

(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
29. Dezember 2004 (29.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/113560 A1

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/006827

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juni 2004 (24.06.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 28 775.2 25. Juni 2003 (25.06.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **RUPRECHT-KARLS- UNIVERSITÄT HEIDEL-
BERG** [DE/DE]; Grabengasse 1, 69117 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BODEM, Jochen**
[DE/DE]; Wielandtstrasse 3, 69120 Heidelberg
(DE). **KRÄUSSLICH, Hans-Georg** [DE/DE]; Lu-
dolf-Krehl-Strasse 27b, 69120 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: **HUHN, Michael**; Isenbruck-Bösl-Hörschler-
Wichmann-Huhn, Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165
Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, 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 (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

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

(54) Title: IN VIVO TEST SYSTEM FOR DETECTING HIV-PROTEASE ACTIVITY

(54) Bezeichnung: IN VIVO-TESTSYSTEM ZUM NACHWEIS VON HIV-PROTEASEAKTIVITÄT

(57) Abstract: The invention relates to a protein-containing composition, comprising a first fusion protein that contains an interac-
tion domain A and a fluorophore and comprising a second fusion protein that contains an interaction domain A' and a fluorophore
B'. The invention is characterized that A and A' can bind to one another and that the interface for a protease is inserted between A
and B or between A' and B'. The invention also relates to the nucleic acid that codes for the protein-containing composition, to a
method for detecting protease activity, and to a method for identifying protease inhibitors.

(57) Zusammenfassung: Offenbart ist eine proteinhaltige Zusammensetzung, umfassend ein erstes Fusionsprotein, enthaltend eine
Interaktionsdomäne A und ein Fluorophor und ein zweites Fusionsprotein, enthaltend eine Interaktionsdomäne A' und ein Fluoro-
phor B', dadurch gekennzeichnet, dass A und A' aneinander binden können, und dass zwischen A und B oder zwischen A' und B'
die Schnittstelle für eine Protease eingefügt ist. Ausserdem offenbart die Erfindung die für die proteinhaltige Zusammensetzung
kodierende Nukleinsäure, ein Verfahren zum Nachweis von Proteaseaktivität sowie ein Verfahren zur Identifizierung von Proteas-
einhibitoren.



WO 2004/113560 A1

In vivo-Testsystem zum Nachweis von HIV-Proteaseaktivität

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) basierendes *In-vivo*-Testsystem zum Nachweis einer Proteaseaktivität, insbesondere HIV-Proteaseaktivität, und zur Selektion wirksamer HIV-Proteaseinhibitoren.

10

Mit einer geschätzten Anzahl von 40 Millionen erkrankten Personen weltweit, 4,1 Millionen Neuinfektionen und etwa 2,5 Millionen Todesfällen pro Jahr breitet sich das erworbene Immundefizienz-Syndrom (AIDS) nach wie vor immer weiter aus. AIDS wird durch das humane Immundefizienzvirus (HIV), ein so genanntes Retrovirus, verursacht. Drei retrovirale Enzyme, reverse Transkriptase, Integrase und Protease (HIV-1p) sind sowohl für den Lebenszyklus von HIV als auch als Zielmoleküle für die Entwicklung von Arzneimitteln entscheidend. Die vornehmliche Funktion von HIV-1p, einer Aspartyl-Protease, besteht in der proteolytischen Spaltung der viralen Polypeptide p55/Gag (gruppenspezifisches Antigen; Strukturproteine) und p160/Pol (reverse Transkriptase, Integrase und RNase H). Die Spaltung dieser essentiellen HIV-Enzyme bzw. Proteine durch HIV-1p ist wichtig für ihre Reifung und ihre Funktion und ist somit für die Lebensfähigkeit von HIV verantwortlich. Zahlreiche antivirale Medikamente, die in der AIDS-Therapie eingesetzt werden, basieren auf einer Hemmung der HIV-1p-Proteaseaktivität (Proteaseinhibitoren). Jedoch treten aufgrund der raschen Anpassung des Virus durch Mutationen bei Therapie mit bestimmten Wirkstoffen schon nach wenigen Wochen resistente Virusvarianten auf, so dass die Behandlung von AIDS-Patienten auch in entwickelten Ländern nach wie vor sehr schwierig ist.

Das Problem der vorliegenden Erfindung besteht somit in der Bereitstellung einer Verbindung oder eines Testsystems, mit dessen Hilfe bevorzugt *in vivo* die Aktivität der HIV-Protease oder jeder anderen Protease schnell und einfach gemessen werden kann, und mit dessen Hilfe potentielle Proteaseinhibitoren auf ihre Wirksamkeit getestet werden können.

Aus dem Stand der Technik sind Testsysteme und Verbindungen bekannt, bei denen der Nachweis einer Proteaseaktivität beispielsweise auf der Messung einer geänderten Fluoreszenz beruht. Lindsten et al. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, Vol.

45, Seiten 2616-2622) beschreibt ein chimäres Nukleinsäurekonstrukt, bestehend aus dem für eine inaktive Vorstufe der HIV-1p-Protease kodierenden Bereich und dem für das so genannte „Green Fluorescent Protein“ (GFP) kodierenden Bereich. Nach Einbringen und Expression in einer Zielzelle werden die beiden fusionierten Anteile des Konstrukts durch die autokatalytische Aktivität der HIV-1p gespalten, so dass sich die Wirkung der Protease entfaltet, was anhand der GFP-basierenden Fluoreszenz bestimmt werden kann. Mit diesem System lässt sich die Aktivität der Protease jedoch nicht direkt nachweisen, sondern nur ihr toxischer Effekt auf die betroffene Zelle, da die Protease zytotoxisch ist und die grün fluoreszierenden Zellen absterben.

10

Seit Beginn der neunziger Jahre hat sich eine Fluoreszenz-basierende Nachweismethode etabliert, die dem Fachmann unter der Bezeichnung „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (FRET) bekannt ist. Mit der FRET-Methode werden üblicherweise Distanzen zwischen Molekülen gemessen. Entweder wird die Distanz zweier fluoreszierender Verbindungen (Fluorophore) voneinander auf einem einzigen Konstrukt, das heißt der Abstand zwischen den Enden bestimmt, oder man ermittelt die Distanz zweier Fluorophore auf zwei verschiedenen Molekülen. In einem typischen FRET-Experiment werden die interessierenden Moleküle mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren verknüpft. Ein Fluorophor wird als „Donor“, das andere als „Akzeptor“ bezeichnet. Die Lichtabsorption des Donors (z.B. 350 nm) erfolgt bei kürzerer Wellenlänge als die des Akzeptors (z.B. 450 nm). Beim FRET wird nun die Anregungsenergie vom Donor über Fluoreszenz auf den Akzeptor übertragen, der bis zu 90 Angström entfernt sein kann. Die übertragene Energie führt zur elektronischen Anregung des Akzeptors, wobei die Fluoreszenz des Donors „gelöscht“ wird. Gibt der Akzeptor seine Anregungsenergie in Form von Fluoreszenzlicht ab, so beginnt die Verbindung nach dem FRET zu fluoreszieren.

25

Die Effizienz des Energietransfers hängt von der Größe der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, der relativen Orientierung der Donor- und Akzeptor-Übergangsdipole und dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab. Aus dem letztgenannten ergibt sich, dass eine experimentell herbei geführte, räumliche Trennung zwischen Donor und Akzeptor zu einer im Vergleich zur Ausgangssituation verringerten emittierten Fluoreszenz des Akzeptors führt. Ein Beispiel für eine experimentelle Ausnutzung dieses physikalischen Prinzips ist in WO-A 02/090987 beschrieben. Die Erfindung offenbart eine zweiteilige Sonde, bestehend aus einer Zielmolekülbindungsstelle, welche mit einem ersten fluoreszierenden Polypeptid verknüpft ist, einem Bindungsmolekül, welches mit einem zweiten fluoreszierenden Polypeptid verknüpft ist, und einem so genannten flexiblen Linker, der das erste und das

30

35

zweite fluoreszierende Polypeptid miteinander verbindet. Mit Hilfe dieser Sonde lässt sich die Bindung einer Testsubstanz untersuchen. Bei erfolgreicher Bindung einer Testsubstanz wird das Bindungsmolekül der Sonde von der Bindungsstelle verdrängt, so dass sich der Abstand zwischen dem ersten und zweiten fluoreszierenden Polypeptid (Donor und Akzeptor) vergrößert, was eine Fluoreszenzänderung hervorruft. Die offenbarte Erfindung eignet sich jedoch offenbar nicht zur Messung einer Proteaseaktivität, auch wenn der Linker eine Proteaseschnittstelle darstellen würde. Denn in diesem Fall wäre eine effiziente Trennung der Fluorophore nicht gewährleistet, da die beiden Teile der Sonde noch über die Bindungsstelle und das Bindungsmolekül miteinander verbunden wären und Proteasen klein sind.

Cummings et al. (Analytical Biochemistry, 1999, Vol. 269, Seiten 79-93) haben sich das FRET-Prinzip für die Entwicklung eines In-vitro-Testsystems für HIV-Protease zunutze gemacht. Bei diesem System ist ein Substrat für die HIV-Protease an einem Ende mit einer Biotingruppe und am anderen Ende mit einem Phosphotyrosinrest versehen. Die Erzeugung eines FRET erfolgt durch Bindung eines gegen Phosphotyrosin gerichteten Antikörper, an welchem Europium-Cryptat (Donor-Fluorophor) gekoppelt ist, und durch gleichzeitige Bindung von Streptavidin, an welches XL665 (Akzeptor-Fluorophor) gekoppelt ist, an die Biotingruppe. Bei erfolgreicher Spaltung des Substrats mittels einer exogen zugegebenen HIV-Protease werden die Fluorophore voneinander getrennt, so dass das Fluoreszenzsignal abnimmt. Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass sie nur *in vitro* angewendet werden kann und infolgedessen sich nicht für Aufnahme- und Verträglichkeitsstudien eignet und dass die Fluoreszenz auch vom Bindungsverhalten eines Fluorophor-Trägers zu seinem entsprechenden Interaktionspartner an dem Substrat abhängt.

In ähnlicher Weise beschreibt EP-A 0 428 000 ein fluorogenes Proteasesubstrat für die HIV- und AMV-Protease (Avian Myeloblastosis Virus), bei welchem Donor- und Akzeptorfluorophor jeweils direkt an ein Ende des Substrats gekoppelt sind. In diesem System wird die emittierte Fluoreszenz des Donors (z.B. EDANS) gemessen, wobei die Fluoreszenz bei intaktem Substrat durch die Anwesenheit des „löschenden“ Akzeptors (z.B. DABCYL) niedrig ist und erst nach erfolgreicher Spaltung des Substrats durch eine Protease und infolgedessen Abtrennung des Akzeptors ansteigt. Auch diese Verbindungen eignen sich nur für einen In-vitro-Nachweis von (HIV-) Proteasen. Das gleiche Prinzip für ein Proteasesubstrat, nämlich die Anheftung eines Donors bzw. Akzeptors an je einem Ende einer proteolytischen Schnittstelle ist in US 6,291,201 beschrieben.

Mit der vorliegenden Erfindung kann das zugrunde liegende Problem unter Vermeidung der vorstehend genannten Nachteile gelöst werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine proteinhaltige Zusammensetzung,
5 umfassend

(a) ein erstes Fusionsprotein, enthaltend eine Interaktionsdomäne A und ein
Fluorophor B

und

(b) ein zweites Fusionsprotein, enthaltend eine Interaktionsdomäne A' und ein
10 Fluorophor B',

dadurch gekennzeichnet, dass A und A' aneinander binden können, und dass zwischen A und B oder zwischen A' und B' die Schnittstelle für eine Protease eingefügt ist.

Die Erfinder haben erkannt, dass bei vorhandener Proteaseaktivität durch Schnitt der
15 Schnittstelle ein Fluorophor abgetrennt wird, so dass kein FRET mehr erfolgen kann. Für die Wirkungsweise der Zusammensetzung ist es gegebenenfalls unerheblich, ob B der Donor und B' der Akzeptor oder ob B' der Donor und B der Akzeptor ist. Demnach ist es außerdem unerheblich, ob durch die Aktivität der Protease der Donor oder der Akzeptor abgetrennt wird, da für einen erfolgreichen Energietransfer die Anwesenheit beider
20 Fluorophore erforderlich ist. Bevorzugt für die vorliegende Erfindung ist es allerdings, wenn die Schnittstelle auf dem den Akzeptor enthaltenden Fusionsprotein platziert ist, so dass der Akzeptor abgetrennt wird.

Wird durch entsprechende Platzierung der Schnittstelle der Akzeptor abgetrennt, nimmt
25 das Fluoreszenzsignal proportional zur Proteaseaktivität ab, sofern die emittierte Fluoreszenz des Akzeptors gemessen wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt hingegen zu, wenn die emittierte, aber infolge des fehlenden Akzeptors nicht mehr übertragbare Fluoreszenz des Donors gemessen wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine zur Proteaseaktivität proportionale Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen.

30 Die Schnittstelle kann eine Schnittstelle für jede dem Fachmann bekannte Protease sein. Dazu zählen alle sauren, neutralen und alkalischen Proteasen, welche zu den Gruppen der Serin-, Cystein-, Aspartat- oder Metallproteasen gehören. Eine umfangreiche Liste von Proteasen (auch bekannt als Peptidasen), deren Aktivität mittels der vorliegenden
35 Erfindung getestet oder nachgewiesen werden kann, ist auf der ExPASy-Internetseite (Expert Protein Analysis System) unter <http://ca.expasy.org/cgi-bin/enzyme-search->

ful?peptidase zu finden. Des Weiteren umfasst die vorliegende Erfindung Schnittstellen für sowohl tierische, pflanzliche, bakterielle als auch virale Proteasen.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Schnittstelle um eine Schnittstelle für eine virale Protease. Besonders günstig für die vorliegende Erfindung ist es, wenn die Schnittstelle die Schnittstelle für die HIV-Protease ist.

10 Als Donor oder Akzeptor (B oder B') eignen sich für die vorliegende Erfindung alle dem Fachmann bekannten Fluorophore, welche die zuvor beschriebenen Eigenschaften aufweisen. Dabei hängt es gegebenenfalls von der zu untersuchenden Protease ab, welches Donor/Akzeptor-Paar sich zur Durchführung der Erfindung am besten eignet. Bei der Wahl eines für die vorliegende Erfindung günstigen Donor/Akzeptor-Paares ist außerdem darauf zu achten, dass die zu untersuchende Protease kein intrinsisches Chromophor (Farbträger) besitzt, welches als Donor oder Akzeptor dienen könnte. Dazu gehören, unter anderem, 15 aromatische Molekülbestandteile wie z.B. Tryptophan, Pyrimidinbasen, Albumin, reduzierte Nicotin-Adenin-Nukleotide, oxidierte Flavin-Mononukleotide, Pyridoxalphosphat, Häm-Gruppe, Retinalgruppe im Rhodopsin. Geeignete Donor/Akzeptor-Paare können beispielsweise sein: Phycoerythrin/Cyan-5, FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)/Cyan-3, Fluoreszein/Hexafluoreszein, Lucifer-Yellow/DNP (2,4-Dinitrophenyl), EDANS/DABCYL, Coumarin/DABCYL, Europiumkryptat/XL665, 20 BFP/GFP, CFP/YFP oder GFP/Rhodamin, sowie weitere unterschiedliche Kombinationen der genannten oder anderer, dem Fachmann bekannten Fluorophore. BFP, GFP, CFP und YFP sind die gebräuchlichen Abkürzungen für Blue, Green, Cyan und Yellow Fluorescent Protein. Bevorzugt sind die Donor/Akzeptor-Paare BFP/GFP und CFP/YFP, besonders 25 bevorzugt BFP/GFP.

Es ist auch möglich, dass der Akzeptor B oder B' ein nicht-fluoreszierender Farbstoff ist. Damit lässt sich beispielsweise Hintergrundfluoreszenz, die auf einer direkten, nicht über den Donor erfolgten Anregung des Akzeptors basiert, minimieren. Beispiele hierfür sind 30 die so genannten QSY-7-Farbstoffe (Molecular Probes), die im Allgemeinen in Kombination mit grün- oder orange-fluoreszierenden Donoren wie Fluoreszein, Oregon Green, Alexa Fluor, BODIPY FL oder Tetramethylrhodamin eingesetzt werden.

35 Zur Anregung des Donors kann jede geeignete Lichtquelle, wie z.B. eine Wolframlampe, Xenonlampe, Quecksilber-Argon-Lampe, Deuteriumbogenlampe, Halogenlampe, ein Laser oder eine LED (Licht-Emittierende Dioden)-Lichtquelle dienen. Die Messung erfolgt mittels gebräuchlicher Detektoren, beispielsweise eine Photomultiplieröhre, Photodioden

(Diodenzeile), Siliziumdetektor oder Charge-Couple-Device-Detektoren. Zur Erzielung optimaler Wellenlängen können verschiedene, dem Fachmann bekannte Interferenzfilter, z.B. Bandpassfilter, Kantenfilter, Konversionsfilter, Wärmereflexionsfilter, UV-Sperrfilter, UV-Spiegel, Kaltlichtspiegel, achromatische Strahlteiler, dichroitische Spiegel, Farbteiler, 5 Fluoreszenz-Anregungs- und Sperrfilter zum Einsatz kommen.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Donor B oder B' um einen so genannten biolumineszenten Donor, der nicht durch absorbierte Lichtenergie angeregt werden muss. Prinzipiell ist diese Vorgehensweise, die der Fachmann unter der 10 Bezeichnung Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) kennt, mit FRET vergleichbar. Der biolumineszente Donor ist dabei üblicherweise die Luciferase des Seestiefmütterchens *Renilla reniformis*, welche in Anwesenheit von Sauerstoff ihr Substrat Coelenterazin zu Coelenteramid oxidiert, wobei Lichtenergie entsteht, die wiederum auf den fluoreszierenden Akzeptor, z.B. GFP oder YFP, übertragen wird. Coelenterazin ist 15 zellpermeabel, so dass diese Methode auch *in vivo* angewendet werden kann.

Als Interaktionspartner A oder A' eignen sich für die vorliegende Erfindung alle dem Fachmann für solche Zwecke gebräuchlichen Moleküle, die natürlicherweise miteinander interagieren. Es kann sich hierbei beispielsweise um Antigen/Antikörper-Paare handeln, 20 oder um die Bindungs- und Aktivator-domäne eines ausgewählten Proteins, z.B. Lex-A/B42 oder GAL4-Bindedomäne/VP16. Andere Beispiele umfassen Myo-D/Id, EVH-1/Act-A, und Biotin/(Strept-)Avidin. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Interaktionspartnern um das so genannte Large-T-Antigen des SV40-Virus und das Proto-Onkogen p53.

25 Die gegenseitige Bindung der Interaktionspartner A und A' aneinander kann als Haupt- oder Nebenvalenzbindung stattfinden. Als Hauptvalenzbindungen kommen unter anderem kovalente (Atombindungen), ionische und metallische Bindungen sowie Übergänge dazwischen in Frage. Als Nebenvalenzbindungen (Van der Waals-Bindungen) kommen 30 elektrostatische Wechselwirkungen wie Dipol-Dipol- oder Dipol-Quadrupol-Wechselwirkungen und indirekte Wechselwirkungen infolge gegenseitiger Polarisierung der Ladungsverteilung in Frage. Ein Beispiel für eine Nebenvalenzbindung stellt die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung dar.

35 Die proteinhaltige Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann nach jedem dem Fachmann zugänglichen Verfahren hergestellt werden. Denkbar sind vor allem chemische Peptidsyntheseverfahren sowie gentechnologische Verfahren. Zur Herstellung der

erfindungsgemäßen, proteinhaltigen Zusammensetzung mittels gentechnologischer Verfahren ist die Bereitstellung der für die proteinhaltige Zusammensetzung kodierenden Nukleinsäure erforderlich.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform richtet sich die vorliegende Erfindung demnach auf eine Nukleinsäure bzw. nukleinsäurehaltige Zusammensetzung, die für die proteinhaltige Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure bzw. nukleinsäurehaltige Zusammensetzung besteht
10 demnach aus

- (a) einer ersten Nukleinsäure, die für ein erstes Fusionsprotein, enthaltend eine Interaktionsdomäne A und ein Fluorophor B, kodiert
und
- (b) einer zweiten Nukleinsäure, die für ein zweites Fusionsprotein, enthaltend eine
15 Interaktionsdomäne A' und ein Fluorophor B', kodiert,
dadurch gekennzeichnet, dass die von der Nukleinsäure kodierten Bereiche A und A' aneinander binden, und dass zwischen den von der Nukleinsäure kodierten Bereichen A und B oder zwischen A' und B' der kodierende Bereich für eine Proteaseschnittstelle eingefügt ist.

20

Als Fluorophore werden in diesem Fall vorzugsweise Renilla-Luciferase, BFP, GFP, CFP und YFP gewählt, da niedermolekulare, fluoreszierende Verbindungen wie z.B. DNP nur nachträglich nach Transkription und Translation am fertigen Protein angebracht werden können.

25

Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße Nukleinsäure zur Expression des von ihr kodierten Proteins in Zellen eingesetzt, die gleichzeitig oder anschließend mit einer für eine Protease, insbesondere HIV-Protease, kodierenden Nukleinsäure transfiziert werden können. Als Zellen in Frage kommen alle Zellen, in denen eine Proteaseaktivität verifiziert
30 oder inhibiert werden soll. Beispielhaft kann die vorliegende Erfindung in T-Zellen ausgeführt werden.

35

Als besonderen Vorteil der vorliegenden Erfindung kann auch gesehen werden, dass die erfindungsgemäße Nukleinsäure nach Transfektion der Zielzellen im Kern lokalisiert, das von der Protease abgetrennte Fluorophor nach Transkription und Translation jedoch im Cytoplasma nachgewiesen wird. Durch die räumliche Abtrennung des Fluorophors in ein

anderes Zellkompartiment ist eine Änderung der Fluoreszenz nach erfolgreicher Spaltung durch eine Protease gewährleistet.

5 Zum Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in die Wirts- bzw. Zielzelle (Transformation oder Transfektion) stehen dem Fachmann zahlreiche Verfahren – abhängig von der gewählten Wirtszelle – zur Verfügung. Die einfachste Methode für den Gentransfer ist die Injektion „nackter“ Nukleinsäuren in ein Zielgewebe/Zielzellen. Eine effizientere Methode besteht in der Manipulation einer einzelnen Zelle durch so genannte Mikroinjektion der Nukleinsäure in den Zellkern. Besonders günstig ist der Einsatz von 10 Reagenzien und Methoden, sowie beliebige Kombinationen davon, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Kalziumchlorid, Rubidiumchlorid, Lithiumchlorid, Kalziumphosphat, DEAE-Dextran, kationische Lipide, biolistische Partikelbombardierung („gene gun“-Methode), Hitzeschocktransformation und Elektroporation.

15 Für die Expression und das Einbringen der Nukleinsäure in die Zielzelle ist es von Vorteil, wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäure bzw. nukleinsäurehaltige Zusammensetzung in einem so genannten Expressionsvektor inseriert ist. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch eine rekombinante DNA und einen Expressionsvektor, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Expressionsvektor um einen eukaryontischen, insbesondere menschlichen, bakteriellen oder einen retroviralen Vektor, Plasmid, Bacteriophagen oder um andere in der Gentechnik übliche Vektoren, z.B. Liposomen, die zur Expression von Proteinen bzw. Peptiden geeignet sind. Falls 25 gewünscht oder erforderlich, kann die Nukleinsäuresequenz im erfindungsgemäßen Vektor mit regulatorischen Elementen, die Transkription und Synthese einer translatierbaren mRNA in pro- und/oder eukaryontischen Zellen gewährleisten, operativ verbunden sein. Derartige regulatorische Elemente sind Promotoren, Enhancer oder Transkriptionsterminationssignale, können aber auch Introns oder ähnliche Elemente sein, 30 wie Elemente, welche die Stabilität und Vermehrung des Vektors, die Selektion und/oder die Integration in das Wirtsgenom ermöglichen oder dazu beitragen.

Die Erfindung umfasst außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, eines Fragments oder Derivats davon, das von der erfindungsgemäßen 35 Nukleinsäure kodiert wird. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte: (a) Einbringen

eines erfindungsgemäßen Vektors, der die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält, in eine geeignete Wirtszelle mittels geeigneter Methoden, wobei die Wirtszelle pro- oder eukaryontisch sein kann, (b) Kultivierung der transfizierten Wirtszelle und (c) Isolierung des rekombinanten Proteins aus der Wirtszelle oder aus dem Kulturmedium.

5

Falls gewünscht oder erforderlich können die gemäß Schritt (c) isolierten Proteine für andere Zwecke weiter aufgereinigt werden. Der Fachmann kennt hierfür zahlreiche Methoden, wie z.B. Salzfractionierung, Größenausschlusschromatografie, Ionenaustauschchromatografie, Reverse-Phase-Chromatografie, Affinitätschromatografie und ähnliches.

10

Durch das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in die Zielzellen können durch Auswahl eines geeigneten, dem Fachmann bekannten, Selektionsmarkers sogenannte stabile Zelllinien generiert werden, d.h. die erfindungsgemäße Nukleinsäure bleibt im Genom der Zielzelle zur dauerhaften Expression vorhanden (stabile gegenüber transienter Transfektion). Gegensand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge auch eine Wirtszelle bzw. eine Zelllinie, welche mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure transfiziert ist.

15

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis einer Proteaseaktivität in einer Zielzelle, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

20

- (a) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für einen für die Schnittstelle der nachzuweisenden Protease enthält,
- (b) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für die Schnittstelle der nachzuweisenden Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die nachzuweisende Protease kodierenden Nukleinsäure als Positivkontrolle,
- (c) Herstellung eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (a) und eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (b)
- und
- (d) Messung der Fluoreszenz der Zelllysate aus Schritt (c) der Zielzellen aus Schritt (a) und aus Schritt (b) und Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzwerte.

25

30

35

Verhält sich die Fluoreszenz der Zielzellen aus (a) ähnlich wie die Fluoreszenz der Zielzellen aus (b), ist davon auszugehen, dass die Zielzellen aus (a) die gesuchte Protease enthalten. Damit ist das erfindungsgemäße Verfahren für diagnostische Zwecke geeignet, insbesondere, wenn damit virale oder bakterielle Proteasen bzw. im allgemeinen organismusfremde Proteasen nachgewiesen werden sollen. Eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Fluoreszenz könnte demnach auf eine Virusinfektion oder andere Art von Kontamination der betroffenen Zelle hindeuten. In einer besonderen Ausführungsform ist die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachzuweisende Protease die HIV-Protease. Ein diagnostisches Kit könnte somit eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eine für eine Protease kodierende Nukleinsäure, Transfektionsreagenzien, bereits transfizierte Zellen als Kontrollen, sowie für die Durchführung des Verfahrens geeignete Puffer und Enzyme enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Proteaseinhibitoren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für die Schnittstelle der zu inhibierenden Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die zu inhibierende Protease kodierenden Nukleinsäure,
 - (b) Zugabe einer Testsubstanz zu einer Teilpopulation der transfizierten Zielzellen aus (a),
 - (c) Herstellung eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (a) und eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (b)
- und
- (d) Messung der Fluoreszenz der Zelllysate aus Schritt (c) der Zielzellen aus Schritt (a) und aus Schritt (b) und Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzwerte.

Sollte die mit der Testsubstanz behandelte Teilpopulation der transfizierten Zielzellen eine im Vergleich zur unbehandelten Teilpopulation veränderte Fluoreszenz aufweisen, könnte dies auf eine erfolgreiche Inhibition der betreffenden Protease hindeuten. In entsprechender Weise ist es auch denkbar, dass das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung eines Proteaseaktivators geeignet ist. Bevorzugt wird das vorstehende Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der HIV-Protease eingesetzt.

Darüber hinaus ist es möglich, unter Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. des davon kodierten Polypeptids zu bestimmen, ob eine bestimmte Sequenz eine Proteaseschnittstelle darstellt. Zu diesem Zweck kann man zwischen die für den Interaktionspartner A oder A' und für das Fluorophor B oder B' kodierende Nukleinsäuresequenz mittels dem Fachmann bekannter, gängiger Klonierungsmethoden eine bestimmte Nukleinsäuresequenz einfügen, die für eine etwaige Proteaseschnittstelle kodiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft demzufolge ein Verfahren zum Nachweis einer Proteaseschnittstelle, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für die nachzuweisende Schnittstelle einer bekannten Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die bekannte Protease kodierenden Nukleinsäure,
- (b) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für die bekannte Schnittstelle einer bekannten Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die bekannte Protease kodierenden Nukleinsäure,
- (c) Herstellung eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (a) und eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (b)
und
- (d) Messung der Fluoreszenz der Zelllysate aus Schritt (c) der Zielzellen aus Schritt (a) und aus Schritt (b) und Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzwerte.

Der Fachmann weiß, wie man die vorstehend beschriebenen Verfahren (Nachweis einer Proteaseaktivität, Identifizierung von Proteaseinhibitoren und Nachweis einer Proteaseschnittstelle) auch *in vitro* durchführen kann, indem nämlich statt der nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung die erfindungsgemäße, proteinhaltige Zusammensetzung eingesetzt wird. Diese kann direkt im Reagenzgefäß in einem geeigneten Puffer mit einer nachzuweisenden Protease, und gegebenenfalls einem entsprechenden Inhibitor, in Kontakt gebracht werden. Der Nachweis einer veränderten Fluoreszenz aufgrund vorhandener oder inhibierter Proteaseaktivität erfolgt entsprechend.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG:**FIGUR 1: Erfindungsgemäße Konstrukte****5 (A)**

Die Zeichnung zeigt eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen, proteinhaltigen Zusammensetzung. In der abgebildeten Konstruktion ist **A** beispielhaft SV40-Large-T-Antigen (LT), **A'** ist beispielhaft p53, **B** ist beispielhaft GFP und **B'** ist beispielhaft BFP. Die Schere bzw. **C** (für „cleavage site“) kennzeichnet die Schnittstelle für eine Protease. Die Wellenlänge der absorbierten und emittierten Lichtenergie ist in Nanometer (nm) angegeben.

(B)

In (B) ist der Aufbau einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure (oben), sowie der der Aufbau einer für eine Protease kodierenden Nukleinsäure (unten) dargestellt. **P** steht für „Promotor“, **A** steht für einen beliebigen Interaktionspartner, **C** steht für „cleavage site“, **B** steht für Fluorophor, **E** steht für HcRED oder DsRed2 (BD Biosciences), **IRES** steht für „internal ribosomal entry site“ (Neustart der Translationsinitiation) und **F** bezeichnet eine beliebige Protease.

20 FIGUR 2: Messung der Proteaseaktivität in Abhängigkeit von Proteaseinhibitoren

FRET (380/508 nm) wurde in Lysaten von Zellen, die mit pGFP-C-LT und pBFP-p53 transfiziert worden waren, und entweder ohne (Spur 1) oder mit einer für eine HIV-Protease kodierenden Nukleinsäure transfiziert (Spuren 2-6) sind, gemessen. Zwei Stunden nach der Transfektion wurden ansteigende Konzentrationen Saquinavir (Spuren 3-6) zugegeben.

FIGUR 3: Einfluss der HIV-Protease auf den FRET

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind entweder in HIV-Wildtyp-infizierte Zellen oder in Zellen, die mit einer HIV-Mutante, welche eine Mutation im katalytischen Zentrum der Protease aufweist (HIV delta-PR, HIVΔPR), eingebracht.

Konstrukte Fluoreszenz (380/507 nm)* :

GFP-c-LT	1
35 GFP-c-LT+BFP-P53	4,8
GFP-c-LT+BFP-P53+ HIV	1,5
GFP-c-LT+BFP-P53+ HIV-ΔPR	4,4

HIV: HIV Klon

HIV- ΔPR : HIV mit Mutation des kat. Zentrum der Protease

5 *Werte sind normalisiert auf GFP

FIGUR 4: Die Spaltung von GFP-C-LT ist spezifisch für die HIV-Protease

10 GFP-Nachweis mit anti-GFP-Antikörper im Lysat aus transfizierten 293-T-Zellen mit GFP-C-LT (Spur 1), GFP-C-LT plus HIV delta-PR (HIVΔPR) (Spur 2) und GFP-C-LT plus HIV (Wildtyp).

FIGUR 5: Modifikation des Protease-Expressionssystems

15

FIGUR 6: Untersuchung der Nelfinavir Resistenz mit Wildtyp und Protease Mutante 10L, 90M

20 Angegeben ist die GFP-Fluoreszenzabnahme durch Proteasespaltung. In der ersten Spalte sind die Klone ohne Protease aufgetragen und in der letzten die Klone ohne NFV. Es zeigt sich bei der 10L, 90M Mutante eine Resistenz bei höheren NFV Konzentrationen (Spalte 5-2), da die Protease hier noch Aktivität zeigt.

25 Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert:

BEISPIEL 1:

30 293-T-Zellen wurden mit den entsprechenden Vektoren ko-transfiziert und die aus den transfizierten Zellen hergestellten Zelllysate einen Tag nach der Transfektion im Fluorometer (380/507 nm) gemessen. Die Vektoren pGFP-LT und pGFP-C-LT unterscheiden sich durch eine zwischen GFP und LT klonierte HIV-Proteaseschnittstelle. Wird diese von der HIV-Protease geschnitten, findet kein FRET mehr statt. Das Kontrollexperiment ist pGFP-C-LT ohne HIV-Protease und pGFP-LT ohne Schnittstelle
35 mit HIV-Protease. In beiden Fällen wurde ein FRET nachgewiesen. Zur Expression der HIV-Protease in den Zellen, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten wurden subvirale HIV-Klone (Sicherheitsstufe I) und ein Konstrukt, welches DsRed2 oder Far-Red

unter der Kontrolle des CMV-I.E.-Promotors exprimiert (z.B. pCMV-DsRed-Express von BD Biosciences). Am 3'-Ende von DsRed wurde eine Interne Ribosomale Eintritts-Stelle (Translationsinitiation; IRES) (z.B. pIRES2-DsRed2 BD Biosciences) und die HIV-I-Protease kloniert, so dass die Protease etwa zwanzigfach niedriger als DsRed exprimiert wird. Dies erlaubt eine niedrige Proteaseexpression und eine interne Transfektionskontrolle.

Ergebnis-Tabelle:

pBFP-p53	pGFP-LT	pGFP-C-LT	Protease	Emission (507 nm)
+				4,3±0,5
	+			5,6±0,4
		+		5,4±0,4
+	+			9,3±0,3
+		+		9,8±0,5
+	+		+	10±0,7
+		+	+	6,4±0,8

10

BEISPIEL 2: Wirkung eines HIV-Proteaseinhibitors

FRET (380/508 nm) wurde in Lysaten von Zellen, die mit pGFP-C-LT und pBFP-p53 transfiziert worden waren, und entweder ohne (FIGUR 2, Spur 1) oder mit einer für eine HIV-Protease kodierenden Nukleinsäure transfiziert (FIGUR 2, Spuren 2-6) sind, gemessen. Zwei Stunden nach der Transfektion wurden ansteigende Konzentrationen Saquinavir (FIGUR 2, Spuren 3-6) zugegeben. Die Abnahme der Fluoreszenz aufgrund der aktiven HIV-Protease und erfolgreicher Abtrennung des Fluorophors wird mit steigender Saquinavirkonzentration verhindert, d.h. die Protease wird durch den Inhibitor erfolgreich inaktiviert, so dass eines der beiden Fluorophore nicht abgetrennt wird und ein FRET nach wie vor erfolgen kann.

25

BEISPIEL 3: Die Veränderung des FRET und die Abspaltung des Fluorophors beruht spezifisch auf HIV-Proteaseaktivität

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind entweder in HIV-Wildtyp-infizierte Zellen oder in Zellen, die mit einer HIV-Mutante, welche eine Mutation im katalytischen Zentrum

der Protease aufweist (HIV delta-PR, HIV Δ PR), eingebracht. Da nur im Wildtyp-HIV-Klon, aber nicht im mutanten HIV-Klon eine Verringerung der Emission beobachtet werden kann, wird deutlich, dass nur die HIV-Protease und nicht ein anderes HIV-Protein den FRET vermindert, d.h. die Reaktion ist spezifisch (FIGUR 3). Der GFP-Nachweis mit anti-GFP-Antikörper im Lysat aus transfizierten 293-T-Zellen mit GFP-C-LT (FIGUR 4, Spur 1), GFP-C-LT plus HIV delta-PR (HIV Δ PR) (FIGUR 4, Spur 2) und GFP-C-LT plus HIV (Wildtyp) verdeutlicht, dass nur in Gegenwart von HIV-Wildtyp, der die funktionelle Protease exprimiert, GFP abgespalten wird.

Das Experiment zeigt, dass nur die HIV-PR und kein anderer HIV-Bestandteil den FRET vermindert.

BEISPIEL 4: Modifikation des Protease-Expressionssystems

Um eine einfach Klonierbarkeit der Protease zu erreichen, wurde der HC-Red-Protease-Vektor so modifiziert, dass er an einer offenen Klonierungsstelle zwei überhängende dTTP-Nukleotide besitzt. Da Taq-Polymerasen dem Amplifikat ein überhängendes dATP anfügen können mit diesem System die PCR-Produkte direkt (ohne Restriktionsverdau) in den Expressionsvektor kloniert werden (siehe Figur 5).

BEISPIEL 5: Untersuchung der Nelfinavir Resistenz mit Wildtyp und Protease Mutante 10I, 90M

Die PR-Mutationen L10I und L90M erzeugen eine mittlere Resistenz gegen Nelfinavir. Die Fragestellung in diesem Versuch lautete: Kann dieser Unterschied mit dem erfindungsgemäßen System gemessen werden. Dazu wurden Zellen mit den FRET-Vektoren und HIV Wt oder HIV-PR-10I, 90M transfiziert. Das Medium wurde 6 h nach der Transfektion gewechselt und NFV in fallender Konz. zugegeben. FRET wurde 24 h nach der Transfektion gemessen (siehe Figur 6).

Patentansprüche

1. Proteinhaltige Zusammensetzung, umfassend
(a) ein erstes Fusionsprotein, enthaltend eine Interaktionsdomäne A und ein
5 Fluorophor B
und
(b) ein zweites Fusionsprotein, enthaltend eine Interaktionsdomäne A' und ein
Fluorophor B',
dadurch gekennzeichnet, dass A und A' aneinander binden können, und dass
10 zwischen A und B oder zwischen A' und B' die Schnittstelle für eine Protease
eingefügt ist.
2. Proteinhaltige Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
die Schnittstelle die Schnittstelle für eine virale Protease ist.
- 15 3. Proteinhaltige Zusammensetzung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass
die virale Protease die HIV-Protease ist.
4. Proteinhaltige Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch
20 gekennzeichnet, dass die Fluorophore B und B' entweder BFP in Kombination mit
GFP oder CFP in Kombination mit YFP sind.
5. Proteinhaltige Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch
gekennzeichnet, dass die Interaktionsdomänen A und A' SV40-Large-T-Antigen in
25 Kombination mit p53 sind.
6. Nukleinsäurehaltige Zusammensetzung, umfassend
(a) eine erste Nukleinsäure, die für ein erstes Fusionsprotein, enthaltend eine
Interaktionsdomäne A und ein Fluorophor B, kodiert
30 und
(b) eine zweite Nukleinsäure, die für ein zweites Fusionsprotein, enthaltend eine
Interaktionsdomäne A' und ein Fluorophor B', kodiert,
dadurch gekennzeichnet, dass die von der Nukleinsäure kodierten Bereiche A und A'
aneinander binden können, und dass zwischen den von der Nukleinsäure kodierten
35 Bereichen A und B oder zwischen A' und B' der kodierende Bereich für eine
Proteaseschnittstelle eingefügt ist.

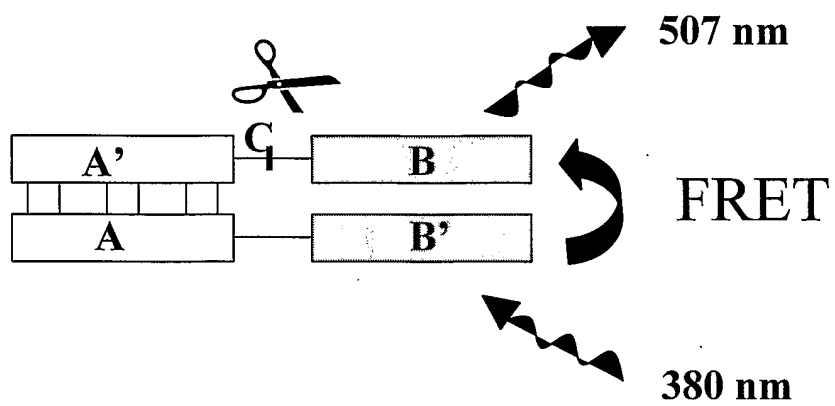
7. Nukleinsäurehaltige Zusammensetzung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der kodierende Bereich für die Schnittstelle der HIV-Protease kodiert.
8. Expressionsvektor, der eine nukleinsäurehaltige Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 6 oder 7 enthält.
9. Wirtszelle, die einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 8 enthält.
10. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, das von der nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 6 oder 7 kodiert wird, umfassend die Schritte
 - (a) Einbringen eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 8 in eine pro- oder eukaryontische Wirtszelle,
 - (b) Kultivierung der transfizierten Wirtszelle, und
 - (c) Isolierung des rekombinanten Proteins aus der Wirtszelle oder aus dem Kulturmedium.
11. Verfahren zum Nachweis einer Proteaseaktivität, umfassend die folgenden Schritte
 - (a) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung gemäß Anspruch 6 oder 7, welche den kodierenden Bereich für die Schnittstelle der nachzuweisenden Protease enthält,
 - (b) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung gemäß Anspruch 6 oder 7, welche den kodierenden Bereich für die Schnittstelle der nachzuweisenden Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die nachzuweisende Protease kodierenden Nukleinsäure als Positivkontrolle,
 - (c) Herstellung eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (a) und eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (b) und
 - (d) Messung der Fluoreszenz der Zelllysate aus Schritt (c) der Zielzellen aus Schritt (a) und aus Schritt (b) und Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzwerte.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die nachzuweisende Protease eine HIV-Protease ist.

13. Diagnostisches Kit zum Nachweis einer Protease, enthaltend eine nukleinsäurehaltige Zusammensetzung gemäß Anspruch 6 oder 7, eine für eine Protease kodierende Nukleinsäure, ein Transfektionsreagenz und gegebenenfalls Puffer und Enzyme.
- 5
14. Verfahren zur Identifizierung von Proteaseinhibitoren, umfassend die folgenden Schritte
- 10
- (a) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung gemäß Anspruch 6 oder 7, welche den kodierenden Bereich für die Schnittstelle der zu inhibierenden Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die zu inhibierende Protease kodierenden Nukleinsäure,
 - (b) Zugabe einer Testsubstanz zu einer Teilpopulation der transfizierten Zielzellen aus (a),
 - (c) Herstellung eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (a) und eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (b),
15 und
 - (d) Messung der Fluoreszenz der Zelllysate aus Schritt (c) der Zielzellen aus Schritt (a) und aus Schritt (b) und Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzwerte.
- 20
15. Verfahren zum Nachweis einer Proteaseschnittstelle, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
- 25
- (a) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für die nachzuweisende Schnittstelle einer bekannten Protease enthält, und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die bekannte Protease kodierenden Nukleinsäure,
 - (b) Transfektion mindestens einer Zielzelle mit einer erfindungsgemäßen, nukleinsäurehaltigen Zusammensetzung, welche den kodierenden Bereich für A/A', für B/B' und für die bekannte Schnittstelle einer bekannten Protease enthält,
30 und Transfektion der selben Zielzelle mit einer für die bekannte Protease kodierenden Nukleinsäure,
 - (c) Herstellung eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (a) und eines Zelllysats aus den Zielzellen aus (b)
und
 - (d) Messung der Fluoreszenz der Zelllysate aus Schritt (c) der Zielzellen aus Schritt (a) und aus Schritt (b) und Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzwerte.
- 35

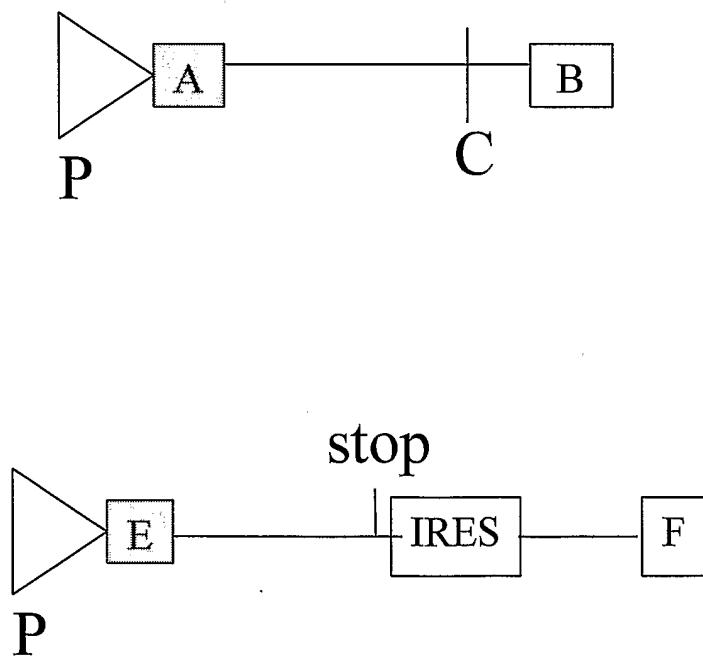
16. Verfahren zum Nachweis einer Proteaseaktivität, umfassend das Inkontaktbringen einer proteinhaltigen Zusammensetzung aus Anspruch 1 mit einer nachzuweisenden Protease und Messung der Fluoreszenz.
- 5 17. Verfahren zur Identifizierung von Proteaseinhibitoren, umfassend das Inkontaktbringen einer proteinhaltigen Zusammensetzung aus Anspruch 1 mit einer zu inhibierenden Protease und mit einer Testsubstanz und Messung der Fluoreszenz.
- 10 18. Verfahren zum Nachweis einer Proteaseschnittstelle, umfassend das Inkontaktbringen einer proteinhaltigen Zusammensetzung aus Anspruch 1 mit einer bekannten Protease und Messung der Fluoreszenz.

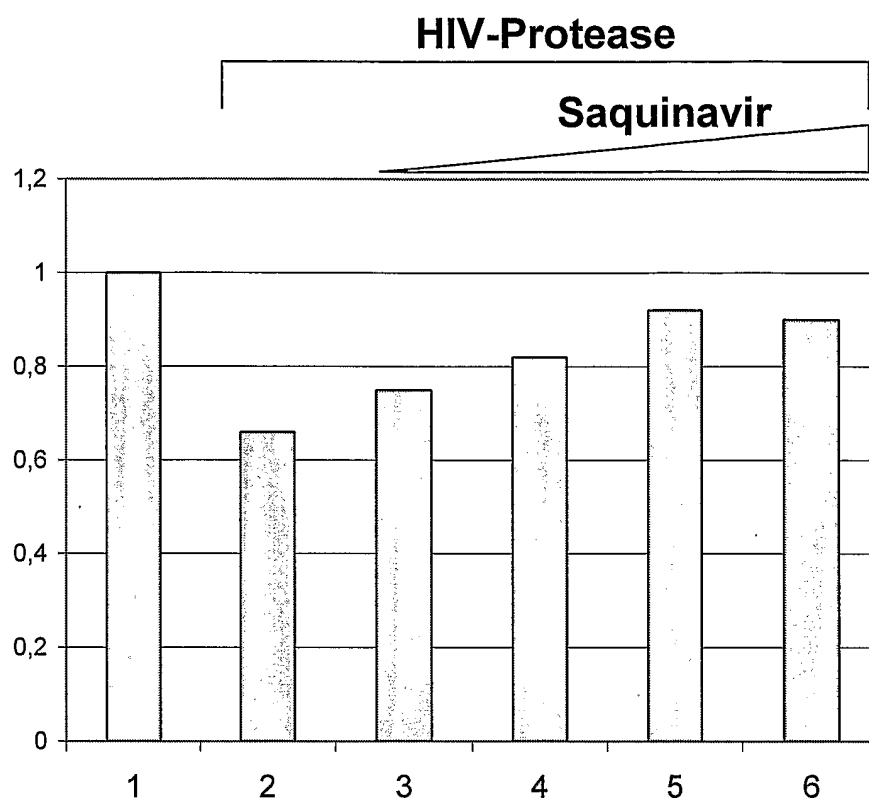
FIGUR 1 / 6

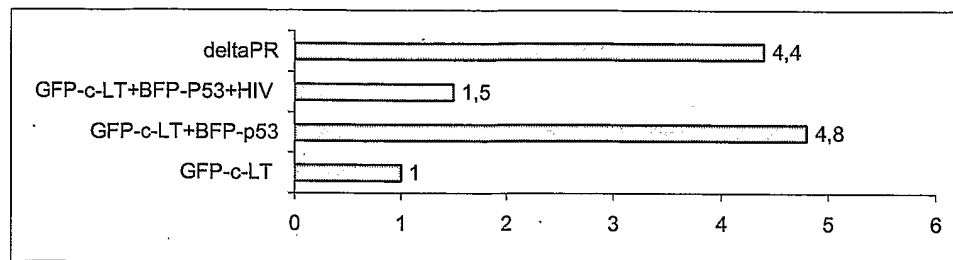
(A)

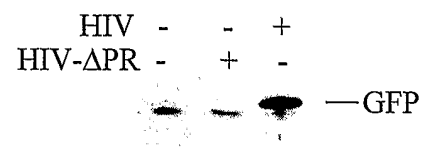


(B)



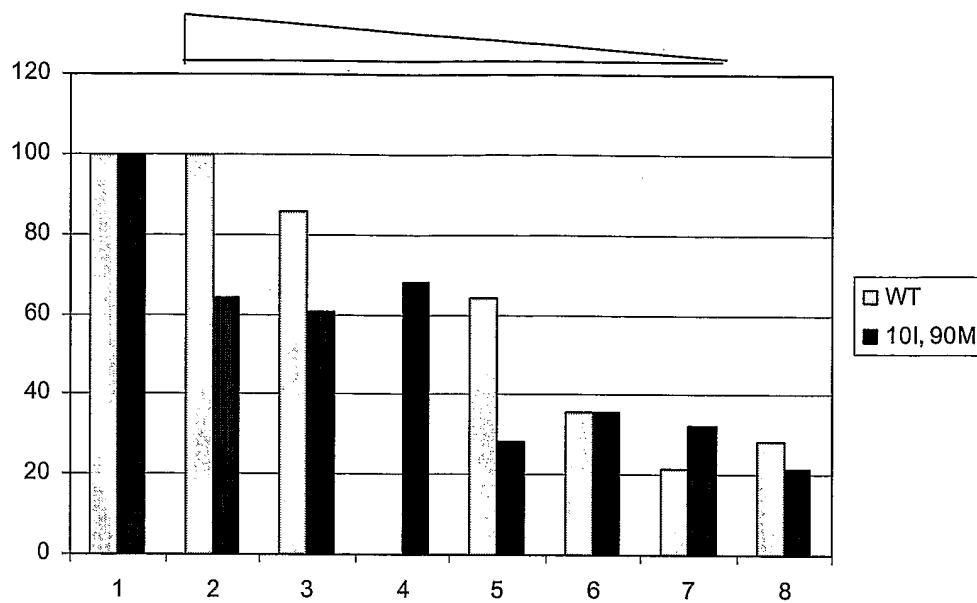
FIGUR 2 / 6

FIGUR 3 / 6

FIGUR 4 / 6

FIGUR 5 / 6



Figur 6 / 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAHAJAN N P ET AL: "BCL-2 AND BAX INTERACTIONS IN MITOCHONDRIA PROBED WITH GREEN FLUORESCENT PROTEIN AND FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 16, June 1998 (1998-06), pages 547-552, XP000876894 ISSN: 1087-0156 abstract page 547, column 2, last paragraph page 551, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 3	1-4, 6-10, 16, 18
Y	----- -/--	5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2004

Date of mailing of the international search report

24/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitt, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006827

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 877 805 B (AURORA BIOSCIENCES CORP ; UNIV CALIFORNIA (US)) 5 June 2002 (2002-06-05) claims 1,2,5,7,9,10,13,16,22 paragraphs '0023!, '0025!, '0026!, '0042! - '0044!, '0053!, '0073!, '0087! -----	1-4, 6-10, 16-18
X	WO 02/090987 A (VAUX DAVID JOHN TALBUTT ; ISIS INNOVATION (GB); FRICKER MARK DAVID (GB) 14 November 2002 (2002-11-14) cited in the application claims 1-5,11,13-15,19-24 page 5, line 16 - line 20 page 14, line 27 - page 15, line 10 page 17, line 11 - page 19, line 12 -----	1-4,6-10
Y	"Alpha-Gal quantitative assay kit. A quantitative kit to assay the strength of protein interactions in two-hybrid analysis" CLONTECHNIQUES, October 1999 (1999-10), XP002302302 the whole document -----	5
A	MITRA R D ET AL: "Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 173, no. 1, 1996, pages 13-17, XP004042847 ISSN: 0378-1119 abstract -----	1-18
L	HAZEBROUCK S ET AL: "Local and spatial factors determining HIV-1 protease substrate recognition." THE BIOCHEMICAL JOURNAL. 1 SEP 2001, vol. 358, no. Pt 2, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 505-510, XP002302303 ISSN: 0264-6021 page 505 -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006827

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0877805	B	18-11-1998	US 6803188 B1	12-10-2004
			AT 218615 T	15-06-2002
			AU 717873 B2	06-04-2000
			AU 2250497 A	22-08-1997
			CA 2245108 A1	07-08-1997
			DE 69713059 D1	11-07-2002
			DE 69713059 T2	19-12-2002
			DK 877805 T3	26-08-2002
			EP 0877805 A1	18-11-1998
			ES 2177939 T3	16-12-2002
			PT 877805 T	31-10-2002
			US 2002164674 A1	07-11-2002
			WO 9728261 A1	07-08-1997
			US 5981200 A	09-11-1999
			US 2003186229 A1	02-10-2003
WO 02090987	A	14-11-2002	EP 1388011 A2	11-02-2004
			WO 02090987 A2	14-11-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006827

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MAHAJAN N P ET AL: "BCL-2 AND BAX INTERACTIONS IN MITOCHONDRIA PROBED WITH GREEN FLUORESCENT PROTEIN AND FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 16, Juni 1998 (1998-06), Seiten 547-552, XP000876894 ISSN: 1087-0156 Zusammenfassung Seite 547, Spalte 2, letzter Absatz Seite 551, Spalte 1, Absatz 4 - Spalte 2, Absatz 3	1-4, 6-10, 16, 18
Y	----- -/--	5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/11/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmitt, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	EP 0 877 805 B (AURORA BIOSCIENCES CORP ; UNIV CALIFORNIA (US)) 5. Juni 2002 (2002-06-05) Ansprüche 1,2,5,7,9,10,13,16,22 Absätze '0023!, '0025!, '0026!, '0042! - '0044!, '0053!, '0073!, '0087! -----	1-4, 6-10, 16-18
X	WO 02/090987 A (VAUX DAVID JOHN TALBUTT ; ISIS INNOVATION (GB); FRICKER MARK DAVID (GB) 14. November 2002 (2002-11-14) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-5,11,13-15,19-24 Seite 5, Zeile 16 - Zeile 20 Seite 14, Zeile 27 - Seite 15, Zeile 10 Seite 17, Zeile 11 - Seite 19, Zeile 12 -----	1-4,6-10
Y	"Alpha-Gal quantitative assay kit. A quantitative kit to assay the strength of protein interactions in two-hybrid analysis" CLONTECHNIQUES, Oktober 1999 (1999-10), XP002302302 das ganze Dokument -----	5
A	MITRA R D ET AL: "Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, Bd. 173, Nr. 1, 1996, Seiten 13-17, XP004042847 ISSN: 0378-1119 Zusammenfassung -----	1-18
L	HAZEBROUCK S ET AL: "Local and spatial factors determining HIV-1 protease substrate recognition." THE BIOCHEMICAL JOURNAL. 1 SEP 2001, Bd. 358, Nr. Pt 2, 1. September 2001 (2001-09-01), Seiten 505-510, XP002302303 ISSN: 0264-6021 Seite 505 -----	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006827

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0877805 B	18-11-1998	US 6803188 B1	12-10-2004
		AT 218615 T	15-06-2002
		AU 717873 B2	06-04-2000
		AU 2250497 A	22-08-1997
		CA 2245108 A1	07-08-1997
		DE 69713059 D1	11-07-2002
		DE 69713059 T2	19-12-2002
		DK 877805 T3	26-08-2002
		EP 0877805 A1	18-11-1998
		ES 2177939 T3	16-12-2002
		PT 877805 T	31-10-2002
		US 2002164674 A1	07-11-2002
		WO 9728261 A1	07-08-1997
		US 5981200 A	09-11-1999
		US 2003186229 A1	02-10-2003
WO 02090987 A	14-11-2002	EP 1388011 A2	11-02-2004
		WO 02090987 A2	14-11-2002