



19 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

12 **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

97 **EP 0 856 051 B 1**

10 **DE 696 20 432 T 2**

61 Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/11
C 07 K 14/18
C 12 Q 1/70
C 12 N 7/00
C 12 N 9/00

DE 696 20 432 T 2

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 696 20 432.0
- 96 PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/14033
- 96 Europäisches Aktenzeichen: 96 929 843.9
- 87 PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/08310
- 86 PCT-Anmeldetag: 28. 8. 1996
- 87 Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 6. 3. 1997
- 97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 5. 8. 1998
- 97 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 3. 4. 2002
- 47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 21. 11. 2002

- 30 Unionspriorität:
520678 29. 08. 1995 US
- 73 Patentinhaber:
Washington University, St. Louis, Mo., US
- 74 Vertreter:
TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München
- 84 Benannte Vertragstaaten:
BE, CH, DE, ES, FR, GB, IE, IT, LI, NL, PT

- 72 Erfinder:
RICE, Charles M., St.Louis Missouri 63110, US;
KOLYKHALOV, Alexander A., St. Louis, US

54 **NEUE 3' TERMINALE SEQUENZ VON HEPATITIS C VIRALEN GENOM UND SEINE DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 696 20 432 T 2

Übersetzung des Europäischen Patents Nr. 0 856 051
Europäische Patentanmeldung Nr. 96 929 843.9
Washington University

Case:
Me/Ka

5

NEUE 3' TERMINALE SEQUENZ VON HEPATITIS C VIRALEN GENOM
UND SEINE DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE VERWENDUNG

10

Beschreibung

Unterstützung durch die Regierung

15

[0001] Diese Arbeit wurde durch das National Cancer Institute/National Institutes of Health, Zuschuß-Nummer CA57973 unterstützt. Die Regierung kann gewisse Rechte an dieser Erfindung besitzen.

Technisches Gebiet der Erfindung

20

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft im allgemeinen ein neues Nukleotidsequenzelement, identifiziert an oder nahe dem 3'-Ende der viralen Genom-RNA des Hepatitis-C-Virus (HCV). Dieses Element ist unter HCV-Genotypen hoch konserviert und kann für die HCV-Replikation essentiell sein.

25

Hintergrund der Erfindung

30

35

[0003] Nach der Entwicklung von diagnostischen Tests für Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-B-Virus wurde ein weiteres Agens, welches experimentell auf Schimpansen übertragen werden konnte (Alter et al., 1978; Hollinger et al., 1978; Tabor et al., 1978) als die Hauptursache von durch Transfusion erworbener Hepatitis erkannt. Im Jahre 1989 wurde über cDNA-Klone berichtet, welche dem auslösenden Agens von Nicht-A-Nicht-B(NANB)-Hepatitis entsprechen, das als Hepatitis-C-Virus (HCV) bezeichnet wird (Choo et al., 1989). Dieser Durchbruch hat zu raschen Fortschritten in der Diagnostik und in unserem Verständnis der Epidemiologie, Pathogenese und molekularen Virologie von HCV geführt (siehe Houghton et al., 1994, zur Übersicht). Beweise für HCV-Infektion werden in der ganzen Welt gefunden, und das Vorherrschen von Anti-HCV-Antikörpern reicht von 0,4-2 % in den am stärksten entwickelten Ländern bis zu mehr als 14 % in Ägypten (Hibbs et al., 1993). Neben der Übertragung über das Blut oder Blutprodukte, oder weniger häufig über sexuelle und

kongenitale Wege, treten sporadische Fälle auf, welche nicht mit bekannten Risikofaktoren assoziiert sind, und machen mehr als 40 % der HCV-Fälle aus (Alter et al., 1990; Mast und Alter, 1993). Die Infektionen sind üblicherweise chronisch (Alter et al., 1992), und die klinischen Folgen reichen von einem unauffälligen Trägerzustand bis zu akuter Hepatitis, chronischer aktiver Hepatitis und Zirrhose, welche in starkem Maße mit der Entwicklung von hepatozellulärem Karzinom assoziiert ist. Obwohl gezeigt wurde, dass alpha-IFN nützlich zur Behandlung mancher Patienten mit chronischen HCV-Infektionen ist (Davis et al., 1989; DiBisceglie et al., 1989), und Impfstoffe aus Untereinheiten sich im Schimpansen-Modell als einigermaßen vielversprechend erweisen (Choo et al., 1994), sind zukünftige Anstrengungen zur Entwicklung wirksamerer Therapien und Impfstoffe nötig. Die unter verschiedenen HCV-Isolaten beobachtete beträchtliche Diversität (zur Übersicht siehe Bukh et al., 1995), das Auftreten von genetischen Varianten in chronisch infizierten Personen (Enomoto et al., 1993; Hijikata et al., 1991; Kato et al., 1992; Kato et al., 1993; Kurosaki et al., 1993; Lesniewski et al., 1993; Ogata et al., 1991; Weiner et al., 1991; Weiner et al., 1992) und das Fehlen einer nach HCV-Infektion hervorgerufenen, schutzgebenden Immunität (Farci et al., 1992; Prince et al., 1992) stellen die hauptsächlichen Herausforderungen hinsichtlich dieser Ziele dar.

Molekularbiologie von HCV

[0004] Klassifizierung. Basierend auf seiner Genomstruktur und den Virion-Eigenschaften, ist HCV als eine getrennte Gattung in der Familie der Flaviviren klassifiziert worden, welche zwei weitere Gattungen einschließt: Die Flaviviren [wie Gelbfiebervirus (YF)] und die Tier-Pestiviren [virales Rinderdiarrhoe-Virus (BVDV) und klassisches Schweinefieber-Virus (CSFV)] (Francki et al., 1991). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen hüllentragende Virionen, welche ein Positiv-Strang-RNA-Genom enthalten, codierend für alle bekannten virusspezifischen Proteine über Translation eines einzigen, langen offenen Leserahmens (ORF; siehe nachstehend).

[0005] Struktur und physikalische Eigenschaften des Virions. Es sind wenige Informationen über die Struktur und Replikation von HCV verfügbar. Die Untersuchungen sind behindert worden durch das Fehlen eines Zellkultursystems, welches fähig ist, eine effiziente Virus-Replikation und die typischerweise niedrigen Titer an infektiösem Virus, welche in Serum vorhanden sind, zu unterstützen. Die Größe des infektiösen Virus, basierend auf Filtrationsexperimenten, beträgt zwischen 30-80 nm (Bradley et al., 1985; He et al., 1987; Yuasa et al., 1991). HCV-Partikel, isoliert aus vereinigttem menschlichem Plasma (Takahashi et al., 1992), vorhanden in Hepatozyten aus infizierten Schimpansen, und hergestellt in Zellkultur (Shimizu et al., 1994a), sind (versuchsweise) durch Elektronenmikroskopie visualisiert worden.

Anfängliche Messungen der Schwebedichte von infektiösem Material in Saccharose ergaben einen Bereich von Werten, wobei der Hauptteil in einem Niedrigdichte-Pool von < 1,1 g/ml vorlag (Bradley et al., 1991). Nachfolgende Untersuchungen benutzten RT/PCR zum Nachweis HCV-spezifischer RNA als indirektes Maß von potentiell infektiösem Virus, das in Seren aus chronisch infizierten Menschen oder experimentell infizierten Schimpansen vorhanden war. Aus diesen Untersuchungen ist es zunehmend deutlich geworden, dass eine beträchtliche Heterogenität zwischen unterschiedlichen klinischen Proben besteht, und dass viele Faktoren das Verhalten von HCV-RNA enthaltenden Partikeln (Hijikata et al., 1993; Thomssen et al., 1992) beeinflussen können. Solche Faktoren schließen die Assoziation mit Immunoglobulinen (Hijikata et al., 1993) oder Low-Density-Lipoprotein (Thomssen et al., 1992; Thomssen et al., 1993) ein. In hochinfektiösem Akute-Phase-Schimpansenserum wird HCV-spezifische RNA üblicherweise in Fraktionen mit geringer Schwebedichte (1,03-1,1 g/ml) nachgewiesen (Carrick et al., 1992; Hijikata et al., 1993). In anderen Proben ist die Gegenwart von HCV-Antikörpern und die Bildung von Immunkomplexen korreliert mit Partikeln höherer Dichte und geringerem Infektionsvermögen (Hijikata et al., 1993). Die Behandlung von Partikeln mit Chloroform, welches das Infektionsvermögen inaktiviert (Bradley et al., 1983; Feinstone et al., 1983), oder mit nichtionischen Detergenzien erzeugt RNA-enthaltende Partikel von höherer Dichte (1,17-1,25 g/ml), von denen man annimmt, HCV-Nukleocapside zu repräsentieren (Hijikata et al., 1993; Kanto et al., 1994; Miyamoto et al., 1992).

[0006] Es hat viele Berichte über variierende Spiegel von HCV-spezifischen Negativ-Sinn-RNAs in Seren und Plasma gegeben (siehe Fong et al., 1991). Allerdings scheint es unwahrscheinlich, dass solche RNAs wesentliche Komponenten von infektiösen Partikeln sind, da manche Seren mit hoher Infektiosität geringe oder nicht-nachweisbare Spiegel an Negativ-Strang-RNA aufweisen können (Shimizu et al., 1993). Die Virion-Proteinzusammensetzung ist nicht rigoros bestimmt worden, aber vermeintliche HCV-Strukturproteine schließen ein basisches C-Protein und zwei Membranglykoproteine, E1 und E2 ein.

[0007] HCV-Replikation. Die frühen Ereignisse bei der HCV-Replikation sind schlecht verstanden. Zelluläre Rezeptoren für die HCV-Glykoproteine sind nicht identifiziert worden. Die Assoziation mancher HCV-Teilchen mit beta-Lipoprotein und Immunoglobulinen erweckt die Möglichkeit, dass diese Wirtsmoleküle die Virusaufnahme und den Gewebetropismus modulieren können. Untersuchungen, welche die HCV-Replikation erforschen, sind in großem Maße auf menschliche Patienten oder experimentell inokulierte Schimpansen beschränkt gewesen. Im Schimpansen-Modell wird HCV-RNA im Serum so früh wie 3 Tage nach der Inokulation nachgewiesen und bleibt über den gesamten Peak der Serum-Alanin-

Aminotransferase(ALT)-Spiegel (ein Indikator von Leberschaden) hinweg bestehen (Shimizu et al., 1990). An den Ausbruch der Virämie schließt sich das Auftreten von indirekten Kennzeichen einer HCV-Infektion der Leber an. Diese beinhalten das Erscheinen eines cytoplasmatischen Antigens (Shimizu et al., 1990) und von Ultrastruktur-Veränderungen in Hepatozyten, wie der Bildung von Mikrotubuli-Aggregaten, weswegen HCV früher als das Chloroform-empfindliche "Tubuli-bildende Agenz" oder "TFA" bezeichnet wurde (übersichtsmäßig bei Bradley, 1990). Wie durch das Auftreten von viralen Antigenen (Blight et al., 1993; Hiramatsu et al., 1992; Krawczynski et al., 1992; Yamada et al., 1993) und den Nachweis von Positiv- und Negativ-Sinn-RNAs (Fong et al., 1991; Gunji et al., 1994; Haruna et al., 1993; Lamas et al., 1992; Nouri Aria et al., 1993; Sherker et al., 1993; Takehara et al., 1992; Tanaka et al., 1993) gezeigt, scheinen Hepatozyten ein hauptsächlichlicher Ort der HCV-Replikation zu sein, insbesondere während einer akuten Infektion (Negro et al., 1992). In späteren Stadien der HCV-Infektion variieren das Auftreten von HCV-spezifischen Antikörpern, die Persistenz oder Auflösung von Virämie und die Schwere der Lebererkrankung in großem Maße sowohl im Schimpansen-Modell als auch in menschlichen Patienten. Obwohl ein gewisser Leberschaden als eine direkte Konsequenz der HCV-Infektion und Cytopathogenität auftreten kann, besteht der sich abzeichnende Konsensus darin, dass Wirtsimmunantworten, insbesondere virusspezifische cytotoxische T-Lymphozyten, eine dominantere Rolle bei der Vermittlung des zellulären Schadens spielen können (siehe Rice und Walker, 1995, zur Übersicht).

[0008] Es ist spekuliert worden, dass HCV auch in extrahepatischen Reservoir(s) replizieren kann, insbesondere in chronisch infizierten Individuen. In einigen Fällen hat RT/PCR oder *in situ*-Hybridisierung eine Assoziation von HCV-RNA mit mononuklearen Zellen des peripheren Blutes gezeigt, einschließlich T-Zellen, B-Zellen und Monozyten (Blight et al., 1992; Bouffard et al., 1992; Gil et al., 1993; Gunji et al., 1994; Moldvay et al., 1994; Nuovo et al., 1993; Wang et al., 1992; Young et al., 1993; Yun et al., 1993; Zignego et al., 1992). Ein derartiger Gewebetropismus könnte für die Etablierung chronischer Infektionen relevant sein und könnte auch eine Rolle in der Assoziation zwischen HCV-Infektion und gewissen immunologischen Abnormalitäten spielen, wie gemischter Cryoglobulinämie (übersichtsartig aufgeführt von Ferri et al., 1993), Glomerulonephritis und seltenen Nicht-Hodgkin-B-Lymphomen (Ferri et al., 1993; Kagawa et al., 1993). Allerdings haben der Nachweis von zirkulierender Negativ-Strang-RNA im Serum, die Schwierigkeiten beim Erhalten von wirklich strangspezifischer RT/PCR (Gunji et al., 1994) und die geringen Anzahlen von offensichtlich infizierten Zellen es schwierig gemacht, unzweifelhafte Beweise für die Replikation in diesen Geweben *in vivo* zu erhalten.

[0009] Obwohl ein Zellkultursystem, das zur effizienten HCV-Replikation fähig ist, nicht entwickelt worden ist, ist ein gewisser Fortschritt von statten gegangen. Übereinstimmend mit den obenstehend erwähnten *in vivo*-Beobachtungen, hat man über die *in vitro*-HCV-Infektion und Kurzzeitreplikation für Schimpansen- und Menschen-Hepatozyten (Carloni et al., 1993; Iacovacci et al., 1993; Lanford et al., 1994), eine menschliche Hepatom-Linie (Huh7; Yoo et al., 1995, siehe unten), periphere Blut-Leukozyten (Muller et al., 1993), eine humane B-Zelllinie, welche EBV-Antigene exprimiert (Bertolini et al., 1993), eine mit Mausretrovirus infizierte humane T-Zelllinie (Molt4-Ma; Shimizu et al., 1992), eine mit HTLV-1 transformierte humane T-Zelllinie (MT-2; Kato et al., 1995) und aus menschlicher Vorhaut abgeleiteten Fibroblasten (Zibert et al., 1995) berichtet. Bislang scheint nur eine kleine Fraktion dieser Zellen infiziert zu sein. Das *in vitro*-Infektionsvermögen von verschiedenen HCV-Inokula unter Verwendung eines permissiven Subklons der Molt4-Ma-T-Zelllinie stimmt gut mit deren *in vivo*-Infektionsvermögen im Schimpansen-Modell überein (Shimizu et al., 1993). Diese Zelllinie ist auch verwendet worden, um mit der Untersuchung der HCV-Bindung und dem möglichen Auftreten von Neutralisations-Fluchtmutanten während einer chronischen Infektion zu beginnen (Shimizu et al., 1994b).

[0010] Genomstruktur. Vollängen- oder Beinahe-Vollängen-Genomsequenzen von zahlreichen HCV-Isolaten sind berichtet worden (siehe Lin et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Sakamoto et al., 1994 und die Zitate darin). In Anbetracht der beträchtlichen genetischen Divergenz unter den Isolaten ist es deutlich, dass mehrere Haupt-HCV-Genotypen über die gesamte Welt verteilt sind (siehe nachstehend). Diejenigen mit der größten Bedeutung in den Vereinigten Staaten sind der Genotyp 1, Subtypen 1a und 1b. HCV-Genom-RNAs weisen eine Länge von etwa 9,4 Kilobasen auf. Das 5'-NTR weist 341-344 Basen auf und ist das am stärksten konservierte RNA-Sequenzelement im HCV-Genom. Die Länge des langen ORF variiert unter den Isolaten geringfügig, wobei Polyproteine von 3010, 3011 oder 3033 Aminosäuren codiert werden. Die berichteten 3'-NTR-Strukturen zeigen beträchtliche Diversität sowohl in der Zusammensetzung als auch der Länge (28-42 Basen), und scheinen mit Poly(U) zu enden (für Beispiele, siehe Chen et al., 1992; Okamoto et al., 1991; Tokita et al., 1994), außer in einem Fall (HCV-1, Typ 1a), welcher einen 3'-terminalen Poly(A)-Trakt zu enthalten scheint (Han et al., 1991). Die EP-A-0 510 952 beschreibt Oligonukleotidprimer für den hochgenauen Nachweis von Nicht-A,Nicht-B-Hepatitis-Virus.

[0011] Translation und proteolytische Prozessierung. Mehrere Untersuchungen haben die zellfreie Translation und vorübergehende Expression in Zellkultur angewandt, um die Rolle des 5'-NTR bei der Translationsinitiation zu untersuchen (Fukushi et al., 1994; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993; Yoo et al., 1992). Diese hochkonservierte Sequenz enthält

mehrere kurze AUG-initiierte ORFs und zeigt signifikante Homologie mit der 5'-NTR-Region von Pestiviren (Bukh et al., 1992; Han et al., 1991). Auf der Grundlage von Computer-Modellberechnungen ist eine Reihe von "Stem-Loop"- bzw. Stamm/Schleifen-Strukturen und eine Empfindlichkeit gegenüber Verdau durch verschiedene Ribonukleasen vorgeschlagen worden (Brown et al., 1992; Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Obwohl noch umstritten (siehe Wang et al., 1993; Yoo et al., 1992) zeigen die Ergebnisse von mehreren Arbeitsgruppen, dass dieses Element als eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) fungiert, welche eine effiziente Translationsinitiation am ersten AUG des langen ORF gestattet (Fukushi et al., 1994; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993). Einige der vorhergesagten Merkmale der HCV- und Pestivirus-IRES-Elemente sind einander ähnlich (Brown et al., 1992). Es ist vorgeschlagen worden, dass die 5'-terminale Haarnadel-Struktur und die kurzen ORFs wirken können, um die Translation herunterzuregulieren (Yoo et al., 1992). Die Fähigkeit dieses Elementes, als ein IRES zu funktionieren, legt nahe, dass den HCV-Genom-RNAs eine 5'-Kappen- bzw. "Cap"-Struktur fehlen kann.

[0012] Die Organisation und Prozessierung des HCV-Polypeptids scheint am ähnlichsten zu jener der Pestiviren zu sein. Es sind mindestens 10 Polypeptide identifiziert worden, und die Reihenfolge dieser Spaltungsprodukte in dem Polyprotein ist NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Die proteolytische Prozessierung wird durch Wirts-Signalpeptidase und zwei HCV-codierte Proteinasen, die NS2-3-Autoprotease und die NS3-4A-Serin-Proteinase, vermittelt. C ist ein basisches Protein, von dem man annimmt, das virale Kern- oder Capsid-Protein zu sein; E1 und E2 sind vermeintliche Virion-Hüllenglykoproteine; p7 ist ein hydrophobes Protein von unbekannter Funktion, welches ineffizient von dem E2-Glykoprotein abgespalten wird (Lin et al., 1994; Mizushima et al., 1994; Selby et al., 1994), und NS2-NS5B sind wahrscheinlich nicht strukturelle (NS) Proteine, welche in viralen RNA-Replikationskomplexen wirken. Neben seiner N-terminalen Serinproteinase-Domäne enthält NS3 insbesondere für RNA-Helicasen charakteristische Motive, und es ist gezeigt worden, dass es eine RNA-stimulierte NTPase-Aktivität besitzt (Suzich et al., 1993); NS5B enthält das GDD-Motiv, das charakteristisch für die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen von Positiv-Strang-RNA-Viren ist.

[0013] Virion-Zusammenbau und -Freisetzung. Dieses Verfahren ist nicht direkt untersucht worden, aber das Fehlen von komplexen Glycanen, die ER-Lokalisierung von exprimierten HCV-Glykoproteinen (Dubuisson et al., 1994; Ralston et al., 1993) und die Abwesenheit dieser Proteine auf der Zelloberfläche (Dubuisson et al., 1994; Spaete et al., 1992) legen nahe, dass die anfängliche Virion-Morphogenese durch Abknospen zu intrazellulären Vesikeln erfolgen kann. Bislang ist eine effiziente Partikelbildung und -freisetzung nicht in transienten

Expressionsassays beobachtet worden, was nahelegt, dass wesentliche virale oder Wirtsfaktoren fehlen oder blockiert sind. Die HCV-Virion-Bildung und -Freisetzung kann ineffizient sein, wobei eine wesentliche Fraktion des Virus zellassoziiert bleibt, wie man dies bei den Pestiviren findet. Eine jüngere Untersuchung zeigt, dass extrazelluläre HCV-Partikel, teilweise aufgereinigt aus humanem Plasma, komplexe N-verknüpfte Glykane enthalten, obwohl nicht gezeigt wurde, dass diese Kohlenhydrat-Einheiten spezifisch mit E1 oder E2 assoziiert sind (Sato et al., 1993). Komplexe Glykane, assoziiert mit Glykoproteinen auf freigesetzten Virionen, würden einen Durchgang durch den Trans-Golgi und eine Bewegung der Virionen durch den sekretorischen Pfad des Wirtes nahelegen. Wenn diese Annahme zutreffend ist, könnten eine intrazelluläre Sequestrierung von HCV-Glykoproteinen und eine Virionbildung dann eine Rolle in der Etablierung chronischer Infektionen durch Minimieren der Immun-Überwachung und Verhinderung der Lyse von virusinfizierten Zellen durch Antikörper und Komplement spielen.

[0014] Genetische Variabilität. Wie für alle Positiv-Strang-RNA-Viren nimmt man an, dass der RNA-abhängigen RNA-Polymerase von HCV (NS5B) eine 3'-5'-Exonuklease-Korrekturlese- bzw. "Proof-Reading"-Aktivität zum Entfernen falsch eingebauter Basen fehlt. Die Replikation ist deswegen fehleranfällig, was zu einer "Quasispezies"-Viruspopulation führt, welche aus einer großen Anzahl von Varianten besteht (Martell et al., 1992; Martell et al., 1994). Diese Variabilität ist auf mehreren Ebenen offenkundig. Zunächst treten in einem chronisch infizierten Individuum Veränderungen in der Viruspopulation im Lauf der Zeit auf (Ogata et al., 1991; Okamoto et al., 1992), und diese Veränderungen können bedeutende Folgen für die Erkrankung haben. Ein besonders interessantes Beispiel besteht in den N-terminalen 30 Resten des E2-Glykoproteins, welche einen viel höheren Grad an Variabilität aufweisen als der Rest des Polyproteins (für Beispiele, siehe Higashi et al., 1993; Hijikata et al., 1991; Weiner et al., 1991). Es mehren sich die Beweise, dass diese hypervariable Region, möglicherweise analog zur V3-Domäne von HIV-1-gp120, unter einer Immunselektion durch zirkulierende antivirale Antikörper stehen kann (Kato et al., 1993; Taniguchi et al., 1993; Weiner et al., 1992). In diesem Modell können gegen diesen Abschnitt von E2 gerichtete Antikörper zur Virusneutralisierung beitragen und dadurch die Selektion von Varianten mit Substitutionen, welche der Neutralisierung entfliehen, vorantreiben. Diese Plastizität legt nahe, dass eine spezifische Aminosäuresequenz in der hypervariablen E2-Region nicht für andere Funktionen des Proteins wesentlich ist, wie Virion-Anlagerung, -Penetration oder -Zusammenbau. Die genetische Variabilität kann auch zu dem Spektrum an unterschiedlichen Antworten beitragen, welches nach der Behandlung chronisch infizierter Patienten mit alpha-IFN beobachtet wird. Verringerte Serum-ALT-Spiegel und verbesserte Leber-Histologie, welche manchmal mit einer Abnahme des Spiegels von zirkulierender HCV-RNA korreliert

ist, wird in lediglich ~40 % der behandelten Fälle beobachtet (Greiser-Wilke et al., 1991). Nach der Behandlung zeigen ungefähr 70 % der ansprechenden Fälle einen Rückfall. In manchen Fällen wird, nach einem vorübergehenden Verlust an zirkulierender viraler RNA, eine erneute Virämie sogar während des Verlaufs der Behandlung beobachtet. Obgleich dies die Existenz oder Erzeugung von IFN-resistenten HCV-Genotypen oder -Varianten nahelegen könnte, sind weitere Arbeiten nötig, um die relativen Beiträge des Virusgenotyps und von wirtsspezifischen Unterschieden der Immun-Ansprechbarkeit zu bestimmen. Schließlich haben Sequenzvergleiche unterschiedlicher HCV-Isolate aus der ganzen Welt eine enorme genetische Diversität enthüllt (übersichtsmäßig zusammengefaßt in Lit.: Bukh et al., 1995).

5 Weil biologisch relevante serologische Assays, wie Kreuz-Neutralisierungs-Tests fehlen, werden HCV-Typen (bezeichnet durch Nummern), Untertypen (bezeichnet durch Buchstaben) und Isolate derzeit auf der Grundlage von Nukleotid- oder Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit klassifiziert. Die Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit zwischen den am stärksten divergenten Genotypen kann so gering wie ~50 % sein, abhängig von dem Protein, welches verglichen wird. Diese Diversität besitzt wahrscheinlich wichtige biologische Implikationen, insbesondere für die Diagnostik, das Impfstoff-Design und die Therapie. Wie früher erwähnt, sind die Genotypen 1a und 1b in den Vereinigten Staaten am stärksten verbreitet (siehe Bukh et al., 1995, für eine Erörterung des Vorherrschens und der Verteilung des Genotyps). Kürzlich wurden in Yoo et al., (1995) T7-Transkripte aus verschiedenen Derivaten eines HCV-1-cDNA-Klons hinsichtlich ihres Vermögens getestet, bei Transfektion der humanen Hepatom-Zelllinie Huh7 zu replizieren. Eine mögliche HCV-Replikation wurde durch strangspezifische RT/PCR (unter Verwendung von 5'-NTR-Primern) und der metabolischen Markierung von HCV-spezifischen RNAs mit 3H-Uridin untersucht. Transkripte, welche entweder mit Poly(A) oder Poly(U) enden, waren bei diesen Assays positiv, aber diejenigen mit einer Deletion der 5'-terminalen 144 Basen waren es nicht. In manchen Kulturen, konnte HCV-spezifische RNA im Kulturmedium nachgewiesen werden und konnte verwendet werden, um frische Huh7-Zellen zu reinfizieren. Obgleich diese Behauptungen nicht direkt widerlegt werden können, erscheint es wahrscheinlich, dass die Autoren nicht wirklich authentische HCV-Replikation nachweisen. Zum Beispiel bestand die Positivkontrolle der Autoren in der produktiven Transfektion von Huh7-Zellen mit RNA, extrahiert aus 1 ml Schimpansen-Plasma von hohem HCV-Titer. Diese extrahierte Probe würde ein Maximum von 10⁷ potentiell infektiösen Vollängen-HCV-RNA-Molekülen enthalten. Unter optimalen Transfektionsbedingungen (von Mikroinjektion verschieden), werden typischerweise >10⁵ RNA-Moleküle Virion-RNA (zumindest für Poliovirus, Sindbis-Virus oder YF) erfordert, um ein einziges Infektionsereignis herbeizuführen. Dies legt nahe, dass in dem HCV-1-Experiment weniger als 100 Zellen produktiv transfiziert sein würden.

10
15
20
25
30
35

[0015] 16 Tage nach der Transfektion wurden ohne weiteres sowohl Positiv- als auch Negativ-Strang-RNAs nach 8 Stunden metabolischer Markierung nachgewiesen. Der Nachweis von Negativ-Strang-RNA durch dieses Verfahren (sowohl für transfizierte Virion-RNA als auch Transkript-RNA) legt nahe, dass HCV zu beidem, einer effizienten Replikation als auch Ausbreitung, in der Lage ist, und dass der Spiegel an der HCV-RNA-Synthese ähnlich zu demjenigen ist, welchen man für einen robusteren Flavivirus, wie YF (am Gipfel einer Infektion von hoher Multiplizität), erwarten würde. Trotz zahlreicher Versuche waren die Autoren jedoch nicht in der Lage, HCV-Antigene in diesen Zellen unter Verwendung einer Vielzahl von Antisera oder Vollängen-Positiv- oder -Negativ-Strängen in der Northernanalyse (welche viel empfindlicher als die metabolische Markierung mit 3H-Uridin ist) nachzuweisen (J. Han, persönliche Mitteilung). Um es noch milde auszudrücken, sind diese Ergebnisse erstaunlich und lassen sich nicht ohne weiteres mit einer authentischen HCV-Replikation in Einklang bringen. Schließlich ist das ausschlaggebende Experiment, welches zeigt, dass RNA oder Virus, abgeleitet aus dem HCV-1-Klon, in dem Schimpansen-Modell infektiös ist, nicht berichtet worden (trotz der anfänglichen Vorstellung dieser Arbeit bei einer Tagung vor mehr als zwei Jahren). Die Arbeiten mit anderen RNA-Virus-Systemen haben gezeigt, dass spezifische terminale Sequenzen für die Erzeugung funktioneller, replikationskompetenter RNAs kritisch sein können (übersichtsmäßig zusammengefaßt in Boyer und Haenni, 1994). Man nimmt an, dass solche Sequenzen bei der Initiation von Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Synthese beteiligt sind. In manchen Fällen werden einige wenige zusätzliche Basen, oder sogar längere nicht-virale Sequenzen, an den 5'- und 3'-Enden toleriert; während der authentischen viralen Replikation gehen diese Sequenzen typischerweise verloren oder werden gegen-selektiert. Bei anderen RNA-Viren sind Extra-Basen, insbesondere am 5'-Terminus, nachteilig (Boyer und Haenni, 1994). Im Gegensatz dazu, mit Ausnahme einiger weniger Fälle, sind Transkripte, denen authentische terminale Sequenzen fehlen, nicht-funktionell (Boyer und Haenni, 1994). Zum Beispiel ist die Deletion der 3'-terminalen Sekundärstruktur oder der konservierten Sequenzelemente in dem 3'-NTR der Flavivirus-Genom-RNA für die RNA-Replikation von YF (P.J. Bredenbeek und C.M.R., nicht veröffentlicht) oder TBE (C. Mandl, persönliche Mitteilung) lethal.

In Anbetracht der Wichtigkeit dieser Sequenzelemente für andere Viren, ist es deutlich, dass es an der Zeit war, eine rigorosere Bestimmung der terminalen HCV-Sequenzen vorzunehmen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0016] In Anbetracht der vorstehend erwähnten Mängel, welche HCV-cDNA-Klone des Stands der Technik und Zellkultursysteme für die Analyse der HCV-Replikation begleiten,

und für die Entwicklung von therapeutischen Zusammensetzungen hierfür, ist es offensichtlich, dass im Fachgebiet eine Notwendigkeit nach der Identifizierung insbesondere der 3'-terminalen Sequenz von HCV besteht, welche in einen Vollängen-cDNA-Klon eingebaut werden kann, der fähig zur Erzeugung infektiöser RNA-Transkripte ist, welche dann als
5 Zielsequenzen für die Herstellung von attenuiertem HCV für Impfstoffe verwendet werden können und welche als Ziele für therapeutische Zusammensetzungen verwendet werden können.

[0017] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden Nukleotidsequenzen, abgeleitet aus
10 klonierter cDNA, vorgesehen, welche ein 3'-terminales RNA-Element von HCV codieren. Das neuentdeckte 3'-Element ist insbesondere unter HCV-Genotypen in hohem Maße konserviert, und ist ein allgemeines Merkmal des HCV-RNA-Genoms.

[0018] Die vorliegende Erfindung schließt einen Poly(UC)-Trakt ein, gefolgt von einem 101
15 Nukleotiden langen 3'-terminalen RNA-Sequenzelement, und Vollängen-HCV-Virusgenom-RNA oder abgeleitete HCV-RNA-Replikons, enthaltend die folgende Sequenz:

5'- poly (UC) - AAUGGUGGCUCCAUCUJAGCCCUAGUCACGGCUA
GCUGUGAAAGGUCCGUGAGCCGCAUGACUGCAGA
GAGUGCUGAUACUGGCCUCUCUGCUGAUGAUGU -3' (Seq.-ID Nr.:1).

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft auch das Komplement dieser RNA-Sequenz und
20 Vollängen-HCV-Negativ-Sinn-RNAs, welche die folgende Sequenz enthalten:

5' -
ACAUGAUCAGCAGAGAGGCCAGUAUCAGCACUCUCUGCAGUCAUGCGGCUCACGGAC
CUUUCACAGCUAGCCGUGACUAGGGCUAAGAUGGAGCCACCAUU-poly (GA) - 3'
(Seq.-ID Nr.: 2).

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die DNA-Sequenz, entsprechend dem 3'-
25 NTR-Element in der Positiv-Sinn-HCV-Genom-RNA:

5' - poly - (TC) -
AATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCAT
GACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCTGATCATGT-3' (Seq.-ID Nr.: 3).

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die DNA-Sequenz, entsprechend dem Komplement des 3'-NTR-Elements, das in der Negativ-Sinn-HCV-RNA vorhanden ist:

5' -

ACATGATCAGCAGAGAGGCCAGTATCAGCACTCTCTGCAGTCATGCGGCTCACGGACC
TTTCACAGCTAGCCGTGACTAGGGCTAAGATGGAGCCACCATT-poly (GA)-3' (Seq.-ID
Nr.: 4).

5

[0022] In einem Aspekt sieht die Erfindung eine isolierte Nucleinsäure vor, die eine Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden umfasst, wobei die Sequenz zumindest 90%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist. Die Erfindung sieht auch eine isolierte Nucleinsäure vor, die zumindest 75%ige Sequenzidentität mit einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist. Diese und andere Aspekte der Erfindung werden hierin und in den begleitenden Ansprüchen beschrieben.

10

15

[0023] Gemäß eines weiteren Aspekts der Erfindung wird ein Oligonucleotidprimer vorgesehen, der zumindest 15 Nucleotide einer der Sequenzen Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon umfasst.

20

[0024] In einem weiteren Aspekt wird eine Wirtszelle vorgesehen, die mit dem Nucleinsäuremolekül der Erfindung transformiert oder transfiziert ist.

25

[0025] In einem weiteren Aspekt wird ein attenuiertes Virus vorgesehen, das eine Sequenz der Erfindung, wie obenstehend definiert, in Kombination mit einer Sequenz umfasst, die im Wesentlichen homolog mit jener von HCV-1, HC-J1, HC-J, HCV-BK, HCV-H, HC-J6, HC-J8, HC-J483, HC-J491, HC-C2, HCV-JK, HCV-N, HCV-T, HCV-JT, HC-G9, HCV-K3a, NLZ1 oder HCV-Tr ist.

30

[0026] Gemäß eines weiteren Aspekts wird eine Antisense-Nucleinsäure gegen eine virale Genom-RNA oder ihr Komplement oder ein rekombinantes DNA- oder RNA-Molekül, das bei der Transkription die Antisense-Nucleinsäure produziert, vorgesehen, wobei die Antisense-Nucleinsäure eine Nucleinsäure umfasst, die vollständig komplementär zur 3'-

terminalen Sequenz von HCV ist, wobei die 3'-terminale Sequenz von HCV die Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst.

5 [0027] In einem weiteren Aspekt wird ein Verfahren zum Nachweis der Gegenwart des 3'-NTR von Hepatitis C-Virus (HCV) in einer Probe vorgesehen, umfassend:

10 (a) das Kontaktieren der Probe mit zumindest einem Oligonucleotid, das eine Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden umfasst, wobei die Sequenz zumindest 75%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist;

15 (b) das Schaffen von Bedingungen, die für die Hybridisierung des Oligonucleotids an den 3'-NTR eines HCV geeignet sind; und

(c) den Nachweis, ob Hybridisierung des Oligonucleotids erfolgt ist.

20 [0028] In einem weiteren Aspekt wird ein Set zum Nachweis der Gegenwart eines HCV 3'-NTR in einer Probe vorgesehen, wobei das Set ein Oligonucleotid, das eine Nucleinsäure der Erfindung ist, in einem Behälter verpackt umfasst.

25 [0029] In einem weiteren Aspekt wird ein Testsystem zum Screenen von Arzneimitteln und anderen Mitteln auf die Fähigkeit zur Modulation der Replikation eines Virus vorgesehen, das die Nucleinsäure der Erfindung umfasst, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

das Kultivieren des Virus in Gegenwart eines Arzneimittels oder anderen Mittels; und

30 das Bestimmen der Wirkung des Arzneimittels oder anderen Mittels auf die virale Replikation durch Messen der Replikation des Virus anhand der Bestimmung einer Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden, wobei die Sequenz zumindest 90%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer der enthaltenen Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3, Seq.-ID Nr.: 4, Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 aufweist; oder

35 das Bestimmen der Bindung des Arzneimittels oder anderen Mittels an die Sequenz.

[0030] In einem weiteren Aspekt wird ein Oligonucleotid, das eine Sequenz der Erfindung wie obenstehend definiert umfasst, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder Diagnose von Hepatitis C-Virus vorgesehen.

5 [0031] In einem weiteren Aspekt wird eine therapeutische Zusammensetzung zur Behandlung zellulärer Schwächungen, Störungen oder Funktionsstörungen und/oder anderer Erkrankungszustände bei Säugetieren, die durch ein Virus hervorgerufen werden, das die 3'-terminale Sequenz eines HCV enthält, die eine Sequenz der Erfindung wie obenstehend definiert umfasst, vorgesehen, wobei die Zusammensetzung ein Material umfasst, das aus der aus dem 3'-
10 terminalen Element, seinem Komplement, einem Mittel, das fähig ist, die Produktion und/oder Aktivität des 3'-terminalen Elements zu fördern, einem Mittel, das fähig ist, die Aktivität des 3'-terminalen Elements nachzuahmen, einem Mittel, das fähig ist, die Aktivität des 3'-terminalen Sequenzelements zu hemmen, oder einem spezifischen Bindungspartner dafür bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

15

[0032] Man sollte davon ausgehen, dass obwohl die Sequenzen Seq.-ID Nr.: 1 - 4 "nicht-codierend" zu sein scheinen, es möglich ist, dass die Sequenzen ein Polypeptid von Bedeutung für die HCV-Replikation codieren. Es gibt zwei kurze offene Leserahmen in dem Komplement des 3'-terminalen Elements, welche am 5' der Negativ-Sinn-RNA wären, gefolgt von
20 Poly(A). Diese Sequenzen könnten über Translation der Negativ-Strang-RNA (entweder eines Vollängen-Negativ-Strangs oder einer subgenomischen RNA) exprimiert werden.

[0033] Dieses Element, das sich über die früher angenommenen Homopolymertrakte aus Poly(U) oder Poly(A) hinaus erstreckt, kann verwendet werden, um Vollängen-HCV-cDNA-Klone für HCV-H und andere HCV-Isolate (Genotypen, Typen und Subtypen) zusammenzubauen (HCV-1 Zugangs.-Nr. bzw. acc.# M62321; HC-J1 acc.# D10749; HC-J acc.# D90208; HCV-BK acc.# M58335; HCV-H acc.# M67463; HC-J6 acc.# D00944; HC-J8 acc.# D01221; HC-J483 acc.# D13558; HC-J491 acc.# D10750; HC-C2 acc.# D10934; HCV-JK acc.# X61596; HCV-N acc.# S62220; HCV-T acc.# M84745; HCV-JT acc.# D01171; HCV-JT
30 acc.# D01172; HC-G9 acc.# D14853; HCV-K3a acc.# D28917; NZL1 acc.# D17763; HCV-Tr acc.# D26556). Solche Vollängen-Viren oder abgeleitete HCV-RNA-Replikons sind nützlich für die Untersuchung der HCV-Replikation und der Virus-Wirt-Wechselwirkungen als auch für die Entwicklung von Screening-Assays für HCV-Therapeutika und die Bewertung therapeutischer Verbindungen.

35

[0034] Lebend- attenuierte Stämme von HCV können als Impfstoffe verwendet werden.

[0035] Hierin wird ein rekombinantes DNA- oder RNA-Molekül oder eine degenerierte Variante davon beschrieben, welches für das 3'-terminale Sequenzelement von HCV codiert; vorzugsweise enthält die Nucleinsäure eine Sequenz mit im wesentlichen der gleichen Nucleotidsequenz wie Seq.-ID Nr.: 1 - 4 oder jenen, die gezeigt werden in FIGUR 3 (Seq.-ID Nr.:20-24; nur die Teile der Sequenzen stromabwärts des Poly(U)-Trakts), FIGUR 6 (Seq.-ID Nr.:28-31) und FIGUR 8 (Seq.-ID Nr.: 33-36), und Sequenzen, welche eine Sekundärstruktur ausbilden, ähnlich zu der von Figur 4 (Seq.-ID Nr.:25), oder alternativ dazu eine Struktur, welche über Wechselwirkung des 3'-terminalen Sequenzelements (oder seines Komplements) mit anderen HCV-RNA-Sequenzen (z. B. 5'-terminalen Sequenzen oder anderen Sequenzen am oder nahe zum 3' NTR) ausgebildet werden kann.

[0036] Die Sequenzen aus dem HCV oder Abschnitte davon können als Sonden (oder Primer für RT-PCR) hergestellt werden, um nach komplementären Sequenzen und verwandten Klonen in der gleichen oder alternativen Species zu screenen.

Derartig hergestellte Sonden oder Primer können für das Screening von cDNA-Bibliotheken, Plasma oder infizierten Zellen hinsichtlich HCV vorgesehen werden. Zum Beispiel können die Sonden synthetisch und mittels rekombinanter DNA mit einer Vielzahl von bekannten Vektoren, wie einem Phagen-, Plasmid- oder viralen Vektor, hergestellt werden. Plasmide, einschließlich solcher Vektoren, können hergestellt werden. Die DNA/RNA-Sequenzen können verwendet werden, um Vektoren zu konstruieren, welche Antisense-RNA oder Ribozyme exprimieren, die natürliche oder technisch-erzeugte HCV-RNAs angreifen, welche irgendeine oder alle der Sequenzen, dargestellt in den FIGUREN 3 (Seq.-ID Nr.: 20-24), FIGUR 6 (Seq.-ID Nr.: 28-31) und FIGUR 8 (Seq.-ID Nr.: 33-36), oder wie obenstehend als Seq.-ID Nr.: 1-4, Derivative der Sequenzen oder homologe Sequenzen aus anderen HCV-Typen/Subtypen, enthalten. Dementsprechend können Antisense-RNA und Ribozyme hergestellt werden.

[0037] Es werden RNA-Moleküle mit den hierin angegebenen Eigenschaften beschrieben, welche die obenstehend dargestellten und beschriebenen Sequenzen aufzeigen und ausgewählt sind aus Seq.-ID Nr.: 1 - 4, 20-24, 28-31 und 33-36.

[0038] Die volle Nucleotidsequenz des HCV, enthaltend die obenstehend bestimmten Sequenzen, kann in einen passenden Wirt eingebracht werden. Die Erfindung erstreckt sich demgemäß auf Wirtszellen, die mit der isolierten Nucleinsäure der Erfindung transfiziert oder transformiert sind. Ferner können Wirtszellen mit klonierten HCV-Sequenzen und/oder daraus abgeleiteter RNA transformiert oder transfiziert werden, und genauer gesagt replikationskompetenten und/oder kompletten DNA/RNA-Sequenzen, die unter Verwendung

der obenstehend angegebenen Sequenzen oder homologer Derivative zusammengebaut wurden.

5 [0039] Gewisse bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um eine transient transfizierte oder stabile Zelllinie vorzusehen, um infektiöses HCV, und attenuierte Stämme von HCV herzustellen.

10 [0040] Zur Herstellung der HCV-Sequenzen können mehrere Methoden angewandt werden, einschließlich, wie hierin veranschaulicht, bekannter rekombinanter Techniken, und solche synthetischen Präparationen können eingesetzt werden. Die Isolation der hierin offenbarten Sequenzen erleichtert die Reproduktion nicht nur der Nucleinsäure-Sequenzen selbst, sondern auch von infektiösem HCV und attenuiertem HCV, durch solche rekombinante Techniken, und folglich können die Wildtyp- und attenuierten HCVs derartig aus den offenbarten Sequenzen hergestellt werden, und transient transfizierte Zellen oder stabile Zelllinien, die 15 diese Sequenz exprimieren, HCV-RNA replizieren und/oder Virus produzieren, können hergestellt werden.

[0041] Die Erfindung kann auch in einem Assaysystem zum Screening von potentiellen Arzneimitteln angewandt werden, die wirksam zur Modulierung der Replikation von HCV in 20 Zielzellen durch Unterbrechen oder Potenzieren des viralen Lebenszyklus sind. Die Potenzierung wäre erwünscht, wo Stammvorräte von HCV zur Verwendung in experimentellen als auch therapeutischen Dosierungs-Plänen (d.h. Impfstoffen) hergestellt werden sollen. In einem Fall könnte das Test-Arzneimittel an eine zelluläre Probe verabreicht werden, welche mit einem infektiösen HCV, cDNA-Klon oder replikationskompetenter RNA transfiziert ist, um deren Effekt auf die replikative Aktivität des HCV in Gegenwart irgendeiner chemischen Probe (einschließlich DNA oder RNA), oder des Test-Arzneimittels, im Vergleich zu einer 25 Kontrolle zu bestimmen.

30 [0042] Das Assay-System könnte in noch bedeutenderer Weise angepasst werden, um Arzneimittel oder andere Entitäten zu identifizieren, welche in der Lage zur Bindung an die HCV-RNA-Sequenzen sind, oder welche essentielle Faktoren binden, die mit diesen Sequenzen wechselwirken, wodurch die Replikation inhibiert oder potenziert wird. Solche Assays wären nützlich in der Entwicklung von Arzneimitteln, welche spezifisch gegen eine breite Auswahl von HCV-Isolaten sind, und zwar wegen der Konservierung eines wichtigen 3'-terminalen Sequenzmotivs, angegeben durch Seq.-ID Nr.: 1-4. 35

[0043] Antagonisten der Aktivität von HCV, insbesondere ein Mittel oder Molekül, das virale Replikation oder Transkriptions-Aktivität im allgemeinen inhibiert, können unter Anwendung der Erfindung identifiziert werden. In einer spezifischen Ausführungsform, kann der Antagonist ein Oligonukleotid sein, aufweisend die Sequenz (oder ihr Komplement) eines Teils einer 3'-terminalen Domäne eines HCV. Solche Oligonukleotide können fähig zur Zerstörung der Strangsynthese sein, welche für die virale Replikation, Translation von HCV-RNA zu Protein oder die Verpackung von Genom-RNA in Virus-Partikel erforderlich ist.

[0044] Die diagnostische Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung erstreckt sich auf die Verwendung der vorliegenden 3'-terminalen Sequenz in Assays zum Screenen hinsichtlich einer HCV-Infektion. Insbesondere können Sonden oder PCR-Primer hergestellt werden, welche in der Lage zum Nachweis von HCV-Infektion in Blut oder in infizierten Zellen sind. Solche Sonden können mit irgendeiner nachweisbaren Markierung markiert sein. In dem Fall, wo eine radioaktive Markierung, wie die Isotope ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I und ^{186}Re , verwendet wird, können bekannte, derzeit verfügbare Zähl-Verfahrensweisen eingesetzt werden. In dem Fall, wo die Markierung ein Enzym ist, kann der Nachweis durch irgendeine der derzeit angewandten kolorimetrischen, spektrophotometrischen, fluorospektrophotometrischen, amperometrischen oder gasometrischen Techniken, welche im Fachgebiet bekannt sind, bewerkstelligt werden.

[0045] Ein Assaysystem kann in der Form eines Testkits für die quantitative Analyse des Ausmaßes des Vorliegens der HCV-Sequenzen oder zur Identifizierung von Arzneistoffen oder anderen Mitteln, welche die Aktivität solcher Sequenzen nachahmen oder blockieren können, hergestellt werden. Das System oder Testkit kann eine markierte Komponente, hergestellt durch eine der radioaktiven und/oder enzymatischen Techniken, welche hierin erörtert sind, die Kopplung einer Markierung an eine Sonde für HCV-Nukleinsäure oder einen Bindungspartner dafür, oder einen Bindungspartner des HCV-Virions selbst, und eine oder mehrere weitere immunchemische Reagenzien umfassen, von denen mindestens eines ein freier oder immobilisierter Ligand ist, der entweder zur Bindung mit der markierten Komponente, deren Bindungspartner, einer der zu bestimmenden Komponenten oder deren Bindungspartner(n) fähig ist.

[0046] Bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können in bestimmten therapeutischen Verfahren angewandt werden, welche auf der Aktivität der HCV-Sequenz(en), oder aktiver Fragmente davon, oder auf Mitteln und anderen Arzneistoffen, die festgestelltermaßen die gleiche Aktivität besitzen, basieren. Ein erstes therapeutisches Verfahren ist mit der Verhinderung einer Infektion durch HCV assoziiert, insbesondere durch

Vorsehen eines Impfstoffes, aufgebaut aus einem attenuierten HCV, entworfen durch Mutieren der hierin offenbarten Sequenzelemente.

5 [0047] Genauer gesagt könnte das therapeutische Verfahren, auf das hierin im allgemeinen Bezug genommen wird, das Verfahren zur Behandlung von Hepatitis oder anderen zellulären Funktionsstörungen, die von HCV verursacht werden, durch die Verabreichung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, welche effektive Inhibitoren des HCV oder seiner Untereinheiten umfassen können, oder anderer gleichermaßen effektiver Arzneimittel, entwickelt beispielsweise durch einen Arzneistoff-Screening-Assay, hergestellt und verwendet gemäß eines
10 weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung, einschließen. Zum Beispiel können Arzneistoffe oder andere Bindungspartner für die HCV-Nukleinsäure oder deren codierte Proteine verabreicht werden, um die Transkriptionsaktivität zu inhibieren oder zu potenzieren.

15 [0048] Insbesondere könnten HSV oder sein hierin identifiziertes 3'-Sequenzelement oder Fragmente davon, und Bindungspartner hierfür, in pharmazeutischen Formulierungen zur Verabreichung in Fällen, bei welchen Interferon-Therapie angemessen ist, so wie chronische virale Hepatitis oder eine andere HCV-assoziierte Krankheit zu behandeln, hergestellt werden.

20 [0049] Folglich ist es ein Hauptziel der vorliegenden Erfindung, ein neues 3'-Sequenzelement von HCV sowie Vollängen-HCV-Genome, welche für Wildtyp- oder attenuierten HCV codieren, welcher diese zusätzliche Sequenz trägt, vorzusehen.

25 [0050] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Nachweis des Vorliegens des HCV in Säugern, bei denen der Verdacht der Gegenwart von HCV besteht, vorzusehen.

30 [0051] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren und ein assoziiertes Assaysystem zum Screenen von Substanzen, wie Arzneistoffen, Mitteln und dergleichen, vorzusehen, welche potenziell wirksam bei der Bekämpfung der nachteiligen Effekte des HCV in Säugern sind.

35 [0052] Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren für die Behandlung von Säugern zur Regulierung der Menge oder Aktivität des HCV oder von Fragmenten davon vorzusehen, so dass die nachteiligen Folgen eines derartigen Vorliegens oder einer derartigen Aktivität abgeändert werden.

[0053] Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren für die Behandlung von Säugern zur Regulierung der Menge oder Aktivität des HCV oder seiner Untereinheiten vorzusehen, so dass die nachteiligen Folgen eines pathologischen Zustands behandelt oder abgewendet werden.

5

[0054] Es ist noch ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung in therapeutischen Verfahren vorzusehen, umfassend oder basierend auf HCV, dessen Sequenzelementen, spezifischen Bindungspartner(n) dafür, oder auf Mitteln oder Arzneimitteln, welche die Produktion regulieren oder welche die Aktivitäten des HCV nachahmen oder ihnen entgegenwirken .

10

[0055] Andere Ziele und Vorteile werden dem Fachmann aus einer Durchsicht der folgenden Beschreibung offensichtlich werden, welche unter Bezugnahme auf die folgenden veranschaulichenden Zeichnungen vorgeht.

15

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0056] Die Figur 1 zeigt ein Verfahren zur Bestimmung der 3'-terminalen Sequenz von HCV. Ein phosphoryliertes synthetisches Oligodesoxynukleotid ("Oligo A"; 5'-GACTGTTGTGGC-CTGCAGGGCCGAATT-3'; Seq.-ID Nr.: 5) wurde an das 3'-Ende der RNA ligiert, um als eine spezifische Priming-Stelle für die cDNA-Synthese zu dienen. Ein Primer für cDNA-Synthese ("Oligo B"; (1)5'-TTGAATTCGACCCTGCAGGCCACAACA-3'; Seq.-ID Nr.: 6 oder B(2); 5'-TTGAATTCGGCCCTGCAGGCCACAACAGTC-3'; Seq.-ID Nr.: 7) war komplementär zu demjenigen, der für die Ligation an die RNA verwendet wurde; ein zweiter Positiv-Sinn-Primer für die PCR entsprach einer Sequenz nahe dem 3'-Ende des HCV-ORF ("Oligo C"; 5'-CAAGTCGACGGGGAGACATTTATCACAGC-3'; Seq.-ID Nr.: 8).

25

Die Figur 2 zeigt ein Alignment bzw. eine Parallelübereinanderstellung, vergleichend den Abschnitt der 3'-terminalen Sequenz (DNA, entsprechend der Positiv-Sinn-HCV-Genom-RNA) von HCV-H-AAK [Seq.-ID Nr.: 11; ermittelt durch Sequenzieren eines unklonierten DNA-Fragments, welches durch PCR unter Verwendung eines Oligo(dA)-Primers und "Oligo C" synthetisiert wurde] zwischen dem Terminations-Codon des ORF und dem Poly(U)-Trakt mit einer teilweisen Liste von veröffentlichten Sequenzen für andere HCV-Isolate (Genotypen): HCV-H(1a)-Isolat (Seq.-ID Nr.: 9); HCV-1(1a) (Seq.-ID Nr.: 10); HCV-J1(1a) (Seq.-ID Nr.: 12); HCV-BK(1b) (Seq.-ID Nr.: 13); HCV-TW(1b) (Seq.-ID Nr.: 14); HCV-N(1b) (Seq.-ID Nr.: 15); HCV-J6(2a) (Seq.-ID Nr.: 16); HCV-J8 (Seq.-ID Nr.: 17); HCV-NZL1(3a) (Seq.-ID Nr.: 18); und HCV-Tr(3b) (Seq.-ID Nr.: 19).

35

Die Figur 3 zeigt die Sequenz (DNA, entsprechend der Positiv-Sinn-HCV-Genom-RNA) von HCV-H 3'-Klonen, einschließlich H77-#1,2 (Seq.-ID Nr.: 20), H77-#8 (Seq.-ID Nr.: 21), H77-#10 (Seq.-ID Nr.: 22), H77-#74 (Seq.-ID Nr.: 23), H77-#5 (Seq.-ID Nr.: 24).

5

Die Figur 4 zeigt die vom Computer vorhergesagte (FOLDRNA, GCG-Paket) Sekundärstruktur des 3'-Endes von HCV-H (Seq.-ID Nr.: 25). Die letzten 46 Nukleotide bilden eine stabile Stem-Loop-Struktur (vorhergesagte Energie -25 kCal/Mol).

10 Die Figur 5 verdeutlicht das Schema, verwendet für die RT/PCR-Amplifikation und Klonierung von partiellen 3'-terminalen Segmenten aus vier unterschiedlichen HCV-Subtypen (1b, 3, 4 und 4a) (Seq.-ID Nr.: 28-31). Kurz gesagt, wurde das Oligo D (5'-TAACATGATCAGCAGAGAGGCCAG-3') (Seq.-ID Nr.: 26) an das 3'-Ende der genomischen RNA angelagert, und cDNA wurde synthetisiert. Als nächstes wurde eine PCR unter Verwendung
15 von Oligo C (Seq.-ID Nr.: 8) und Oligo E (5'-CTCACGGACCTTTCACAGC-3') (Seq.-ID Nr.: 27) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert.

Die Figur 6 zeigt eine Übereinanderstellung von Sequenzen (5'-3') (DNA-Sequenz, entsprechend der Positiv-Sinn-HCV-Genom-RNA), bestimmt für 3 Segmente aus den HCV-Subtypen 1b, 3, 4 und 4a, amplifiziert und kloniert, wie in Figur 5 beschrieben. Das
20 Terminations-Codon (TGA) ist im Fettdruck gezeigt.

Die Figur 7 zeigt ein Schema für 3'-Enden-Oligonukleotidligation, RT/PCR und Klonierung der HCV-RNA aus vier unterschiedlichen HCV-Genotypen/Subtypen (1b, 3, 4 und 4a). Die
25 Verfahren waren im wesentlichen wie in Figur 1 umrissen beschaffen, außer dass Oligo F (5'-CCAAGAATTCCCTAGTCACGGCTAGC-3') (Seq.-ID Nr.: 32) anstelle von Oligo C verwendet wurde.

Die Figur 8 zeigt die Sequenzen (DNA-Sequenz, entsprechend der Positiv-Sinn-HCV-Genom-RNA) (Seq.-ID Nr.: 33-36), resultierend aus der Analyse, die in der Figur 7
30 beschrieben wird. Die Isolat-spezifischen Sequenzunterschiede sind in Fettdruck gezeigt.

Die Figur 9 zeigt ein Schema für alternative 3'-Enden-Primer-Ligation und RT/PCR für ein Genotyp-4-Isolat von HCV. Ein unterschiedliches Oligonukleotid ("Oligo G"; 5'-CGCACC-
35 CTGTCCGACTACAACATCC-3'; Seq.-ID Nr.: 37) wurde für den RNA-Ligationsschritt verwendet. Die Primer, welche für cDNA-Synthese ("Oligo H"; CAGAATTCTTGTAGTCGGA-

CAGGGTGCG-3'; Seq.-ID Nr.: 38) und für PCR ("Oligo F" und "Oligo H") verwendet wurden, sind angezeigt.

Die Figur 10 bildet die vorhergesagte Struktur einer Vollängen-HCV-Genom-RNA ab (die
5 genauen Nummern beziehen sich auf HCV-H). Die Genom-RNA beginnt wahrscheinlich mit einem G-Rest und enthält eine 5'-nicht-translatierte Region (NTR) von 341 Basen. Der ORF besteht aus 9033 Basen, codierend für ein Polyprotein von 3011 Aminosäureresten. Im Anschluß an das Opal(UGA)-Stopcodon findet sich eine Sequenz von 40 Basen, ein Poly(U)-Trakt, eine Polypyrimidin-Strecke und ein neues konserviertes RNA-Element von 101 Basen.

10

Ausführliche Beschreibung

[0057] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann man herkömmliche molekularbiologische, mikrobiologische und rekombinante DNA-Techniken innerhalb des Kenntnisstands des Fach-
15 gebiets anwenden. Solche Techniken werden ausführlich in der Literatur erläutert; siehe z. B. Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Bände I-III [Hrsg.: Ausubel, R. M. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Bände I-III [Hrsg.: J. E. Celis (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Bände I-III [Hrsg.: Coligan, J. E. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (Hrsg.:
20 M.J. Gait, 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [Hrsg.: B.D. Hames & S.J. Higgins (1985)]; "Transcription And Translation" [Hrsg.: B.D. Hames & S.J. Higgins (1984)]; "Animal Cell Culture" [Hrsg.: R.I. Freshney (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

25 [0058] Deshalb sollen die folgenden Begriffe, falls sie hierin auftreten, die nachstehend dargestellten Definitionen aufweisen.

[0059] Die Begriffe "3'-terminales Sequenzelement", "3'-Terminus", "3'-Sequenzelement" und jegliche nicht spezifisch aufgezählte Varianten können hierin austauschbar verwendet werden
30 und beziehen sich, wie in der gesamten vorliegenden Anmeldung und den Ansprüchen verwendet, auf Nukleotidsequenzen, welche die Sequenzdaten, die hierin beschrieben und in Seq.-ID Nr.: 1-4 präsentiert sind, oder diejenigen, gezeigt in Figur 3 (Seq.-ID Nr.: 20-24; nur die Teile der Sequenzen stromabwärts des Poly(U)-Traktes), Figur 6 (Seq.-ID Nr.: 28-31) und Figur 8 (Seq.-ID Nr.: 33-36), und das Eigenschaftsprofil, welches hierin und in den
35 Ansprüchen dargestellt ist, aufweisen. Man sollte es richtig einschätzen, dass mit den Ausdrücken "3'-terminales Sequenzelement", "3'-Terminus", "3'-Sequenzelement" beabsichtigt ist, alle der folgenden Sequenzen abzudecken: (i) Eine RNA-Sequenz am 3'-Terminus der

- Positiv-Sinn-Genom-RNA; (ii) das Komplement dieser RNA-Sequenz am 5'-Terminus der HCV-Negativ-Sinn-RNA; (iii) die DNA-Sequenz, entsprechend der Positiv-Sinn-Sequenz des RNA-Elementes; und (iv) die DNA-Sequenz entsprechend der Negativ-Sinn-Sequenz des RNA-Elements. Beispiele solcher Sequenzen sind jeweilig in den Seq.-ID Nr.: 1-4 veranschaulicht. Demgemäß werden Nukleotidsequenzen, welche im wesentlichen äquivalente oder veränderte Eigenschaften aufzeigen, gleichermaßen in Betracht gezogen. Diese Modifikationen können willkürlich sein, wie beispielsweise Modifikationen, erhalten durch ortsgerichtete Mutagenese, oder können zufällig sein, wie diejenigen, erhalten durch Mutationen in Wirten, welche Erzeuger des Komplexes oder seiner genannten Untereinheiten sind. Ebenso wird beabsichtigt, dass die Begriffe "3'-terminale Sequenz", "3'-Terminus" und "3'-Sequenzelement" innerhalb ihres Umfanges Nukleinsäuremoleküle, welche hierin spezifisch zitiert werden, sowie im wesentlichen alle homologen Analoge und allelische Variationen einschließen.
- 15 [0060] Es wird bevorzugt, dass jegliche hierin beschriebenen Aminosäurereste in der "L"-Isomerform vorliegen. Allerdings können Reste in der "D"-Isomerform für jeglichen L-Aminosäurerest substituiert werden, solange die gewünschte funktionelle Eigenschaft der Immunglobulin-Bindung von dem Polypeptid beibehalten wird. NH₂ bezieht sich auf die freie Aminogruppe, vorhanden am Aminoterminus eines Polypeptides. COOH bezieht sich auf die freie Carboxygruppe, vorhanden am Carboxyterminus eines Polypeptids. Unter Beibehaltung der Standard-Polypeptid-Nomenklatur, *J. Biol. Chem.*, 243:3552-59 (1969), sind Abkürzungen für Aminosäurereste in der folgenden Entsprechungstabelle gezeigt:

ENTSPRECHUNGSTABELLE		
SYMBOL	AMINOSÄURE	
1-Buchstabe	3-Buchstaben	
Y	Tyr	Tyrosin
G	Gly	Glycin
F	Phe	Phenylalanin
M	Met	Methionin
A	Ala	Alanin
S	Ser	Serin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
P	Pro	Prolin
K	Lys	Lysin
H	His	Histidin
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
W	Trp	Tryptophan
R	Arg	Arginin
D	Asp	Asparaginsäure
N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein

[0061] Es sollte bemerkt werden, dass alle Sequenzen von Aminosäureresten hierin durch Formeln repräsentiert werden, deren Links- und Rechts-Orientierung in der konventionellen Richtung von Aminoterminus zu Carboxyterminus vorliegt. Darüber hinaus sollte bemerkt werden, dass ein Strich am Beginn oder Ende einer Aminosäurerest-Sequenz eine Peptidbindung zu einer weiteren Sequenz aus einem oder mehreren Aminosäureresten anzeigt. Die obenstehende Tabelle wird angegeben, um die Drei-Buchstaben- und Ein-Buchstaben-Schreibweisen, welche hierin abwechselnd erscheinen können, zu korrelieren.

5
10

[0062] Ein "Replikon" ist jedwedes genetische Element (z. B. Plasmid, Chromosom, Virus), welches als eine autonome Einheit der DNA- oder RNA-Replikation *in vivo* funktioniert; d. h. fähig zur Replikation unter seiner eigenen Steuerung ist. Bradenbeck und Rice (1992) *Semin. Virol.* 3:297-310, enthält eine Beschreibung von RNA-Replikons.

[0063] Ein "Vektor" ist ein Replikon, wie ein Plasmid, Phage oder Cosmid, an welches ein anderes DNA- (oder RNA-)Segment angefügt werden kann, damit die Replikation des angefügten Segmentes herbeigeführt wird.

5

[0064] Ein "DNA-Molekül" bezieht sich auf die polymere Form von Desoxyribonukleotiden (Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin) entweder in ihrer einzelsträngigen Form oder einer doppelsträngigen Helix. Dieser Ausdruck bezieht sich nur auf die Primär- und Sekundärstruktur des Moleküls und schränkt es nicht auf irgendwelche besonderen tertiären Formen ein.

10 Somit schließt dieser Begriff doppelsträngige DNA ein, welche unter anderem in linearen DNA-Molekülen (z. B. Restriktionsfragmenten), Viren, Plasmiden und Chromosomen zu finden ist. Bei der Erörterung der Struktur von bestimmten doppelsträngigen DNA-Molekülen können Sequenzen hierin gemäß der normalen Konvention beschrieben werden, lediglich die Sequenz in der 5'-nach-3'-Richtung entlang des nicht-transkribierten Stranges der DNA (d.h. dem Strang mit einer Sequenz, die homolog zur mRNA ist) anzugeben.

15

[0065] Ein "RNA-Molekül" bezieht sich auf die polymere Form von Ribonukleotiden (Adenin, Guanin, Uridin oder Cytosin) entweder in ihrer einzelsträngigen Form oder einer doppelsträngigen Helix. Dieser Begriff bezieht sich nur auf die Primär- und Sekundärstruktur des Moleküls, und schränkt selbiges nicht auf irgendwelche besonderen Tertiärformen ein. Somit schließt dieser Begriff einzelsträngige und doppelsträngige RNA ein, welche unter anderem in linearen oder zirkulären RNA-Molekülen zu finden ist. Bei der Erörterung der Struktur von besonderen RNA-Molekülen kann die Sequenz hierin gemäß der normalen Konvention beschrieben werden, nach der die Sequenz in der 5'-nach-3'-Richtung angegeben wird.

20

25

[0066] Ein "Replikationsursprung" bezieht sich auf diejenigen DNA-Sequenzen, welche an der DNA-Synthese beteiligt sind.

30 [0067] Eine "codierende Sequenz" oder ein "offener Leserahmen" ist eine Nukleotidsequenz, welche *in vivo* transkribiert und zu einem Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Steuerung von passenden regulatorischen Sequenzen gebracht wird. Die Grenzen der codierenden Sequenz werden durch ein Start-Codon am 5'-(Amino)-Terminus und ein Translations-Stop-Codon am 3'-(Carboxyl)-Terminus bestimmt. Eine codierende Sequenz kann, ohne
35 darauf eingeschränkt zu sein, prokaryotische Sequenzen, cDNA von eukaryotischer mRNA, genomische DNA-Sequenzen aus eukaryotischer (z. B. Säuger-)DNA und sogar synthetische DNA- oder RNA-Sequenzen einschließen. Ein Polyadenylierungssignal und eine

Transkriptions-Terminationssequenz werden üblicherweise 3' zu der codierenden Sequenz lokalisiert sein.

5 [0068] Transkriptionelle und translationale Steuerungssequenzen sind regulatorische DNA-Sequenzen, wie Promotoren, Enhancer, Polyadenylierungssignale, Terminatoren und dergleichen, welche für die Expression einer codierenden Sequenz in einer Wirtszelle sorgen.

10 [0069] Eine "Promotorsequenz" ist eine regulatorische DNA-Region, fähig zur Bindung von RNA-Polymerase in einer Zelle und zur Einleitung der Transkription einer stromabwärts gelegenen (3'-Richtung) codierenden Sequenz. Für die Zwecke der Definierung der vorliegenden Erfindung wird die Promotorsequenz an ihrem 3'-Terminus von der Transkriptionsinitiationsstelle begrenzt und erstreckt sich stromaufwärts (5'-Richtung), um die minimale Anzahl von Basen oder Elementen einzuschließen, die notwendig sind, um eine Transkription bei über dem Hintergrund nachweisbaren Spiegeln zu initiieren. Innerhalb der Promotorsequenz wird
 15 man eine Transkriptionsinitiationsstelle (herkömmlicherweise definiert durch Kartieren mit Nuklease S1) sowie proteinbindende Domänen (Konsensus-Sequenzen), verantwortlich für die Bindung von RNA-Polymerase, finden. Eukaryotische Promotoren werden oft, aber nicht immer, "TATA"-Boxen und "CAT"-Boxen enthalten. Prokaryotische Promotoren enthalten Shine-Dalgarno-Sequenzen zusätzlich zu den -10- und -35-Konsensussequenzen. "Promotorsequenzen" kann auch benutzt werden, wenn man sich auf analoge RNA-Sequenzen oder -
 20 Strukturen von ähnlicher Funktion in der RNA-Virus-Replikation und -Transkription beziehen will.

25 [0070] Eine "Expressions-Kontrollsequenz" ist eine DNA-Sequenz, welche die Transkription und Translation einer anderen DNA-Sequenz kontrolliert und reguliert. Eine codierende Sequenz steht "unter der Kontrolle" von transkriptionellen und translationalen Steuerungssequenzen in einer Zelle, wenn RNA-Polymerase die codierende Sequenz zu mRNA transkribiert, welche dann zu dem von der codierenden Sequenz codierten Protein translatiert wird. RNA-Sequenzen können auch als Expressions-Steuerungssequenzen dienen, dank ihrer
 30 Fähigkeit, die Translation, RNA-Stabilität und Replikation (für RNA-Viren) zu modulieren.

[0071] Eine "Signalsequenz" kann vor der codierenden Sequenz eingeschlossen sein. Diese Sequenz codiert für ein Signalpeptid, N-terminal zum Polypeptid, welches die Wirtszelle anweist, das Polypeptid an die Zelloberfläche zu richten oder das Polypeptid in das Medium zu sezernieren, und dieses Signalpeptid wird von der Wirtszelle abgespalten, bevor das Protein
 35 die Zelle verläßt. Signalsequenzen können in Assoziation mit einer Vielzahl von Proteinen, welche natürlicherweise in Prokaryoten und Eukaryoten vorkommen, gefunden werden.

[0072] Der Begriff "Oligonukleotid", wie hierin verwendet bei der Bezugnahme auf die Sonde der vorliegenden Erfindung, ist als ein Molekül definiert, das aus zwei oder mehr, vorzugsweise mehr als drei, Ribonukleotiden aufgebaut ist. Seine exakte Größe wird von vielen Faktoren abhängen, welche ihrerseits von der letztendlichen Funktion und Verwendung des Oligonukleotids abhängen.

[0073] Der Begriff "Primer", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Oligonukleotid, ob natürlich vorkommend, wie in einem gereinigten Restriktionsverdau, oder synthetisch hergestellt, welches fähig ist, als ein Initiationspunkt der Synthese zu wirken, wenn es unter Bedingungen, bei denen die Synthese eines Primerverlängerungsproduktes, welches komplementär zu einem Nukleinsäurestrang ist, induziert wird, d.h. in Gegenwart von Nukleotiden und einem induzierenden Mittel, wie einer DNA-Polymerase, und unter eine geeignete Temperatur und einen geeigneten pH-Wert gestellt wird. Der Primer kann entweder einzelsträngig oder doppelsträngig sein, und muß ausreichend lang sein, um die Synthese des gewünschten Verlängerungsproduktes in Gegenwart des induzierenden Mittels zu primen bzw. einzuleiten. Die exakte Länge des Primers wird von vielen Faktoren abhängen, einschließlich Temperatur, Quelle des Primers und Anwendung des Verfahren. Zum Beispiel enthält, für diagnostische Anwendungen, in Abhängigkeit von der Komplexität der Zielsequenz, der Oligonukleotidprimer typischerweise 15-25 oder mehr Nukleotide, obwohl er weniger Nukleotide enthalten kann.

[0074] Die Primer werden hierin gewählt, um "im wesentlichen" komplementär zu verschiedenen Strängen einer besonderen Ziel-DNA-Sequenz zu sein. Dies bedeutet, dass die Primer ausreichend komplementär sein müssen, um mit ihren jeweiligen Strängen zu hybridisieren. Deshalb muß die Primersequenz nicht die exakte Sequenz der Matrize widerspiegeln. Zum Beispiel kann ein nicht-komplementäres Nukleotidfragment an das 5'-Ende des Primers angeheftet werden, wobei der Rest der Primersequenz komplementär zu dem Strang ist. Alternativ dazu, können nicht-komplementäre Basen oder längere Sequenzen in den Primer eingestreut sein, vorausgesetzt, dass die Primersequenz ausreichende Komplementarität mit der Sequenz des Stranges, der damit hybridisieren und dadurch die Matrize für die Synthese des Verlängerungsproduktes bilden soll, aufweist.

[0075] Wie hierin verwendet, beziehen sich die Ausdrücke "Restriktionsendonukleasen" und "Restriktionsenzyme" auf bakterielle Enzyme, von denen jedes doppelsträngige DNA an oder nahe einer spezifischen Nukleotidsequenz spaltet.

[0076] Eine Zelle ist durch exogene oder heterologe DNA "transformiert" worden, wenn eine solche DNA innerhalb der Zelle eingebracht worden ist. Die transformierende DNA kann in die chromosomale DNA, welche das Genom der Zelle ausmacht, integriert (kovalent verknüpft) sein, oder nicht. In Prokaryoten, Hefe und Säugerzellen kann die transformierende DNA zum Beispiel auf einem episomalen Element, wie einem Plasmid, beibehalten werden. Im Hinblick auf eukaryotische Zellen ist eine stabil transformierte Zelle eine solche, in welcher die transformierende DNA in ein Chromosom integriert worden ist, so dass sie durch Chromosomen-Replikation auf Tochterzellen vererbt wird. Diese Stabilität wird durch die Fähigkeit der eukaryotischen Zelle demonstriert, Zelllinien oder Klone zu begründen, welche aus einer Population von Tochterzellen bestehen, welche die transformierende DNA enthalten. Ein "Klon" ist eine Population von Zellen, welche aus einer einzelnen Zelle oder einem gemeinsamen Vorfahr durch Mitose abgeleitet ist. Eine "Zelllinie" ist ein Klon einer primären Zelle, welcher zu einem stabilen Wachstum *in vitro* über viele Generationen in der Lage ist. Diese Definition kann auf RNA-Moleküle angewandt werden, welche verwendet werden können, um Zellen zu transformieren oder zu "transfizieren". Für manche RNA-Viren können derartige Verfahren angewandt werden, um infizierte Zelllinien zu erzeugen, welche die Virus-Replikation vorübergehend oder kontinuierlich unterstützen, und welche in manchen Fällen infektiöse Viren-Partikel erzeugen.

[0077] Zwei DNA- oder RNA-Sequenzen sind "im wesentlichen homolog", wenn mindestens etwa 75 % (vorzugsweise mindestens etwa 80 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 90 oder 95 %) der Nukleotide sich über die definierte Länge der DNA-Sequenzen entsprechen. Sequenzen, welche im wesentlichen homolog sind, können durch Vergleichen der Sequenzen unter Anwendung von Standardsoftware, erhältlich in Sequenzdatenbanken, oder in einem Southern-Hybridisierungsexperiment unter beispielsweise stringenten Bedingungen, wie für dieses besondere System definiert, identifiziert werden. Das Definieren angemessener Hybridisierungsbedingungen liegt innerhalb des Kenntnisstands im Fachgebiet; siehe z. B. Maniatis et al., *siehe oben*; DNA Cloning, Band I & II, *siehe oben*; Nucleic Acid Hybridization, *siehe oben*. Entfernter verwandte Sequenzen oder Strukturen, welche die gleichen oder ähnliche Funktionen aufweisen können, werden als "homolog" bezeichnet. Im Extremfall könnten solche Sequenzen hinsichtlich der linearen Sequenzidentität unverwandt sein, können aber eine im wesentlichen ähnliche Sekundärstruktur aufweisen.

[0078] Eine "heterologe" Region eines DNA- oder RNA-Konstruktes ist ein identifizierbares Segment eines DNA- oder RNA-Moleküls innerhalb einer größeren Nukleinsäure, welches in der Natur nicht in Assoziation mit dem größeren Molekül gefunden wird. Wenn die heterologe Region zum Beispiel ein Säuger-Gen codiert, wird das Gen üblicherweise von

DNA flankiert, welche die genomische Säuger-DNA im Genom des Quellorganismus nicht flankiert. Ein anderes Beispiel einer heterologen codierenden Sequenz ist ein Konstrukt, worin die codierende Sequenz selbst nicht in der Natur gefunden wird (z. B. eine cDNA, wo die genomische codierende Sequenz Introns enthält, oder synthetische Sequenzen mit unterschiedlichen Codons als beim nativen Gen). Allelische Variationen oder natürlich auftretende Mutationsereignisse führen nicht zur Entstehung einer heterologen Region von DNA, wie hierin definiert.

[0079] Ein "Antikörper" ist irgendein Immunglobulin, einschließlich Antikörpern und Fragmenten davon, welches ein spezifisches Epitop bindet. Der Begriff beinhaltet polyklonale, monoklonale und chimäre Antikörper, wobei die zuletzt erwähnten in weiterer Ausführlichkeit in den U.S.-Patenten Nr. 4 816 397 und 4 816 567 beschrieben werden.

[0080] Eine "Antikörper-Bindungsstelle" ist derjenige strukturelle Abschnitt eines Antikörpermoleküls, aufgebaut aus variablen und hypervariablen Regionen der schweren und leichten Kette, welcher spezifisch Antigen bindet.

[0081] Der Ausdruck "Antikörpermolekül" in seinen verschiedenen grammatikalischen Formen, wie hierin verwendet, zieht sowohl ein intaktes Immunglobulin-Molekül als auch einen immunologisch aktiven Abschnitt eines Immunglobulin-Moleküls in Betracht.

[0082] Exemplarische Antikörpermoleküle sind intakte Immunglobulinmoleküle, im wesentlichen intakte Immunglobulinmoleküle und diejenigen Abschnitte eines Immunglobulinmoleküls, welche das Paratop enthalten, einschließlich derjenigen Abschnitte, welche im Fachgebiet bekannt sind als Fab, Fab', F(ab')₂ und F(v), wobei diese Abschnitte für die Verwendung in den hierin beschriebenen therapeutischen Verfahren bevorzugt sind.

[0083] Fab- und F(ab')₂-Abschnitte von Antikörpermolekülen werden durch die proteolytische Reaktion von Papain bzw. Pepsin an im wesentlichen intakten Antikörpermolekülen durch Verfahren, welche gut bekannt sind, hergestellt; siehe zum Beispiel das U.S.-Patent Nr. 4 342 566 von Theofilopolous et al.. Fab'-Antikörpermolekülabschnitte sind ebenfalls gut bekannt und werden aus F(ab')₂-Anteilen hergestellt, gefolgt von einer Reduktion der Disulfidbrücken, welche die zwei Schwere-Kette-Portionen verknüpfen, wie z. B. mit Mercaptoethanol, und gefolgt von Alkylieren des resultierenden Protein-Mercaptans mit einem Reagenz, wie Iodacetamid. Ein Antikörper, der intakte Antikörpermoleküle enthält, wird hierin bevorzugt.

[0084] Der Begriff "monoklonaler Antikörper" in seinen verschiedenen grammatikalischen Formen bezieht sich auf einen Antikörper, aufweisend nur eine Spezies von Antikörper-Bindungsstelle, welche fähig zur Immunreaktion mit einem besonderen Antigen ist. Ein monoklonaler Antikörper zeigt daher typischerweise eine einzige Bindungsaffinität für irgendein Antigen, mit welchem er immunreagiert, auf. Ein monoklonaler Antikörper kann deshalb ein Antikörpermolekül enthalten, das eine Mehrzahl von Antikörper-Bindungsstellen aufweist, jeweils spezifisch für ein unterschiedliches Antigen; wie z. B. bei einem bispezifischen (chimären) monoklonalen Antikörper.

10 [0085] Der Ausdruck "pharmazeutisch annehmbar" bezieht sich auf molekulare Entitäten und Zusammensetzungen, welche physiologisch tolerierbar sind und typischerweise keine allergische oder ähnliche ungünstige Reaktion hervorrufen, wie Magenverstimmung, Schwindligkeit und dergleichen, wenn sie an einen Menschen verabreicht werden.

15 [0086] Der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" wird hierin verwendet, um eine Menge zu bezeichnen, die ausreichend ist, eine Verhinderung und vorzugsweise Reduzierung um mindestens etwa 30 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, am stärksten bevorzugt um mindestens 90 %, einer klinisch signifikanten Änderung in der S-Phasen-Aktivität einer Zielzellmasse, oder eines anderen Merkmals der Pathologie, wie beispielsweise erhöhtem Blutdruck, Fieber oder der Anzahl weißer Zellen, wie sie deren Vorliegen und Aktivität begleiten können, zu bewirken.

25 [0087] Eine DNA-Sequenz ist "operativ verknüpft" an eine Expressions-Kontrollsequenz, wenn die Expressions-Kontrollsequenz die Transkription und Translation dieser DNA-Sequenz kontrolliert und reguliert. Der Begriff "operativ verknüpft" beinhaltet das Vorliegen eines passenden Startsignals (z. B. ATG oder AUG) vor der zu exprimierenden DNA-Sequenz und das Einhalten des korrekten Leserahmens, um die Expression der DNA-Sequenz unter der Steuerung der Expressions-Kontrollsequenz und die Herstellung des von der DNA-Sequenz codierten, gewünschten Produktes zu erlauben. Wenn ein Gen, das man in ein rekombinantes DNA-Molekül zu inserieren wünscht, kein angemessenes Startsignal enthält, kann ein derartiges Startsignal vor das Gen inseriert werden.

35 [0088] Der Begriff "Standard-Hybridisierungsbedingungen" betrifft im allgemeinen Salz- und Temperaturbedingungen, welche im wesentlichen äquivalent zu 5 x SSC und 65°C sowohl für Hybridisierung als auch den Waschschrift sind. Jedoch wird der Fachmann es richtig einschätzen, dass solche "Standard-Hybridisierungsbedingungen" abhängig von den jeweiligen Umständen sind, einschließlich der Konzentration von Natrium und Magnesium im Puffer,

der Nukleotidsequenzlänge und -konzentration, dem Prozentgehalt der Fehlpaarung, dem Prozentgehalt des Formamids und dergleichen. Ebenfalls wichtig bei der Bestimmung der "Standard-Hybridisierungsbedingungen" ist, ob es sich bei den zwei hybridisierenden Sequenzen um RNA-RNA, DNA-DNA oder RNA-DNA handelt. Derartige Standard-Hybridisierungsbedingungen werden vom Fachmann gemäß gut bekannten Formeln leicht bestimmt, wobei die Hybridisierung typischerweise 10-20°C unter der vorhergesagten oder bestimmten T_m erfolgt, mit Waschungen von höherer Stringenz, falls gewünscht.

[0089] Mit "HCV" ist eine diversifizierte Gruppe verwandter Viren gemeint, klassifiziert als eine separate Gattung in der Flavivirus-Familie. Die Merkmale dieser Gattung sind im obenstehenden Hintergrund der Erfindung beschrieben, und es sind derartige Mitglieder eingeschlossen, wie HCV-1, HC-J1, HC-J, HCV-BK, HCV-H, HC-J6, HC-J8, HC-J483, HC-J491, HC-C2, HCV-JK, HCV-N, HCV-T, HCV-JT, HC-G9, HCV-K3a, NZL1, HCV-Tr und dergleichen.

[0090] Hierin beschrieben wird die Identifizierung von neuen terminalen Sequenzen, vorhanden in HCV-Positiv-Sinn-Genom-RNA.

[0091] Hierin beschrieben werden neue 5'- und 3'-terminale Sequenzen, welche bei allen Mitgliedern der hierin offenbarten HCVs hochkonserviert sind.

[0092] Wie obenstehend angegeben, wird hierin ein rekombinantes DNA- oder RNA-Molekül oder kloniertes Gen, oder eine degenerierte Variante davon beschrieben, welche(s) für ein HCV oder ein Fragment davon codiert, das eine Nukleotidsequenz aufweist oder komplementär zu einer Nukleotidsequenz ist, welche gezeigt wird in Seq.-ID Nr.: 1-4, oder diejenigen, gezeigt in Figur 3 (Seq.-ID Nr.: 20-24; nur die Teile der Sequenzen stromabwärts des Poly(U)-Traktes), Figur 6 (Seq.-ID Nr.: 28-31) und Figur 8 (Seq.-ID Nr.: 33-36).

[0093] Ebenfalls beschrieben sind infektiöse HCV-cDNA-Klone, umfassend früher offenbarte 5'-nicht-codierende, codierende und 3'-nicht-codierende Sequenzen, einschließlich derjenigen, codierend für Poly(U)- oder Poly(A)-Trakte (HCV-1 acc.# M62321; HC-J1 acc.# D10749; HC-J acc.# D90208; HCV-BK acc.# M58335; HCV-H acc.# M67463; HC-J6 acc.# D00944; HC-J8 acc.# D01221; HC-J483 acc.# D13558; HC-J491 acc.# D10750; HC-C2 acc.# D10934; HCV-JK acc.# X61596; HCV-N acc.# S62220; HCV-T acc.# M84745; HCV-JT acc.# D01171; HCV-JT acc.# D01172; HC-G9 acc.# D14853; HCV-K3a acc.# D28917; NZL1 acc.# D17763; HCV-Tr acc.# D26556 und andere), den Polypyrimidintrakt und das neue 3'-Element von 101 Basen (Seq.-ID Nr.: 1c, d oder verwandte Sequenzen).

[0094] Sowohl die diagnostischen als auch therapeutischen Möglichkeiten, welche durch die Existenz des Vollängen-HCV-Klons erwachsen, leiten sich von der Tatsache ab, dass die terminalen Sequenzen von viralen Genomen kritisch für die Erzeugung funktioneller, replikationskompetenter RNAs sein können (Boyer et al., *J. Gen. Virol.* 198:415-426). Wie früher vorgeschlagen und hierin weiter ausgearbeitet, kann die vorliegende Erfindung für ein pharmazeutisches Eingreifen in den infektiösen Lebenszyklus von HCV verwendet werden.

[0095] So könnte in Fällen, wo es gewünscht wird, die Infektiosität von HCV zu inhibieren, ein passender Inhibitor des 3'-Sequenzelementes eingeführt werden, um die Wechselwirkung der Initiation von für die virale Replikation benötigter Negativ- und Positiv-Strang-Synthese zu blockieren.

Dementsprechend kann die Infektiosität durch die Einbringung zusätzlicher Mengen eines Nukleinsäuremoleküls, das für das 3'-Sequenzelement codiert, oder seiner chemischen oder pharmazeutischen Verwandten, Analoge, Fragmente und dergleichen, behoben werden.

[0096] Wie früher erörtert, können die Moleküle oder Mittel, welche entweder Nachahmung oder Antagonismus zum 3'-Sequenzelement aufzeigen oder die Replikation des HCV steuern, in pharmazeutischen Zusammensetzungen mit einem geeigneten Träger und bei einer Stärke zubereitet werden, welche effektiv zur Verabreichung auf verschiedenen Wegen an einen Patienten ist, der einen nachteiligen, mit HCV assoziierten medizinischen Zustand durchleidet, um selbigen zu behandeln. Eine Vielzahl von Verabreichungstechniken kann zum Einsatz kommen, worunter sich parenterale Techniken, wie subkutane, intravenöse und intraperitoneale Injektionen, Katheterisierungen und dergleichen finden. Die durchschnittlichen Mengen der Moleküle oder ihrer Untereinheiten können variieren und sollten im Besonderen auf den Empfehlungen und der Verschreibung durch einen qualifizierten Arzt oder Tierarzt beruhen.

[0097] Wie früher vorgeschlagen, können diagnostische Verfahren unter Verwendung der vorliegenden Erfindung das Untersuchen einer zellulären Probe oder von Medium mittels eines Assays umfassen, welcher eine effektive Menge eines Bindungspartners für die HCV-RNA einschließt. Wie früher erörtert, sind bei den Patienten, die in der Lage sind, Nutzen aus diesem Verfahren zu ziehen, diejenigen eingeschlossen, welche unter einer Infektion mit HCV leiden. Verfahren zum Isolieren der Moleküle, welche HCV-Sequenzen binden, um bei der Untersuchung der Zielzellen zu helfen, sind im Fachgebiet gut bekannt.

[0098] Die vorliegende Erfindung kann ferner in therapeutischen Zusammensetzungen verwendet werden, die nützlich zur Ausführung der hierin beschriebenen therapeutischen Verfah-

ren sind. Eine vorliegende therapeutische Zusammensetzung schließt in einer Mischung, einen pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten (Träger) und eines oder mehrere unter einem 3'-terminalen Sequenzelement, dessen Analog oder dessen Fragment oder ein Molekül, welches die Eigenschaften oder Aktivitäten dieses Sequenzelementes inhibiert, wie hierin beschrieben, als einen Wirkstoff ein. In einer bevorzugten Zusammensetzung umfasst die Zusammensetzung ein Molekül, das zum Modulieren der Sekundärstrukturbildung des 3'-Terminus der HCV-RNA und/oder der Initiation von Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Synthese und/oder der RNA-Verpackung fähig ist.

10 [0099] Eine weitere therapeutische Zusammensetzung schließt einen attenuierten Volllängen-HCV ein, welcher als ein Impfstoff gegen HCV-Infektion verwendet werden kann, wobei eine Sequenz innerhalb des Genoms von HCV, insbesondere das 3'-terminale Sequenzelement (Seq.-ID Nr.: 1-4), entweder als ein natürlich-vorkommendes Isolat oder über *in vitro*-Auswertung oder ortsgerichtete Mutagenese modifiziert worden ist. Besondere Mutationen, die für derartige attenuierte Viren geeignet sind, schließen diejenigen ein, welche die Struktur des 3'-Terminus der HCV-Genom-RNA (oder des 5'-Terminus der Negativ-Sinn-HCV-RNA) verändern, und dadurch die Initiation und/oder Translation von Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Synthese und/oder die RNA-Verpackung verändern. Derartige Modifikationen können durch Computer-Modellerstellung unterstützt und unter Verwendung von Infektiositäts-Assays ausgewertet werden.

[0100] Die Herstellung von therapeutischen Zusammensetzungen, welche das 3'-terminale Sequenzelement oder einen Antagonisten davon, oder das attenuierte Volllängen-HCV, Analoge oder aktive Fragmente als Wirkstoffe enthalten, ist im Fachgebiet gut verstanden. Typischerweise werden derartige Zusammensetzungen als Injektionen, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen, hergestellt, wobei jedoch auch feste Formen, die geeignet sind zur Lösung in, oder Suspension in, Flüssigkeit vor der Injektion, hergestellt werden können. Die Präparation kann auch emulgiert werden. Der aktive therapeutische Bestandteil wird häufig mit Exzipienten gemischt, welche pharmazeutisch annehmbar und mit dem aktiven Bestandteil kompatibel sind. Geeignete Exzipienten sind zum Beispiel Wasser, Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerin, Ethanol oder dergleichen und Kombinationen hiervon. Darüber hinaus kann die Zusammensetzung, falls gewünscht, kleinere Mengen an Hilfssubstanzen enthalten, wie Netz- oder Emulgiermittel und pH-Puffermittel, welche die Effektivität des aktiven Bestandteils erhöhen.

35 [0101] Ein Polypeptid, Analog oder aktives Fragment können als neutralisierte, pharmazeutisch annehmbare Salzformen zu der therapeutischen Zusammensetzung formuliert werden.

Pharmazeutisch annehmbare Salze schließen die Säureadditionssalze (gebildet mit den freien Aminogruppen des Polypeptid- oder Antikörpermoleküls), welche mit anorganischen Säuren, wie zum Beispiel Chlorwasserstoff- oder Phosphorsäuren, oder solchen organischen Säuren, wie Essig-, Oxal-, Wein-, Mandelsäure, gebildet werden, und dergleichen ein. Von den freien Carboxylgruppen gebildete Salze können auch von anorganischen Basen abgeleitet sein, wie zum Beispiel Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisen(III)-hydroxiden, und solchen organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und dergleichen.

10 **[0102]** Die therapeutischen Zusammensetzungen werden herkömmlicherweise intravenös verabreicht, wie zum Beispiel durch Injektion einer Einheitsdosis. Der Begriff "Einheitsdosis" bezieht sich, wenn in Hinsicht auf eine therapeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendet, auf physikalisch diskrete Einheiten, geeignet als Einheits-Dosierungen für Menschen, wobei jede Einheit eine vorherbestimmte Menge an aktivem Material, die
15 berechnetermaßen den gewünschten therapeutischen Effekt erzeugt, in Assoziation mit dem erforderlichen Verdünnungsmittel, d.h. Träger oder Vehikel, enthält.

[0103] Die Zusammensetzungen werden in einer mit der Dosierungsformulierung kompatiblen Weise und in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht. Die zu verabreichende Menge hängt von dem zu behandelnden Subjekt, der Kapazität des Immunsystems des Subjekts, den aktiven Bestandteil zu nutzen, und dem gewünschten Ausmaß der Inhibition oder Neutralisierung von HCV ab. Die genau erforderlichen, zu verabreichenden Mengen an aktivem Bestandteil hängen von der Beurteilung des behandelnden Arztes ab und sind für jedes Individuum besonders. Allerdings können geeignete Dosierungen von etwa 0,1 bis 20, vorzugsweise etwa 0,5 bis etwa 10 und weiter bevorzugt einem bis mehreren Milligramm aktiven Bestandteil pro Kilogramm Körpergewicht des Individuums pro Tag reichen und hängen vom Verabreichungsweg ab. Im Falle, dass ein attenuierter Virus als ein Impfstoff verwendet wird, könnten die Dosierungen von 10 bis 10^6 infektiösen Dosen reichen. Für inaktivierte virale Impfstoffe könnten höhere Dosierungen von HCV-Antigen und ein geeignetes Adjuvanz erforderlich sein. Geeignete Dosierungsschemen für die anfängliche Verabreichung und Booster-Einspritzungen sind ebenfalls variabel, werden aber typisch veranschaulicht durch eine anfängliche Verabreichung, gefolgt von Wiederholungs-Dosen bei Intervallen von einer oder mehreren Stunden durch eine anschließende Injektion oder anderweitige Verabreichung. Alternativ dazu wird eine kontinuierliche intravenöse Infusion, ausreichend, um Konzentrationen von zehn Nanomolar bis zehn Mikromolar im Blut aufrechtzuerhalten, in Betracht gezogen.

[0104] Die therapeutischen Zusammensetzungen können ferner eine effektive Menge des 3'-Sequenzelements, des Antagonisten davon oder Analoges davon in Kombination mit einem Antibiotikum, einem Steroid, Interferon oder einem anderen Anti-HCV-Therapeutikum einschließen. Exemplarische Formulierungen sind nachstehend angegeben:

5

Formulierungen

[0105]

Intravenöse Formulierung I	
Bestandteil	mg/ml
Cefotaxim	250,0
HCV, Fragment oder Antagonist	10,0
Dextrose USP	45,0
Natriumbisulfit USP	3,2
Edetat-Dinatrium USP	0,1
Wasser zur Injektion q.s.a.d.	1,0 ml

10

Intravenöse Formulierung II	
Bestandteil	mg/ml
Ampicillin	250,0
HCV, Fragment oder Antagonist	10,0
Natriumbisulfit USP	3,2
Dinatrium-Edetat USP	0,1
Wasser zur Injektion q.s.a.d.	1,0 ml

Intravenöse Formulierung III	
Bestandteil	mg/ml
Gentamycin (geladen als Sulfat)	40,0
HCV, Fragment oder Antagonist	10,0
Natriumbisulfit USP	3,2
Dinatrium-Edetat USP	0,1
Wasser zur Injektion q.s.a.d.	1,0 ml

Intravenöse Formulierung IV	
Bestandteil	mg/ml
HCV, Fragment oder Antagonist	10,0
Dextrose USP	45,0
Natriumbisulfit USP	3,2
Edetat-Dinatrium USP	0,1
Wasser zur Injektion q.s.a.d.	1,0 ml

Intravenöse Formulierung V	
Bestandteil	mg/ml
HCV, Fragment oder Antagonist	5,0
Natriumbisulfit USP	3,2
Dinatrium-Edetat USP	0,1
Wasser zur Injektion q.s.a.d.	1,0 ml

5 [0106] Wie hierin verwendet, bedeutet "pg" pikogramm, "ng" bedeutet Nanogramm, "ug" oder "µg" bedeutet Mikrogramm, "mg" bedeutet Milligramm, "ul" oder "µl" bedeutet Mikroliter, "ml" bedeutet Milliliter, und "l" bedeutet Liter.

10 [0107] Eine breite Vielfalt von Zelltypen kann als Wirtszellen zur HCV-Replikation nützlich sein, wenn selbige unter Verwendung der funktionellen HCV-cDNA-Klone initiiert wird, die durch Einbringen von Sequenzen aus der vorliegenden Erfindung erzeugt werden. Diese Wirtszellen können primäre humane Zellen (z. B. Hepatozyten, T-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Vorhaut-Fibroblasten) sowie kontinuierliche humane Zelllinien [z. B. HepG2, Huh7, HUT78, HPB-Ma, MT-2 (und andere mit HTLV-I und HTLV-II infizierte T-Zelllinien), Namalowa, Daudi, EBV-transformierte LCLs] einschließen. Darüber hinaus
15 können kontinuierliche Zelllinien, die leicht mit RNA transfiziert werden und für die Replikation von Flaviviren oder Pestiviren permissiv sind, die HCV-Replikation unterstützen (z. B. SW-13, Vero, BHK-21, COS, PK-15, MBCK). Der Fachmann wird in der Lage sein, die richtigen Wirtszellen ohne übermäßigen experimentellen Aufwand auszuwählen, um den gewünschten Infektiositäts-Assay ohne Abweichung vom Umfang dieser Erfindung zu
20 bewerkstelligen.

[0108] Es ist ferner beabsichtigt, dass die 3'-terminalen Sequenzanaloga oder HCV-Analoga aus Nucleotidsequenzen hergestellt werden können, die innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung abgeleitet werden. Analoga, wie Fragmente oder Mutanten (z. B. "Muteine"),

können durch Standard-Spaltung durch Restriktionsenzyme oder durch ortsgerichtete Mutagenese der codierenden und nicht-codierenden (5'- und 3'-terminalen) HCV-Sequenzen hergestellt werden. Analoga, welche "HCV-inhibierende Aktivität" aufzeigen, wie kleine Moleküle, ob sie fördernd oder als Inhibitoren wirken, können durch bekannte *in vivo*-und/oder *in vitro*-Assays identifiziert werden.

[0109] Wie obenstehend erwähnt, kann eine DNA-Sequenz, codierend für das 3'-Sequenzelement, dessen Komplement oder den Vollängen Wildtyp- oder attenuierten HCV, eher synthetisch hergestellt als kloniert werden. Die DNA-Sequenz kann mit passenden Codons für die Aminosäuresequenz, welche von dem offenen Leserahmen von HCV codiert wird, entworfen werden. Die vollständige Sequenz wird aus überlappenden, durch Standardverfahren hergestellten Oligonucleotiden zusammengebaut und zu einer vollständigen codierenden Sequenz zusammengefügt; siehe z. B. Edge, *Nature*, **292**: 756 (1981); Nambair et al., *Science*, **223**:1299 (1984); Jay et al., *J. Biol. Chem.*, **259**:6311 (1984).

[0110] Die Fähigkeit des 3'-terminalen Sequenzelements, replikationskompetente HCV-RNAs herbeizuführen, kann unter Verwendung von Konstrukten analysiert werden, in welchen der ORF von HCV durch ein Reporteragen wie Luciferase ersetzt worden ist, welches direkt nachgewiesen und mit dem Spiegel an HCV-RNA in der Zelle korreliert werden kann. Im besonderen kann das 3'-terminale Sequenzelement verwendet werden, um replikationskompetente HCV-RNAs, und zwar entweder Vollängen-RNAs, fähig zur kompletten Replikation und Virus-Produktion, oder Replikons, abzuleiten. Solche Replikons wären fähig zur RNA-Replikation, aber ihnen könnte die strukturelle Region/Verpackungs-Maschinerie fehlen, und sie könnten deshalb keinen Virus herstellen. Mit solchen Replikons (enthaltend das 3'-Element) transfizierte/transformierte Zellen wären nützlich für Inhibitoren der HCV-RNA-Replikation, wobei solche eingeschlossen sind, welche die Funktion des 3'-Elementes oder seines Komplements stören könnten. Die RNA-Replikation könnte untersucht werden, indem man entweder direkt die HCV-RNA-Spiegel beobachtet (RT/PCR, B-DNA, Northern-Blot-Analysen) oder indem man einen empfindlichen Reporter (wie Luziferase) unter der Steuerung der HCV-RNA-Replikations- und Translations-Maschinerie einbaut.

[0111] Synthetische DNA-Sequenzen gestatten die zweckmäßige Konstruktion von Genen, welche HCV, HCV-Varianten oder attenuiertes HCV exprimieren werden. Alternativ dazu kann für variantes oder attenuiertes HCV codierende DNA durch ortsgerichtete Mutagenese von nativen HCV-cDNAs hergestellt werden.

[0112] Ein allgemeines Verfahren für den ortsspezifischen Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine wird beschrieben in Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science*, **244**: 182-188 (April 1989). Dieses Verfahren kann angewandt werden, um HCV-Virionen, enthaltend Proteine mit unnatürlichen Aminosäuren, zu erzeugen.

[0113] Wie hierin beschrieben, können Antisense-Nukleotide und Ribozyme hergestellt werden und können verwendet werden, um die HCV-RNA-Translation, -Stabilität, -Replikation/Transkription und/oder -Verpackung zu stören. Dieses Vorgehen verwendet Antisense-Nukleinsäure und Ribozyme, um die virale Replikation zu blockieren, entweder durch Maskieren der HCV-RNA mit einer Antisense-Nukleinsäure oder durch Spalten derselben mit einem Ribozym.

[0114] Antisense-Nukleinsäuren sind DNA- oder RNA-Moleküle, welche komplementär zu mindestens einem Abschnitt eines spezifischen RNA-Moleküls sind (siehe Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988). In der Zelle hybridisieren sie an diese RNA, wobei ein doppelsträngiges Molekül gebildet wird. Deshalb können Antisense-Nukleinsäuren die virale Replikation stören (entweder durch einen direkten Blockierungs-Effekt oder dadurch, dass sie zum Abbau der Ziel-RNA durch zelluläre Enzyme führen). Oligomere aus etwa fünfzehn Nukleotiden sind angemessen, da sie leicht zu synthetisieren sind und es wahrscheinlich ist, dass sie weniger Probleme als größere Moleküle aufwerfen, wenn man sie in HCV-infizierbare Zellen einführt. Jedoch sind auch Oligonukleotide von natürlicher Struktur oder jene mit Modifikationen zur Erhöhung der Stabilität, Erleichterung der Aufnahme etc., geeignet; Darüber hinaus können längere Antisense-RNAs *in vivo* in Hepatozyten oder anderen HCV-Zielzellen unter Anwendung von Gentherapie-Vorgehensweisen erzeugt werden. Antisense-Verfahren sind angewandt worden, um die Expression vieler Gene *in vitro* zu inhibieren (Marcus-Sekura, 1988; Hambor et al., 1988).

[0115] Ribozyme sind RNA-Moleküle, welche das Vermögen besitzen, andere einzelsträngige RNA-Moleküle in einer Weise zu spalten, die einigermaßen analog zu DNA-Restriktionsendonukleasen ist. Ribozyme wurden durch die Beobachtung entdeckt, dass bestimmte mRNAs die Fähigkeit aufweisen, ihre eigenen Introns herauszuschneiden. Durch Modifizieren der Nukleotidsequenz dieser RNAs sind Forscher in der Lage gewesen, Moleküle zu bauen, welche spezifische Nukleotidsequenzen in einem RNA-Molekül erkennen und selbiges spalten (Cech, 1988). Da sie sequenzspezifisch sind, werden nur RNAs (wie die HCV-Positiv-Sinn-Genom-RNA oder ihr Komplement) mit besonderen Sequenzen inaktiviert.

[0116] Forscher haben zwei Typen von Ribozymen identifiziert, den *Tetrahymena*-Typ und den "Hammerkopf"-Typ (Hasselhoff und Gerlach, 1988). Ribozyme vom *Tetrahymena*-Typ erkennen Vier-Basen-Sequenzen, wohingegen der "Hammerkopf"-Typ Elf- bis Achtzehn-Basen-Sequenzen erkennt. Je länger die Erkennungs-Sequenz, desto wahrscheinlicher ist es, dass sie ausschließlich in der Ziel-mRNA-Spezies auftritt. Deshalb sind Ribozyme vom "Hammerkopf"-Typ gegenüber Ribozymen vom *Tetrahymena*-Typ zur Inaktivierung einer spezifischen mRNA-Spezies zu bevorzugen, und Achtzehn-Basen-Erkennungssequenzen werden gegenüber kürzeren Erkennungssequenzen bevorzugt.

10 [0117] Die hierin beschriebenen DNA-Sequenzen können somit verwendet werden, um Antisense-Moleküle gegen HCV-RNA und Ribozyme, welche HCV-RNA spalten, herzustellen. Man sollte es richtig einschätzen, dass derartige Antisense-Moleküle und Ribozyme Nukleotidsequenzen sowohl von Positiv- als auch Negativ-Strang-Polarität einschließen werden, so dass sie sowohl an die Positiv- als auch Negativ-Strang-HCV-RNAs binden können.

[0118] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls eine Vielzahl von diagnostischen Anwendungen, einschließlich Verfahren zum Nachweis von HCV. Die Erfindung kann auch in Verfahren zum Korrelieren von 3'-NTR-Sequenzen mit verschiedenen klinischen Parametern, wie der Schwere der Erkrankung, dem Ansprechen auf eine Behandlung mit Interferon und dem Immunstatus, oder zur Bestimmung des Gewebe-Tropismus (prädiktive Diagnostik) angewandt werden.

25 [0119] Die vorliegenden HCV-Sequenzen können experimentell verwendet werden, um HCV-Isolate zu identifizieren, die zusätzliche 3'-Sequenzen enthalten, um 3'-NTR-Sequenzen für verschiedene HCV-Genotypen zu bestimmen, um weitere Bereiche der Konservierung und Divergenz zu definieren. Auch die chemische Modifikation und Analyse der RNA durch RNase-Kartierung und dreidimensionale Strukturanalyse der RNA ist eine Hilfe zur Identifizierung von Wirts- oder Virus-Faktoren, welche mit der Sequenz wechselwirken, und/oder zur Identifizierung von Molekülen, welche die Replikation inhibieren.

[0120] Die HCV-RNA kann auch therapeutisch verwendet werden, d.h. attenuiertes HCV kann zur Impfstoff-Entwicklung verwendet werden, und das 3'-NTR-Sequenzelement kann als ein transdominanter Inhibitor der HCV-Replikation via Gentherapie eingesetzt werden.

35 [0121] Die Replikation von HCV in Zellen kann durch verzweigte DNA (B-DNA), quantitative RT/PCR und immunologische Vorgehensweisen oder unter Anwendung von Standardver-

fahren zur Bestimmung des Virentiters (d.h. Titration im Schimpansen) festgestellt werden. Die Vorgehensweisen und deren Anwendung sind dem Fachmann sämtlich vertraut und können folglich innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung angewandt werden. Ein "kompetitives" Antikörper-Bindungs-Vorgehen wird in den U.S.-Patenten Nr. 3 654 090 und
 5 3 850 752 beschrieben. Ein "Sandwich"-Vorgehen wird in den U.S.-Patenten Nr. RE 31 006 und 4 016 043 beschrieben. Noch andere Vorgehensweisen sind als das "Doppel-Antikörper"- oder "DASP"-Verfahren bekannt.

[0122] In jedem Fall bilden HCV-Proteine Komplexe mit einem oder mehreren Antikörper(n)
 10 oder Bindungspartnern, und ein Mitglied des Komplexes wird mit einer nachweisbaren Markierung markiert. Alternativ dazu kann ein Antikörper erzeugt oder in HCV-infizierten Patienten identifiziert werden, der an das vorliegende 3'-terminale Sequenzelement von HCV bindet. Die Tatsache, dass ein Komplex gebildet worden ist, und, falls gewünscht, dessen Menge, können durch bekannte Verfahren ermittelt werden, welche für den Nachweis von
 15 Markierungen anwendbar sind.

[0123] Es werden ebenfalls RNA-Moleküle beschrieben, welche das 3'-terminale Sequenzelement oder dessen Komplementär nachahmen oder an diese Elemente binden, welche *in vitro*
 20 unter Anwendung der "SELEX"-Verfahrensweise (Tuerk und Gold, 19__) oder anderen *in vitro*-Selektions/Evolutions-Verfahrensweisen selektiert werden. Diese Verfahren stellen Bibliotheken von RNAs mit statistischen Sequenzen bereit, welche durch re-iterative Bindung an ein Ziel (in diesem Falle das 3'-terminale Sequenzelement, dessen Komplement oder die für die Funktionen dieser jeweiligen Elemente erforderlichen, entsprechenden Bindungspartner) selektiert werden können, und daran gebundene RNAs werden durch PCR
 25 amplifiziert. Solche Moleküle können entweder die Struktur des 3'-terminalen Elements nachahmen oder kompetitive Inhibitoren des 3'-terminalen Sequenzelements sein. Derartige SELEX-RNAs können für diagnostische und sogar therapeutische Anwendungen innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung geeignet sein.

30 [0124] Alternativ dazu kann die Gegenwart von HCV-RNA durch Northern-Analyse, Polymerasekettenreaktion (PCR), Primerverlängerung und dergleichen bestimmt werden.

[0125] Die am häufigsten für diese Untersuchungen verwendeten Markierungen sind radioaktive Elemente, Enzyme, Chemikalien, welche bei Aussetzen an ultraviolettes Licht fluoreszieren, und andere.
 35

[0126] Eine Anzahl von fluoreszenten Materialien ist bekannt und kann als Markierungen eingesetzt werden. Diese schließen zum Beispiel Fluorescein, Rhodamin, Auramin, Texas-Rot, AMCA-Blau und Lucifer-Gelb ein. Ein besonderes Nachweismaterial ist Anti-Kaninchen-Antikörper, welcher in Ziegen hergestellt und über ein Isothiocyanat mit Fluorescein konjugiert wird.

[0127] Ein Antikörper gegen HCV-Proteine oder eine Sonde für HCV-RNA oder Bindungspartner dafür kann ebenfalls mit einem radioaktiven Element oder mit einem Enzym markiert sein. Die radioaktive Markierung kann durch eine der derzeitig verfügbaren Zähl-Verfahrenswesen nachgewiesen werden. Das bevorzugte Isotop kann ausgewählt werden unter ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I und ^{186}Re .

[0128] Enzym-Markierungen sind gleichermaßen nützlich und können durch eine der derzeitig angewandten kolorimetrischen, spektrophotometrischen, fluorospektrophotometrischen, amperometrischen oder gasometrischen Techniken nachgewiesen werden. Das Enzym ist durch Reaktion mit Verbrückungsmolekülen, wie Carbodiimiden, Diisocyanaten, Glutaraldehyd und dergleichen, an die ausgewählte Sonde konjugiert. Viele Enzyme, welche in diesen Vorgehensweisen verwendet werden können, sind bekannt und können eingesetzt werden. Bei den bevorzugten davon handelt es sich um Peroxidase, β -Glucuronidase, β -D-Glucosidase, β -D-Galactosidase, Urease, Glucoseoxidase plus -peroxidase und alkalische Phosphatase. Als Beispiele sei auf die U.S.-Patente Nr. 3 654 090; 3 850 752 und 4 016 043 verwiesen, und zwar wegen ihrer Offenbarung alternativer Markierungsmaterialien und -verfahren. Darüber hinaus kann eine Sonde Biotin-markiert sein und danach mit markiertem Avidin, oder einer Kombination von Avidin und einem markierten Anti-Avidin-Antikörper, nachgewiesen werden. Die Sonden können auch darin eingebautes Digoxigenin aufweisen und dann mit einem markierten Anti-Digoxigenin nachgewiesen werden und mit einem markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen werden.

[0129] In einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung können kommerzielle Test-Sets, geeignet zur Anwendung durch einen medizinischen Spezialisten, hergestellt werden, um die Gegenwart oder Abwesenheit von infektiösem HCV in verdächtigten Patientenproben zu bestimmen. Solche Test-Sets können Techniken, wie RT/PCR, verzweigte DNA und Ligations-Kettenreaktion (LCR) anwenden. Gemäß den obenstehend erörterten Test-Techniken wird eine Klasse solcher Kits zumindest eine(n) markierte(n) HCV-Antikörper oder -Oligonukleotidsonde oder deren Bindungspartner und Anweisungen, welche selbstverständlich von dem gewählten Verfahren abhängen, enthalten. Die Sets können auch periphere Reagenzien, wie Puffer, Stabilisatoren etc. enthalten.

[0130] Folglich kann ein Test-Set für das Aufzeigen der Gegenwart von HCV hergestellt werden, umfassend:

- 5 (a) eine vorherbestimmte Menge mindestens einer markierten Oligonukleotid-Sonde, gerichtet gegen ein 3'-Sequenzelement des HCV-Genoms, erhalten durch direkte oder indirekte Verknüpfung des Oligonukleotids oder eines spezifischen Bindungspartners davon an eine nachweisbare Markierung;
- (b) andere Reagenzien; und
- 10 (c) Anweisungen zur Anwendung des Sets.

[0131] Genauer gesagt, kann das diagnostische Test-Set umfassen:

- 15 (a) eine bekannte Menge der markierten Oligonukleotidsonde, wie obenstehend beschrieben (oder einen Bindungspartner), im allgemeinen gebunden an eine feste Phase zur Bildung eines Immunosorbens oder, alternativ dazu, an eine geeignete Markierungssubstanz, oder mehrere solche Endprodukte etc. (oder ihre Bindungspartner), und zwar jeweils eines hiervon;
- (b) falls notwendig, andere Reagenzien; und
- (c) Anweisungen zur Anwendung des Test-Sets.

[0132] Gemäß dem obenstehenden, kann ein Testsystem zum Screenen potentieller
20 Arzneimittel, wirksam zur Modulierung der replikativen Aktivität der HCV-RNA, hergestellt werden. Die infektiöse HCV-RNA kann in ein Testsystem eingebracht werden und das prospektive Arzneimittel kann ebenfalls in die resultierende Zellkultur eingeführt werden, und die Kultur danach untersucht werden, um Änderungen der replikativen Aktivität der Zellen aufgrund der Zugabe des prospektiven Arzneimittels zu beobachten.

25 **Einleitende Erwägungen**

[0133] Obgleich in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, gibt es immer noch eine überwältigende Anzahl unbeantworteter Fragen in Bezug auf die HCV-Replikation,
30 -Pathogenese und -Immunität. Das Gebiet erreicht rasch einen Engpaß. Man versteht einige Aspekte der Funktionen der HCV-Genom-RNA und ihrer codierten Proteine, aber vor der vorliegenden Erfindung gab es keinen Weg, experimentell Struktur/Funktions-Fragen im Zusammenhang der authentischen Virus-Replikation zu untersuchen. Solche Analysen sind kritisch für das Verständnis jedes Schritts im Virus-Lebenszyklus auf einer Ebene, die den Ent-
35 wurf von schutzgebenden Impfstoffen und einer effektiven Therapie für chronisch infizierte Patienten gestatten wird.

[0134] Die vorliegende Erfindung leitet sich aus Bemühungen ab, funktionelle cDNA-Klone für HCV, insbesondere den HCV-H-Stamm, zu konstruieren. Vor der vorliegenden Erfindung waren Versuche, infektiöse HCV-RNA aus cDNA zu gewinnen, nicht erfolgreich. Es bestehen mehrere mögliche Erklärungen, einzeln oder gemeinsam, für die früheren Fehlschläge, einschließlich fehlender oder inkorrekt terminaler Sequenzen, für die HCV-Replikation schädlicher oder letaler interner Fehler, oder unangemessener Verfahren zum Testen des Infektionsvermögens und der Replikation.

[0135] **Vorgehensweise zur rigorosen Bestimmung der HCV-H-Termini.** Die 5'- und 3'-terminalen Sequenzen von HCV-H waren zuvor unbekannt. Frühere Bestrebungen, funktionelle Transkripte zu erzeugen, verwendeten terminale Sequenzen, die für andere HCV-Isolate bestimmt worden waren. Wie obenstehend erwähnt, haben Arbeiten in anderen RNA-Virus-Systemen gezeigt, dass spezifische terminale Sequenzen für die Erzeugung funktioneller, replikationskompetenter RNAs kritisch sein können (Boyer und Haenni (1994), *J. Gen. Virol.* **198**: 415-426). Man nimmt an, dass solche Sequenzen an der Initiation von Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Synthese beteiligt sind. In Anbetracht der Bedeutung dieser Sequenzelemente für andere Viren, wurden in der vorliegenden Erfindung die terminalen HCV-H-Sequenzen rigoroser bestimmt.

[0136] **Struktur der 5'-NTR.** Verfahren, welche zur Amplifizierung und Klonierung der äußersten 5'-Termini von RNAs angewandt wurden, schließen Homopolymer-Tailing oder Ligation von synthetischen Oligonukleotiden an Erststrang-cDNA (5'-RACE), die Cyclus-Behandlung von Erststrang-cDNA, gefolgt von inverser PCR (Zeiner und Gehring (1994), *Bio-Techniques* **17**: 1051-1053), oder die Cyclus-Behandlung von Genom-RNA mit RNA-Ligase (nach Behandlung zur Entfernung der 5'-Cap-Strukturen, falls notwendig), gefolgt von cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation über die 5'-3'-Verknüpfung hinweg (Mandl et al. (1991) *Biotechniques* **10**: 486), ein. 5'-terminale Sequenzen wurden für eine Anzahl von HCV-Isolaten bestimmt, und diese stimmen im allgemeinen miteinander überein. Für HCV-H wurden sowohl die Verfahren der Cyclus-Behandlung/inversen PCR als auch der 5'-RACE angewandt, um eine 5'-terminale Konsensus-Sequenz zu bestimmen.

5'-GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAAATC-3' (Seq.-ID Nr.: 37)

[0137] Diese Sequenz ist in hohem Maße homolog zu denjenigen, die für andere Isolate bestimmt wurden. Mit geringerer Häufigkeit wurden auch Klone mit zusätzlichen 5'-Resten (üblicherweise ein zusätzliches G) gewonnen. Obwohl dies zusätzliche Sequenzen oder Heterogenität am HCV-5'-Terminus widerspiegeln könnte, können diese Klone auf Artefakten beruhen und durch teilweises Kopieren einer 5'-Cap-Struktur oder Hinzufügen von Nicht-Ma-



trizen-vorgegebenen 3'-Basen durch die reverse Transkriptase während der Erststrang-cDNA-Synthese erzeugt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der 5'-Terminus von HCV-Genom-RNA eine 5'-Cap-Struktur oder ein kovalent gebundenes terminales Protein, wie das VPg der Picornaviren, enthält. Für die Pestiviren legen jüngere Untersuchungen nahe, dass Genom-RNAs kein 5'-Cap enthalten dürften (Brock et al. (1992) *J. Virol. Meth.* **38**: 39-46), und dass diese Struktur nicht für das Infektionsvermögen von transkribierter RNA erforderlich ist (R. Donis, R.J. Moorman, persönliche Mitteilungen). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen enthalten weder HCV noch die Pestiviren Motive, die charakteristisch für am Capping oder der Methylierung von CAP-Strukturen beteiligten, Virus-codierten Enzymen sind (Rice (1995)). Es besteht die Möglichkeit eines an den 5'-Terminus der HCV-Genom-RNA kovalent gebundenen Proteins, aber synthetische RNA-Transkripte, entsprechend Viren, welche normalerweise solche 5'-Strukturen enthalten, sind infektiös, was zeigt, dass selbige üblicherweise kein absolutes Erfordernis für die Initiation der Replikation sind.

Beispiel 1

[0138] Struktur der HCV-H 3'-NTR. Die Bestimmung der äußersten 3'-terminalen HCV-Sequenzen stellte eine größere Herausforderung dar. Aufgrund der begrenzten Mengen an HCV-Genom-RNA ist das klassische Verfahren der 3'-Endenmarkierung und der direkten RNA-Sequenzanalyse nicht durchführbar gewesen. Einer der ersten Berichte legte nahe, dass HCV-RNAs 3'-terminale Poly(A)-Trakte (für HCV-1) enthielten. Han et al. (1991) verwendeten markierte Oligo(dT)-Primer für die cDNA-Synthese, gefolgt von PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzanalyse. Dies ist kein akzeptables Verfahren für die 3'-Enden-Bestimmung, da es bereits einen 3'-Poly(A)- oder Polypurin-Trakt voraussetzt und derartige RNAs selektieren wird, selbst wenn sie in geringer Häufigkeit vorhanden wären. In einigen Berichten verwendete man *E. coli*-Poly(A)-Polymerase, um 3'-Homopolymer-Trakte vor der Oligo(dT)-geprimten cDNA-Synthese anzufügen, und fand Beweise für ein 3'-terminales Poly(U) (d.h. Kato et al., 1990), oder man isolierte 3'-Klone mit Poly(U)-Trakten aus statistisch geprimten cDNA-Bibliotheken. Um die 3'-terminale Sequenz tatsächlich zu bestimmen und diesen Widerspruch zu klären [3'-Poly(A) im Gegensatz zu Poly(U)], wurde 5'-RACE angewandt, um die 5'-terminale Sequenz von HCV-Negativ-Strang-RNA zu bestimmen (Chen et al., 1992). Diese Untersuchung sagte einen 3'-terminalen Poly(U)-Trakt für die HCV-Genom-RNA voraus. Anschließend haben andere Gruppen nicht versucht, die tatsächlichen 3'-Termini zu bestimmen, sondern vermuteten vielmehr einen 3'-Poly(U)-Trakt und verwendeten Oligo(dA) zum Priming von cDNA-Synthese oder isolierten 3'-Klone mit Poly(U)-Trakten aus statistisch geprimten cDNA-Bibliotheken. In Abhängigkeit von der tatsächlichen 3'-Struktur weisen alle diese Vorgehensweisen potentielle Probleme auf (einige sind nachstehend

erörtert), und eine kritische Lektüre der Literatur macht deutlich, dass das 3'-Ende der Genom-RNA bis jetzt schlecht und bestenfalls unsicher charakterisiert worden ist. Deshalb wurden alternative Vorgehensweisen zur Bestimmung der terminalen Sequenz von HCV-H verfolgt.

5 [0139] Eine solche Vorgehensweise, obenstehend erwähnt für die 5'-Endenbestimmung, besteht darin, die RNA unter Verwendung von T4-RNA-Ligase, gefolgt von cDNA-Synthese und Amplifikation unter Verwendung eines Negativ-Sinn-Primers, komplementär zu einer Sequenz im 5'-NTR, und eines Positiv-Sinn-Primers nahe zum 3'-Ende, zu cyclen (Mandl et al., 10 1991). Idealerweise sollten die Klonierung und Sequenzanalyse solcher Produkte Informationen über die 5'- und 3'-terminalen Sequenzen, welche im gleichen RNA-Molekül vorhanden sind, liefern. Da der 5'-Terminus mittels anderer Verfahren ziemlich gut definiert worden ist, sollten diese Daten im Falle von HCV die Bestimmung des 3'-Terminus gestatten. Trotz wiederholter Versuche ist mit diesem Verfahren unglücklicherweise die Bestimmung von terminalen HCV-H-Sequenzen fehlgeschlagen (selbst bei Verwendung von RNA, die aus 15 einem hochspezifischen infektiösen Plasma erhalten wurde). Potentielle Probleme beinhalten (i) einen blockierten 5'-Terminus, (ii) Fehlen einer 3'-OH-Gruppe oder einen schlechten Akzeptor für die RNA-Ligase (wie einen U-Rest; Moore und Sharp, 1992), (iii) Ribonuklease-Aktivität während der RNA-Präparation oder RNA-Ligation (siehe nachstehend) oder (iv) terminale RNA-Strukturen, welche eine 5'-3'-Ligation sterisch verhindern. In jedem Fall haben neuere Arbeiten gezeigt, dass dieses Verfahren unzuverlässig ist, selbst bei Einsatz 20 großer Mengen gereinigter, anfänglich intakter TBE-Genom-RNA. Wahrscheinliche Probleme beinhalten eine RNase-Kontamination in den meisten handelsüblichen Präparationen von saurer Pyrophosphatase aus Tabak und T4-RNA-Ligase (A.A. Kolykhalov, unveröffentlichte Daten) und eine wahrscheinliche Überempfindlichkeit des Poly(U)/Polypyrimidin-Traktes gegenüber der Wirkung von RNasen. In jedem Fall wurde Poly(A) inkorrekt als die terminale 25 Sequenz von TBE-Genom-RNA ausgewiesen, wohingegen spätere Experimente zeigten, dass solche Poly(A)-Trakte intern lagen und ihnen zusätzliche Sequenzen folgten, einschließlich einer 3'-terminalen Haarnadel-Struktur (C. Mandl, persönliche Mitteilung). Interessanterweise wird die korrekte 3'-Struktur, aber nicht der Poly(A)-Trakt für die Infektiosität der 30 transkribierten TBE-RNA erfordert (C. Mandl, persönliche Mitteilung).

[0140] Zwei weitere Verfahren wurden in Erwägung gezogen. Zur Bestimmung des YF-3'-Terminus war *E.coli*-Poly(A)-Polymerase verwendet worden, um 3'-terminales Poly(A) anzufügen, gefolgt von Oligo(dT)-Priming und einer selektiven Klonierungsstrategie. Der YF-3'- 35 Terminus war unter großen Schwierigkeiten kloniert worden, und lag festgestelltermaßen als eine hochstabile Haarnadel-Struktur vor (Hahn et al., 1987; Rice et al., 1985). Allerdings wurde diese Vorgehensweise nicht in Betracht gezogen, da die Hinzufügung von 3'-Poly(A)



ein Selbst-Priming am HCV-Poly(U)-Trakt und die anschließende Eliminierung potentieller, dazwischenliegender Sequenzen während der Zweitstrang-cDNA-Synthese und Klonierung zulassen würde. Vielmehr wurde ein alternatives 3'-RACE-Verfahren angewandt, in welchem ein synthetisches Oligodesoxynukleotid, vorhanden in hohen Konzentrationen, an das 3'-Ende der RNA ligiert wurde, um als eine spezifische Primingstelle für die cDNA-Synthese zu dienen (Figur 1). Die Ligationsbedingungen wurden optimiert durch Testen der Fähigkeit von T4-RNA-Ligase, 5'-endmarkierte Oligonukleotide an eine synthetische Akzeptor-RNA zu ligieren (Brennan et al. (1983) *Meth. Enz.* **100**:38-52). Kritische Parameter beinhalteten die Charge der RNA-Ligase (viele waren stark mit RNase kontaminiert), die Konzentration an DMSO (20-30 %) und das zur Ligation verwendete jeweilige Oligonukleotid (A. A. Kolykhalov, unveröffentlicht). Für die 3'-Analyse von HCV-H wurden 10^4 Moleküle von RNA aus H77-Plasma von hohem Titer gereinigt, an das synthetische Oligonukleotid ligiert, und diese modifizierte RNA wurde für RT/PCR verwendet (Figur 1). Ein Primer für die cDNA-Synthese und die PCR-Amplifikation (Oligo B - Seq.-ID Nr.: 6 und 7) war komplementär zu demjenigen, der für die Ligation an die RNA verwendet wurde (Oligo A - Seq.-ID Nr.: 5); ein zweiter Positiv-Sinn-Primer entsprach einer Sequenz nahe zum 3'-Ende des HCV-ORF (Oligo C - Seq.-ID Nr.: 8).

[0141] Nach 40 Zyklen der PCR-Amplifikation wurde ein Schmier von amplifizierten Produkten, wie aufgelöst mittels Agarosegelelektrophorese, erhalten. Diese DNA wurde entweder zusätzlichen PCR-Analysen unterzogen oder direkt für Sequenzbestimmungen kloniert. Die Gegenwart von vorhergesagten internen HCV-Sequenzen und Homopolymer-Trakten wurde unter Verwendung eines geschachtelten Positiv-Sinn-Primers und von entweder Oligo(dA) oder Oligo(dT) getestet. Ein Produkt der erwarteten Größe (basierend auf früheren HCV-3'-NTR-Sequenzen) wurde unter Verwendung des Oligo(dA)-Primers erhalten; kein Produkt wurde unter Verwendung von Oligo(dT) gefunden. Prototyp-HCV-cDNA-Klone, welche entweder mit Poly(A) oder Poly(T) endeten, dienten als Positiv- und Negativkontrollen für diese Primerpaare und ergaben die erwarteten Ergebnisse. Diese Daten legen in starkem Maße nahe, dass HCV-H nicht Poly(A) enthält, sondern vielmehr, wie für die meisten HCV-Isolate gefunden, einen Poly(U)-Trakt [oder zumindest eine Stelle für das Priming mittels Oligo(dA)] an oder nahe seinem 3'-Terminus enthält. Aus dem klonierten Material [welches keiner weiteren Amplifikation unter Verwendung von Oligo(dA) unterzogen worden war] wurden Sequenzen aus 20 unabhängigen Klonen ermittelt. Im wesentlichen alle diese Klone enthielten (5' nach 3', Positiv-Sinn) (i) die früher bestimmte HCV-H-Sequenz (Inchauspe et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10292-10296), (ii) 40 Basen, homolog zu anderen HCV-Isolaten (Figur 2), (iii) Poly(U)-Trakte von verschiedenen Längen und (iv) die Sequenz des für die RNA-Ligation verwendeten Oligonukleotids. Fünf unabhängige

Klone, abgeleitet aus zwei verschiedenen PCR-Amplifikations-Experimenten, besaßen festgestelltermaßen ungewöhnliche Strukturen. Im Anschluß an variable Längen von Poly(U) und Polypyrimidin-Strecken, welche hauptsächlich aus U mit gelegentlich dazwischenliegenden C-Resten bestanden, enthielten vier dieser Klone eine neue Sequenz von 101 Basen (Seq.-ID Nr.: 1), welche in allen Klonen fast identisch war (zwei Klone unterschieden sich um jeweils 1 Substitution; 1 Klon endete nach lediglich 39 Basen dieser Sequenz) (Figur 3). Diese 101 Basen lange Sequenz, insbesondere die 3'-terminalen 46 Basen bildet der Vorhersage nach (FOLDRNA, GCG-Paket) eine hochstabile Sekundärstruktur, welche an die 3'-Enden von Mitgliedern der Flavivirus-Gattung erinnert (Chambers et al., (1990) *Virology* 177:159-174) (Figur 4). Allerdings hat eine erschöpfende Durchsichtung (BLAST, FASTA) der Datenbanken keinen Eintrag aufgezeigt, der eine signifikante Homologie zu dieser neuen HCV-Sequenz zeigt.

[0142] Mehrere Beweislinien legen nahe, dass diese 101 Basen lange Sequenz kein RT/PCR-Artefakt ist und die 3'-terminale Sequenz der HCV-Genom-RNA repräsentiert.

[0143] Zunächst wurden, wie obenstehend erwähnt, HCV-H-Klone mit ähnlichen aber nicht identischen Strukturen aus zwei unabhängigen Experimenten erhalten (Figur 3). Diese Klone unterschieden sich in der Länge des Poly(U)/Polypyrimidin-Traktes und durch einige wenige Basensubstitutionen innerhalb des 101-Basen-Elementes, aber die Sequenzen um den Grenzpunkt zwischen der neuen Sequenz und dem ligierten Oligonukleotid waren in vier Klonen identisch.

[0144] In einem zweiten Satz von Experimenten wurden Negativ-Sinn-Oligonukleotide entworfen, basierend auf der Sequenz des 101-Basen-Elementes, und für RT/PCR-Amplifikation und Klonierung von HCV-RNA aus entweder HCV-H- oder vier unterschiedlichen klinischen Proben, erhalten von Forschern aus der gesamten Nation, verwendet. Die Proben wurden aus Patienten mit chronischer Hepatitis C erhalten, und alle waren HCV-RNA-positiv und von unterschiedlichen Genotypen (1b, 3 und zwei Proben von Genotyp 4) als früher analysiertes HCV-H(1a). Mehrere unabhängige Klone wurden für jede amplifizierte Probe erhalten und sequenziert (Figur 6). Wie obenstehend beschrieben, enthielten, für HCV-H, alle Klone identische Sequenzen am Ende des ORF und an der 3'-NTR-Sequenz, welche dem Poly(U)/Polypyrimidin-Trakt vorausgeht. Dieser Poly(U)/Polypyrimidin-Trakt wies eine variable Länge auf, und an diesen schloß sich das neue 3'-Element an. Klone aus den anderen Isolaten besaßen ähnliche Strukturen, außer dass genotyp-spezifische Unterschiede im ORF und der 3'-NTR-Sequenz, welche dem Poly(U)/Polypyrimidin-Trakt vorausgeht, beobachtet wurden. Die Sequenz des neuen 3'-Elements war vorhanden und in allen diesen Klonen absolut identisch,

was nahelegt, dass dieses Element sowohl in den Genom-RNAs von unterschiedlichen Genotypen vorhanden als auch hoch-konserviert ist. Dieses Experiment beweist auch, dass diese Struktur kein von T4-RNA-Ligase erzeugter *in vitro*-Artefakt ist.

5 [0145] Diese Analyse zeigte, dass das neue 3'-Element in anderen HCV-Genotypen vorhanden war, definierte jedoch nicht das tatsächliche 3'-Ende dieser Genom-RNAs. Unter Anwendung eines ähnlichen RNA-Ligations-Vorgehens (Figur 7) wurden die 3'-terminalen Sequenzen dieser verschiedenen HCV-Genotypen bestimmt. Die gleiche neue 3'-terminale Sequenz (mit einer oder zwei Isolat-spezifischen Substitutionen) wurde an exakt dem gleichen Grenzpunkt
10 an die Sequenz des für die T4-RNA-Ligation verwendeten Oligonukleotids gebunden festgestellt (Figur 8).

[0146] Ein viertes Experiment liefert noch mehr Beweise, dass die neue 3'-Sequenz den 3'-Terminus von HCV-Genom-RNA repräsentiert. Man könnte einwenden, dass Klone mit der
15 neuen Struktur durch internes Priming innerhalb des 3'-NTR erhalten werden könnten, wenn zufällig der 3'-Abschnitt des für die cDNA-Synthese (und die PCR-Amplifikation) verwendeten synthetischen Primers komplementär zu einer Sequenz innerhalb des HCV-3'-NTRs wäre. Um diese Einwand zu entkräften, wurde die Analyse unter Verwendung von Serum aus einem anderen Patienten (WD) und eines unterschiedlichen Oligonukleotids ("Oligo G"; Seq.-
20 ID Nr.: 37) im RNA-Ligationsschritt wiederholt, dessen Sequenz nicht homolog zu dem Oligonukleotid war, das in den anfänglichen Experimenten verwendet wurde. Das Komplement dieses Oligonukleotids ("Oligo H"; Seq.-ID Nr.: 38) wurde zusammen mit "Oligo F" (Seq.-ID Nr.: 32) für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation verwendet, und die Produkte wurden kloniert und sequenziert. Die gleiche neue 3'-terminale Sequenz wurde
25 an exakt dem gleichen Grenzpunkt an die Sequenz des alternativen synthetischen Oligonukleotids gebunden festgestellt.

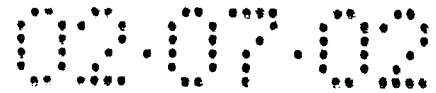
[0147] Diese neue 3'-NTR-Struktur scheint unter HCV-Isolaten hoch konserviert zu sein und ist wahrscheinlich ein essentielles RNA-Element, erforderlich für die Virus-Replikation und
30 das erfolgreiche Gewinnen infektiöser HCV-RNA aus cDNA.

[0148] Basierend auf diesen Daten ist das derzeitige Bild der Genomstruktur von HCV-H diagrammartig in der Figur 10 dargestellt. Die Genom-RNA beginnt wahrscheinlich mit einem G-Rest und enthält eine 5'-NTR von 341 Basen. Der ORF besteht aus 9033 Basen,
35 welche für ein Polyprotein von 3011 Aminosäureresten codieren. Im Anschluß an das Opal(UGA)-Stopcodon ist eine Sequenz von 40 Basen, Poly(U)-Trakt, eine Polypyrimidin-Strecke und ein hoch-konserviertes RNA-Element von etwa 100 Basen vorhanden. Manche

Positiv-Strang-RNA-Viren (Poliovirus, Sindbis-Virus) enthalten 3'-terminales Poly(A), aber viele andere enden mit konservierten RNA-Sequenzen, welche häufig zu stabilen Sekundärstrukturen gefaltet werden können (Bromoviren, Flaviviren). Neben TBE-Isolaten, enthaltend internes Poly(A), gefolgt von einer 3'-terminalen Sekundärstruktur, gibt es ein weiteres Beispiel eines Virus, das ein 3'-NTR enthält, welches ähnlich dem zu hier für HCV vorgeschlagenen ist. Dieses Virus, bezeichnet als GBV-B, ist eines der neu klonierten und sequenzierten GB-Hepatitis-Agenzien (Simons et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3401-5). Diese zwei Isolate (GBV-A und GBV-B) scheinen, zusammen mit HGV (ein von Genelabs kloniertes Agenz) am nächsten mit HCV verwandt zu sein. Alle scheinen Positiv-Genom-RNAs von ~9-10 kb und einen einzelnen langen ORF aufzuweisen, der Proteine mit signifikanter Homologie zu denjenigen von HCV codiert. Im Falle von GBV-B besteht die 3'-NTR aus 27 Basen, einem Poly(U)-Trakt und einer zusätzlichen Sequenz von 49 Basen (Simons et al., 1995). Mit Ausnahme des Poly(U)-Trakts zeigt diese Sequenz keine signifikante Homologie mit dem HCV-H-3'-NTR (A.A. Kolykhalov, unveröffentlicht).

Diskussion

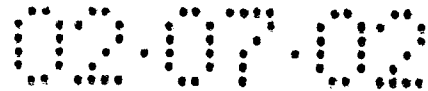
[0149] Die vorliegende Erfindung sieht Sequenzdaten vor, welche zeigen, dass die Genom-RNA von HCV-H (ein Isolat vom Typ 1a) nicht mit einem Homopolymertrakt, wie man zuvor annahm, sondern vielmehr mit einer neuen Sequenz von 101 Basen zu enden scheint. Darüber hinaus legen Ergebnisse nahe, dass diese 3'-NTR-Struktur und das mutmaßliche 3'-terminale Element Merkmale sein können, die weiteren HCV-Genotypen gemeinsam sind. Zusätzlich zur möglichen Bedeutung des 3'-NTR für die HCV-Replikation und die Gewinnung von authentischem HCV aus cDNA, besitzt die offensichtliche Konservierung des konservierten 3'-Elements bedeutende Anwendungen für HCV-Diagnose und -Therapie. Die Bestimmung von HCV-RNA-Spiegeln in Patientenplasma und -gewebe ist nicht nur für die Diagnose einer HCV-Infektion in Abwesenheit einer Antikörperantwort bedeutsam, sondern auch für das Verfolgen der Wirksamkeit von therapeutischen Dosierungsschemen (Bresters et al. (1994) *J. Med. Virol.* 43:262-8; Cha et al. (1991) *J. Clin. Microbiol.* 29:2528-34; Chazouilleres et al. (1994) *Gastroenterology* 106:994-9; Davis et al. (1994) *Hepatology* 19:1337-41; Feray et al. (1994) *Hepatology* 20:1137-43; Gordon et al. (1994) *Am. J. Gastroenterol.* 89: 1458-61; Simmonds et al. (1994) *J. Gen. Virol.* 75:1053-1061; Wright et al. (1994) *Hepatology* 20:773-9). Derzeitige Verfahren, wie quantitative RT/PCR oder verzweigte DNA, beruhen auf konservierten RNA-Zielen im HCV-Genom, welche entweder gattungs-, typ- oder subtyp-spezifisch sein können. Der Nachweis dieser neuen, konservierten Sequenz kann eine nützliche Alternative für die Diagnose einer HCV-Infektion sein. In Hinsicht auf die Therapie ist von hoch-konservierten Elementen in RNA-Genomen, in den meisten Fällen, gezeigt worden, für



eine effiziente Virus-Replikation essentiell zu sein. Solche Elemente wirken über Wechselwirkung mit viralen und/oder Wirts-Faktoren, bei der Translation der eintretenden viralen RNA, als Promotoren für Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Synthese und als Signale für die selektive Verpackung viraler RNAs. Ein konserviertes 3'-Element im HCV-Genom, das wahrscheinlich bedeutsam für einen oder mehrere dieser Vorgänge ist, präsentiert ein attraktives therapeutisches Ziel. Die Identifizierung von Verbindungen, welche die Wechselwirkung dieses Elements mit seinen entsprechenden Wirts- oder Viren-Faktoren blockieren, oder Gentherapie-Vorgehensweisen unter Verwendung dieses Elements als einem RNA-Köder (Sullenger et al. (1990) *Cell* 63:601-608) in transplantierten Hepatozyten, können sich bei der Auslöschung oder Bekämpfung chronischer HCV-Infektionen als nützlich erweisen.

[0150] Die vorliegende Erfindung zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem neuen Sequenzelement und der HCV-Infektion bestehen kann. Das neue 3'-Sequenzelement kann verwendet werden für: (i) Konstruieren von Vollängen-HCV-H-cDNA-Klonen, fähig zur Erbringung von infektiöser RNA und Virus (Impfstoff-Entwicklung, Bewertung von therapeutischen Verbindungen); (ii) Entwerfen funktioneller HCV-RNA-Replikons für HCV-Replikations-Untersuchungen und therapeutische Bewertung; (iii) Bestimmung von 3'-NTR-Sequenzen für weitere HCV-Genotypen und phylogenetische Analyse zur Definierung von Bereichen der Konservierung und Divergenz (Nukleinsäure-basierende Diagnostik zum HCV-Nachweis); (iv) Verbesserung von Verfahren zur Bestimmung der HCV-3'-NTR-Sequenzen und Untersuchung möglicher Korrelationen zwischen HCV-3'-NTR-Merkmalen und klinischen Parametern (Schwere einer Erkrankung, Antwort auf IFN, Immunstatus) oder Gewebe-Tropismus (prädiktive Diagnostik); (v) Bestimmung der 3'-NTR-Sekundärstruktur unter Anwendung von chemischer Modifikation und RNase-Kartierung, und Bestimmung der 3D-Struktur durch NMR; (vi) Struktur/Funktions-Untersuchungen an der 3'-NTR unter Verwendung des infektiösen Klons (Therapie, Impfstoffentwicklung); (vii) Definition von Wirts- oder Viren-Faktoren, welche mit der Sequenz interagieren (Therapie); (viii) Aufstellen von Screening-Tests zur Identifizierung von Verbindungen, welche die Wechselwirkung des Elements mit seinen entsprechenden Wirts- und/oder Viren-Faktoren inhibieren, und zum Testen der identifizierten Verbindungen hinsichtlich ihrer Effekte auf die HCV-Replikation (Therapie); (ix) Testen des konservierten 3'-NTR-Sequenzelements als trans-dominanten Inhibitor der HCV-Replikation (Gentherapie).

[0151] Es folgt eine Aufzählung von Druckschriften, welche die obenstehende Offenbarung und insbesondere die experimentellen Vorgehensweisen und die Diskussionen betreffen. Die Druckschriften sind numeriert, um mit der gleichen Nummer angegebenen Druckschriften, die hier obenstehend erscheinen können, zu entsprechen.



1. Alter, H. J. et al. (1978). *Lancet* 1:459-463.
2. Alter, M. J. et al. (1990). *J. Am. Med. Assoc.* 264:2231-2235.
3. Alter, M. J. et al. (1992). *N. Eng. J. Med.* 327:1899-1905.
4. Bertolini, L. et al. (1993). *Res. Virol.* 144:281-285.
5. Blight, K. et al. (1993). *Amer. J. Path.* 143:1568-1573.
6. Blight, K. et al. (1992). *Liver* 12:286-289.
7. Bouffard, P. et al. (1992). *J. Inf. Dis.* 166:1276-1280.
8. Boyer, J.-C. et al. (1994). *J. Gen. Virol.* 198:415-426.
9. Bradley, D. et al. (1991). *J. Med. Virol.* 34:206-208.
10. Bradley, D. W. (1990). *Prog. Med. Virol.* 37:101-135.
11. Bradley, D. W. et al. (1983). *J. Infect. Dis.* 148:254-265.
12. Bradley, D. W. et al. (1985). *Gastroenterology* 88:773-779.
13. Brennan, C. A. et al. (1983). *Meth. Enz.* 100:38-52.
14. Bresters, D. et al. (1994). *J. Med. Virol.* 43:262-8.
15. Brock, K. V. et al. (1992). *J. Virol. Meth.* 38:39-46.
16. Brown, E. A. et al. (1992). *Acids Res.* 20:5041-5045.
17. Bukh, J. et al. (1995). *Sem. Liver Dis.* 15:41-63.
18. Bukh, J. et al. (1992). *Natl. Acad. Sci. USA* 89:4942-4946.
19. Carloni, G. et al. (1993). *Arch. Virol. Suppl.* 8:31-39.
20. Carrick, R. J. et al. (1992). *J. Virol. Meth.* 39:279-289.
21. Cha, T. A. et al. (1991). *J. Clin. Microbiol.* 29:2528-34.
22. Chambers, T. J. et al. (1990). *Virology* 177:159-174.
23. Chazouilleres, O. et al. (1994). *Gastroenterology* 106:994-9.
24. Chen, P. J. et al. (1992). *Virology* 188:102-113.
25. Choo, Q. L. et al. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1294-1298.
26. Choo, Q. L. et al. (1989). *Science* 244:359-362.

27. Davis, G. L. et al. (1989). *N. Engl. J. Med.* 321:1501-1506.
28. Davis, G. L. et al. (1994). *Hepatology* 19:1337-41.
29. DiBisceglie, A. M. et al. (1989). *New Engl. J. Med.* 321:1506-1510.
30. Dubuisson, J. et al. (1994). *J. Virol.* 68:6147-6160.
31. Enomoto, N. et al. (1993). *J. Hepatol.* 17:415-416.
32. Farci, P. et al. (1992). *Science* 258:135-140.
33. Feinstone, S. M. et al. (1983). *Infect. Immun.* 41:816-821.
34. Feray, C. et al. (1994). *Hepatology* 20:1137-43.
35. Ferri, C. et al. (1993). *Invest.* 23:399-405.
36. Fong, T. L. et al. (1991). *J. Clin. Invest.* 88:1058-1060.
37. Francki, R. I. B. et al. (1991). *Arch. Virol. Suppl.* 2:223.
38. Fukushi, S. et al. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199:425-432.
39. Gil, B. et al. (1993). *Hepatology* 18:1050-1054.
40. Gordon, S. C. et al. (1994). *Am. J. Gastroenterol.* 89:1458-61.
41. Greiser-Wilke, I. et al. (1991). *J. Gen. Virol.* 72:2015-2019.
42. Gunji, T. et al. (1994). *Arch. Virol.* 134:293-302.
43. Hahn, C. S. et al. (1987). *J. Mol. Biol.* 198:33-41.
44. Han, J. H. et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1711-1715.
45. Haruna, Y. et al. (1993). *J. Hepatol.* 18:96-100.
46. He, L. F. et al. (1987). *J. Infect. Dis.* 156:636-640.
47. Hibbs, R. G. et al. (1993). *J. Inf. Dis.* 168:789-790.
48. Higashi, Y. et al. (1993). *Virology* 197:659-668.
49. Hijikata, M. et al. (1991). *Biophys. Res. Comm.* 175:220-228.
50. Hijikata, M. et al. (1993). *J. Virol.* 67:1953-1958.
51. Hiramatsu, N. et al. (1992). *Hepatology* 16:306-311.
52. Hollinger, F. B. et al. (1978). *Intervirology* 10: 60-68.
53. Houghton, M. et al. (1994). *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* 61:1-11.
54. Iacovacci, S. et al. (1993). *Res. Virol.* 144:275-279.
55. Inchauspe, G. et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10292-10296.
56. Kagawa, T. et al. (1993). *Lancet* 341:316-317.
57. Kanto, T. et al. (1994). *Hepatology* 19:296-302.
58. Kato, N. et al. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206:883-9.
59. Kato, N. et al. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189:119-127.

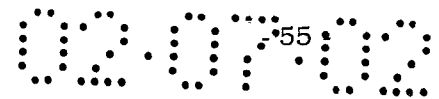
60. Kato, N. et al. (1993). *J. Virol.* 67:3923-3930.
61. Kato, N. et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9524-9528.
62. Kolykhalov, A. A. et al. (1996). in Arbeit
63. Krawczynski, K. et al. (1992). *Gastroenterology* 103:622-629.
64. Kurosaki, M. et al. (1993). *Hepatology* 18:1293-1299.
65. Lamas, E. et al. (1992). *J. Hepatol.* 16:219-223.
66. Lanford, R. E. et al. (1994). *Virology* 202:606-614.
67. Lesniewski, R. R. et al. (1993). *J. Med. Virol.* 40:150-156.
68. Lin, C. et al. (1994). *J. Virol.* 68:5063-5073.
69. Mandl, C. W. et al. (1991). *Biotechniques* 10:486.
70. Maran, A. et al. (1994). *Science* 265:789-792.
71. Martell, M. et al. (1992). *J. Virol.* 66:3225-3229.
72. Martell, M. et al. (1994). *J. Virol.* 68:3425-3436.
73. Mast, E. E. et al. (1993). *Semin. Virol.* 4:273-283.
74. Miyamoto, H. et al. (1992). *J. Gen. Virol.* 73:715-718.
75. Mizushima, H. et al. (1994). *J. Virol.* 68:6215-6222.
76. Moldvay, J. et al. (1994). *Blood* 83:269-273.
77. Moore, M. J. et al. (1992). *Science* 256:992-997.
78. Muller, H. M. et al. (1993). *J. Gen. Virol.* 74:669-676.
79. Negro, F. et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2247-2251.
80. Nouri Aria, K. T. et al. (1993). *J. Clin. Inves.* 91:2226-2234.
81. Nuovo, G. J. et al. (1993). *J. Surg. Path.* 17:683-690.
82. Ogata, N. et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3392-3396.
83. Okamoto, H. et al. (1992). *Virology* 190:894-899.
84. Okamoto, H. et al. (1994). *J. Gen. Virol.* 75:629-635.
85. Okamoto, H. et al. (1991). *J. Gen. Virol.* 72:2697-2704.
86. Prince, A. et al. (1992). *J. Infect. Dis.* 165:438-443.
87. Ralston, R. et al. (1993). *J. Virol.* 67:6753-6761.
88. Rice, C. M. et al. (1995). *Curr. Opin. Immunol.* In press.
89. Rice, C. M. (1995). In "Fields Virology" (B.N. Fields, D.M. Knipe und P.M. Howley, Hrsg.), Dritte Ausgabe, pp. 931-959, Raven Press, New York.
90. Rice, C. M. et al. (1985). *Science* 229:726-733.
91. Sakamoto, M. et al. (1994). *J. Gen. Virol.* 75:1761-1768.

92. Sato, K. et al. (1993). *Virology* 196:354-357.
93. Selby, M. J. et al. (1994). *Virology* 204:114-122.
94. Sherker, A. H. et al. (1993). *J. Med. Virol.* 39:91-96.
95. Shimizu, Y. et al. (1994a). Hepatitis C virus: Detection by electron microscopy of intracellular virus particles., eingereicht
96. Shimizu, Y. K. et al. (1994b). *J. Virol.* 68:1494-1500.
97. Shimizu, Y. K. et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5477-5481.
98. Shimizu, Y. K. et al. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6037-6041.
99. Shimizu, Y. K. et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6441-6444.
100. Simmonds, P. et al. (1994). *Virol.* 75:1053-1061.
101. Simons, J. N. et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3401-3405.
102. Spaete, R. R. et al. (1992). *Virology* 188:819-830.
103. Sullenger, B. A. et al. (1990). *Cell* 63:601-608.
104. Suzich, J. A. et al. (1993). *J. Virol.* 67:6152-6158.
105. Tabor, E. et al. (1978). *Lancet* 1:463-466.
106. Takahashi, K. et al. (1992). *Virology* 191:431-434.
107. Takehara, T. et al. (1992). *Hepatology* 15:387-390.
108. Tanaka, Y. et al. (1993). *Liver* 13:203-208.
109. Taniguchi, S. et al. (1993). *Virology* 195:297-301.
110. Thomssen, R. et al. (1992). *Med. Microbiol. Immunol.* 181 293-300.
111. Thomssen, R. et al. (1993). *Med. Microbiol. Immunol.* 182:329-334.
112. Tokita, H. et al. (1994). *J. Gen. Virol.* 75:931-936.
113. Tsukiyama-Kohara, K. et al. (1992). *J. Virol.* 66:1476-1483.
114. Wang, C. et al. (1993). *J. Virol.* 67:3338-3344.
115. Wang, J. T. et al. (1992). *J. Inf. Dis.* 166:1167-1169.
116. Weiner, A. J. et al. (1991). *Virology* 180:842-848.
117. Weiner, A. J. et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3468-3472.
118. Wright, T. L. et al. (1994). *Hepatology* 20:773-779.
119. Yamada, G. et al. (1993). *Digest Dis. Sci.* 38:882-887.
120. Yoo, B. J. et al. (1995). *J. Virol.* 69:32-38.
121. Yoo, B. J. et al. (1992). *Virology* 191:889-899.
122. Young, K. C. et al. (1993). *J. Med. Virol.* 41:55-60.
123. Yuasa, T. et al. (1991). *J. Gen. Virol.* 72:2021-2024.

124. Yun, Z. B. et al. (1993). *J. Med. Virol.* 39:57-61.
125. Zeiner, M. et al. (1994). *BioTechniques* 17:1051-1053.
126. Zibert, A. et al. (1995). *Virology* 208:653-661.
127. Zignego, A. L. et al. (1992). *J. Hepatol.* 15:382-386.

PATENTANSPRÜCHE

1. Isolierte Nucleinsäure, die eine Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden umfasst, wobei die Sequenz zumindest 90%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist.
2. Isolierte Nucleinsäure nach Anspruch 1, worin die Sequenz zumindest 95%ige Sequenzidentität aufweist.
3. Isolierte Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, worin die Sequenz zumindest 25 Nucleotide lang ist.
4. Isolierte Nucleinsäure, die zumindest 75%ige Sequenzidentität mit einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist.
5. Oligonucleotidprimer, die zumindest 15 Nucleotide einer der Sequenzen Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon umfasst.
6. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach einem der vorangegangenen Ansprüche, umfassend eine rekombinante DNA oder RNA mit einer HCV-Sequenz, die eine Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst.
7. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6, worin das HCV eine Sequenz aufweist, die im Wesentlichen homolog mit jener von HCV-1, HC-J1, HC-J, HCV-BK,



HCV-H, HC-J6, HC-J8, HC-J483, HC-J491, HC-C2, HCV-JK, HCV-N, HCV-T, HCV-JT, HC-G9, HCV-K3a, NLZ1 oder HCV-Tr ist.

8. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6 oder 7, worin das HCV replikationskompetent ist.

9. Nucleinsäure nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die mit einer Expressionskontrollsequenz operabel verbunden ist.

10. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die eine DNA ist.

11. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 10 transformiert oder transfiziert ist.

12. Wirtszelle nach Anspruch 11, die eine Säugetier-Wirtszelle ist.

13. Wirtszelle nach Anspruch 12, die eine menschliche Zelle ist.

14. Wirtszelle nach Anspruch 13, ein Hepatocyt ist.

15. Attenuiertes Virus, das eine Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in Kombination mit einer Sequenz umfasst, die im Wesentlichen homolog mit jener von HCV-1, HC-J1, HC-J, HCV-BK, HCV-H, HC-J6, HC-J8, HC-J483, HC-J491, HC-C2, HCV-JK, HCV-N, HCV-T, HCV-JT, HC-G9, HCV-K3a, NLZ1 oder HCV-Tr ist.

16. Antisense-Nucleinsäure gegen eine virale Genom-RNA oder ihr Komplement oder rekombinantes DNA- oder RNA-Molekül, das bei der Transkription die Antisense-Nucleinsäure produziert, worin die Antisense-Nucleinsäure eine Nucleinsäure umfasst, die vollständig komplementär zur 3'-terminalen Sequenz von HCV ist, wobei die 3'-ter-

minale Sequenz von HCV eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst.

17. Verfahren zum Nachweis der Gegenwart des 3'NTR von Hepatitis C-Virus (HCV) in einer Probe, umfassend:

(a) das Kontaktieren der Probe mit zumindest einem Oligonucleotid, das eine Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden umfasst, wobei die Sequenz zumindest 75%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist;

(b) das Schaffen von Bedingungen, die für die Hybridisierung des Oligonucleotids an den 3'NTR eines HCV geeignet sind; und

(c) den Nachweis, ob Hybridisierung des Oligonucleotids erfolgt ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, worin der Nachweis den Einsatz von PCR umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, worin der Nachweis die Verwendung eines markierten Oligonucleotids umfasst, das eine Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden umfasst, wobei die Sequenz zumindest 75%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 oder einer von Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 oder Komplementen davon aufweist.

20. Verfahren nach Anspruch 17 bis 19, worin der Nachweis die Verwendung einer Nucleinsäure oder eines Primers nach einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin das Oligonucleotid oder die Nucleinsäure oder der Primer mit einem radioaktiven Element, einem Enzym oder einem Fluorophor markiert ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, worin das markierte Oligonucleotid durch kolorimetrische, spektralphotometrische, fluorospektralphotometrische, amperometrische oder gasometrische Verfahren detektiert wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 22, worin der Nachweisschritt weiters das Quantifizieren der Gegenwart von HCV in der Probe umfasst.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 23, worin das Oligonucleotid zu einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 komplementär ist.
25. Verfahren nach Anspruch 17 bis 23, worin das Oligonucleotid eine Sequenz aufweist wie in Seq.-ID Nr.: 6, Seq.-ID Nr.: 7, Seq.-ID Nr.: 8, Seq.-ID Nr.: 26, Seq.-ID Nr.: 27 oder Seq.-ID Nr.: 32 angegeben.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 25, worin die Probe eine Blutprobe ist.
27. Set zum Nachweis der Gegenwart eines HCV 3'NTR in einer Probe, wobei das Set ein Oligonucleotid, das eine Nucleinsäure wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert ist, in einem Behälter verpackt umfasst.
28. Set nach Anspruch 27, das zum Quantifizieren der Gegenwart des 3'NTR geeignet ist.
29. Set nach Anspruch 27 oder 28, worin das Oligonucleotid zu einer von Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3 oder Seq.-ID Nr.: 4 komplementär ist oder eine Sequenz wie in Seq.-ID Nr.: 6, Seq.-ID Nr.: 7, Seq.-ID Nr.: 8, Seq.-ID Nr.: 29, Seq.-ID Nr.: 27 oder Seq.-ID Nr.: 32 angegeben aufweist.

30. Set nach einem der Ansprüche 27 bis 29, worin das Oligonucleotid mit einem radioaktiven Element, einem Enzym oder einem Fluorophor markiert ist.

31. Set nach Anspruch 30, worin das markierte Oligonucleotid durch kolorimetrische, spektralphotometrische, fluorospektralphotometrische, amperometrische oder gasometrische Verfahren nachgewiesen werden kann.

32. Testsystem zum Screenen von Arzneimitteln und anderen Mitteln auf die Fähigkeit zur Modulation der Replikation eines Virus, das eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 6 bis 10 umfasst, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

das Kultivieren des Virus in Gegenwart eines Arzneimittels oder anderen Mittels;
und

das Bestimmen der Wirkung des Arzneimittels oder anderen Mittels auf die virale Replikation durch Messen der Replikation des Virus anhand der Bestimmung einer Sequenz aus zumindest 15 Nucleotiden, wobei die Sequenz zumindest 90%ige Sequenzidentität mit dem komplementären Abschnitt einer der enthaltenen Seq.-ID Nr.: 1, Seq.-ID Nr.: 2, Seq.-ID Nr.: 3, Seq.-ID Nr.: 4, Seq.-ID Nr.: 33, Seq.-ID Nr.: 34, Seq.-ID Nr.: 35 oder Seq.-ID Nr.: 36 aufweist; oder

das Bestimmen der Bindung des Arzneimittels oder anderen Mittels an die Sequenz.

33. Oligonucleotid, das eine Sequenz wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert umfasst, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder Diagnose von Hepatitis C-Virus.

34. Therapeutische Zusammensetzung zur Behandlung zellulärer Schwächungen, Störungen oder Funktionsstörungen und/oder anderer Erkrankungszustände bei Säugtieren, die durch ein Virus hervorgerufen werden, das die 3'-terminale Sequenz eines HCV enthält, die eine Sequenz wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert umfasst, wobei die Zusammensetzung ein Material umfasst, das aus der aus dem 3'-terminalen

Element, seinem Komplementär, einem Mittel, das fähig ist, die Produktion und/oder Aktivität des 3'-terminalen Elements zu fördern, einem Mittel, das fähig ist, die Aktivität des 3'-terminalen Elements nachzuahmen, einem Mittel, das fähig ist, die Aktivität des 3'-terminalen Sequenzelements zu hemmen, oder einem spezifischen Bindungspartner dafür bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

FIG. 1

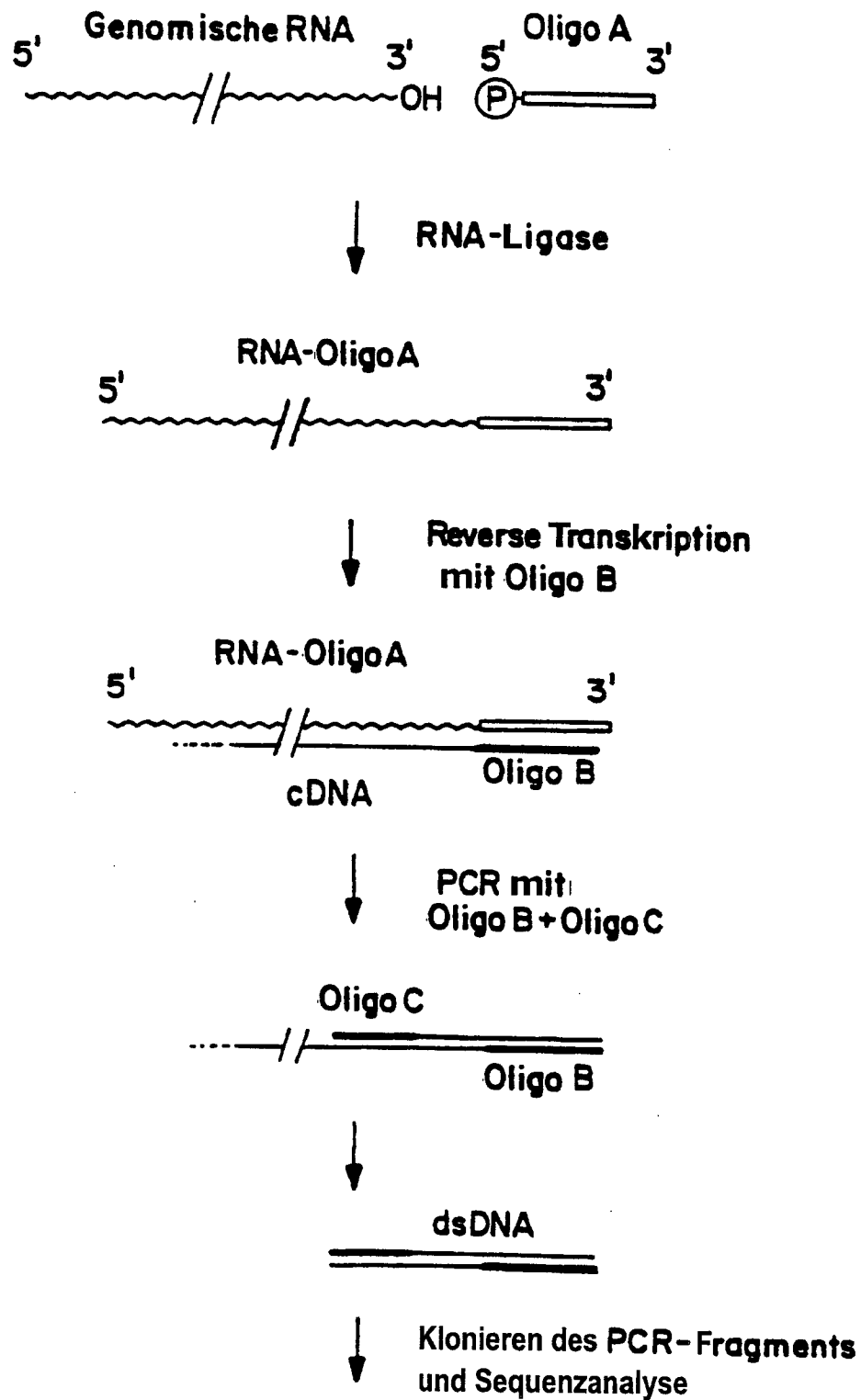


FIG.2

HCV-H (1a)	TGAagattgggctaaccactcc
	::: ::: ::: ::: ::: ::: :::
HCV-1 (1a)	TGAaggttgggtaaacactcc-ggcct (an)
	::: ::: ::: ::: ::: ::: :::
HCV-H-AAK	TGAaggttgggtaaacactcc-ggcctcttaggccatttcctgt (tn)
	: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: :::
HCV-J1 (1a)	TAAaggttgggtaaacactcc-ggcctcttaggccatttcctgtg (tn)
HCV-BK (1b)	TGAacggggagataaacactccaggccaa-tagccatcccc (tn)
HCV-TW (1b)	TGAacggggagctaacactccaggccaa-tagccatccctg (tn)
HCV-N (1b)	TGAacggggagctaacactccag-ccaa-taggccatttccttttg (tn)
HCV-J6 (2a)	TAGagcggcacac-ttagctaacactcca--tagctaacgtgcc (tn)
HCV-J8 (2b)	TAGagcggcaaacctagctaacactcca--tagctagtttccg (tn)
HCV-NZL1 (3a)	TGAgctggttagataaacactcca-----tttcttttttg (tn)
HCV-Tr (3b)	TGAgctggttagttaaacaccca-----accctgtg (tn)

FIG. 3

H77-#1.2 GTGTCTCATGCCCGGCCCGCTGGTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTCAC
 H77-#8 GTGTCTCATGCCCGGCCCGCTGGTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTCGC
 H77-#10 GTGTCTCATGCCCGGCCCGCTGGTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTCGC
 H77-#74 GTGTCTCATGCCCGGCCCGCTGGTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTCGC
 H77-#5 GTGTCTCATGCCCGGCCCGCTGGTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTG

H77-#1.2 TGCAGGGGTAGGTATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAA
 H77-#8 TGCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAA
 H77-#10 TGCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAA
 H77-#74 TGCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAA
 H77-#5 TGCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAA

H77-#1.2 CACTCCGGCCTCTTAGGCCATTCCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT...
 H77-#8 CACTCCGGCCTCTTAGGCCATTCCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 H77-#10 CACTCCGGCCTCTTAGGCCATTCCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 H77-#74 CACTCCGGCCTCTTAGGCCATTCCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 H77-#5 CACTCCGGCCTCTTAGGCCATTCCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

H77-#1.2
 H77-#8 TTTTTTTTTT.....
 H77-#10 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTITTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTCTT
 H77-#74 TTI ITI ITI ITI ITTTTTTTI ITI ITI ITTT.....
 H77-#5 TTTITTTTTTTTTTTTTTTTTTTITTTTTT.....

H77-#1.2CTTTCCTTCTTTTTT..CCTTTCTTTTCTTTC
 H77-#8CTTTCCTTCTTTTTT..CCTTTTCTTTCTTTC
 H77-#10 TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCCTTCTTTTTT..CCTTTCTTTTCTTTC
 H77-#74CTTTCCTTCTTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTC
 H77-#5CTTTCCTTCTTTTTTCC.CTTTTCTTTTC.TTC

H77-#1.2 CTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAA
 H77-#8 CTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAA
 H77-#10 CTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAA
 H77-#74 CTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAA
 H77-#5 CTTCTTTAATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGT

H77-#1.2 GGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCA
 H77-#8 GGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCA
 H77-#10 GGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCA
 H77-#74 GGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCA
 H77-#5 GGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCT

H77-#1.2 GATCATGT
 H77-#8 GATCATGT
 H77-#10 GATCATGT
 H77-#74 GATCATGT
 H77-#5 GATCATGT

FIG.5

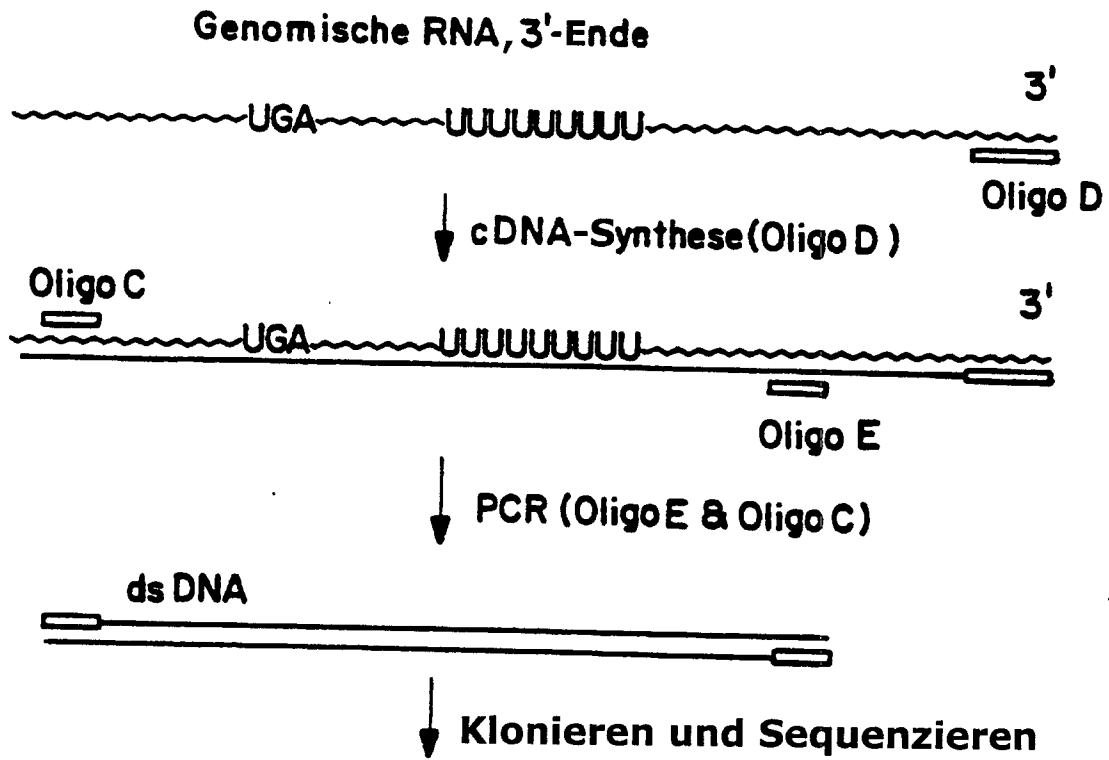


FIG. 6

```

1
1b CTGTCTCGTG CCCGACCCCG CTGGTTCATG TTGTGCCTAC TCCTACTTTC 50
3 GTGTCACGTG CCCGAACCCG CTATTTGCTG CTTTGCCTAC TCCTACTAAC
4? GTGTCCCATG CCCGACCCCG CTATCTACTC CTGTGCCTAC TCCTACTTTC
4a ATGTCTCATG CCCGACCCCG CTATTTACTC CTGTGCCTAC TCCTACTTAC

51
1b CGTAGGGGTA GGCATCTACC TGCTCCCCAA CCGATGAA.. CGGGGAGCTA 100
3 GGTAGGGGTA GGCATCTTTC TCCTGCCAGC GCGATGAGCT GGTAGG.ATA
4? CGTAGGGGTA GGCATCTTCC TGCTGCCTGC TCGATAGGCA GCT.....TA
4a AGTAGGGGTA GGCATCTTCC TGCTGCCTGC TCGGTAGGCA GCT.....TA

101
1b ACACTCCAGG CCAATAGG.C AT..CCTGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 150
3 ACACT..... CC ATTTCTTTTT TTGTTTTTTT TTTTTTTTTT
4? ACACTCCGAC CT..TAGGGT CCTTC.TGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
4a ACACTCCGAC CT..TAGGGT CCCCT.TGTT TTTTTTTTTT .....

151
1b TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TT..... 200
3 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
4? TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
4a .....

201
1b ..... CTTTTCTTT 250
3 ...CTTTTTT TTTCCCTTCT TTTCTGACTT CTAATT..TT CCTTCTT..A
4? TTTTTTCCTT ACCCTTTCCT TCTTTTCTTC CTTTTTTTTT CTTACTTT..
4a .....C TTTCCCTTCTT T...CCTTTC CTAAT.CTTT CTTTCTT...

251
1b GGTGGCTCCA TCTTAGCCCT AGTCACGGCT A
3 GGTGGCTCCA TCTTAGCCCT AGTCACGGCT A
4? GGTGGCTCCA TCTTAGCCCT AGTCACGGCT A
4a GGTGGCTCCA TCTTAGCCCT AGTCACGGCT A
    
```

FIG. 7

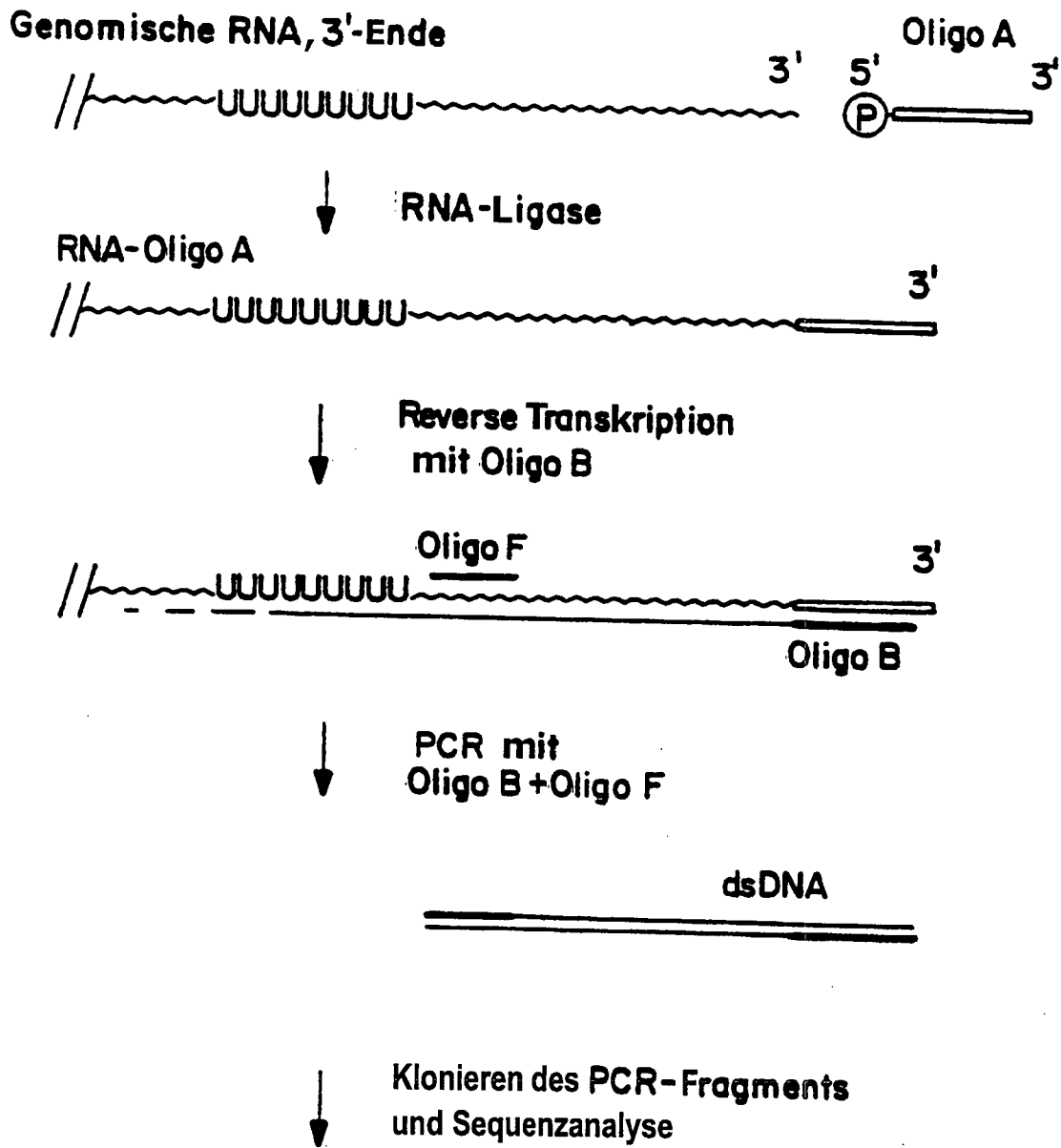


FIG.8

1b GCTGTGAAAG GTCCCGTGAGC CGCATGACTG CAGAGAGTGC TGAAACTGGC CTCTCT
3 GCTGTGAAAG GTCCCGTGAGC CGTTGACTG CAGAGAGTGC TGATACTGGC CTCTCT
4? GCTGTGAAAG GTCCCGTGAGC CGCATGACTG CAGAGAGTGC TGATACTGGC CTCTCT
4a GCTGTGAAAG GTCCCGTGAGC CGCATGACTG CAGAGAGTGC TGAAACTGGC CTCTCT

1b CTCTCTGCA GATCATGT
3 CTCTCTGCA GATCAAGT
4? CTCTCTGCA GATCATGT
4a CTCTCTGCA GATCATGT

FIG. 9

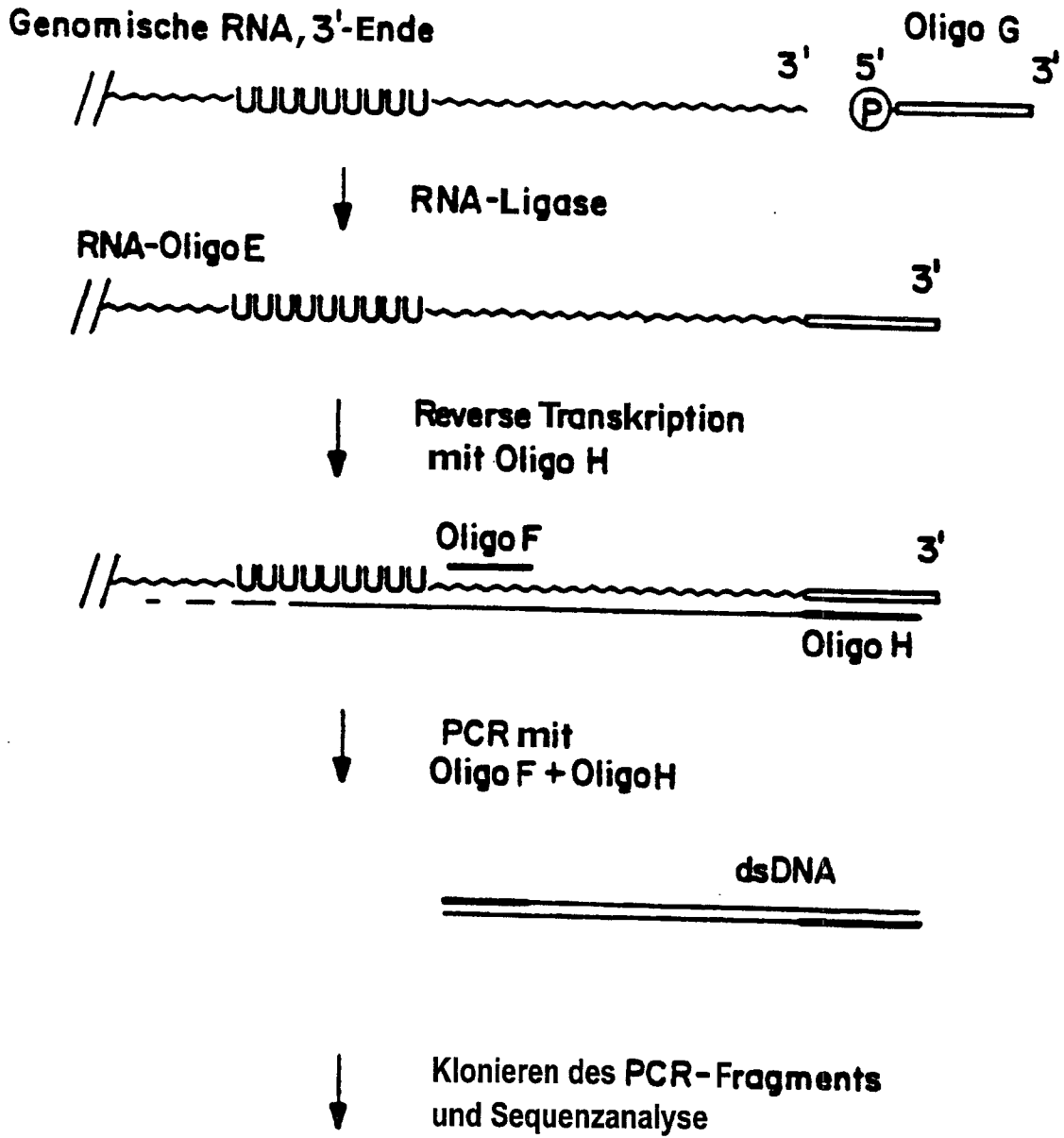


FIG.10

