

# Создание системы для переноса генов посредством ретровируса на основе Pr-RSV-C с расширенной хозяйской специфичностью

И. В. Кайда, Л. А. Цыба, П. Н. Болтовец, В. И. Кашуба

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

*Провирус адаптированного к уткам варианта вируса Pr-RSV-C и его трансформационно-дефектного мутанта послужил основой для создания репликативно-компетентного вектора *td da Pr-RSV-C e* и вируса-помощника *td da Pr-RSV-C e PS<sup>Neo</sup>*, необходимого для упаковки репликативно-дефектного ретровирусного вектора. Для снижения вероятности включения клеточных проонкогенов в состав ретровирусного вектора последовательности E-элемента, предположительно вовлеченные в этот процесс, делетированы. Было показано, что QТ6-клетки, трансформированные последовательностями вируса-помощника *td da Pr-RSV-C e PS<sup>Neo</sup>* продуцируют вирусные белки, в том числе p27gag, на уровне, необходимом для сборки репликативно-дефектного ретровирусного вектора. Помимо этого, из-за модифицирования генома вируса-помощника не происходит включения его собственной РНК в состав вириона и сборки полноценной инфекционной вирусной частицы. Это подтверждается тестированием супернатантов упаковочных клонов методом обратной транскрипции: большинство из них не показывают включения [<sup>3</sup>H]ТТР в реакции обратной транскрипции, характерного для репликативно-компетентного вируса.*

**Введение.** Ретровирусы нашли широкое применение как векторы для переноса эндогенных последовательностей в эукариотические клетки благодаря их уникальной способности интегрировать в специфические участки генома клетки-хозяина [1]. Последовательности вирусных генов в ретровирусном векторе частично или полностью заменяют на чужеродные кодирующие последовательности, которые в составе вирусной частицы проникают в клетку. Таким образом можно добиться переноса и стабильной экспрессии кодирующих последовательностей величиной 7—10 тыс. пар нуклеотидов (п. н.) в делящихся клетках *in vitro* и *in vivo*. Применение ВИЧ в качестве вектора дало возможность получить экспрессию трансгена и в неделящихся клетках [2].

Поскольку рекомбинантный ретровирусный вектор репликативно дефектен из-за отсутствия собственных структурных генов, полностью или частично замещенных на чужеродные, то для получе-

ния инфекционных частиц такому репликативно-дефектному векторному вирусу необходим вирус-помощник. Поэтому были созданы упаковочные клеточные линии, экспрессирующие вирусные белки, в которых происходит «сборка» рекомбинантного ретровирусного вектора без продукции репликативно-компетентного вируса дикого типа [3, 4]. Подробно о репликативно-дефектных ретровирусных системах для переноса генов у птиц см. [5].

Трансформационно-дефектный мутант адаптированного к уткам варианта пражского штамма вируса саркомы Рауса (*td da Pr-RSV-C*), выделенный из вирусного пула *td da Pr-RSV-C* с расширенной хозяйской специфичностью [6], был использован при создании упаковочных клеток как вирус-помощник. Модифицирование исходного провируса *td da Pr-RSV-C* направлено на исключение продукции репликативно-компетентного вируса упаковочными клетками: делетирование сигналов упаковки делает невозможным включение собственной геномной РНК в состав псевдотипированного вириона, несущего РНК репликативно-дефектного вектора, продуцируемого упаковочными клетками.

Включение вместо *src*-гена последовательностей гена неомидинфосфотрансферазы под промотором вируса SV40 позволяет вести селекцию упаковочных клеток в культуре.

Хозяйская специфичность векторного вируса и спектр клеток-мишеней зависит от *Env*-белка оболочки вириона [7]. Расширение хозяйской специфичности произошло в течение повторяющихся пассажей Pr-RSV-C на клетках условно-пермиссивного хозяина — утки. Полученный таким образом вирус был назван адаптированным и отличался от Pr-RSV-C, в основном, последовательностями, кодирующими *gp85* домен гена *env*, ответственный за узнавание вирусом соответствующего рецептора на поверхности клетки [8]. Благодаря таким изменениям адаптированный да Pr-RSV-C может инфицировать клетки не только условно-пермиссивного хозяина — утки, но и клетки млекопитающих [9]. Вирусные последовательности интегрируют, однако вирусная продукция отсутствует. Причиной может быть нарушение транспорта полноразмерной геномной РНК в цитоплазму, а также невозможность эффективного процессирования, сборки и транспортировки *Gag*-предшественника в клетках млекопитающих [10]. Однако это не мешает стабильной экспрессии вставленного гена в тканях трансгенных млекопитающих [11], инфицированных репликативно-компетентным векторным вирусом на базе RSV, несущим вместо *src* последовательность вставленного гена под контролем тканеспецифического промотора. Тот факт, что вирус полностью репликативно-дефектен в клетках млекопитающих, открывает возможность использовать репликативно-компетентный вектор на его основе для переноса чужеродных генов в ткани млекопитающих и делает *td da Pr-RSV-C* особенно привлекательным как вектор для генной терапии.

Однако интеграция ретровируса в геном животного может привести к трансдукции клеточных протоонкогенов и восстановлению трансформационных свойств векторного вируса [12]. Чтобы уменьшить вероятность этого процесса, участок генома *td da Pr-RSV-C*, названный E-элементом [13] и предположительно вовлеченный в этот процесс (Я. Свобода, частное сообщение), deletировали при создании конструкции репликативно-компетентного векторного вируса *td da Pr-RSV-C e* и вируса-помощника *td da Pr-RSV e PS Neo*.

**Материалы и методы. Плазмиды.** Из ДНК клона DF3 геномной библиотеки утиных эмбриональных фибробластов, содержащего полный провирус *da Pr-RSV-C* [8], выделен *KpnI-KpnI*-фрагмент 6,0 тыс. п. н. и субклонирован в плазмиде *pUC19* (*p6.0*, рис. 1). Этот фрагмент несет последо-

вательности 5'-LTR, *gag*, *pol*. Из клона DFtd7 [8], содержащего дефектный провирус *td da Pr-RSV-C*, выделили *KpnI-DraI*-фрагмент, включающий последовательности *env*, E-элемента и 3'-LTR *td da Pr-RSV-C*, и субклонировали в плазмиде *pUC19* (*p2.8*, см. рис. 1). *pSV2-βG* [14] содержит последовательности Simian Virus 40 (SV40) промотора. Бактериальный ген устойчивости к неомидину (G 418) взят из *pBR322Neo* [14].

**Ферменты.** В работе использованы эндонуклеазы рестрикции («Boehringer Mannheim», Германия), Т4-ДНК-лигаза («Promega», США), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* («Boehringer Mannheim»).

**Клетки и среды.** QT6 [15] (химически трансформированные фибробласты перепелки, свободные от эндогенных последовательностей) любезно предоставлены д-ром Г. Калоти (Ин-т Кюри, Франция) и д-ром Я. Гериком (Ин-т молекулярной генетики Чешской Академии Наук, Чехия). QT6-клетки культивировали на среде DMEM/F10 (1:1) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Биопол», Россия) и 1 % куриной сыворотки (Ин-т молекулярной генетики ЧАН). Гибридные клетки линии NY.21.6 (E. Humfries), продуцирующие anti-*p27gag*-антитела, также любезно предоставлены д-ром Я. Гериком, культивировали на среде DMEM/F10 (1:1) с добавлением 10 % телячьей сыворотки («Sigma», США).

**Трансфекция.** Плазмидную ДНК вводили в клетки QT6 методом электропорации [16]: 750 тыс. клеток трансформировали 1 мкг плазмидной ДНК током импульсом 1,5 кВ/см в течение 100 мкс. Затем высевали трансформированные клетки по 500 тыс. на чашку диаметром 60 мм и селектировали на среде с добавлением G 418 («GIBCO BRL», США) (60 мкг/мл) в течение 14 дней. Индивидуальные клоны отбирали с помощью цилиндров для клонирования.

**Определение вирусных белков методом ELISA.** Продукцию вирусных белков детектировали методом твердофазного иммуоферментного анализа с anti-*p27gag*-антителами [17]. *p27gag* кодируется геном *gag* и является капсидным белком вириона.

Anti-*p27gag* получали из гибридомы NY.21.6 (титр менее 1 мкг антител в 1 мл культуральной среды). Для повышения титра антител гибридому пассировали в линейных мышцах BALB/c. У трехмесячных самцов индуцировали асцит внутрибрюшинным введением 400 мкл пристана («Seriva», Германия). Через две недели в образовавшуюся опухоль вводили 1,2 млн клеток NY.21.6 и через 14 дней провели забор асцитной жидкости из образовавшегося асцита. Иммуноглобулины фракциони-

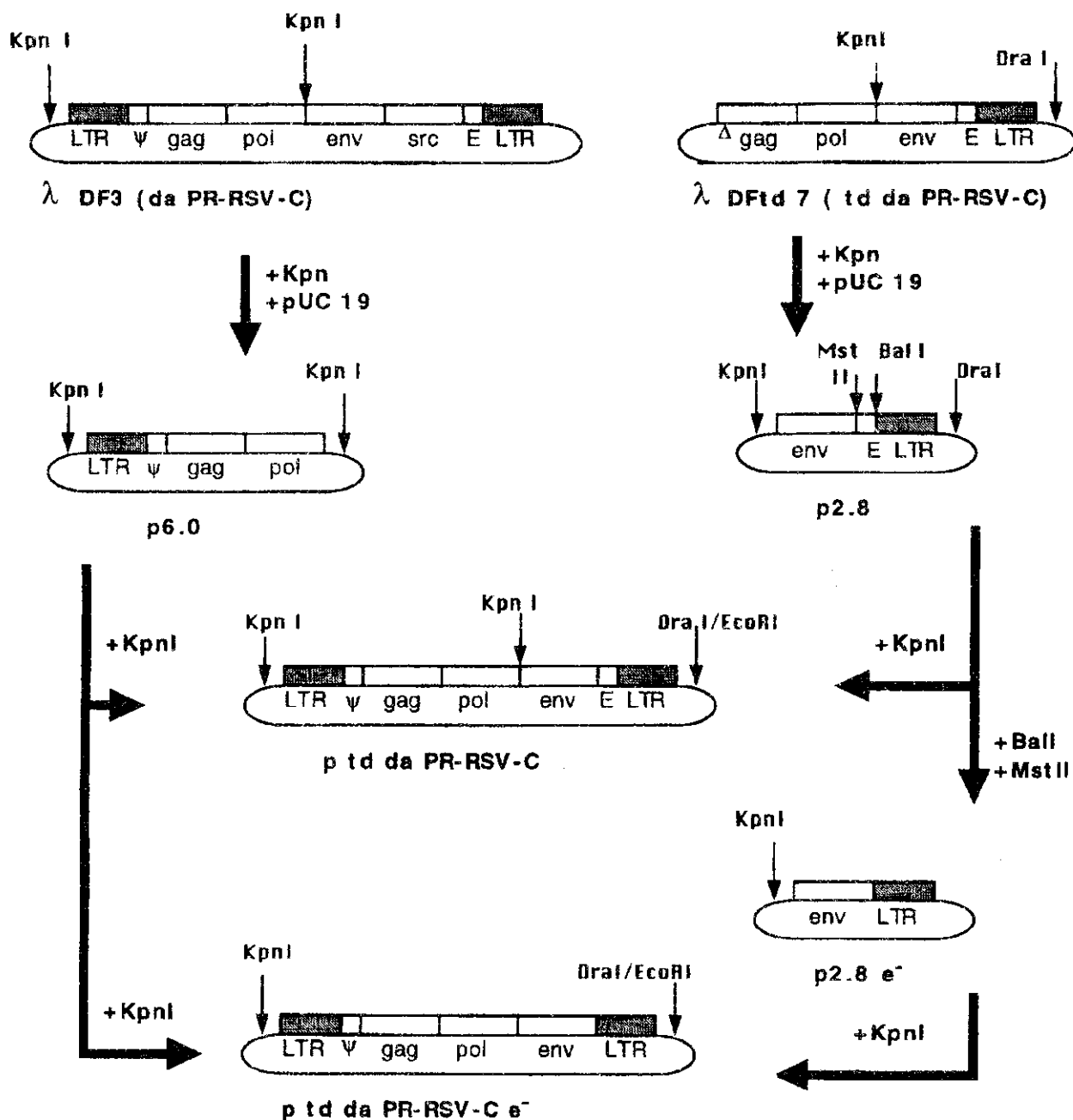


Рис. 1. Схема получения провируса репликативно-компетентного трансформационно-дефектного вируса саркомы Рауса (p td da PR-RSV-C) и удаления E-элемента. Прямоугольниками обозначены ретровирусные гены *gag*, *pol*, *env*, а также последовательности E-элемента, упаковочные последовательности ( $\psi$ ) и LTR. Бактериальная часть конструкции показана тонкой изогнутой линией

ровали методом осаждения в 50 %-м сульфате аммония [18].

Продукцию *p27gag* определяли в супернатантах и клеточных лизатах упаковочных клеток.

Трипсинизированные клетки осаждали в течение 3 мин при 1500 об/мин, суспендировали в 200 мкл фосфатного буфера и лизировали двукратным размораживанием — оттаиванием. Клеточные облом-

ки осаждали центрифугированием (10 мин, 8000 об/мин), а полученный лизат отбирали и определяли *p27gag* в 0,2 мкг суммарного белка [17].

Для тестирования супернатанта упаковочных клеток на наличие *p27gag* снятый с клеток супернатант центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин для освобождения от дебриса, а затем 50 мкл супернатанта применяли в одной реакции ELISA.

Для определения *p27gag* использовали прямой ИФА [17] с anti-*p27gag* в количестве 0,8 мкг в лунку. Биотинилированные антитела кролика против IgG мыши («ДиаГен», Россия) в разведении 1:500 и авидин-пероксидазу («Sigma») (1:1500) применяли для тестирования клеточных лизатов на наличие *p27gag*, а для тестирования клеточных супернатантов пользовались конъюгатом кроль — антимышь, меченным пероксидазой, в разведении 1:800.

*Определение вирусной продукции обратной транскрипцией.* Супернатант упаковочных клонов центрифугировали (15 мин, 3000 об/мин) для осаждения дебриса. Для одной реакции обратной транскрипции использовали систему: 15 мкл супернатанта упаковочного клона; 1 мкМ водный р-р [<sup>3</sup>H]ТТР (5 · 10<sup>9</sup> имп/мин) («Amersham», Англия); 5 мкг poly(rA) · pdT12-18 («Promega»); 10 мМ трис-HCl, pH 7,4; 10 мМ дитиотреитол; 5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,05 % тритон X-100 («Merck», Германия).

Обратную транскриптазу определяли в течение 1 ч при температуре 42 °С. Включение [<sup>3</sup>H]ТТР выявляли, используя DE 81 («Whatman», США). Несвязавшиеся трифосфаты отмывали 5 %-м раствором гидрофосфата натрия и после высушивания подсчитывали количество имп/мин на счетчике радиоактивности «Beckman» (США), пользуясь сцинтилляционной жидкостью «Beckman».

*Результаты и обсуждение.* Основной для создания провирусов репликативно-компетентного вектора и вируса-помощника служили последовательности адаптированного к уткам варианта вируса саркомы Рауса и его трансформационно-дефектного мутанта. Адаптированный к уткам вариант Pr-RSV-C с расширенной хозяйской специфичностью [8] выделен из геномной библиотеки эмбриональных фибробластов уток, трансформированных *in vitro* Pr-RSV-C и прошедших 30 пассажей в культуре клеток [6]. Из ДНК клона DF3, содержащего полный провирус da Pr-RSV-C, выделен *KpnI-KpnI*-фрагмент (см. рис. 1) и субклонирован в *pUC19* (*p6.0*). Этот фрагмент включает в себя 5'-LTR, гены *gag*, *pol*. В то же время из клона DFtd7, содержащего последовательности трансфор-

мационно-дефектного мутанта td da Pr-RSV-C, выделен *KpnI-DraI*-фрагмент, состоящий из последовательностей 3'-LTR, 3'-нетранслируемого района, включая E-элемент, а также гена *env*, и субклонировали в *pUC19* (*p2.8*). Клонированный провирус td da Pr-RSV-C имеет неполный *gag*-ген и не содержит 5'-LTR. Этот дефект был устранен за счет аналогичных последовательностей da Pr-RSV-C. Для этого рекомбинантную плазмиду *p2.8* расщепляли по *KpnI*-сайту и лигировали с *KpnI-KpnI*-фрагментом из плазмиды *p6.0*. Полученный рекомбинант содержал 5'-LTR и гены *gag*, *pol* из провируса da Pr-RSV-C, а также ген *env* и 3'-LTR из провируса td da Pr-RSV-C. Таким образом получили провирус репликативно-компетентного трансформационно-дефектного мутанта da Pr-RSV-C и базовую конструкцию для создания провируса репликативно-компетентного вектора p td da Pr-RSV-C e и вируса-помощника p td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS<sup>+</sup>Neo.

Для предотвращения восстановления трансформирующих свойств векторного вируса при пассировании его *in vivo* делетировали E-элемент [19], обрабатывая *p2.8* эндонуклеазами *BalI* и *MstII*. Размер внесенной делеции составил около 100 н. п. *p2.8e<sup>+</sup>* обрабатывали эндонуклеазой *KpnI* и лигировали с *KpnI-KpnI*-фрагментом плазмиды *p6.0*. Плазмида p td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>, являющаяся провирусом репликативно-компетентного вектора, стала основой для создания конструкции вируса-помощника.

Экспрессия структурных генов ретровирусов *gag*, *pol*, *env* была получена введением в культуру перепелиных клеток QT6 клонированного в составе бактериальной плазмиды *pUC19* провируса вируса-помощника p td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS<sup>+</sup>Neo. Ген устойчивости к G 418, необходимый для ведения селекции в культуре клеток, поместили под внутренним промотором вируса SV40 для усиления его транскрипции [20, 21]. Фрагмент с последовательностями SV40 промотора лигировали с *HindIII-BamHI*-фрагментом, несущим последовательность гена неоминифосфотрансферазы, в составе *pBR322* (рис. 2). *Nhe-EcoRI*-фрагмент *pBR322* SV40Neo включили в состав *p2.8e<sup>+</sup>* по *SacI*. Для того чтобы предотвратить упаковку собственной РНК вируса-помощника, в его провирусе необходимо делетировать сигналы упаковки, расположенные между 5'-LTR и *gag*-инициирующим кодоном [22]. Для этого в *p6.0* удалили *BstII-PstI*-фрагмент длиной 100 н. п. в 5'-нетранслируемой области (см. рис. 2). Конструкция вируса-помощника p td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS<sup>+</sup>Neo получена лигированием *p6.0* PS<sup>+</sup> и *p2.8e<sup>+</sup>*Neo по *KpnI*-сайту.

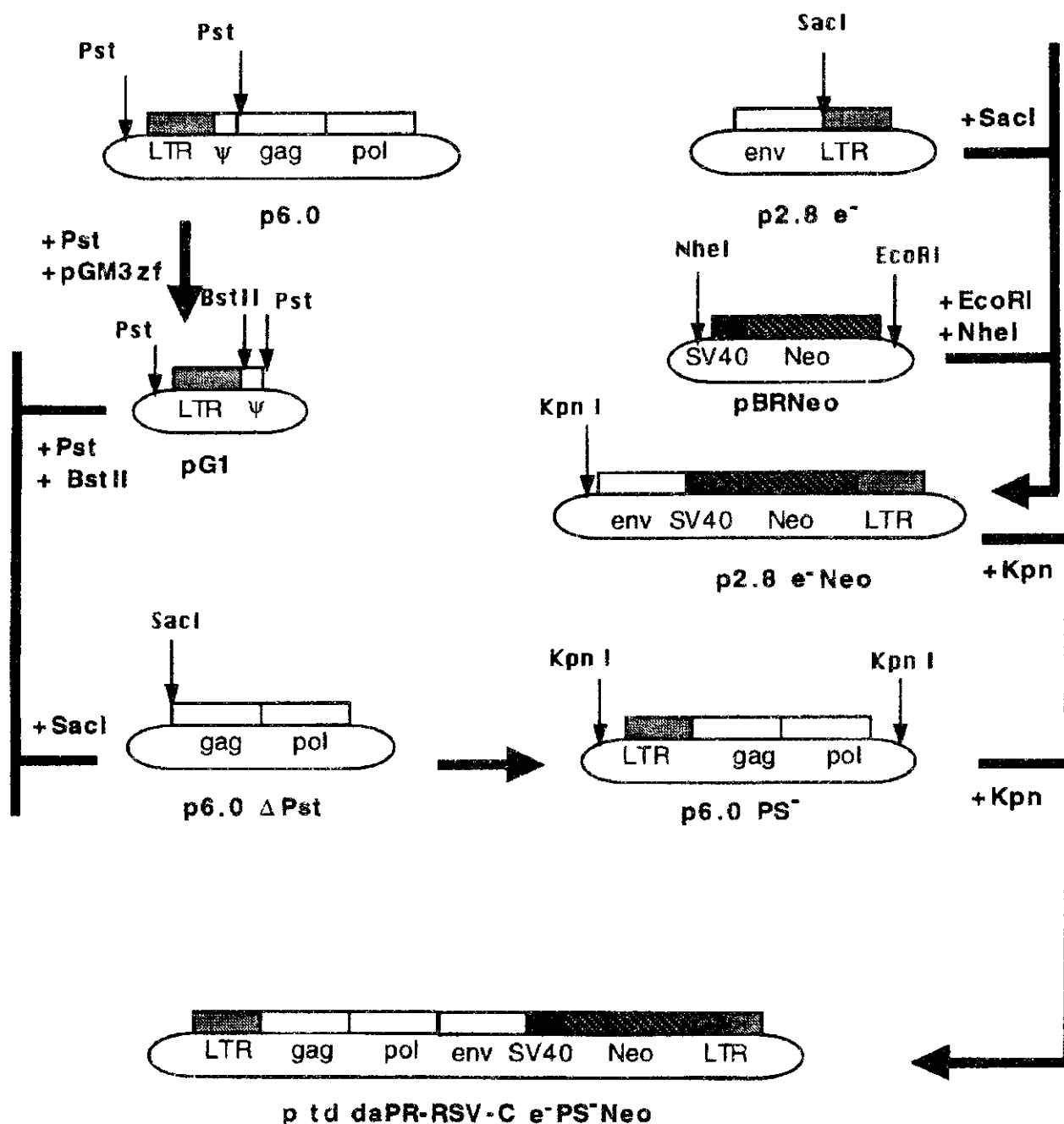


Рис. 2. Схема создания конструкции вируса-помощника. Часть конструкции, относящаяся к бактериальному вектору, обозначена тонкой изогнутой линией. Ретровирусные гены *gag*, *pol*, *env*, а также упаковочные последовательности ( $\psi$ ) и LTR обозначены прямоугольниками. *Neo* — ген неомидифосфотрансферазы; SV40 — промотор вируса SV40. Стрелками указаны сайты для соответствующих рестриктаз

ДНК вируса-помощника p td da Pr-RSV-C e-PS<sup>-</sup>Neo трансфекцией вводили в клетки QT6. Использование для электропорации тока импуль-

сом 1,5 кВ/см в течение 100 мкс было достаточным для эффективного проникновения ДНК в клетки QT6 (эффективность трансфекции составила 21

колонию на 1 мкг плазмидной ДНК) и не оказало значительного повреждающего действия на клеточную мембрану: только около 10 % трансформированных клеток утратили жизнеспособность в результате воздействия током. После недельной селекции на среде с G418 было отобрано 18 индивидуальных клонов. Их клеточный супернатант проверяли на наличие репликативно-компетентного вируса методом обратной транскрипции (таблица), что позволило сделать вывод о полноте внесенной делеции сигналов упаковки в конструкции вируса-помощника. Большинство клонов не показали включения [<sup>3</sup>H]ТТР в реакции обратной транскрипции. Однако при длительном пассировании (7—9 пассажей) прослеживалась тенденция к увеличению счета, регистрируемого после реакции обратной транскрипции (F18), а F3 и F33 показали счета, аналогичные da Pr-RSV-C на QT6.

Десять из упаковочных клонов тестировали на продукцию вирусного *p27gag* в клеточном лизате (см. таблицу). В качестве отрицательного контроля использовали лошадиный сывороточный альбумин. Достаточно высокий уровень положительного сигнала при тестировании клеточного лизата QT6-клеток можно отнести на счет возможного связывания конъюгата с клеточными белками [17]. При-

сутствие *p27gag* обнаружено и в клеточном супернатанте упаковочных клонов, однако четкой корреляции между уровнем продукции *p27gag* в клеточном лизате и в супернатанте упаковочных клеток, описанных в работе [23], в нашем случае не наблюдалось. Этот факт, скорее всего, связан с маскировкой истинного связывания моноклональных anti-*p27gag*-антител с антигеном из-за присутствия в клеточном супернатанте агента, препятствующего эффективному связыванию комплекса антиген — антитело с конъюгатом кроль — антимышь. Возможно, это связано с наличием эмбриональной телячьей сыворотки и куриной сыворотки в клеточном супернатанте. Таким образом, было доказано, что упаковочные клетки, созданные на базе последовательностей трансформационно-дефектного мутанта, адаптированного к уткам варианта Pr-RSV-C, способны продуцировать вирусные белки в QT6-клетках на уровне, сопоставимом с таковым у клеток, содержащих последовательности полного провируса da Pr-RSV-C и необходимым для упаковки репликативно-дефектного ретровирусного вектора.

При создании конструкции вируса-помощника мы ограничились минимальными изменениями в последовательности da Pr-RSV-C, которые необхо-

Продукция *p27gag* и обратнотранскриптазная активность упаковочных клонов

Клон	Включение [ <sup>3</sup> H]ТТР в реакции обратной транскрипции, имп/мин	<i>p27gag</i> в клеточном лизате, OD405*	<i>p27gag</i> в клеточном супернатанте, OD405*
F33	5500	—	—
F3	3500	—	—
F5	184	2,497	2,230
F9	156	2,507	—
F16	140	2,100	1,350
F18	722	3,050	1,520
F19	144	1,900	2,400
F20	116	1,508	2,250
F25	176	1,703	2,200
F26	146	1,823	2,300
F28	602	1,670	2,250
F34	134	1,413	1,600
QT6	180	1,480	1,100
QT6-daPr-RSV	1378	2,341	2,601
JICA**	—	0,172	0,132

П р и м е ч а н и е. \*Уровень продукции *p27gag* в клеточных лизатах и супернатантах упаковочных клонов, определенный ELISA; \*\*лошадиный сывороточный альбумин.

димы для предотвращения упаковки РНК вируса дикого типа и селекции упаковочных клонов в культуре клеток. Столь популярный в последние годы подход, заключающийся в глубоком модифицировании последовательностей вируса-помощника для предотвращения рекомбинаций с векторным вирусом за счет включения последовательностей различных ретровирусов в состав конструкции вируса-помощника: LTR одного вируса, polyA другого [24]; а также в разнообразном модифицировании *env* [25], введении внутренних промоторов и амплификации вирусных генов [26], повлек за собой проблему неустойчивости получаемого ретровирусного вектора. При пассировании такого химерного вектора в культуре клеток наряду с низким титром отмечают высокую частоту deletирования различных последовательностей, что часто приводит в конечном итоге к элиминации популяции химерного векторного вируса — он не выдерживает давления отбора в культуре клеток.

Главное ограничение всякой репликативно-дефектной системы — отсутствие репликативно-компетентного вируса в пуле продуцируемого упаковочными клетками репликативно-дефектного векторного вируса. Основными причинами восстановления репликативной компетентности считают гомологическую рекомбинацию между последовательностями векторного вируса, вируса-помощника, эндогенных вирусов и их «обломков». Модифицируя вирус-помощник и подбирая соответствующий вектор в опухолевых клетках, не несущих эндогенных последовательностей [24, 27], либо в клетках животного иного вида [24] решают на какое-то время проблему широкого распространения репликативно-компетентного или восстановления вируса дикого типа, имеющих селективное преимущество перед репликативно-дефектным вектором.

Наличие высокого уровня «шума» в репликативно-дефектных системах, а также их небольшая продуктивность сместили их с лидирующих позиций в системах для переноса генов. Однако, несмотря на более высокую продуктивность и технологичность аденовирусных, полиомавирусных и липосомных систем, заманчивую возможность встраивать гены непосредственно в геном и наследовать их по меньшей мере в двух поколениях трансгенных животных предоставляют только ретровирусы. Исследования, проведенные с репликативно-дефектными системами, а также работы последних лет, касающиеся расширения хозяйской специфичности птичьих ретровирусов, показывают значительные преимущества применения птичьих репликативно-компетентных систем для переноса

генов в клетки млекопитающих: репликативно-компетентный вектор генетически более стабилен, чем репликативно-дефектный; для его наработки нет необходимости в упаковочных клетках, а пассирование его на CEF-0 (свободных от эндогенных последовательностей) дает достаточно высокую продукцию векторного вируса [10, 11]. Поскольку RSV полностью репликативно-дефектен в клетках млекопитающих, это открывает возможность применения векторов на его основе в генной терапии.

Авторы выражают благодарность С. В. Зубаку и А. И. Михайлику за участие в создании ретровирусных конструкций; С. М. Серову — за помощь в создании упаковочных клеток; К. Д. Маковой — за участие в получении anti-p27gag и Л. Л. Сидорик — за помощь в обработке параметров ELISA системы для определения вирусного p27gag.

*И. В. Кайда, Л. А. Циба, П. Н. Болтовець, В. І. Кашуба*

Створення системи для ретровірусного переносу генів за допомогою векторного вірусу на базі Pr-RSV-C з розширеною хазяйською специфічністю

Резюме

*Провірус адаптованого до качок варіанту вірусу Pr-RSV-C та його трансформаційно-дефектного мутанту став основою для створення репликативно-компетентного вектора *td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>* та вірусу-помічника *td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS Neo*, необхідного для упаковки репликативно-дефектного ретровірусного вектора. Для того щоб знизити вірогідність включення клітинних протоонкогенів до складу ретровірусного вектора, послідовності E-елементу, які можуть бути залучені до цього процесу, deletовано. Було показано, що QT6-клітини, трансформовані послідовностями вірусу-помічника *td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS Neo*, продукують вірусні білки, зокрема p27gag, у кількості, необхідній для складання репликативно-дефектного ретровірусного вектора. Геном вірусу-помічника модифіковано таким чином, що його власна РНК не включається до складу віріону та не відбувається складання повноцінної інфекційної частинки. Цей факт підтверджено тестуванням супернатантів пакуючих клонів методом зворотньої транскрипції: більшість з них не показала включення Н-ТТР у реакції зворотньої транскрипції, характерного для репликативно-компетентного вірусу.*

*I. V. Kaida, L. A. Tsyba, P. N. Boltovets, V. I. Keshuba*

A new retroviral vector system based on the duck-adapted variant of Pr-RSV-C with the extended host ranger

Summary

*We have constructed retroviral vector *td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>* and helper virus *td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS Neo* based on the duck-adapted variant of Pr-RSV-C with the extended host ranger and its transformation-defective mutant. To decrease the risk of transducing cell protooncogenes, E-element, supposedly involved in this process, was deleted. In order to obtain helper cell line the QT6 cells have been transfected by helper plasmid *p td da Pr-RSV-C e<sup>+</sup>PS Neo*. Packaging cells produce viral proteins, including p27gag, but intact helper virus is not detectable in reverse transcriptase assay.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zoubak S., Rynditch A., Bernardi G. Compositional bimodality and evolution of retroviral genomes // *Gene*.—1992.—119.—P. 207—213
2. Shimada T. Targeted gene transfer into CD4 positive cells by HIV based vectors // *Int. Symp. on Human Gene Therapy* (Sept. 10—13, 1995).—Inuyama and Nagoya, 1995.—P. 29.
3. Boerkoel C. F., Federspiel M., Salter D. W. et al. A new retroviral system based on the Bryan Strain of Rous Sarcoma Virus // *J. Virol.*—1993.—195.—P. 669—679.
4. Miller A. D. Retrovirus packaging cells // *Human Gene Therapy*.—1990.—1.—P. 5—14.
5. Кайда И. В., Рындич А. В. Применение ретровирусных векторов для целенаправленного переноса генов у птиц // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13, № 1.—С. 5—13.
6. Кашуба В. И., Зубак С. В., Рындич А. В. и др. Структура нового трансформационно-дефектного мутанта вируса саркомы Рауса // *Докл. АН СССР*.—1989.—304.—С. 206—208.
7. Bova-Hill C., Swanstrom R. Genetic analysis of the RSV subgroup D env gene: mammal-tropism correlates with temperature sensitivity of gp85 // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 2073—2080.
8. Кашуба В. И., Кавсан В. М., Рындич А. В. и др. Полная нуклеотидная последовательность адаптированного к клеткам уток варианта вируса саркомы Рауса // *Молекуляр. биология*.—1993.—27.—С. 436—450.
9. Vodor J., Svoboda J. The LTR, v-src, LTR provirus generated in the mammalian genome by src mRNA reverse transcription and integration // *J. Virol.*—1989.—63.—P. 1015—1018.
10. Barsov E., Hughes S. Gene transfer into mammalian cells by RSV-based retroviral vector with the host range of the amphotropic Murine Leukemia Virus // *Ibid.*—1996.—70.—P. 3922—3929.
11. Federspiel M., Bates P., Young J., Hughes S. A system for tissue-specific gene targeting: transgenic mice susceptible to subgroup A avian leukosis virus-based retroviral vectors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1994.—91.—P. 11241—11245.
12. Dezelee P., Barnier J., Geryk J. et al. New case of c-src gene transduction; the generation of virus PR 2257 // *Folia Biol. (Praga)*.—1994.—40.—P. 211—223.
13. *The molecular biology of RNA tumor virus* / Eds R. Weiss et al. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*—1985.—P. 580—585.
14. Southern P. J., Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter // *J. Mol. and Appl. Genet.*—1982.—1.—P. 327—341.
15. Moscovici C., Moscovici H., Jimenez M. et al. Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail // *Cell*.—1977.—11.—P. 95—103.
16. Погребной Л., Серов С., Кленцин В. и др. Экспрессия гена трансформирующего фактора роста типа 1, перенесенного рекомбинантным ретровирусным вектором в клетки A 431 // *Молекуляр. биология*.—1993.—27.—С. 833—838.
17. Clark D., Dougherty R. Detection of avian oncovirus group-specific antigens by the enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Gen. Virol.*—1980.—47.—P. 283—291.
18. *Monoclonal antibodies: principles and practice* // Ed. J. W. Goding.—New York: Acad. press, 1986.—P. 121—125.
19. Kashuba V., Zubak S., Rynditch A. et al. The nucleotide sequence of the region of src gene deletion in transformation-defective RSV adapted to semipermissive host cells // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17.—P. 3294
20. Emerman M., Temin H. M. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by unepigenetic mechanism // *Cell*.—1984.—39.—P. 459—467.
21. Emerman M., Temin H. Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6.—P. 792—800.
22. Katz R., Terry R., Skalka A. A conserved cis-acting sequence in the 5' leader of Avian Sarcoma Virus RNA is required for packaging // *J. Virol.*—1986.—59, N 1.—P. 163—167.
23. Savatier P., Bagnis C., Thoraval P. et al. Generation of a helper cell line for packaging avian leukosis virus-based vectors // *Ibid.*—1989.—63.—P. 513—522.
24. Dougherty J., Temin H. A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1987.—84.—P. 1197—1201.
25. Cosset F.-L., Ronfort C., Molina R. M. et al. Packaging cells for avian leukosis virus-based vectors with various host ranges // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 5671—5676.
26. Boris-Lavrie K. A., Temin H. M. Recent advances in retrovirus vector technology // *Curr. opinion in Genet. and Develop.*—1993.—3.—P. 102—109.
27. Cosset F.-L., Legras C., Savatier P. et al. A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate trans-complement in helper genomes // *J. Virol.*—1990.—64.—P. 1070—1078.

УДК 577.21+578.828  
Поступила в редакцию 21.05.97