggaggact tgotggaaga cactgagaca 7080
 ccaattgaca ctaccatcat ggcaaaaaat gaggttttct gcgttcaacc agagaaagga 7140
 ggccgcaagc cagctcgctt tatogtgttc ccagatttgg gagttcgtgt atgcgagaaa 7200
 atggcccttt acgacgtggt ctccaccctt cctcatgcg tgatgggctc ctcatcggga 7260
 tttcagtact ccccgggcga gcgggtcgaa tacctggtga aagcctggag ctcaaagaaa 7320
 aacctatgg gcttcgcata tgacaccgc tgttttgact caacagttac tgagaatgac 7380
 atccgtgttg aggagtcaat ttaccaatgc tgtgacttgg ccccggaagc tagacaggcc 7440
 ataaggctgc tcacagagcg gctttatatt gggggtcccc tgaccaattc aaaagggcag 7500
 aactgcggtt atgcgcgatg ccgcgcaagc ggctgctga cgactagctg cggtaatacc 7560
 ctccatgtt acttgaaggc ctctgcggcc tgtcgagctg cgaagctcca ggactgcacg 7620
 atgctcgtgt gcggggacga cctcgtcgtt atctgtgaaa gcgcgggaac ccaggaggac 7680
 gcggcgagcc tacgagtctt caggaggct atgactagat actctgcccc ccccgagac 7740

-6-

ccgccccaac cagaatacga cttggagctg ataacatcat gctcctccaa tgtgtcgggc 7800
 gcgcacgatg catctggcaa aaggggtgtac tacctcaccg gtgacccccc cccccccctt 7860
 gcacggggcgg cgtgggagac agctagacac actccagtca actcctggct aggcaacato 7920
 atcatgtatg cgcaccaact atgggcaagg atggttctga tgactcattt cttctctatc 7980
 cttctagctc aggaacaact tgaaaaagcc ctggattgtc agatctatgg ggctgtttac 8040
 tccattgaac cacttgacct acctcagatc attcagcgac tccatggtct tagcgcattt 8100
 tcactccata gttactctcc aggagagatc aatagggtgg cttcatgcct caggaaactt 8160
 ggggtaccac ccttgcgagt ctggagacat cgggccagga gtgtccgcgc taagctactg 8220
 tcccgggggg ggaggggcgc tacttggtggc aagtacctct tcaactgggc ggtaaggacc 8280
 aagctcaaac tcactccaat tccggctgca tccgggtgg acttggtcgg ctggttcggt 8340
 gctggttaca gcgggggaga catatatcac agcctgtctc ctgcccagacc ccgctggttc 8400
 tggttttgac tactcctgct tgctgcaggg gtaggcattc acctccttcc caaccggtga 8460

<210> 2

<211> 662

<212> DNA

<213> human CD8 cDNA Fragment

<400> 2

ogaagcttac catggcctta ccagtgaacc ccttgcctct gccgctggcc ttgtgtctcc 60
 acgcgcgcag gcgcagccag ttccgggtgt cgcgcctgga tcggacctgg aacctggggc 120
 agacagtgga gctgaagtgc cagggtgtgc tgtccaaccc gacgtcgggc tgctcgtggc 180
 tcttcagacc gcgcggcgcc gccgccagtc ccaccttctt cctatacctc tccaaaaca 240
 agcccaaggc ggccgagggg ctggacaccc agcggttctc gggcaagagg ttgggggaca 300
 ccttcgtctt caccctgagc gacttcgcc gagagaacga gggctactat ttctgtctgg 360
 ccctgagcaa ctccatcatg tacttcagcc acttcgtgcc ggtcttcctg ccagcgaagc 420
 ccaccagac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc 480
 tgtccctgcg ccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc 540
 tggacttcgc ctgtgatata tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc 600
 tcctgtcact gggtatcacc ctttactgca accacaggaa ccgaagacgt gtttggatcc 660
 gc 662

-7-

<210> 3

<211> 717

<212> DNA

<213> GalVP16 cDNS

<400> 3

```

goggatcctg gaattcaagc tactgtcttc tatcgaacaa gcatgcgata tttgcgact      60
taaaaagctc aagtgtctca aagaaaaacc gaagtgcgcc aagtgtctga agaacaactg    120
ggagtgtcgc tactctccca aaacaaaaag gtctccgctg actagggcac atctgacaga    180
agtggaatca aggctagaaa gactggaaca gctatttcta ctgatttttc ctcgagaaga    240
ccttgacatg attttgaaaa tggattcttt acaggatata aaagcattgt taacaggatt    300
atttgtacaa gataatgtga ataaagatgc cgtcacagat agattggctt cagtggagac    360
tgatatgcct ctaacattga gacagcatag aataagtgcg acatcatcat cggaagagag    420
tagtaacaaa ggtcaaagac agttgactgt atcggaata cccggggatc tggccccccc    480
gaccgatgtc agcctggggg acgagctcca cttagacggc gaggacgtgg cgatggcgca    540
tgccgacgcg ctagacgatt tcgatctgga catgttgggg acgggggatt ccccgggtcc    600
gggatttacc cccacgact ccgcccccta cggcgctctg gatatggcog acttcgagtt    660
tgagcagatg tttaccgatg cccttggaat tgacagtagt ggtgggtaat ctagacg      717

```

<210> 4

<211> 297

<212> DNA

<213> HCV NS5a/5b Spaltstelle, cDNS Fragment

<400> 4

```

gcggatccct cttgagggag agccggggga ccccgatctc agcgacgggt cttgggtctac    60
cgtaagcgag gaggccagtg aggacgtcgt ctgctgctog atgtcctaca catggacagg    120
tgccctgata acgccatgcg ctgcggagga aagcaagctg cccatcaatg cgttgagcaa    180
ctcttttgctg cgccaccata acatggttta tgccacaaca tcccgcagtg caagccagcg    240
gcagaagaag gttacttttg ataggctgca ggtcctggat gatcactaog aattcgc      297

```

-8-

<210> 5

<211> 1561

<212> DNA

<213> HCV NS2/3 Protease cDNS

<400> 5

```

gccaattoga ccgggagatg gccgcacatgt gccggaggcgc ggttttcata ggtctggcac      60
tctgacattt gtcaccatac tataaagtgt tctcgccaa gtcacatagg tggttgcaat      120
actttatcac cagagccgag gccgatttgc aagtgtggat ccccccctctt aatgttcgag      180
ggggccgcga tgccatcatc cttcttacgt gcccggtcca ccagagcta atctttgaca      240
tcaccaagct cttgctcgtc atactcggcc cactcatggt gctccaggcc ggcataatta      300
gagcgccgta cttcgtgcgc gctcaagggc tcattcgtgc atgcatgttg gtgcggaagg      360
ttgctggggg ccattatgtc cagatggctc ttatgaagct ggccgcactg acgggtacgt      420
acgtctacga ccaccttacc ccactgcggg actgggcccc cgcgggccta cgagaccttg      480
cgggtggcggg tgagcccgtc gtcttttccg acatggagac caagatcatc acctgggggg      540
cagacactgc agcgtgcggg gacgtcatct tgggcctacc cgtctccgcc cgaaggggga      600
aggagatatt tctgggacca gccgatagcc ttgaggggca aggggtggcga ctctcgcctc      660
ccatcacggc ctattcccaa cagacgcggg gcctgcttgg ctgtatcatc accagtotta      720
caggccggga caagaaccag gtcgaggggg aggttcaagt ggtttccacc gcaacacaat      780
ctttcctggc gacctgtgtc aatggtgttt gctggactgt cttocatggt gctggctcaa      840
agaccctagc cggcccaaag ggtccaatca cccaaatgta caccaatgta gaccaggacc      900
tcgtcggtctg gccggcgccc ccgggagcgc gctccttgac accttgccac tgcggcagct      960
cggacctota cttggtctcg aggcattgtg atgtcatccc ggtgcgcggg cggggcgaca     1020
gccgggggag cctactttcc ccaggcccg tctctacttt gaagggttcc tggggtggcc     1080
cactgctctg cccctggggg catgtcgcgg gcatcttccg ggctgctgtg tgcaccgggg     1140
gggttgogaa agcgggtggc tttgtgcocg ttgagtctat ggaaaccacc acgcggtccc     1200
cggctctcac ggacaactca tccccacctg ctgtaccgca gacatttcaa gtggcccatc     1260
tgacgcccc cactggcagc ggcaagagca ctaagggtgc agccgcatat gcagcccaag     1320
ggtataaggt acttgctctg aaccgctccg ttgccgccac attaagtttt ggggcgtata     1380
tgtctaaggc acatggtgtc gacctagca tcagaactgg gacaaggacc atcaccacgg     1440

```

- 9 -

gagcccccat cacatatccc acctacggca agttccttgc cgacgggtggt tgctctgggg 1500
 gogoctatga catcataata tgtgatgagt goctotcaac tgactcgacc tcogaattcg 1560
 c 1561

<210> 6

<211> 1919

<212> DNA

<213> HCV NS3 Protease cDNS

<400> 6

gcaagcttac catggctccc atcacggcct attcccaaca gacgcggggc ctgcttggct 60
 gtatcatcac cagtcttaca ggccgggaca agaaccagggt cgagggggag gttcaagtgg 120
 tttccacgcg aacacaatct ttcttgga cctgtgtcaa tgggtgtttgc tggactgtct 180
 tccatggtgc tggctcaaag accctagccg gcccaaaggg tccaatcacc caaatgtaca 240
 ccaatgtaga ccaggacctc gtcggctggc cggcgccccc cggagcgcgc tccttgacac 300
 cttgcacctg cggcagctcg gacctctact tggctctcgag gcatgctgat gtcacccgg 360
 tgcgcgggcg gggcgacagc cgggggagcc tactttcccc caggcccgtc tctacttga 420
 aggggttctc ggggtggcca ctgctctgcc cctcggggca tgtcgcgggc atcttcggg 480
 ctgctgtgtg cacccggggg gttgcgaaag cgggtggactt tgtgcccgtt gagtctatgg 540
 aaaccaaccac gcggtccccg gtcttcaagg acaactcact cccacctgct gtaccgcaga 600
 catttcaagt ggcccatctg cagccccca ctggcagcgg caagagcaat aagggtgccag 660
 ccgcatatgc agcccaaggg tataaggtag ttgtctgaa ccggtccgtt gcgcacacat 720
 taagtttttg gggttatatg totaaggcac atggtgtoga cctagcactc agaactggga 780
 caaggacat caccacgggc gccccatca catattccac ctacggcaag ttcttgccg 840
 acggtggttg ctctgggggc goctatgaca tcataatatg tgatgagtgc cactcaactg 900
 actcgacctc catcttgggc atoggcacag tcctggacca agcggagacg gctggagcgc 960
 ggctcgtcgt gctcgccacc gctacgctc cgggatcggg caccgtgcc catcccaaca 1020
 tcgaggagggt ggccttgtcc aacactggag agatccccct ctatggcaaa gccatcccca 1080
 tcgaggccat cagaggggga gggcacctca ttttctgcca ctccaagaag aaatgtgacg 1140
 agctcgccgc acagttgtcg agcctcgggg tcaatgctgt agcatattac cggggccttg 1200

-10-

atgtgtccgt cataccaacc agcggagacg tcgttgtcgt ggcaacagac gctctaata 1260
 cgggctttac cggcgacttt gactcagtga tcgactgtaa taagtgtgtc acccagacag 1320
 ttgatttcag cttggatcct accttcacca ttgagacgac gaccgtaccc caagatgcgg 1380
 tgtcgcgctc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggcaa gaggggtatt tacaggtttg 1440
 tgactocagg agaacggcct togggcatgt ttgattcctc ggtcctgtgc gagtgtatg 1500
 acgcaggctg tgcttggtat gagctcacgc ccgcgcagac ctcggtcaga ctgcgggctt 1560
 acctaaatac accaggggtg ccgctctgcc aggaccatct agagttctgg gagagcgtct 1620
 tcacaggcct caccacata gatgtcact tcttgtcca gaccaaacag gcaggagaca 1680
 acttccccta cctggtagca taccaggcta cgggtgtgcg cagagctcag gctccacctc 1740
 catcgtggga tcaaatgtgg aagtgcctca tacggctgaa gcctacgctg cacgggcga 1800
 caccctgct gtacaggcta ggagccgtcc aaaacgaggt taccctcacc caccocgtaa 1860
 ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcacctga ggaattgc 1919

<210> 7

<211> 2081

<212> DNA

<213> HCV NS3/4A Protease cDNS

<400> 7

gcaagcttac catggctccc atcacggcct attcccaaca gacgcggggc ctgcttggct 60
 gtatcatcac cagtottaca ggccgggaca agaaccaggt cgagggggag gttcaagtgg 120
 ttccaccgc aacacaatct ttctggoga cctgtgtcaa tgggtgtttgc tggactgtct 180
 tccatggtgc tggctcaaag accctagcgc gcccaaaggg tccaatcacc caaatgtaca 240
 ccaatgtaga ccaggacctc gtgggctggc cggcgccccc cggagcggcg tocttgacac 300
 cttgcacctg cggcagctcg gacctctact tgggtctcgag gcatgtgat gtcacccgg 360
 tgogccggcg gggcgacagc cgggggagcc tactttccc caggcccgct toctacttga 420
 agggttcctc ggggtggcca ctgctctgcc cctcggggca tgtcgcgggc atcttcggg 480
 ctgctgtgtg caccoggggg gttgcgaaag cgggtggactt tgtgcccggt gagtctatgg 540
 aaaccaccac ggggtccccg gtcttcacgg acaactcaco cccacctgct gtaccgcaga 600
 catttcaagt ggcccatctg cagcccccga ctggcagcgg caagagcact aagggtgccag 660
 ccgcatatgc agcccaaggg tataaggtag ttgtcctgaa cccgtccggt gccgccacat 720

-11-

taagtttttg ggcgtatatg totaaggcac atggtgtoga cctagcatc agaactggga 780
caaggaccat caccacgggc gccccatca catattccac ctaoggcaag ttctttgcg 840
acggtggttg ctctgggggc goctatgaca tcataatatg tgatgagtgc cactcaactg 900
actcgacctc catcttgggc atcggcacag tcttggaaca agcggagaag gctggagcgc 960
ggctcgtcgt gctcgccacc gctacgctc cgggatcggg caccgtgoca catccaaca 1020
tcgaggaggt ggccttgtcc aacactggag agatcccctt ctatggcaaa gccatcccca 1080
tcgaggccat cagaggggga gggcacctca tttcttgcca ctccaagaag aaatgtgacg 1140
agctgcgcgc acagttgtcg agcctcgggg tcaatgctgt agcatattac cggggccttg 1200
atgtgtcgtc cataccaacc agcggagacg tcgttgtcgt ggcaacagac gctctaataga 1260
cgggctttac cggcgacttt gactcagtga tcgactgtaa tacgtgtgtc acccagacag 1320
ttgatttcag cttggatcct accttcacca ttgagacgac gaccgtacc ccaagatgcgg 1380
tgtcgcgcgc gcagcggcga ggcaggactg gtaggggcaa gaggggtatt tacaggtttg 1440
tgactccagg agaacggcct tcgggcatgt ttgattcctc ggtcctgtgc gagtgtatg 1500
acgcaggctg tgcttggat gagctcacgc ccgccgagac ctcggtcaga ctgcgggctt 1560
acctaaatac accagggttg ccgctctgcc aggaccatct agagttcttg gagagcgtct 1620
tcacaggcct caccacata gatgtcact tcttgtcca gaccaaacag gcaggagaca 1680
acttcccta cctggtagca taccaggcta cgggtgtgcgc cagagctcag gctccacctc 1740
catcgtggga tcaaatgtgg aagtgcctca tacggctgaa gcctacgctg cacgggccga 1800
caccctgct gtacaggcta ggagccgtcc aaaacgaggt taccctcacc caccocgtaa 1860
ccaaatacat catggcatgc atgtcggctg acctggaggt cgtcaccagc acctgggtgc 1920
tggtaggcgg ggtccttgca gctctggcgc cgtattgctt aacaacgggc agcgtggtca 1980
ttgtgggcag gatcatcttg tcggggaggc cggccattat tccgatagg gaagttctct 2040
accgagagtt cgatgagatg gaagagtgcg gaggaattcg c 2081

<210> 8

<211> 1637

<212> DNA

<213> CD8-5A/B-GalVP16 Fusionsprotein cDNS

<400> 8

atggccttac cagtgaacgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgcgcacagg 60
 ccgagccagt tcgggtgtc gccgctggat cggacctgga acctgggoga gacagtggag 120
 ctgaagtgcc aggtgctgct gtccaaccgc acgtggggct gctcgtggct cttccagccg 180
 cgcggcgccg ccgcacgtcc caccctctct ctatacctot cccaaaacaa gcccaaggcg 240
 gccgaggggc tggacaccca ggggtttctg ggcaagaggt tgggggacac cttcgtcctc 300
 acctgagcg acttcgcgc agagaacgag ggctactatt tctgctcggc cctgagcaac 360
 tccatcatgt acttcagcca cttcgtgcgc gtcttctcgc cagcgaagcc caccacgacg 420
 ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc accatcgct cgcagcccct gtccctgcgc 480
 ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggaactcgcc 540
 tgtgatattt acatctgggc gcccttgccc gggacttgct gggtccttct cctgtcactg 600
 gttatcacc tttactgcaa ccacaggaac cgaagacgtg tttggatccc tcttgaggga 660
 gagcggggg accccgatct cagcgacggg tcttggctca ccgtaagcga ggaggccagt 720
 gaggacgtcg tctgctgctc gatgtcctac acatggacag gtgcctgat cagccatgc 780
 gctgcggagg aaagcaagct gccatcaat gcgttgagca actctttgct gcgccaccat 840
 aacatggttt atgccacaac atcccgcagt gcaagccagc ggcagaagaa ggttactttt 900
 gataggctgc aggtcctgga tgatcactac gaattcaagc tactgtcttc tatogaacaa 960
 gcatgcgata tttgcgcact taaaaagctc aagtgtcca aagaaaaacc gaagtgcgcc 1020
 aagtgtctga agaacaactg ggagtgtcgc tactctccca aaacccaaaag gtctccgctg 1080
 actagggcac atctgacaga agtggaatca aggctagaaa gactggaaca gctattttta 1140
 ctgatttttc ctogagaaga ccttgacatg attttgaaaa tggattcttt acaggatata 1200
 aaagcattgt taacaggatt atttgtacaa gataatgtga ataaagatgc cgtcacagat 1260
 agattggctt cagtggagac tgatatgcct ctaacattga gacagcatag aataagtgcg 1320
 acatcatcat cggagagag tagtaacaaa ggtcaaagac agttgactgt atoggggaata 1380
 cccggggatc tggccccccc gaccgatgtc agcctggggg acgagctcca cttagacggc 1440
 gaggacgtgg cagtggcgca tgccgacgcg ctagacgatt tcgatctgga catgttgggg 1500
 acgggggatt cccgggtcc gggatttacc cccaogact ccgcccccta cggcgctctg 1560
 gatatggcgc acttcagatt tgagcagatg tttacogatg cccttggaat tgacgagtac 1620
 ggtgggtaat ctagacg 1637

-13-

<211> 2909

<212> DNA

<213> CD8-NS2/3-GalVP16 Fusionsprotein cDNS

<400> 9

atggccttac cagtgaacgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgagccagt tccgggtgtc gccgctggat cggacctgga acctgggcga gacagtggag	120
ctgaagtgcc aggtgctgct gtccaaccgc acgtcgggct gctcgtggct cttccagccg	180
cgcgggcgcc cgccagtc cacttctctc ctatacctct cccaaaacaa gcccaaggcg	240
gccgaggggc tggacaccca ggggttctcg ggcaagaggt tgggggacac cttcgtcctc	300
acctgagcg acttccgccg agagaacgag ggctactatt tctgctcggc cctgagcaac	360
tccatcatgt acttcagcca cttcgtgcgc gtcttctcgc cagcgaagcc caccacgacg	420
ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc accatcgct cgagcccct gtccctgcgc	480
ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc	540
tgtgatctct acatctgggc gcccttggcc gggacttggt gggtccttct cctgtcactg	600
gttatcacc tttactgcaa ccacaggaac cgaagacgtg tttggatcct ggaattcgac	660
cgggagatgg ccgcatcgtg cggaggcgcg gttttcatag gtctggcaact cctgaccttg	720
tcaccatact ataaagtgtt cctcgccaag ctcatatggt gggtgcaata ctttatcacc	780
agagccgagg cgcatttgca agtggtggatc cccctctta atgttcgagg gggccgcgat	840
gccatcatcc ttcttacgtg cgcgggtccac ccagagctaa tctttgacat caccaagctc	900
ttgctcgcta tactcggccc actcatggtg ctccaggccg gcataattag agcgccgtac	960
ttcgtgcgcg ctcaagggct cattcgtgca tgcattgttg tgcggaagggt tgctgggggc	1020
cattatgtcc agatggctct tatgaagctg gccgcaactga cgggtacgta cgtctacgac	1080
caccttacc cactgcggga ctgggcccac gggggcctac gagaccttgc ggtggcggtt	1140
gagcccgctg tcttttccga catggagacc aagatcatca cctggggggc agacactgca	1200
gcgtgcgggg acgtcatctt gggcctaccc gtctccgcc gaagggggaa ggagatattt	1260
ctgggaccag ccgatagcct tgaggggcaa ggggtggcgac tctcgtctcc catcacggcc	1320
tattcccaac agacgcgggg cctgcttggc tgtatcatca ccagtcttac aggcggggac	1380
aagaaccagg tcgaggggga ggttcaagtg gtttccaccg caacacaatc tttcctggcg	1440
acctgtgtca atgggtgttg ctggactgtc ttocatgggt ctgggtcaaa gacctagcc	1500

ggcccaaagg gtccaatcac ccaaattgtac accaatgttag accaggacct cgtcgggtgg	1560
ccggcgcccc ccggagcgcg ctctttgaca cctttgacct ggggcagctc ggacctctac	1620
ttggtctcga ggcattgctga tgtcatcccg gtgcgcgggc gggggcgacag ccggggggagc	1680
ctactttccc ccaggcccggt ctctactttg aagggttcct cgggtggccc actgctctgc	1740
ccctcggggc atgtcgcggg catcttcggg gctgctgtgt gcaccggggg ggttgcgaaa	1800
gcggtggact ttgtgcccgt tgagtctatg gaaaccacca cgcggtcccc ggtcttcacg	1860
gacaactcat cccacctgc tgtaccgcag acatttcaag tggcccatct gcacgcccc	1920
actggcagcg gcaagagcac taagggtcca gccgcatacg cagcccaagg gtataaggta	1980
cttgtcctga acccgtcgtg tgccgccaca ttaagttttg gggcgatatat gtctaaggca	2040
catggtgtcg accctagcat cagaactggg acaaggacca tcaccacggg cgcctatgac	2100
acatatcca cctacggcaa gttccttgcc gacggtgggt gctctggggg cgcctatgac	2160
atcataatat gtgatygatg cctctcaact gactcgacct ccgaattcaa gctactgtct	2220
tctatcgaa cagcatgcga tatttgccga cttaaaaaagc tcaagtgtct caaagaaaaa	2280
ccgaagtgcg ccaagtgtct gaagaacaac tgggagtgtc gctactctcc caaaaccaa	2340
aggtctccgc tgactagggc acatctgaca gaagtggaa caaggctaga aagactggaa	2400
cagctatttc tactgatttt tctcgagaa gacctgaca tgattttgaa aatggattot	2460
ttacaggata taaaagcatt gttaacagga ttatttgtac aagataatgt gaataaagat	2520
gccgtcacag atagattggc ttcagtggag actgatatgc ctotaacatt gagacagcat	2580
agaataagtg cgacatcatc atcggaagag agtagtaaca aaggtaaag acagttgact	2640
gtatcgggaa taccggggga tctggcccc ccgacgatg tcagcctggg ggacgagctc	2700
cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg catgccgacg cgttagacga tttcgatctg	2760
gacatgttgg ggacggggga ttccccgggt ccgggattta ccccccaaga ctccgcccc	2820
tacggcgctc tggatatggc cgacttogag tttgagcaga tgtttacga tgcccttggg	2880
attgacgagt acggtgggta atctagacg	2909