



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 052 503**⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 15/51, 1/21, A 61 K**
39/29/(C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

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

(21), (22) Заявка: 5057397/13, 03.07.1992

(46) Дата публикации: 20.01.1996

(56) Ссылки: 1. Европейский патент N 0445423, кл. G 01N 33/576, 1990. 2. Авторское свидетельство СССР N 0419182, кл. C 12N 15/51, 1990. 3. Европейский патент N 0388232, C 12N 15/51, 1990. 4. Европейский патент N 0406511, кл. C 12N 15/51, 1990. 5. Европейский патент N 0416725, кл. C 12N 15/51, 1990.

(71) Заявитель:

Биотехнологическая компания "Биосервис"

(72) Изобретатель: Лопарев В.Н.,

Красных В.Н., Блинов В.М., Анисимова
Ю.П., Жукова О.А., Гольцов В.А.

(73) Патентообладатель:

Биотехнологическая компания "Биосервис"

(54) **ПОЛИПЕПТИД, ФРАГМЕНТ ДНК НС 360, ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИПЕПТИДА, СЛИТОГО С БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗОЙ E.COLI**

(57) Реферат:

Сущность изобретения состоит в том, что получен полипептид со свойствами внутреннего антигена вируса гепатита С, обладающий способностью связывать антитела к кор-антигену ВГС, вызывать образование специфических антител к кор-антигену вируса гепатита С после введения лабораторным животным и предназначенный для определения антител к вирусу гепатита С и получения специфических антител к кор-антигену вируса

гепатита С. Полипептид синтезируется штаммом бактерий Escherichia coli, полученным путем трансформации штамма PLT90 рекомбинантной плазмидой рН 115, содержащей нуклеотидную последовательность гена кор-антигена, слитой с бета-галактозидазой E. coli или штаммом E. coli, трансформированным плазмидой рН360F, в которой фрагмент ДНК НС 360 находится непосредственно под контролем промотора бактериофага лямбда сго lac Z. 3 с. п. ф-лы.

RU 2 0 5 2 5 0 3 C 1

RU 2 0 5 2 5 0 3 C 1



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 052 503**⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 15/51, 1/21, A 61 K**
39/29/(C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5057397/13, 03.07.1992

(46) Date of publication: 20.01.1996

(71) Applicant:
Biotekhnologicheskaja kompanija "Bioservis"

(72) Inventor: Loparev V.N.,
Krasnykh V.N., Blinov V.M., Anisimova
Ju.P., Zhukova O.A., Gol'tsov V.A.

(73) Proprietor:
Biotekhnologicheskaja kompanija "Bioservis"

(54) POLYPEPTIDE, DNA FRAGMENT HC 360, STRAIN OF BACTERIUM ESCHERICHIA COLI - A PRODUCER OF POLYPEPTIDE FUSED WITH BETA-GALACTOSIDASE OF ESCHERICHIA COLI

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: polypeptide showing properties of internal antigen of hepatitis C virus and showing capability to bind antibodies to core-antigen of hepatitis C virus is prepared. Polypeptide induces the specific antibodies to core-antigen of hepatitis C virus after administration to laboratory animals and can be used for determination of antibody to core-antigen of hepatitis C

virus. Polypeptide is synthesized by strain of bacterium E. coli obtained by transformation of strain PLT 90 with recombinant plasmid pH115 containing nucleotide sequence of core-antigen gene fused with beta-galactosidase of E. coli or strain of E. coli transformed with plasmid pH360F in which DNA fragment HC 360 is under direct control of promoter of lambda bacteriophage cro lac Z. EFFECT: improved method of preparing. 4 cl

RU 2 0 5 2 5 0 3 C 1

RU 2 0 5 2 5 0 3 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, генной инженерии и иммунологии и может быть использовано для проведения серодиагностики гепатита С.

Гепатит С возникает в результате заражения вирусом гепатита С (ВГС) и отличается от других форм вирусассоциированных заболеваний печени, включая уже известные гепатит А, гепатит В, гепатит D, а также гепатитов, вызванных вирусом Эпштейн-Барра или цитомегаловирусом. Заражение ВГС, как правило, осуществляется при переливании крови. ВГС при попадании в организм поражает клетки печени. Клинически гепатит С протекает более легко, чем гепатит В. Однако показано, что почти у пятидесяти процентов пациентов болезнь принимает хроническое течение с периодическим обострением процесса и у двадцати процентов хронических больных гепатитом С заболевание приводит к циррозу печени. Кроме того, имеются данные о том, что заражение вирусом гепатита С имеет прямое отношение к возникновению первичного рака печени. Поэтому для проведения противоэпидемических, профилактических мероприятий и своевременного выявления ВГС-инфекции крайне актуальна разработка диагностических препаратов, позволяющих выявлять инфицированных ВГС.

Многочисленные исследования ВГС позволили определить его структуру, организацию генома, выяснить механизм экспрессии и функции отдельных вирусных белков. ВГС имеет позитивный РНК-геном, состоящий примерно из 9400 нуклеотидов. Данная последовательность нуклеотидов содержит единственную большую открытую рамку считывания, которая перекрывает большую часть вирусного генома и может кодировать большой вирусспецифический полипептид, состоящий из 3010-3011 аминокислотных остатков, который является предшественником индивидуальных структурных и неструктурных вирусных белков. Данный белок процессируется под действием клеточных и вирусспецифической протеаз. К структурным белкам ВГС относятся кор(ядерный)антиген размером 19 кДа. Кор-антиген обладает способностью связывать РНК и образует нуклеокапсид ВГС. Два других структурных белка представлены гликопротеинами размером около 32 кДа и 72 кДа, которые процессируются, как и корантиген, с N-концевой областью вирусспецифического полипротеина. Белок размером 32 кДа предположительно является матричным или поверхностным белком вириона ВГС, а белок размером 72 кДа является либо поверхностным белком вириона, либо первым неструктурным белком ВГС (NS1). Белок NS2 ВГС размером 23 кДа ассоциирован с мембранами зараженных вирусом клеток, однако его функциональная роль неизвестна. Белок NS3 размером 60 кДа обладает: во-первых, нуклеотид трифосфат-связывающей геликазной активностью и, по-видимому, участвует в репликации генома ВГС; во-вторых, ферментативной активностью сериновой протеазы, которая, по-видимому, обеспечивает процессирование неструктурных белков. Продукты экспрессии генов NS4 и NS5 еще не охарактеризованы,

однако они могут кодировать белки размером 52 и 116 кДа соответственно. Как и белок NS2, NS4 очень гидрофобен и, вероятно, является мембраносвязывающим белком с неизвестной функцией. Продукт экспрессии гена NS5, по-видимому, многофункционален, обладает РНК-зависимой РНК-полимеразной активностью, которая используется при репликации вирусного генома.

Большинство методов диагностики ВГС-инфекции основано на определении антител к белкам ВГС в сыворотках крови (серодиагностика). Для этих целей используются различные подходы, в которых применяются принципы иммуноферментного анализа (ИФА), реакции агглютинации (латекса, эритроцитов), иммунофлуоресценции, иммуноблотинга и радиоиммунопреципитации. Одним из наиболее перспективных путей совершенствования всех этих диагностических тест-систем является использование в качестве антитело-связывающего субстрата рекомбинантных белков ВГС, синтезированных в различных экспрессирующих системах. Использование таких рекомбинантных белков, сохраняющих антигенные детерминанты ВГС, вместо вирусных антигенов не только увеличивает специфичность и чувствительность тест-систем, но и делает их безопасными в работе. Существует значительное число разработок, направленных на создание рекомбинантных белков-продуктов генов ВГС, и в частности гена корантигена ВГС [1-5]

В настоящее время ведется поиск по-липептидов, наиболее перспективных для диагностики, лечения и профилактики гепатита С. Исследования ведутся как в направлении выбора клеток продуцентов [3] так и в направлении выбора наиболее антигеноактивных детерминант [1] и создания рекомбинантных полипептидов, продуктов генов ВГС.

Сущность данного технического решения состоит в том, что предложен оригинальный гибридный полипептид HC115, состоящий из продукта экспрессии фрагмента генома ВГС (115 аминокислотных остатков корантигена), свободный или слитный с бета-галактозидазой E.coli, связывающий антитела к продукту гена корантигена ВГС, отличающийся от известных: во-первых, размером полипептиды p1 и p35 (патенты EP 0 445 423) соответствуют 1-75 и 35-75 аминокислотным остаткам корантигена ВГС; пептид CB 279a соответствует 1-84 аминокислотным остаткам корантигена ВГС, во-вторых, наличием аминокислотных замен (например, R <->K в 9-м положении, T <->N в 13-м положении, P <->T в 49-м положении по сравнению с пептидами p1 и p35 [1]) Фрагмент ДНК HC360, кодирующий полипептид HC115. Сущность изобретения состоит также в штамме E.coli HC115 ВКПМ, трансформированном рекомбинантной плазмидой pHC115, содержащей фрагмент ДНК HC115 и экспрессирующей белок HC115.

Штамм-продуцент характеризуется следующими признаками: клетки прямые, палочковидной формы, подвижные с перитрихальными жгутиками, грамотрицательные, неспороносные. Клетки растут на среде LB и других питательных

средах, используемых для культивирования *Escherichia coli*, и простых питательных средах, содержащих 10 мкг/мл тетрациклина и 50 мкг/мл ампициллина. При выращивании на питательных агаризованных средах при 37°C колонии клеток гладкие, круглые, блестящие, бледно-желтые, прозрачные, края ровные. При росте на тех же средах, но при 30-32°C колонии клеток имеют "слизистый" фенотип, характерный для колоний клеток с *lop* мутациями, растущими при пониженной температуре. При росте на жидких средах клетки образуют ровную интенсивную муть. Клетки хорошо растут при температуре от 4 до 37°C при оптимуме pH от 6,8 до 7,5. В качестве источника азота клетки используют как минеральные соли в аммонийной и нитратной форме, так и органические формы в виде пептона и аминокислот. Нитраты восстанавливают до нитритов. Желатину не разжижают. Мальтозу не сбраживают. Уреазная активность не образуется. Трансформацию клеток плазмидами с промоторами бактериофага проводят по стандартным методикам. Полученные клоны клеток с плазмидами выращивают на среде LB при температуре 30-32°C. Препаративную ферментацию для наработки рекомбинантного белка проводят при температуре 39-42°C. Продуктивность штамма при использовании плазмидных векторов экспрессии с промоторами бактериофага составляет около 500 кг рекомбинантного белка на 1 л клеточной суспензии при плотности культуры 1 x 10⁸ кл/мл. Белок стабилен при температуре 4°C в течение 3-4 месяцев.

Рекомбинантный полипептид C115, выделенный и очищенный из штамма продуцента, иммобилизованный на твердом носителе (полихлорвиниловые или полистироловые планшеты, нитроцеллюлоза, нейлон, латексы, эритроциты и др.), связывает антитела к продуктам гена корантигена ВГС в сыворотках крови и др. биологических жидкостях. Штамм депонирован в коллекции промышленных микроорганизмов НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов ВКПМ.

Пример 1. Получение фрагмента ДНК HC360.

Для получения фрагмента ДНК были использованы олигонуклеотиды:

cr1 5'
GATCCCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAA
GAAAAAC 3'

cr2 5'
CAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGA
CGTCAAGTTC 3'

cr3 5'
CCGGCGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTT
TACCTGTTGCCGCGCAGG 3'

cr4 5'
GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGCCCAG
GAAGACTTC 3'

cr5 5'
CGAGCGGTGCGAACCTCGTGAAGGCGACA
ACCTATCCC 3'

cr6 5'
CAAGGCTCGCCGGCCCGAGGGCAGGACCTG
GGCTCAGCCCCGGGTAC 3'

cr7 5'
CCTTGGCCTCTSTATGGCAATGAGGGCTTAG
GGTGGG 3'

cr8 5'
CAGGATGGCTCCTGTACCCCCGCGGCTCCC
GGCCTAGTTGGGGCCCCACG 3'

cr9 5'
GACCCCCGGCGTAGGTAATAATAGCTGCA 3'

rc1 5'
GCCCGGGAACCTTGACGTCCTGTGGCGGGC
GTTGGTGTACGTTTGGTTTTTC
TTTGAGGTTTAGGATTCGTCTCATGG 3'

rc2 5'
GGCCCCGCGCGGCAACAGGTAAACTCCAC
CAACGATCTGACCACC 3'

rc3 5'
GAGGTTGCGACCGCTCGGAAGTCTTCCTGG
GCGCGCGCACACCCAACCTGG 3'

rc4 5'
CCGGGCTGAGCCCAGGTCCTGCCCTCGGGC
CGGCGAGCCTTGGGGATAGGTTGTCC
CCTTCCAC 3'

rc5 5'
GAGCCATCCTGCCCCACCCTAAGCCCTCATTG
CCATAGAGAGGCCAAGGGTAC 3'

rc6 5'
CCGGGGGTCCGTGGGGCCCCAACTAGGCC
GGGAGCCGCGGGGTGACAG 3'

rc7 5' GCTATTATTACCTACG 3'

Олигонуклеотиды cr 1,2,3,4,5,6 и rc 1,2,3,4 смешивают и кинируют с помощью полинуклеотидкиназы фага T4. Для этого в эппендорфовскую пробирку на 1,5 мл вносят по 50 пмолей каждого из олигонуклеотидов, 50 мкл десятикратного буфера для киназы (0,5 М трис HCl, pH 7,6, 0,1 М MgCl 50 мМ дитиотрейтол, 1 мМ спермидина и 1 мМ ЭДТА), 250 пмольями (150 мкКи) [гамма- P] АТФ (удельная активность 3000 Ки/ммоль), 150 единицами активности полинуклеотидкиназы фага T4 и бидистиллированной воды до объема 500 мкл и инкубируют 30-60 мин при 37°C. Затем реакционную смесь нагревают до температуры 98°C, охлаждают до 16°C и сшивают ДНК-лигазой. Для этого 100 мкл смеси обработанных киназой олигонуклеотидов смешивают с 12 мкл десятикратного буфера для лигирования (0,66 М трис-HCl, pH 7,6, 50 мМ MgCl, 50 мМ дитиотрейтол и 10 мМ АТФ), 8 мкл (50 единиц активности) ДНК-лигазы фага T4 и инкубируют при 4°C в течение 5 ч. Затем реакционную смесь нагревают до температуры 65°C в течение 15 мин для инактивации фермента. 10 мкл раствора обработанных киназой и лигазой олигонуклеотидов используют для анализа ДНК методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле по обычной методике (Molecular cloning, New York, CSHL, 1982). После радиоавтографии геля виден фрагмент размером около 249 п. н. 100 мкл раствора полученного фрагмента ДНК гидролизуют рестриктазами BamHI и KpnI в буферном растворе для рестрикции (конечная концентрация 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl, 1 мМ дитиотрейтол) в течение 5 ч при температуре 37°C. Ферменты инактивируют нагреванием при 70°C. 10 мкл раствора фрагментов ДНК, гидролизованных рестрикционными эндонуклеазами, используют для анализа ДНК в 12% полиакриламидном геле (после радиоавтографии виден фрагмент размером около 249 п.н.).

ДНК осаждают этиловым спиртом и растворяют в 20 мкл дистиллированной воды.

10 мкл обработанного рестриктазами эндонуклеазами фрагмента ДНК вносят в эппендорфовскую пробирку, содержащую 7 мкл (0,1 мкг/мл) ДНК векторной плазмиды pUC18, обработанной рестриктазами BamHI и KpnI, 2 мкл десятикратного буфера для лигирования, 1 мкл (5 единиц активности) ДНК-лигазы фага T4 и инкубируют при 4°C в течение 5 ч. Полученной лигазной смесью трансформируют клетки E. coli штамм DH5альфа по обычной методике (Molecular cloning, New York, CSHL, 1982). Трансформированные клетки высевают на чашки с 1,2% LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина. Выросшие колонии проверяют на наличие рекомбинантных плазмид. Для этого бактериальные клетки лигируют и выделяют плазмидную ДНК, как описано (Nature, 1981, 145, 1365). Выделенную плазмидную ДНК обрабатывают рестриктазами Bam HI и KpnI и гидролизат исследуют электрофорезом в 12% полиакриламидном геле. Отбирают штамм HCBK. Гидролизат плазмидной ДНК из рекомбинантного штамма HCBK имеет на электрофореграмме 2 полосы ДНК размерами 2686 и 249 п.н. что соответствует размерам вектора и синтезированного фрагмента ДНК.

Олигонуклеотиды cr 7,8,9 и rc 5,6,7 смешивают и обрабатывают последовательно полинуклеотидкиназой и ДНК лигазой фага T4, как описано выше.

100 мкл раствора полученного фрагмента ДНК гидролизуют рестриктазами PstI и KpnI в буферном растворе для рестрикции (конечная концентрация 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl, 1 мМ дитио-трейтол) в течение 5 ч при температуре 37°C. Ферменты инактивируют нагреванием при 70°C, 10 мкл раствора фрагментов ДНК, гидролизованных рестриктазами, используют для анализа ДНК в 12% полиакриламидном геле (после радиавтографии виден фрагмент размером около 116 п.н.).

ДНК осаждают этиловым спиртом и растворяют в 20 мкл дистиллированной воды. 10 мкл обработанного рестриктазами эндонуклеазами фрагмента ДНК вносят в эппендорфовскую пробирку, содержащую 7 мкл (0,1 мкг/мл) ДНК векторной плазмиды pUC18, обработанной рестриктазами PstI и KpnI, 2 мкл десятикратного буфера для лигирования, 1 мкл (5 единиц активности) ДНК-лигазы фага T4 и инкубируют при 4°C в течение 5 ч.

Полученной лигазной смесью трансформируют клетки E.coli штамм DH5альфа. Трансформированные клетки высевают на чашки с 1,2% LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина. Выросшие колонии проверяют на наличие рекомбинантных плазмид. Для этого бактериальные клетки лигируют и выделяют плазмидную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК обрабатывают рестриктазами PstI и KpnI и гидролизат исследуют электрофорезом в 12% полиакриламидном геле. Отбирают штамм HCBK. Гидролизат плазмидной ДНК из рекомбинантного штамма HCBK имеет на электрофореграмме 2 полосы ДНК размерами 2686 и 116 п.н. что соответствует размерам вектора и синтезированного нами фрагмента ДНК.

Плазмидную ДНК из штаммов HCBK и

HCBK использовали для получения фрагмента ДНК HС360. Для этого бактериальные клетки штаммов HCBK и HCBK лигируют и выделяют плазмидную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК и рHCBK обрабатывают рестриктазами BamHI и KpnI, а ДНК рHCBK обрабатывают рестриктазами PstI и KpnI. Продукты гидролиза фракционируют в полиакриламидном геле и выделяют фрагменты ДНК размером 116 п.н. (фрагмент KP) и 249 п.н. (фрагмент BK) по обычной методике (Molecular cloning, New York, CSHL, 1982). Изолированные фрагменты ДНК осаждают этиловым спиртом и растворяют в 20 мкл дистиллированной воды. По 5 мкл фрагментов ДНК BK и KP лигируют с ДНК векторной плазмиды pUC18, обработанной рестриктазами PstI и BamHI.

Лигазной смесью трансформируют клетки E.coli штамм DH5альфа. Клетки высевают на чашки с 1,2% LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина. Колонии проверяют на наличие рекомбинантных плазмид. Для этого бактериальные клетки лигируют и выделяют плазмидную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК обрабатывают рестриктазами PstI и BamHI и гидролизат исследуют электрофорезом в 12% полиакриламидном геле. Отбирают штамм HCBP. Гидролизат плазмидной ДНК из рекомбинантного штамма HCBP имеет на электрофореграмме 2 полосы ДНК размерами 2686 (ДНК плазмиды pUC18) и 360 п.н. (фрагмент ДНК HС360).

Методом Сэнгера (PNAS, 1977, 74, 5463) определяют нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК HС360:

GATCCCATGAGCACGAATCCTAAACCTCA
AAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGC
CCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTG
GTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCC
G

CGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGC
GCGAAGCCCAGGACTTCCGAGCGGTGCGAA
CCT

CGTGGAAGGCGACAACCTATCCCCAAGG
CTCGCCGGCCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTC
AG

CCCGGGTACCCTTGGCCTCTCTATGGCA
ATGAGGGCTTAGGGTGGGCAGGATGGCTCC
TG

TCACCCCGCGGCTCCCGGCCTAGTTGGG
GCCCCACGGACCCCCGGCGTAGGTAATAAT
AG

CTGCA

Данный фрагмент ДНК HС360 также был получен путем известного метода цепной реакции полимеризации с использованием олигонуклеотидов cr1 и rc7.

Пример 2. Получение плазмиды рHС115.

Фрагмент ДНК HС360 лигируют с ДНК векторной плазмиды pEL5A, обработанной рестриктазами BamHI и PstI. Лигазной смесью трансформируют клетки E.coli штамм PLT90. Трансформированные клетки высевают на чашки с 1% LB-агаром, содержащие 50 мкг/мл ампициллина. Выросшие колонии проверяют на наличие рекомбинантных плазмид. Для этого бактериальные клетки лигируют и выделяют плазмидную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК обрабатывают рестриктазами BamHI и PstI и гидролизат исследуют электрофорезом в 2% агарозе. Отбирают штамм HС115. Гидролизат плазмидной ДНК из рекомбинантного штамма

HC115 имеет на электрофореграмме 2 полосы ДНК размерами 6400 и 360 нуклеотидов, что соответствует размерам вектора и синтезированного фрагмента ДНК HC360. При определении нуклеотидной последовательности плазмиды pHС115 установлено, что синтезированный фрагмент гена корантигена ВГС через BamHI сайт присоединен к 3'-концу гена бета-галактозидазы E.coli. Таким образом плазида HC360 кодирует рекомбинантный белок, содержащий аминокислотные последовательности корантигена ВГС, слитые с последовательностью бета-галактозидазы E.coli. Аналогичным образом получена плазида pHС360F, в которой фрагмент ДНК HC360 находится непосредственно под контролем промотора бактериофага лямбда croLacZ. Данная плазмидная ДНК обеспечивает синтез рекомбинантного корантигена ВГС, свободного от аминокислотных последовательностей бета-галактозидазы E. coli.

Пример 3. Синтез белка HC115.

Штамм E.coli PC115, содержащий плазмиду pHС115, выращивают в 100 мл среды LB при 30°C до плотности 8 x 10 кл/мл. После этого температуру повышают до 40°C и растят клетки еще в течение 2 ч. Клетки собирают центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин. Клетки лизируют ультразвуком и выделяют белки по описанному методу (EMBO J. 1984, 3, 1429).

Выделенные белки анализируют в 10% ПААГ по стандартному методу Лэммли (Nature, 227, 680-685, 1970). В качестве маркеров молекулярных масс белков используют набор фирмы "Pharmacia", содержащий маркеры молекулярных масс от 20 до 160 кД. В качестве контроля используют полученный аналогичным образом лизат клеток штамма E.coli PLT90, содержащий векторную плазмиду pEL5A и не содержащий плазмиду pHС115. Сравнительный анализ белкового состава показывает, что штамм E.coli HC115, содержащий плазмиду pHС115, экспрессирует гибридный полипептид с молекулярной массой 150-160 кД. Этот полипептид назван С115. Аминокислотная последовательность гибридного полипептида (последовательность бета-галактозидазы не представлена), определенная на основании нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента провирусной ДНК ВГС, представлена ниже:

```
M S T N P K P Q R K T K R N T N R R P Q D
V K F P G
G G Q I V G G V Y L L P R R G P R L G V R
A P R K T
S E R S Q P R G R R Q P I P K A R R P E G
R T W A Q
P G Y P W P L Y G N E G L G W A G W L L
S P R G S R
P S W G P T D P R R R
```

слитный с бета-галактозидазой E.coli.

Пример 4. Контроль антигенной активности.

Контроль антигенной активности препаратов осуществляют методом иммуноблотинга. Для этого проводят процедуру электрофореза (как описано в примере 3), затем осуществляют перенос электрофоретически разделенных белков на нитроцеллюлозные мембраны ВН85 с помощью аппарата для электроблотинга в

режиме 24В, 400 мА в течение 1 ч. Качество переноса проверяют окрашиванием мембран раствором 0,2 Понсо S в 3%-ной ТХУ в течение 5 мин при комнатной температуре. Краску дважды отмывают в течение 30 мин буфером TBS (0,15M NaCl, 20 mM трис-HCL, pH 7,4) с 0,05% Твина-20 при комнатной температуре. На следующем этапе проводят блокирование нитроцеллюлозных мембран с иммобилизованными белками раствором 5%-ного обезжиренного сухого молока, приготовленным на 0,1 M Na-фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 30 мин при комнатной температуре. После блокирования мембраны в течение 1 ч при 37°C обрабатывают сыворотками, содержащими антитела к ВГС, в разведении 1:100. Затем проводят трехкратную отмывку мембран TBS с 0,05%-ным Твином-20 в течение 30 мин при комнатной температуре. Выявление специфических антител осуществляют инкубацией фильтра с антивидовым пероксидазным конъюгатом при 37°C в течение часа. Далее повторяют процедуру трехкратной отмывки. Реакцию проверяют добавлением 100 мкл 30% -ной перекиси водорода и 50 мл раствора 4-хлор-1-нафтола (20 мг в 0,1M трис-HCl, pH 8,0). Анализ показывает, что полипептид С115 связывается с антителами к вирусу гепатита С.

Пример 5. Получение специфических антител к корантигену ВГС.

Штамм E.coli HC115, содержащий плазмиду pHС115, выращивают в 100 мл среды LB при 30°C до плотности 8x10 кл/мл. После этого температуру повышают до 40°C и растят клетки еще в течение 2 ч. Клетки собирают центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин. Клетки лизируют ультразвуком и выделяют белки по описанному методу (EMBO J. 1984, 3, 1429). Выделенные белки фракционируют в 10% ПААГ по стандартному методу Лэммли (Nature, 227, 680-685, 1970). В качестве маркеров молекулярных масс белков используют набор фирмы "Pharmacia", содержащий маркеры молекулярных масс от 20 до 160 кД. По обычной методике (Molecular cloning, New York, CSHL, 1982) из геля выделяют мажорный белок с молекулярной массой 150-160 килодальтон. 3 мг очищенного с помощью гель-электрофореза белка используют для иммунизации 3-6 месячных самок мышей BALB/c. Белок вводят внутривидно с интервалом 2 недели с полным адъювантом Фрейнда (при первых двух иммунизациях) и неполным адъювантом Фрейнда (при последующих двух иммунизациях). Выявление антител к корантигену ВГС в сыворотках крови иммунизированных животных проводят с помощью вестерн-блот-анализа. Для этого через две недели после последней иммунизации у животных берут кровь и получают сыворотку, используя стандартные методы (LNA cloning, Oxford, 1987). Затем фракционируют плазму крови больных гепатитом С методом электрофореза в полиакриламидном геле и белки переносят на нитроцеллюлозный фильтр, блокирование нитроцеллюлозных мембран с иммобилизованными белками, обработку сыворотками животных, иммунизированных рекомбинантными белками, выявление

специфических антител с помощью антивидового конъюгата, отмывки проводят как описано в примере 4. Анализ показывает, что сыворотки животных, иммунизированных рекомбинантными белками, содержат антитела, которые специфически взаимодействуют с корантигеном ВГС (полипептид с молекулярной массой 19 килодальтон).

Таким образом, объектом защиты изобретения является полипептид со свойствами внутреннего антигена вируса гепатита С, взаимодействующий с антителами к корантигену ВГС, способный вызывать образование специфических антител к корантигену вируса гепатита С после введения лабораторным животным.

Формула изобретения:

1. Полипептид, полученный в штамме бактерий *Escherichia coli*, трансформированном рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей фрагмент ДНК

с нуклеотидной последовательностью, R и аминокислотной последовательностью R₁, приведенными в описании, где R и R₁ = O, или R - это последовательность нуклеотидов, кодирующая бета-галактозидазу, R₁ - аминокислотная последовательность бета-галактозидазы,

обладающий способностью связывать антитела к продукту гена корантигена вируса гепатита С и вызывать образование специфических антител к вирусу гепатита С после введения лабораторным животным.

2. Фрагмент ДНК НС 360, полученный с помощью искусственного химического синтеза или реакции полимеризации цепи ДНК с нуклеотидной последовательностью, приведенной в описании, содержащий на 3' -конце стоп-кодон.

3. Штамм бактерий *Escherichia coli* ВКПМ N В - 6254 - продуцент полипептида НС115, слитого с бета-галактозидазой *E. coli*.

20

25

30

35

40

45

50

55

60