



(19) **RU**<sup>(11)</sup> **2 159 285**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК<sup>7</sup> **C 12 N 15/63, 15/64, A 61 K 48/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000105366/13, 06.03.2000  
(24) Дата начала действия патента: 06.03.2000  
(46) Дата публикации: 20.11.2000  
(56) Ссылки: RU 1380209 А1, 30.12.1994.  
(98) Адрес для переписки:  
119828, Москва, ул. Малая Пироговская, д.1а,  
НИИ ФХМ МЗ РФ, директору Лопухину Ю.М.

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

(54) ПЛАЗМИДА РСДТ, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:  
Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для селективного уничтожения клеток, зараженных вирусом гепатита С (НСV) или его инфекционной РНК. Сущность изобретения заключается в введении в клетки плазмиды рсДТ, кодирующей псевдо НСV <<->> РНК и

способной направлять синтез А-субъединицы дифтерийного токсина в зараженных НСV клетках. Псевдо НСV <<->> РНК не убивает здоровые клетки, не зараженные НСV. Псевдо НСV <<->> РНК не способна к трансляции. Изобретение может быть использовано для создания вакцины против гепатита С. 3 с.п. ф-лы, 1 ил.

RU 2 1 5 9 2 8 5 C 1

RU 2 1 5 9 2 8 5 C 1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 159 285** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 N 15/63, 15/64, A 61 K**  
**48/00**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000105366/13, 06.03.2000

(24) Effective date for property rights: 06.03.2000

(46) Date of publication: 20.11.2000

(98) Mail address:  
119828, Moskva, ul. Malaja Pirogovskaja,  
d.1a, NII FKHM MZ RF, direktoru Lopukhinu Ju.M.

(71) Applicant:  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
fiziko-khimicheskij meditsiny Ministerstva  
zdravookhraneniya RF

(72) Inventor: Knjazhev V.A.,  
Sergienko V.I., Sivov I.G., Martynov A.K.

(73) Proprietor:  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
fiziko-khimicheskij meditsiny Ministerstva  
zdravookhraneniya RF

(54) **PLASMID PCDT, METHOD OF PREPARATION AND APPLICATION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE:  
invention aims to selectively eliminate  
cells infected with hepatitis C virus or  
infection RNA thereof. For that, into cells  
is introduced plasmid pcDT encoding pseudo  
hepatitis C virus "-" RNA and capable of

orienting synthesis of A subunit of  
diphtheria toxin in hepatitis C  
virus-infected cells. Such RNA does not kill  
sound cells and is incapable of translation.  
EFFECT: enlarged resource for preparing  
antihpatitis vaccines. 3 cl, 1 dwg

RU 2 1 5 9 2 8 5 C 1

RU 2 1 5 9 2 8 5 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для селективного уничтожения клеток, зараженных вирусом гепатита С (HCV) или его инфекционной РНК.

Известно, что геномная РНК вируса гепатита С размножается при помощи комплементарной

HCV-специфической <<->> РНК (А.А. Khromykh, М.Т. Kenney, Е. 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 рсDT, которая отличается от исходной плазмиды рSV3-нео встроенной в ее полилинкер последовательностью. При транскрипции встроенной последовательности не транскрибируемая РНК (псевдо HCV <<->> РНК). Однако, в случае зараженной HCV клетки, псевдо HCV <<->> РНК, из-за 5'- и 3'-концевых HCV-специфических последовательностей, способна служить матрицей для синтеза комплементарной РНК (псевдо HCV <<+>> РНК). Псевдо HCV <<+>> РНК транскрибируется также эффективно, как геномная РНК <<+>> HCV, но в результате ее транскрипции, образуется фермент АДФ-рибозил трансфераза. Активности единственной молекулы этого фермента достаточно, чтобы убить зараженную вирусом гепатита С клетку.

Способ конструирования плазмиды рсDT заключается в том, что в исходную плазмиду рSV3-нео между сайтами рестрикции HindIII и EcoRI была встроена последовательность ДНК, составленная из трех фрагментов: HindIII - NcoI и XmaI - EcoRI, а также NcoI - XmaI. Фрагменты представляли собой соответственно 5'- и 3'- концевые HCV-специфические последовательности и структурный ген А-субъединицы дифтерийного токсина. Полная нуклеотидная последовательность HindIII - EcoRI фрагмента показана на чертеже.

Для получения псевдо HCV <<->> РНК in vitro последовательность ДНК, встроенную в рSV3-нео, амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью "безошибочной" термополимеразы Pwo II и праймеров, позволяющих в последствии транскрибировать продукт ПЦР (ампликон)

РНК - полимеразой бактериофага T7.

Полученную in vitro псевдо HCV <<->> РНК смешивали с инфекционной РНК <<->> HCV и вводили методом электропорации в клетки линий 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. 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 следующем примере.

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

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

2. Выделенный ампликон использовали для его транскрипции РНК-полимеразой бактериофага T7.

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

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

7. Контроли показали, что за 10 ч 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 ч после электропорации.

Предлагаемая генно-инженерная конструкция позволяет селективно уничтожить клетки, зараженные вирусом гепатита С.

#### Формула изобретения:

1. Плазмида рсDT, направляющая синтез А - субъединицы токсина дифтерии, в

зараженных вирусом гепатита С (HCV) клетках млекопитающего и содержащая ДНК-последовательности, представленные на чертеже, кодирующие псевдо HCV <<->> РНК.

2. Способ конструирования плазмиды рсDT по п.1, включающий введение в исходную плазмиду рSV3-нео ДНК-последовательности между сайтами Hind III и Eco R1, составленной из трех фрагментов: Nco 1-Hind III, Xma 1 - Eco R1 и Xma1 - Nco1, представленных на рис.1.

3. Способ получения псевдо

HCV <<->> РНК, заключающийся в том, что фрагмент плазмиды рсDT Hind III - Eco R1 амплифицируют в полимеразной цепной реакции с термополимеразой Pwo II и олигонуклеотидными праймерами: прямым (F<sub>сDT</sub>)

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAATTCGACAG CTGGGCGG-A-3' и обратным (R<sub>сDT</sub>) 5'TTCACGCAGAAAGCGTCTA-3', а затем продукт ПЦР транскрибируют in vitro с помощью РНК-полимеразы бактериофага T7.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-4-

RU 2 1 5 9 2 8 5 C 1

RU ? 1 5 9 2 8 5 C 1

**Xma I - EcoRI** фрагмент

CCCGGGACATGATCTGCGGAGAGGCCAGTATCAGCACTCTCTGCAGTCAT  
GCAGCTCACGGACCTTTCACAGCTAGCCGTGACTAGGGCTAAGATGGACC  
ACCATTGAATTC

**Xma I - Nco I** фрагмент

CCCGGGACATGATCTGCGGAGAGGCCAGTATCAGCACTCTCTGCAGTCAT  
GCAGCTCACGGACCTTTCACAGCTAGCCGTGACTAGGGCTAAGATGGACC  
ACCATCGGCCGCTATTATTCAAATTAATCTCAAGTTCTACGCTTAACGCTT  
TCGCCTGTTCCCAGTTATTAATATATTCAACGCTAGAACTCCCCTCAGCGA  
AGGGAAGGCTGAGCACTACACGCGAAGCACCATCACCGAACCTTTTGATA  
AACTCTTCCGTTCCGACTTGCTCCATCAACGGTTCAGTGAGACTTAAACCT  
AACTCTTTCTTAATAGTTTTCGGCATTATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCG  
TCAGTCCTGGATACGTCACCTTTGACCACGCCTCCAGCTTTTCCAGAGAGC  
GGTTTTTCATTATCTACAGAGTATCCCGCAGCGTCGTATTTATTGTCCGTA  
CTATAAAACCCTTTCCAATCATCGTCATAATTTCTTGTGTACCAGATTTTG  
GCTTTTGTATACCTTTTTGAATGGAATCTACATAACCAGGTTTAGTCCCGTG  
GTACGAAGAAAAGTTTTCCATCACAAAAGATTTAGAAGA  
ATCAACAACATCATCAGCGCCTGCATGGGCTGAAGGTGGGGCCCCTATCC  
CCAGTAGCGCCCCTATTAAGATTGACGCAAACAGTTTTCTGCCCATGG

**Nco I - Hind III** фрагмент

CCATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCCCGGGGCACTCGCAAGCACCCCTAT  
CAGGCAGTACCACAAGGCCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCTAGCAGT  
CTCGCGGGGGCACGCCAAATCTCCAGGCATTGAGCGGGTTGATCCAAG  
AAAGGACCCGGTCGTCTGGCAATTCCGGTGTACTCACCGGTTCCGCAGA  
CCACTATGGCTCTAAGCTT

RU 2159285 C1

RU 2159285 C1