

35. *Instability of ASV genomes structure in mammalian and duck cells* / A. Rynditch, B. Yatsula, I. Hlozanek, J. Svoboda // 17th FEBS meeting: Abstr.— Berlin, 1986.— Vol. 367.— P. 226.
36. *Robertson M.* Mapping the disease phenotype // Nature.— 1986.—327.— P. 372—373.
37. *Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence* / V. H. Lee, R. Bookstein, F. Hong et al. // Science.— 1987.—235, N 4794.— P. 1394—1399.
38. *White R.* The search for the cystic fibrosis gene // Ibid.— 1986.—234, N 4780.— P. 1054—1055.

Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 01.03.88

УДК 575.155:575.224.46

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК SV40 ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ

С. М. Ландау

Благодаря развитию генной инженерии и использованию эукариотических векторов и, в частности, векторов на основе генома вакуолизирующего вируса SV40 появилась возможность подойти к изучению экспрессии генов в организме животных и даже, в перспективе, в организме человека. Хотя эти исследования еще далеки от использования их результатов на практике, однако, несомненно, они относятся к первым попыткам в развитии нового направления — генной терапии.

Чтобы оценить реальные возможности SV40 как вектора для генной терапии, необходимо рассмотреть молекулярные основы вирусной инфекции. В связи с этим представляет интерес изучение некоторых основных свойств вируса SV40 и его ДНК.

Общие свойства вируса и его ДНК. Обезьяний вирус 40, относящийся к семейству *Paroviridae* и роду *Polyomavirus*, впервые обнаружен Суитом и Хиллеманом в 1960 г. в клетках почки обезьян, используемых для производства вакцины против полиомиелита.

Геном вируса SV40 состоит из 5224 пар оснований (п. о.). В настоящее время определена полная нуклеотидная последовательность ДНК SV40. На рис. 1 показана генетическая карта SV40 [1]. ДНК SV40 имеет раннюю и позднюю области и регуляторный район, состоящий из «ориджина» репликации, раннего и позднего промоторов и усилителей. В состав контролирующих элементов SV40 входит блок палиндромов 17, 15 и 27 п. о., ТАТА-бокс (АТ-обогащенная область 17 п. о.), три копии повторов по 21 п. о. и две копии повторов по 72 п. о. (рис. 2) [2]. «Ориджин» ДНК SV40 разделен на две области с определенными границами: первая включает 17, 15 и 27 п. о. палиндромы и АТ-обогащенную последовательность, необходимые для репликации; другая — несет вспомогательные функции и включает повторы 21 п. о., повышающие эффективность репликации.

Ранний промотор SV40 перекрывается с поздним и с «ориджином» репликации. Ранний промотор эффективнее позднего. Два повтора по 72 п. о. являются энхансерами (усилителями) транскрипции. В регуляторном районе SV40 имеются I, II и III сайты для связывания с ранним белком T-антигеном.

Ранняя область SV40 несет информацию о двух белках. Это большой (T) и малый (t) антигены. Основные функции T-антигена заключаются в его необходимости для: 1) усиления репликации клеточной ДНК; 2) инициации репликации вирусной ДНК; 3) авторегуляции ранней транскрипции; 4) индукции поздней транскрипции; 5) детерминации круга хозяев; 6) неопластической трансформации клеток. При

трансформации вирусом пермиссивных хозяев *T*-антиген SV40 часто обнаруживается в комплексе с белком P53, найденным в различных типах опухолевых клеток. *t*-Антиген SV40 необходим для поддержания у клеток трансформированного фенотипа.

Поздний район SV40 содержит информацию о трех капсидных белках вириона (VP1 — основной капсидный белок; VP2 и VP3 — минорные капсидные белки). В последнее время в геноме SV40 обнаружена кодирующая последовательность нового белка, названного агно-белком.

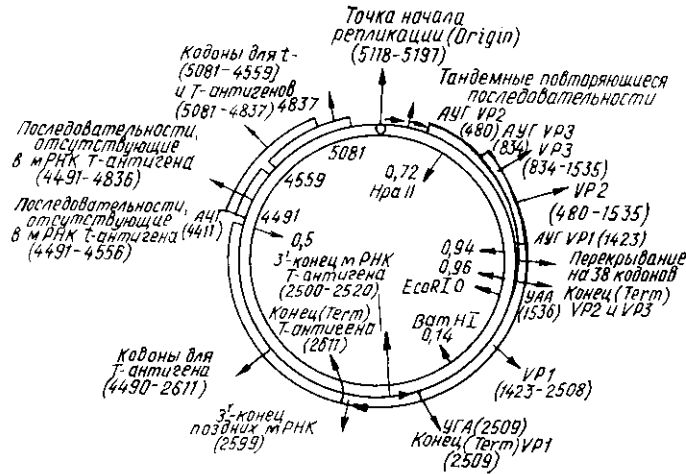


Рис. 1. Геном SV40. Целые числа — номера нуклеотидов; дробные — показывают положение районов ДНК SV40 относительно нулевой точки отсчета (единичного сайта для рестриктазы *EcoRI*) [1]

Fig. 1. SV40 genome. Integer numbers — nucleotide numbers. Fraction numbers indicate position of SV40 DNA regions relatively to zero point of reading (a single *EcoRI* restriction site) [1]

Как происходит развитие вирусной инфекции в пермиссивных и непермиссивных культурах клеток? На ранних стадиях литического цикла инфекции клеточная РНК-полимераза II инициирует раннюю транскрипцию и синтез продукта гена *A-T*-антигена. Последний аккумулялируется в ядрах инфицированных клеток и, достигнув порога концентрации, инициирует репликацию ДНК SV40 [3]. При этом *T*-антиген узнает и специфически связывает район SV40, содержащий *ori* репликации и ранний транскрипционный промотор. *T*-антиген связывается с тремя сайтами на ДНК SV40, из них сайт I имеет наибольшую аффинность.

После того как возрастает концентрация *T*-антигена в клетке, начинается репликация ДНК и активируется поздняя транскрипция, в то же время уровень синтеза ранних мРНК снижается в результате репрессии *T*-антигеном. Вновь реплицирующаяся ДНК SV40 является преимущественной матрицей для дальнейшей репликации и поздней транскрипции [4].

До сих пор шла речь о пермиссивной системе обезьяньих клеток. О репликации ДНК SV40 и ее транскрипции в непермиссивной системе клеток известно гораздо меньше. При заражении непермиссивных клеток мышей вирусом SV40 на ранних стадиях инфекции в них синтезируются большой (*T*) и малый (*t*) антигены, но только в клетках обезьян на поздних стадиях инфекции (после начала репликации вирусной ДНК) синтезируются эквивалентные количества структурных белков вируса [5].

При трансформации непермиссивных клеток вирусом SV40 происходит интеграция части вирусных ДНК в клеточный геном. Кроме того, было показано, что специфические последовательности SV40 могут существовать в непермиссивных трансформированных клетках также и в свободном эписомном состоянии [6].

Что же известно о развитии инфекции вируса SV40 в клетках человека? В основном, в линиях клеток человека SV40 не размножается. Однако некоторые культуры клеток человека являются полупермиссивными для вируса. В то же время культуры клеток из биопсийного материала человека и, в частности, нормальные диплоидные фибробласты или же клетки мерцательного эпителия глаза трансформируются вирусом SV40 [7, 8].

Векторы на основе ДНК SV40. Рассмотрев основные моменты развития вирусной инфекции в культурах пермиссивных и непермиссив-

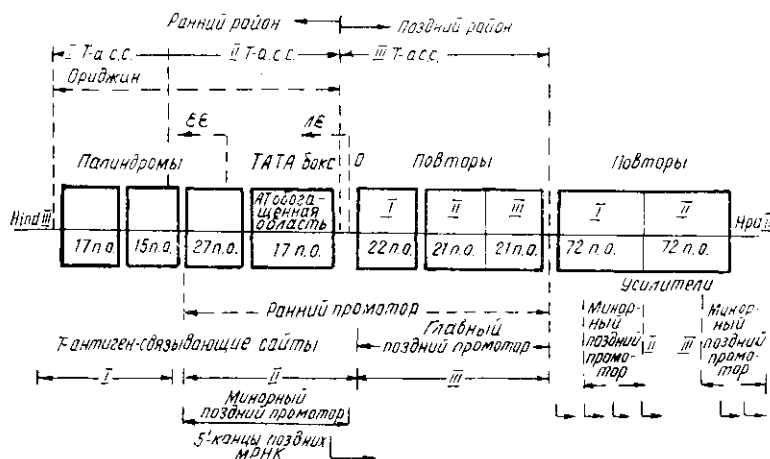


Рис. 2. Контролирующие элементы SV40 [2]
Fig. 2. Controlling SV40 elements [2]

ных хозяев, можно перейти к вопросу об использовании ДНК SV40 в качестве вектора для генотерапии. Следует отметить, что при выделении регуляторного района SV40 для конструирования эукариотического вектора, как правило, удается сохранить энхансеры транскрипции. Энхансеры SV40 не обладают строгой специфичностью и могут усиливать транскрипцию в непермиссивной системе клеток, например в культуре человеческих клеток *HeLa*. Кроме того, энхансер SV40 может стимулировать транскрипцию как прокариотических, так и эукариотических генов, например, β -глобинового гена человека или гена хлорамфениколацетилтрансферазы *Escherichia coli* [7, 8]. Представляет интерес также возможность энхансеров SV40 действовать на отдаленных расстояниях (1500 п.о.) и в обеих ориентациях, что облегчает использование этих усилителей при конструировании рекомбинантных молекул.

Можно создавать конструкции, используя несколько копий 72-членного повтора SV40. Например, показано, что использование четырех копий повторов резко усиливает экспрессию встроенных генов [9].

При конструировании векторов на основе SV40 используют либо ранний, либо поздний промоторы. При этом вырезают либо полностью регуляторный район, либо раннюю или позднюю области.

При полном вырезании регуляторного района используют, как правило, рестриктазу *HindIII* или фрагмент *HindIII-HpaII* (по уникальному сайту *HpaII* ген ставят под поздний промотор), или используют фрагмент *HindIII-BglIII* (по *BglIII*-сайту ген ставят под ранний промотор).

В основном, все возможные варианты векторов на основе SV40 для генотерапии можно представить в виде следующей схемы. Нужно заметить при этом, что ни один из ныне существующих эукариотических векторов, в том числе векторов на основе вирусов, например, ретровирусов, аденовирусов, вирусов папилломы, не обладает таким диапазоном возможностей, как векторы на основе SV40.

Варианты векторов на основе VV40. 1. Неинтегративные векторы. Вектор без *A*-гена: а) не реплицируется, ген преимущественно находится под ранним промотором *SV40*; б) вектор реплицируется в *COS*-клетках (обезьяньи *CV1*-клетки, трансформированные ДНК *SV40* с дефектным *ori*, клетки содержат функционально активный *T*-антиген *SV40*).

A-ген в цис-положении: а) вектор не реплицируется в перmissive системе клеток (кроме *COS*-клеток), если плазида содержит «ядовитые» последовательности, препятствующие векторам, содержащим геном *SV40*, реплицироваться в чувствительной клеточной системе [10]. Экспрессия генов осуществляется с позднего промотора *SV40*; б) вектор реплицируется в перmissive системе, если бактериальные плазмиды не содержат «ядовитых» последовательностей, т. е. сконструированы на основе плазмид *pML2*. Экспрессия генов осуществляется с позднего промотора *SV40*.

A-ген в транс-положении. Совместное введение вектора и ДНК вируса-помощника (хэлпера) для индукции репликации вектора в перmissive клетках. Принцип индукции репликации вектора заключается в том, что при попадании в одну и ту же клетку вирусной и плазмидной ДНК синтезированный на вирусной ДНК *T*-антиген реплицирует одновременно как вирусную, так и плазмидную ДНК. В такой системе плазмидная ДНК реплицируется даже в том случае, если она содержит «ядовитые» последовательности. Здесь возможны два варианта хэлпера. В первом варианте одновременно с исследуемым вектором вводят рекомбинантную плазмиду, которая осуществляет синтез *T*-антигена вируса *SV40* (это должна быть плазида, не содержащая «ядовитых» последовательностей). Нам не известны подобные примеры из литературы, однако такая котрансфекция вполне осуществима. Во втором варианте можно одновременно с вектором вводить ДНК вируса *SV40* для индукции репликации рекомбинантной молекулы. При этом, если вектор составляет 90—105 % длины генома вируса, можно получить рекомбинантный вирус (псевдовирион).

Такие векторы могут быть полезными для однократного получения продукта в системе трансфекции. Следует отметить, что именно в такой системе возможен наибольший выход биопрепарата, поскольку его синтез идет на уровне синтеза собственных белков вируса *SV40*.

2. Интегративные векторы. Интегративные векторы отличаются от неинтегративных не по системе конструирования, а по способу выявления экспрессии исследуемого гена.

В случае неинтегративной системы экспрессия выявляется в системе трансфекции, т. е. практически в течение 2—4 сут. Что же касается интегративных систем, то здесь необходимо получать культуры трансформированных клеток и, что лучше всего, вести селекцию по какому-либо маркеру. Такие культуры трансформированных клеток могут длительное время служить источником биопрепарата, однако выход его будет значительно ниже, чем в системе котрансфекции. Нужно иметь в виду, что прежде чем приступить к получению интегративной системы трансформированных клеток, необходимо исследуемый вектор проверить в опытах по трансфекции. Для получения трансформированных клеток, на наш взгляд, нужно использовать только проверенные векторы, а для этого наилучшим способом будет проверка в системе перmissive культур клеток в варианте «*A*-ген в транс-положении».

Вектор без *A*-гена. Трансформация клеток векторами на основе *SV40* может происходить без участия *T*-антигена. Такие векторы (без *T*-антигена) можно использовать для генотерапии.

A-ген в цис-положении. Чаще всего такая система предполагает иммортализацию клеток в культуре и использование трансформированных культур клеток, синтезирующих *T*-антиген и необходимый продукт.

A-ген в транс-положении. Практические примеры подобных систем нам не известны, однако можно предположить по аналогии с *TK*-геном вируса герпеса, что вполне вероятно получение трансформированных

клеточных линий при совместном введении двух плазмид, одна из которых ответственна за синтез *T*-антигена *SV40*. Такие клеточные линии могут служить источником определенных продуктов.

Следует отметить, что все варианты векторов без *A*-гена перспективны для введения во взрослый организм, так как не содержат онкогенов, а векторы, где *A*-ген содержится в цис- или транс-положениях, перспективны для практической медицины при получении биопрепарата.

Кроме того, прежде чем использовать вектор без *A*-гена, его следует проверить в системе котрансфекции, где *A*-ген находится в транс-положении, для выявления максимальной экспрессии.

Использование эукариотических векторов на основе *SV40* для биомедицины. Векторы на основе *SV40* можно применять в биомедицине как для имплантации нужных генов в организм, так и для получения лечебных препаратов. Рассмотрим обе эти возможности.

Одной из главных проблем генной терапии является доставка интактного гена. Наиболее целесообразно в этом случае использовать специально сконструированные эукариотические векторы, созданные на основе вирусов животных. Одним из перспективных векторов является именно геном вируса *SV40*. К настоящему времени уже известны работы, в которых с помощью векторов, созданных на основе *SV40*, удается трансформировать клетки костного мозга интактных животных.

Так, в работе Карлсона и др. [11] были сконструированы рекомбинантные вирусы на основе генома *SV40*. В ДНК *SV40* вместо области ранних генов был введен ген хлорамфениколацетилтрансферазы. Рекомбинантный *SV40* обеспечивал перенос и экспрессию гена хлорамфениколацетилтрансферазы в клетках костного мозга мышей и человека, а также в эритролейкозных клетках мышей и других линиях клеток крови.

Исследована также возможность инкапсидации плазмидной ДНК, содержащей геном *SV40*, в псевдовирсоны для введения нового генетического материала в клетки животных [12]. Инкапсидацию получали в обезьяньих клетках *COS*, которые конститутивно экспрессируют ранний белок вируса *SV40* (*T*-антиген), необходимый для репликации вирусной ДНК, при совместном введении с вирусом-помощником. Бактериальный ген *CAT* применяли в качестве модели для передачи генов. После инкапсидации псевдовирсоны использовали при инфекции человеческой эритролейкемической линии клеток *K562* и нормальных клеток костного мозга человека. Результаты свидетельствуют о высокой частоте передачи гена *CAT*. Свыше 40 % инфицированных клеток *K562* и 30 % инфицированных клеток костного мозга содержали плазмиду. Более того, авторы считают, что эффективность генной трансмиссии с помощью этого вектора может достигать 100 %. Естественно, что этот метод введения генов может быть использован только в случае получения препаратов псевдовирсонов, свободных от вируса-помощника, чтобы обеспечить надежный уровень безопасности, требуемый для генной терапии.

Представляет интерес работа с вектором *SV40*, обеспечившим введение прокариотического гена дигидрофолатредуктазы (ДФФР) в клетки костного мозга интактных животных [13]. В клетки костного мозга вводили плазмиду, содержащую бактериальный ген метотрексатустойчивой ДФФР, находящийся под контролем раннего промотора вируса *SV40*. Введение таких клеток в кровотоки летально облученных мышей приводило к увеличению продолжительности жизни реципиентов, которым вводили метотрексат, подавляющий активность собственной ДФФР мышей. В ДНК кровяных клеток селезенки, клеток костного мозга и клеток печени облученных мышей, выживших после введения метотрексата, обнаружены нуклеотидные последовательности плазмиды, а в белковых экстрактах селезенки и костного мозга — метотрексатустойчивая форма ДФФР.

Казакова и др. [14] трансформировали клетки костного мозга грызунов рекомбинантной плазмидой *pBRSV*, содержащей ген раннего белка (*T*-антигена) вируса *SV40*.

Была показана экстрахромосомная локализация рекомбинантной ДНК, выделенной из клеток селезенки мышей, которым вводили трансформированные клетки костного мозга.

Из вышесказанного ясно, что векторы, созданные на основе *SV40*, применяют для трансформации клеток интактных животных, в частности мышей, а ввиду того, что эти векторы обеспечивают трансформацию нормальных клеток костного мозга человека, они могут быть использованы и для целей генной терапии. Однако здесь можно отметить следующее. Трансформация клеток животных векторами на основе генома *SV40* без *A*-гена — чрезвычайно трудная задача. Поэтому более целесообразно использовать ретровирусные векторы. В настоящее время широко применяют культуры клеток, продуцирующие модифицированные ретровирусы, для трансформации клеток костного мозга интактных животных. Разработаны методы переноса генов с использованием ретровирусных векторов не только для мелких животных, например мышей [15], но и для крупных, таких как обезьяны [16].

С помощью векторов на основе *SV40* показан синтез в культурах клеток млекопитающих ценных биологических веществ, некоторые из них могут быть использованы в качестве лечебных препаратов. Так, путем замены либо ранних, либо поздних генов *SV40* клонированной копией гена гемагглютинаина вируса инфлюэнцы был сконструирован рекомбинантный вирус, который в зараженных клетках экспрессирует большие количества гемагглютинаина (в количестве 10^8 молекул на клетку), идентичного по молекулярной массе собственному гемагглютиниону вируса инфлюэнцы; он аккумулируется на поверхности клеток и обладает гемадсорбционной активностью [17].

При использовании клонированной в векторах *SV40* кДНК вируса гриппа получена активная нейраминидаза, которая гликозилируется и транспортируется к клеточной поверхности. Максимальный уровень ее наблюдается через 30—40 ч после трансфекции рекомбинантной ДНК [18]. С помощью вектора на основе *SV40* продемонстрирована экспрессия гена человеческого фибробластного интерферона при трансфекции обезьяньих клеток. Показана экспрессия двух генов гормона роста человека в клетках обезьян при трансфекции рекомбинантным вирусом *SV40* [19]. Культуры клеток млекопитающих продуцируют $8 \cdot 10^7$ молекул на клетку гормона роста в сутки. Продуцируемый клетками гормон накапливается в культуральной среде [20].

При использовании рекомбинантной плазмиды, содержащей фрагмент генома *SV40* и ген поверхностного антигена вируса гепатита, удалось показать синтез капсидного белка вируса в гликозилированной форме. Белок обладает антигенными свойствами и молекулярной массой, соответствующей истинному поверхностному антигену вируса гепатита, и выделяется в культуральную среду [21].

Ген инсулина человека в составе рекомбинантной ДНК под ранним промотором *SV40* вводили в культуры клеток *COS*, при этом был получен иммунологически активный проинсулин, выделяющийся в культуральную среду [22].

При котрансфекции клеток яичника китайского хомячка, дефицитных по ДГФР, плазмидами, содержащими кДНК гена человеческого антитромбина III под ранним промотором *SV40*, и кДНК мышинной ДГФР получены клоны, экспрессирующие ген ДГФР. После амплификации метотрексатом различные клеточные линии секретировали до 22 мкг антитромбина на 10^6 клеток за 24 ч. Выделенный антитромбин III идентичен таковому из плазмы крови человека по иммунологическим критериям и биологической активности [23].

В заключение необходимо отметить, что в настоящее время биомедицина как отрасль практической медицины включает несколько разделов и, по-видимому, возможности молекулярной биологии и ген-

ной инженерии могут быть реализованы в следующих направлениях: а) создание молекулярных зондов для выявления возбудителей заболевания, особенно это касается вирусных инфекций (диагностика); б) установление природы заболевания с невыясненной этиологией (диагностика); в) получение лечебных препаратов биологическим способом (например, в прокариотической системе клеток или в культуре клеток млекопитающих); г) генотерапия.

Первые два направления касаются улучшения способов диагностики различных заболеваний, а вторые призваны улучшить способы их лечения. Вирус SV40 может быть использован как для получения биопрепаратов, так и для генотерапии.

Вопрос о возможностях SV40 как вектора для синтеза определенного продукта в культуре клеток уже рассматривался.

Сейчас отметим особенности векторов на основе SV40 для генотерапии.

1. Небольшие размеры регуляторных последовательностей.
2. Наличие двух промоторов и энхансеров, дающее возможность использовать более сильный ранний или более слабый поздний промоторы, а также, применяя блок энхансеров, усиливать транскрипцию и экспрессию с промотора SV40.
3. Возможность интеграции в клетки млекопитающих, в том числе в клетки человека.
4. Интеграция в геном клеток векторов на основе SV40, происходящая без участия T-антигена, вызывающего злокачественную трансформацию.
5. Легко определяемая экспрессия исследуемого гена в различных модельных системах перед использованием рекомбинантной молекулы для генотерапии.
6. Использование векторов на основе SV40 для введения во взрослый организм (через клетки костного мозга).
7. Возможность экспрессии как прокариотических, так и эукариотических генов с помощью векторов на основе SV40.
8. Применение SV40 в сложных векторах, имеющих последовательность двух вирусов.

POSSIBILITIES OF USING VECTORS ON THE BASIS OF DNA SV40 FOR GENE THERAPY

S. M. Landau

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

It is shown possible to use eukaryotic vectors on the basis of vacuolating virus SV40 for introduction into animal organism and, even in perspective, into the human organism. The main advantages of SV40-based vectors are small sizes of regulatory sequences and ability to integrate into the mammalian cells, including the human cells, in the absence of T-antigen inducing malignant cell transformation.

1. *The genome of simian virus 40* / O. B. Reddy, B. Thimmappaye, R. Dhar et al. // Science.— 1978.—200, N 4341.— P. 494—502.
2. *Brady J., Loeken M. R., Khoury G.* Interaction between two transcriptional control sequences required for tumor antigen-mediated simian virus 40 late gene expression // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.—82, N 21.— P. 7299—7303.
3. *Tjian R.* T-antigen binding and the control of SV40 gene expression // Cell.— 1981.—26, N 1—2.— P. 1—2.
4. *Green M. H., Brooks T. L.* Recently replicated simian virus 40 DNA is a preferential template for transcription and replication // J. Virol.— 1978.—26, N 2.— P. 325—334.
5. *Expression of simian virus 40 early and late genes in mouse oocytes and embryos* / L. E. Chalilour, D. O. Wirak, P. M. Wassarman, M. L. de Pamphilis // Ibid.— 1986.— 59, N 3.— P. 619—627.

6. Subbanaidu R. Unintegrated viral sequences in rat cells transformed by simian virus 40 and a temperature sensitive A gene mutant // Cell Biol. Int. Repts.—1983.—7, N 9.—P. 735—743.
7. Sharon E., Wang J. Transcription of the human β -globin gene is stimulated by an SV40 enhancer to which it is physically linked but topologically uncoupled // Cell.—1986.—45, N 4.—P. 575—580.
8. Robbins P. D., Rio D. C., Botchan M. R. Transactivation of the simian virus 40 enhancer // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 4.—P. 1283—1295.
9. Activation of gene expression is adversely affected at high multiplicities of linked simian virus 40 enhancer / R. Kumar, T. A. Firak, C. T. Schroll, K. N. Subramanian // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 10.—P. 3199—3203.
10. Lusk M., Botchan M. Inhibition of SV40 replication of simian cells by specific pBR322 DNA sequences // Nature.—1981.—293, N 3.—P. 79—81.
11. Transfer of genes into hematopoietic cells using recombinant DNA viruses / S. Karlsson, R. K. Humphries, J. Gluzman, A. W. Wienhuis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 1.—P. 158—162.
12. Efficient introduction of plasmid DNA into human hematopoietic cells by encapsidation in simian virus 40 pseudovirions / A. Oppenheim, E. Peleg, E. Fibach, E. Rachmilewitz // Ibid.—1986.—83, N 18.—P. 6925—6929.
13. Введение бактериального гена дигидрофолатредуктазы в колониеобразующие клетки костного мозга мыши / А. В. Титомиров, А. Е. Переверзев, Л. И. Степаньян и др. // Цитология.—1985.—27, № 10.—С. 1183—1189.
14. Трансформация клеток костного мозга грызунов рекомбинантной плазмидой pBRSV / Т. Б. Казакова, В. А. Шатов, И. А. Вербина и др. // Там же.—1986.—28, № 12.—С. 1345—1350.
15. Bing L., David W. A., Orkin S. Retrovirus-mediated gene transfer of human adenosin-deaminase: expression of functional enzyme in murine hematopoietic stem cells *in vivo* // Mol. and Cell. Biol.—1987.—7, N 10.—P. 3459—3465.
16. Gene transfer and expression in nonhuman primates using retroviral vectors / W. F. Anderson, P. Kantoff, M. Eglitis et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1986.—41, pt 2.—P. 1073—1081.
17. Getnig M. Y., Sambrook J. Cell-surface expression of influenza haem-agglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene // Nature.—1981.—293, N 5834.—P. 620—625.
18. Active influenza virus neuraminidase is expressed in monkey cells from cDNA cloned in simian virus 40 vectors / D. Alan, R. Bos, J. Timothy, D. Nayak // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 13.—P. 3976—3980.
19. Sequences involved in the regulated expression of the human interferon- β_1 gene in recombinant SV40 DNA vectors replicating in monkey cells / J. Marteaux, C. Kahana, J. Mory et al. // EMBO J.—1983.—2, N 3.—P. 325—332.
20. Expression of two human growth hormone genes in monkey cells infected by simian virus 40 recombinants / G. N. Pavlakis, N. Hizuka, P. Gorden et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 12.—P. 7398—7402.
21. Crowley C. W., Liu C.-C., Levinson A. D. Plasmid directed synthesis of hepatitis B surface antigen in monkey cells // Mol. and Cell. Biol.—1983.—3, N 1.—P. 44—55.
22. Laub O., Rutter W. J. Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 10.—P. 6043—6050.
23. Zeitlmeissl G., Ragg M., Karges H. E. Expression of biologically active human antithrombin III in chinese hamster ovary cells // Biotechnology.—1987.—5, N 7.—P. 13—22.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 16.09.88

УДК 612.349.7.018

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА α_1 -АНТИТРИПСИНА ЧЕЛОВЕКА И ВОЗМОЖНЫЕ АСПЕКТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Н. С. Незнанов, И. В. Макарова, И. А. Крамерова, К. Г. Газарян

Введение. α_1 -антитрипсин (α_1 АТ) — один из основных белков сыворотки крови. Этот белок входит в состав семейства белков — ингибиторов протеаз — и подавляет активность эластазы. Анализ сывороток крови различных людей позволил выявить значительную гетерогенность α_1 АТ [1]. Наиболее распространенные его формы получили обозначения М (дикий тип), S и Z [2]. Люди, гомозиготные по S-форме, содержат в плазме крови около 60 % [2], а по Z-форме — лишь 10—15 % от уровня этого белка у гомозиготных по M-форме [3]. В настоящее время из-