



(19) **RU**<sup>(11)</sup> **2 158 139**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 48/00, C 12 N 15/86, A 61 K 31/7052, C 07 H 21/04, A 61 P 31/12**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 99122938/14, 04.11.1999  
(24) Дата начала действия патента: 04.11.1999  
(46) Дата публикации: 27.10.2000  
(56) Ссылки: EP 0464287 A1, 08.01.1992. EP 0718400 A2, 26.06.1996. DE 19532651 A1, 06.03.1997. US 5610054 A, 11.03.1997. WO 97/32018 A2, 04.09.1997. WO 98/00013 A1, 08.01.1998.  
(98) Адрес для переписки:  
119828, Москва, ул. Малая Пироговская 1а,  
НИИ ФХМ РАМН, патентный отдел

(71) Заявитель:  
Научно-исследовательский институт  
физико-химической медицины Минздрава РФ  
(72) Изобретатель: Княжев В.А.,  
Сергиенко В.И., Сивов И.Г., Мартынов А.К.  
(73) Патентообладатель:  
Научно-исследовательский институт  
физико-химической медицины Минздрава РФ

**(54) СПОСОБ СЕЛЕКТИВНОГО УНИЧТОЖЕНИЯ КЛЕТОК (ВАРИАНТЫ)**

(57) Реферат:  
Изобретение относится к медицине и может быть использовано для селективного уничтожения клеток, зараженных РНК вируса гепатита С (HCV). Способ включает 1-й вариант: введение в клетки плазмиды р-сDT, содержащий ДНК с последовательностью нуклеотидов, приведенной на фиг.1, кодирующую псевдо HCV <<->> РНК и способную направлять синтез А-субъединицы дифтерийного токсина в зараженных клетках, при этом псевдо HCV <<->> РНК не убивает здоровые клетки, незараженные HCV. 2-й вариант: введение в клетки псевдо HCV <<->> РНК, кодируемую ДНК с нуклеотидной последовательностью,

приведенной на фиг. 1, и способную направлять синтез А-субъединицы дифтерийного токсина в зараженных клетках. Псевдо HCV <<->> РНК не убивает здоровые клетки, незараженные HCV. Псевдо HCV <<->> РНК получают путем ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК с последовательностью нуклеотидов, приведенной на фиг.1, с последующей транскрипцией РНК-полимеразой. Преимущество изобретения состоит в избирательности действия указанной конструкции, а именно на клетки, зараженные вирусом гепатита С (HCV). 2 с. и 2 з.п.ф-лы, 1 ил.

RU 2 1 5 8 1 3 9 C 1

RU 2 1 5 8 1 3 9 C 1



(19) **RU**<sup>(11)</sup> **2 158 139**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 48/00, C 12 N 15/86, A 61 K 31/7052, C 07 H 21/04, A 61 P 31/12**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99122938/14, 04.11.1999  
(24) Effective date for property rights: 04.11.1999  
(46) Date of publication: 27.10.2000  
(98) Mail address:  
119828, Moskva, ul. Malaja Pirogovskaja 1a,  
NII FKHM RAMN, patentnyj otdel

(71) Applicant:  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
fiziko-khimicheskoy meditsiny Minzdrava RF  
(72) Inventor: Knjazhev V.A.,  
Sergienko V.I., Sivov I.G., Martynov A.K.  
(73) Proprietor:  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
fiziko-khimicheskoy meditsiny Minzdrava RF

(54) **METHOD FOR SELECTIVELY KILLING CELLS**

(57) Abstract:  
FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves introducing p-cDT plasmida cells containing DNA with nucleotide sequence shown. The sequence encodes pseudo hepatitis C virus "-" RNA and is able to control diphtheria toxin A-subunit synthesis in infected cells. Pseudo hepatitis C virus "-" RNA does not kill healthy cells not infected with hepatitis C virus. Another method version involves introducing pseudo hepatitis C virus "-" RNA into the cells

coded with DNA with nucleotide sequence being able to control diphtheria toxin A-subunit synthesis in infected cells. Pseudo hepatitis C virus "-" RNA does not kill healthy cells not infected with. The pseudo hepatitis C virus "-" RNA is produced by means of ПЦР using the DNA with nucleotide sequence shown and carrying out transcription with RNA-polymerase. EFFECT: enhanced selectivity of action upon cells infected with hepatitis C virus. 4 cl, 1 dwg

RU 2 1 5 8 1 3 9 C 1

RU 2 1 5 8 1 3 9 C 1

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для селективного уничтожения клеток, зараженных РНК вируса гепатита С (HCV). Гепатит, вызванный этим вирусом или его РНК, носит характер хронической инфекции (Lemon SM, Brown EA. Hepatitis C virus and chronic liver disease. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 1994, v. 14, pp. 120-41). Вирус или его РНК способны заражать не только клетки печени, но, возможно, клетки костномозгового и эпителиального происхождения (Taglione E., Vatteroni ML, Martini P., Galluzzo E., Lombardini F., Delle Sedie A., Bendinelli W., Pasero G., Bencivelli W., Riente L. Hepatitis C virus infection: prevalence in psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Rheumatol.* 1999, v.26, N 2, p.p. 370-372; Jean-Pierre Bronowicki, Marie-Anne Lorient, Valeri Tiers, Yves Grignon, Anna Linda Zignero and Cristian Brechot. Hepatitis C Virus Persistence in Human Hematopoietic Cells Injected Into SCID Mice. *Hepatology*, 1998, v. 28, p.p. 211-218).

Известно, что геномная РНК вируса гепатита С размножается при помощи комплементарной HCV-специфической <<-> РНК (A. A. Khromykh, M.T. Kenney, E.G. Westaway. Trans-Complementation of Flavivirus RNA Polymerase Gene NS5 by Using Kunjin Virus Replicon-Expressing BHK Cells. *J. Virology*, 1998, v. 72, N 9, p. p. 7270-7279). Оба типа реакции репликации ведет HCV-специфическая РНК-полимераза, которая узнает консервативные 5'- и 3'-последовательности в геномной и комплементарной РНК (Kolykhalov A.A., Feinstone S.M., Rice C.M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 1996, v. 70, p.p. 3363-3371).

Все усилия по созданию ДНК-вакцин направлены на решение двух задач: экспрессирующих либо HCV-специфические антигены, либо образование анти-HCV рибозимов. Однако изменчивость геномной РНК в процессе ее репликации ограничивает возможности этих двух решений.

Задачей настоящего изобретения является создание плазмиды, с помощью которой можно селективно уничтожить клетки, зараженные геномной РНК вируса гепатита С (HCV).

Поставленная задача решается путем создания плазмиды, названной нами р-cDT, которая при транскрипции образует не транскрибируемую РНК. Однако в случае зараженной HCV клетки транскрипт из-за 5'- и 3'-концевых HCV-специфических последовательностей способен служить матрицей для синтеза комплементарной РНК. Эта РНК транскрибируется как геномная РНК HCV, но в результате трансляции образуется токсичный для клетки фермент АДФ-рибозил трансфераза дифтаминильного остатка фактора элонгации, являющийся ингибитором синтеза белка.

Способ конструирования плазмиды заключается в том, что в плазмиду рSV3-нео между сайтами рестрикции HindIII и EcoRI была встроена ДНК, предварительно составленная из фрагментов ДНК: 5'- и 3'-концевые HCV-специфические HindIII - NcoI и XmaI - EcoRI, а также NcoI - XmaI

фрагмент, кодирующий фермент. Последовательности фрагментов, ограниченные необходимыми сайтами рестрикции, получали в полимеразной цепной реакции с соответствующими праймерами и матрицами. ДНК конструкцию синтезировали соединением трех частей: 300 нуклеотидов, кодирующих 5'-концевую часть РНК HCV, 103 нуклеотида, кодирующих 3'-концевую часть РНК HCV и 585 нуклеотидов, кодирующих последовательность А-субъединицы токсина дифтерии. Полная нуклеотидная последовательность HindIII - EcoRI фрагмента показана на фиг.1.

Для получения РНК in vitro ДНК конструкцию амплифицировали в ПЦР с помощью безошибочной термополимеразы Pwo II, а затем транскрибировали полученный ампликон РНК-полимеразой бактериофага T7. Полученную РНК смешивали с инфекционной РНК HCV и вводили методом электропорации в клетки линии Нер-2 или переживающие гепатоциты человека. Эффективность анти-HCV действия ДНК конструкции определяли после ее введения в состав ретровирусного вектора и последующей трансформации полученным вектором клеток линии Нер-2. После селекции клонов, стабильно наследующих ретровирусный вектор рSV3-нео с ДНК-конструкцией, в клетки методом электропорации вводили инфекционную РНК HCV.

Во всех случаях в течение 7 дней контролировали образование РНК HCV специфического антигена и амплификацию РНК в клетках и в среде.

Перечисленные выше генетические конструкции приводят к гибели клетки, зараженной HCV.

Ни в клетках, ни в среде инкубации не обнаружили инфекционных РНК HCV.

Таким образом, предлагаемое изобретение имеет следующие преимущества: во-первых, обеспечивается селективное уничтожение клеток, зараженных геномной РНК вируса гепатита С (HCV). Во-вторых, псевдо HCV <<-> РНК находится в составе ретровирусного вектора, что обеспечивает интеграцию конструкции в геном клеток и ее экспрессию. В третьих, псевдо HCV <<-> РНК не способна к трансляции.

Сущность изобретения поясняется на следующих примерах.

Пример 1 использования плазмиды р-cDT, кодирующей псевдо HCV <<-> РНК.

1. ДНК плазмиды р-cDT методом электропорации вводили в клетки линии Нер-2.

2. Трансформированные клетки отбирали на среде RPMI 1640 с генетицином (1 мг/мл).

3. Клоны устойчивых к генетицину (G 418) использовали для определения HCV-специфических антигенов и РНК.

4. После определения антигенов и РНК в G418 клетки методом электропорации вводили инфекционную РНК HCV.

5. Через 24 часа после электропорации в G418 клетках начинали определять HCV-специфические антигены и РНК, а также дифтерийный токсин.

6. Контроли показали, что за 10 часов до первых морфологических признаков гибели клеток от действия дифтерийного токсина методом твердофазного ИФА определяется

сам токсин.

7. Четкие морфологические признаки гибели G 418 клеток наблюдали через 48 часов после электропорации.

Пример 2 использования плазмиды р-сDT, кодирующей псевдо HCV <<->> РНК.

1. В ПЦР с термополимеразой Pwo II, двумя олигонуклеотидными праймерами (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГААТТСГАСАГС ТGGGCGG-A-3' и 5'-ТТСАСГАСГАААГСГТСТА-3') и матрицей ДНК плазмиды р-сDT.

2. Выделенный ампликон использовали для его транскрипции РНК-полимеразой бактериофага Т7.

3. Полученную РНК методом электропорации вводили в клетки линии Нер-2.

4. Через 24 часа после электропорации в клетках начинали определять дифтерийный токсин. Токсин определяли в течение 120 часов после электропорации.

5. Полученную РНК смешивали с инфекционной РНК HCV и методом электропорации вводили в клетки линии Нер-2.

6. Через 6 часов после электропорации в клетках начинали определять HCV-специфические антигены и РНК, а также дифтерийный токсин.

7. Контроли показали, что за 10 часов до первых морфологических признаков гибели клеток от действия дифтерийного токсина методом твердофазного ИФА определяется сам токсин.

8. Четкие морфологические признаки гибели клеток наблюдали через 18 часов после электропорации.

Предлагаемая генно-инженерная

конструкция позволяет селективно уничтожить клетки, зараженные вирусом гепатита С.

### Формула изобретения:

5 1. Способ селективного уничтожения клеток, зараженных вирусом гепатита С (HCV), предусматривающий введение в клетки плазмиды р-с DT, представляющий собой ДНК-конструкцию, содержащую 300 нуклеотидов 5'-концевой части РНК HCV, 103 нуклеотида 3'-концевой части РНК HCV и 585 нуклеотидов, кодирующих последовательность А-субъединицы токсина дифтерии с последовательностью нуклеотидов, представленной на фиг.1 и встроенную в плазмиду р SV3-neo между сайтами рестрикции Hind 111 и EcoR1, кодирующую псевдо HCV <<->> РНК и способную направлять синтез А-субъединицы дифтерийного токсина в зараженных клетках.

10 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что псевдо <<->> РНК не убивает здоровые клетки, незараженные HCV.

15 3. Способ селективного уничтожения клеток, зараженных вирусом гепатита С (HCV), предусматривающий введение в клетки псевдо HCV <<->> РНК, полученную путем ПЦР с термополимеразой Pwo II и олигонуклеотидными праймерами 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГААТТСГАСАГС ТGGGCGGGA-3' и 5'-ТТСАСГАСГАААГСГТСТА-3' с использованием в качестве матрицы ДНК с нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг.1 и последующей транскрипцией РНК-полимеразой.

20 4. Способ по п.3, отличающийся тем, что псевдо HCV <<->> РНК не убивает здоровые клетки, незараженные HCV.

35

40

45

50

55

60

Последовательность активной части анти-НСV конструкции.

GAATTCACATGATCTGCGGAGAGGCCAGTATCAGCACTCTCTGCAGTCATGCAGCTCACGGACSTT  
TCACAGCTAGCCGTGACTAGGGCTAAGATGGACCACCATCGGCCGCTATTATTCAAAATTAATCTC  
AAGTTCTACGCTTAACGCTTTGCGCTGTTCCAGTTATTAATATATTCAACGCTAGAACTCCCCTCA  
GCGAAGGGAAGGCTGAGCACTACACGCGAAGCACCATCACCGAACSTTTTGATAAACTCTTCCGTT  
CCGACTTGCTCCATCAACGGTTCAGTGAGACTTAAACCTAACTCTTTCTTAATAGTTTCGGCATTAT  
CCACTTTTAGTGCGGAGAACCTTCGTCAGTCCTGGATACGTCACTTTGACCACGCCTCCAGCTTTTC  
CAGAGAGCGGGTTTTCAATTATCTACAGAGTATCCCGCAGCGTCGTATTTATTGTCGGTACTATAAAA  
CCCTTTCCAATCATCGTCATAATTTCTTGTGTACCAGATTTTGGCTTTTGTATACSTTTTGAATGG  
AATCTACATAACCAGGTTTAGTCCCCTGGTACGAAGAAAAGTTTTCCATCACAAAAGATTTAGAAGA  
ATCAACAACATCATCAGCGCCTGCATGGGCTGAAGGTGGGGCCCCTATCCCCAGTAGCGCCCCTA  
TTAAGATTGACGCAACAGTTTTCTGCCCATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCCCGGGGCACTCG  
CAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAAGGCSTTTGCGGACCCAACACTACTCGGCTAGCAGTCTC  
GCGGGGGCACGCCCAAATCTCCAGGCATTGAGCGGGTTGATCCAAGAAAAGACCCGGTTCGTCTC  
GGCAATTCGGTGTACTCACCGTTCCGCAGACCACTATGGCTCTCCCGGGAGGGGGGGTCTCTG  
GAGGCTGCACGACACTCATACTAACGCCATGGCTAGACGCTTTCTGCGTGAAGCTT

Фиг.1

RU 2158139 C1

RU 2158139 C1