

Авторы чрезвычайно благодарны А. А. Ковальской за предоставленный ею олигонуклеотидный зонд.

CLONING OF HUMAN α_1 -ANTITRYPSIN GENE AND POSSIBLE ASPECTS OF ITS UTILIZATION

N. S. Neznanov, I. V. Makarova, I. A. Kramerova, K. G. Gazaryan

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
Institute of Medical Biotechnology, Ministry of Public Health, Moscow

Summary

The human α_1 -antitrypsin gene has been cloned. A cDNA molecule, containing almost the whole coding sequence is isolated. Nucleotide sequence is determined for the regulatory region of α_1 AT gene, responsible for its expression in the liver. The possibility to use cloned genes for the gene therapy of some diseases is discussed.

1. *Fagerhol M. K., Cox D. W.* The Pi polymorphism: genetic, biochemical and clinical aspects of human α_1 antitrypsin // *Adv. Hum. Genet.*—1981.—11, N 1.—P. 1—62.
2. *Complete* sequence of the cDNA for human α_1 antitrypsin and the gene for the S variant / *G. L. Long, T. Chandra, S. L. C. Woo et al.* // *Biochemistry.*—1984.—23, N 21.—P. 4828—4837.
3. α_1 antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene / *V. J. Kidd, R. B. Wallace, K. Itakura, S. L. C. Woo* // *Nature.*—1983.—304, N 5923.—P. 230—234.
4. *Woo S. L. C.* A sensitive and rapid method for recombinant phage screening // *Meth. Enzymol.*—1979.—68.—P. 389—405.
5. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 12.—P. 5463—5467.
6. *The isolation and characterization of a linked δ - and β -globin gene from a cloned library of human DNA / R. W. Lawn, E. F. Fritsch, R. C. Parker et al.* // *Cell.*—1978.—15, N 4.—P. 1157—1174.
7. *Perlino E., Cortese R., Ciliberto G.* The human α_1 antitrypsin gene is transcribed from the two different promoters in macrophages and hepatocytes // *The EMBO J.*—1987.—6, N 9.—P. 2767—2771.
8. *Ciliberto G., Dente L., Cortese R.* Cell-specific expression of a transfected human α_1 antitrypsin gene // *Cell.*—1985.—41, N 2.—P. 531—540.
9. *Expression of the α_1 -proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages / D. H. Perlmutter, F. Cole, P. Kilbridge et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 3.—P. 795—799.
10. *Carrell R.* Therapy by instant evolution // *Nature.*—1984.—312, N 5989.—P. 14.
11. *Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α_1 antitrypsin / S. Rosenberg, P. J. Barr, R. C. Najarian et al.* // *Ibid.*—N 5989.—P. 77—80.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва
Ин-т биомед. технологии МЗ СССР, Москва

Получено 10.12.87

УДК 612.349.7.018

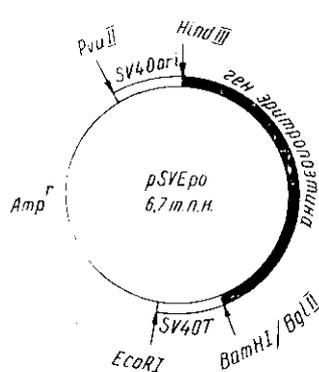
ВОЗМОЖНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ КЛОНИРОВАННОГО ГЕНА ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ СНО

**И. А. Крамерова, М. Г. Зеленин,
М. М. Воронцова, С. Л. Колобков, Т. Е. Мопакова**

Введение. В настоящее время идентифицировано множество белковых факторов, принимающих участие в контроле пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток — интерлейкины (IL-1, 2, 3 и др.), факторы, стимулирующие колониеобразование гранулоцитов (G-CSF), гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), эритроидных клеток (EPA) и др. Факторы, стимулирующие образование колоний (IL-3, G-CSF, GM-CSF, EPA и др.), как правило, не специфичны по отношению к ранним предшественникам различных ростков кроветворения. В част-

ности, пролиферация ранних предшественников эритроидных клеток стимулируется GM-CSF, IL-3 и EPO [1—3].

Наиболее специфичным фактором, который, по-видимому, запускает дифференцировку клеток эритроидного ряда, является эритропоэтин [4]. Это гликопротеидный гормон с молекулярной массой 34000, из которой на долю углеводного компонента приходится примерно 50 % [5]. Основное место синтеза эритропоэтина во взрослом организме — почки [6], у эмбриона — печень [7]. Концентрация эритропоэтина в



Плазмида *pSVEpo*. *HindIII-BglII/BamHI*-фрагмент содержит полную кодирующую последовательность гена эритропоэтина человека; *PvuII-HindIII*-фрагмент — промотор ранних генов вируса SV40; *BamHI/BglII-EcoRI*-фрагмент — 3'-концевая последовательность гена большого Т-антигена вируса SV40, содержащая сигналы полиаденилирования; *EcoRI-PvuII*-фрагмент — плазмидная часть, содержащая ген устойчивости к ампициллину. Размер плазмиды 6,7 тыс. пар нуклеотидов

Expression vector for erythropoietin (*Epo*) gene. *pSVEpo* (6,7 kb) contains the complete coding region of human *Epo* gene (*HindIII-BglII/BamHI* fragment); simian virus 40 early promoter (*PvuII-HindIII* fragment); the 3' terminal region of SV40 large T antigen gene, including polyadenylation signals (*BamHI/BglII-EcoRI* fragment); and plasmid sequence (*EcoRI-PvuII* fragment)

плазме низкая ($(15—30) \cdot 10^{-3}$ ед./мл) [8], что вероятно, объясняется высокой чувствительностью к нему компетентных эритроидных клеток [9, 10]. Снижение уровня циркулирующего эритропоэтина приводит к развитию анемий [11]. Попытки использовать эритропоэтин в качестве терапевтического средства для лечения анемий у экспериментальных животных дали положительные результаты [12]. Низкое содержание эритропоэтина в физиологическом материале и трудности, связанные с выделением больших количеств высокоочищенного препарата, долгое время ограничивали применение эритропоэтина в медицинской практике.

Клонирование гена эритропоэтина человека и создание эффективных продуцентов эритропоэтина на основе клеток животных позволило получать большие количества высокоочищенного гормона [5, 13, 14]. Клинические испытания препарата на пациентах с анемическими синдромами дали положительные результаты [15, 16].

Ранее мы провели скрининг библиотеки геномной ДНК человека, используя в качестве зонда 17-члениый олигонуклеотид, гомологичный фрагменту гена эритропоэтина человека. С помощью рестрикционного картирования и определения нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, содержащего область гомологии с зондом, было показано, что идентифицированный клон действительно содержит ген эритропоэтина человека [17].

Материалы и методы. Для переклоширования гена эритропоэтина человека в плазмидном векторе *pSV2gpt* [18] провели лигирование *HindIII-BglII*-фрагментов выделенного фагового клона и плазмиды *pSV2gtp*, обработанной рестриктазами *HindIII* и *BamHI* (рисунк). Клоны, содержащие ген эритропоэтина, отбирали по гибридизации *in situ* на бактериальных колониях. Зонд метили с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATФ}$ (ВО «Изотоп», Ташкент, отделение) и полинуклеотидкиназы до удельной активности 5×10^7 имп·мин⁻¹·мкг⁻¹ олигонуклеотида. Приготовление фильтров и гибридизацию осуществляли по стандартной методике [19], за исключением того, что гибридизацию и отмывку вели при 49 °С.

В экспериментах по трансфекции использовали линию клеток *CHO1k⁻*, полученную в лаборатории. Клетки выращивали на чашках Петри в смеси сред 199 и Игла (1:1) с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Транзиторную трансфекцию проводили в чашках Петри диаметром 10 см. На 1 чашку вносили $7 \cdot 10^5$ клеток. Через сутки среду меняли на DMEM («Flow laboratory», Англия) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и вносили кальций-фосфатный преципитат [20], содержащий 10 мкг плазмиды *pSVEpo* и 10 мкг ДНК из тимуса теленка в качестве носи-

теля. Через 18 ч среду меняли на ростовую и оставляли на 48 ч. Затем культуральную жидкость сливали, центрифугировали при 400 *g* в течение 10 мин и супернатант использовали для биологического тестирования на активность эритропоэтина. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную жидкость клеток *CHOtk*⁻, трансфицированных плазмидой *pSV2gpt*.

Эритропоэтическую активность тестировали по индукции образования бензидин-положительных колоний в культуре костного мозга мышей *in vitro* [21], а также по включению ³H-тимидина в клетки селезенки мышей с фенилгидразиновой анемией [22]. В качестве положительного контроля использовали сыворотку мышей с индуцированной анемией, содержащей 5—10 ед/мл эритропоэтина [23].

Результаты и обсуждение. Ген эритропоэтина человека в составе *HindIII-BglIII*-фрагмента был включен в плазмидный вектор *pSV2gpt* [19]. Полученная плазида *pSVEpo* содержит ген эритропоэтина человека под контролем промотора ранних генов вируса *SV40* (рисунок). На прилегающем к 3'-концу гена участке расположена 3'-концевая последовательность гена большого Т-антигена вируса *SV40*.

Плазмиду *pSVEpo* использовали для трансфекции клеток из яичника китайского хомячка (линия *CHOtk*⁻) для изучения транзиторной экспрессии гена эритропоэтина человека под контролем промотора вируса *SV40*. Культуральную жидкость через 48 ч после трансфекции тестировали на присутствие эритропоэтической активности, как указано в разделе «Материалы и методы».

При использовании двух методов тестирования: 1-й — по включению ³H-тимидина в спленоциты [22] и 2-й — по образованию эритроидных колоний в культуре клеток костного мозга [21] показано, что клетки *CHOtk*⁻, трансфицированные плазмидой *pSVEpo*, секретируют в среду эритропоэтин с удельной активностью 0,8—1,5 и 0,5—1 ед/мл соответственно. Расчет количества биологически активного эритропоэтина основан на сравнении с кривой титрования сыворотки, полученной из селезенки мышей с фенилгидразиновой анемией, содержащей 7 ед/мл эритропоэтина.

Таким образом, плазида *pSVEpo* может быть использована для экспрессии гена эритропоэтина человека в трансфицированных клетках животных. Получение продуцента эритропоэтина человека на основе клеток животных является важной задачей в связи с возможностью использования эритропоэтина непосредственно в качестве терапевтического средства [15, 16]. Однако количество эритропоэтина, необходимое для лечения хронических анемий (в частности анемий, связанных с хронической почечной недостаточностью) чрезвычайно велико (до 500 ед. препарата на 1 кг веса больного человека) [15]. Очевидно, что более эффективным в случаях, когда требуются не разовые, а систематические инъекции препарата, явилось бы введение в организм больного клеток, продуцирующих эритропоэтин.

В настоящее время разработаны методы, позволяющие с высокой эффективностью вводить новую генетическую информацию в геном соматических клеток животных. Один из подходов основан на применении ретровирусных векторов. В случае исправления дефектов, связанных с недостаточным уровнем экспрессии генов, кодирующих секретируемые биологически активные вещества (к которым относится и эритропоэтин), применение ретровирусных векторов является перспективным.

Показана принципиальная возможность инфекции клеток костного мозга *in vitro* ретровирусными векторами, в которых ген устойчивости к антибиотику *G418* находится под контролем различных вирусных промоторов [24]. Было обнаружено, что при использовании подходящего промотора (в случае клеток костного мозга — промотора гена тимидинкиназы вируса герпеса) происходит эффективная экспрессия гена и интеграция ДНК вектора в геном клеток костного мозга, причем последующие генерации клеток продолжают экспрессировать ген устойчивости к *G418* на высоком уровне. При пересадке стволовых клеток, инфицированных ретровирусным вектором, в селезенку мыши обнаруживали

большое количество устойчивых к *G418* клеток в течение по крайней мере 8 мес.

Перспективным представляется применение метода электростимуляции для введения генетического материала в первичные культуры клеток [25]. Эффективность трансфекции при использовании электростимуляции возрастает примерно в 100 раз по сравнению с другими методами трансфекции клеток.

Наряду с клетками костного мозга в «экспериментальной генотерапии» используют также фибробласты кожи [24]. Фибробласты человека относительно легко культивировать *in vitro*, их можно подвергать биохимической селекции, пренепаративно наращивать полученные клоны и использовать их для трансплантации. Полученная в настоящей работе плазмида *pSVEpo* перспективна для использования с целью трансфекции первичной культуры фибробластов пациентов с недостатком циркулирующего эритропоэтина и последующей ауто трансплантации.

EXPRESSION OF THE CLONED HUMAN ERYTHROPOIETIN GENE IN CHO CELLS

I. A. Kramerova, M. G., Zelenin, M. M. Vorontsova
S. L. Kolobkov, T. E. Monakova

Research Institute of Biomedical Technology,
Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Summary

In the previous study the human gene encoding erythropoietin, the principal factor of erythroid cells differentiation, has been isolated from human genomic phage library. In this paper the plasmid *pSVEpo* containing erythropoietin gene under the control of promoter of early *SV40* genes is obtained. The biologically active erythropoietin has been detected in conditioned media from *CHOtk*⁻ cells transfected with *pSVEpo* plasmid. The plasmid *pSVEpo* may be used in somatic gene therapy experiments.

1. Genomic cloning, characterization and multilineage growth-promoting activity of human GM-CSF / K. Kaushansky, P. J. O' Hara, K. Berkner, G. M. Segal // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 10.—P. 3101—3105.
2. Human IL-3 (Multi SCF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3 / Y.-C. Yang, A. B. Ciarletta, P. A. Temple, M. P. Chung // Cell.—1986.—47, N 1.—P. 3—10.
3. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity / J. C. Gasson, D. W. Golde, S. E. Kaufman et al. // Nature.—1985.—315, N 6022.—P. 768—771.
4. Goldwasser E. Erythropoietin and differentiation of red blood cells // Fed. Proc.—1975.—34, N 13.—P. 2285—2292.
5. Cloning and expression of the human erythropoietin gene / F. K. Lin, S. Suggs, C.-H. Lin et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 22.—P. 7580—7584.
6. Erslev A. J. *In vitro* production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution // Blood.—1974.—44, N 1.—P. 77—85.
7. Fried W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production // Ibid.—1972.—40, N 1.—P. 671—677.
8. Cotes P. M. Immunoreactive erythropoietin in serum. 1. Evidence for the validity of the assay method and physiological relevance of estimates // Brit. J. Haematol.—1982.—50, N 2.—P. 427—438.
9. Krantz S. B., Goldwasser E. Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with anemia strain of Friend virus // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 23.—P. 7574—7578.
10. Mufson R. A., Gesner T. G. Binding and internalization of recombinant human erythropoietin in murine erythroid precursor cells // Blood.—1987.—69, N 5.—P. 1585—1590.
11. Plasma erythropoietin in health and disease / A. J. Erslev, J. Caro, O. Miller, R. Silver // Ann. Clin. Lab. Sci.—1980.—10, N 4.—P. 250—257.
12. Eschbach J. W., Mladenovic J., Garcia J. F. The anemia of chronic renal failure in sheep. Response to erythropoietin-rich plasma *in vivo* // J. Clin. Invest.—1984.—74, N 2.—P. 434—441.
13. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin / K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudensdorf, S. D. Neill // Nature.—1985.—313, N 6005.—P. 806—810.

14. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosomal localization / J. S. Powell, K. L. Berkner, R. V. Lebo, J. W. Adamson // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 17.—P. 6465—6469.
15. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin // New Eng. J. Med.—1987.—316, N 2.—P. 73—78.
16. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis / C. G. Winearls, D. O. Oliver, M. S. Pipard et al. // Lancet.—1986.—2, N 8517.—P. 1175—1178.
17. Клонирование гена эритропоэтина человека / И. А. Крамерова, Н. С. Незнамов, В. М. Божков и др. // Молекуляр. генетика.—1988.—№ 7.—С. 26—28.
18. Mulligan R. C., Berg P. Selection for animal cells that express *Escherichia coli* gene coding for xantine-guanine phosphoribosyltransferase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 4.—P. 2072—2076.
19. Grunstein M., Hogness D. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // Ibid.—1975.—72, N 10.—P. 3961—3965.
20. Graham F. L., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // Virology.—1973.—52, N 2.—P. 456—467.
21. Монакова Т. Е. Гомеостатические процессы в изолированных системах и организмах.—Красноярск: Медицина, 1983.—210 с.
22. Krystal G. A simple microassay for erythropoietin based on ³H-thymidine incorporation into spleen cells treated with phenylhydrazine // Exp. Hematol.—1983.—11, N 7.—P. 649—660.
23. Radioimmunoassay of erythropoietin: circulating levels in normal and polycythemic human being / J. F. Garcia, S. Ebbe, L. Hollander et al. // J. Lab. and Clin. Med.—1982.—99, N 6.—P. 624—635.
24. Modulation of gene expression in multiple hematopoietic cell lineages following retroviral vector gene transfer / M.-C. Magli, J. E. Dick, D. Huszar et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 3.—P. 789—794.
25. Potter H., Weir L., Leder P. Enhancer-dependent expression of human immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation // Ibid.—1984.—81, N 22.—P. 7161—7165.

НИИ биомед. технологии МЗ СССР, Москва

Получено 10.12.87

УДК 577.212:577.352.27

ЭКСПРЕССИЯ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *Escherichia coli* В ГЕМАТОЦИТАХ МЫШИ

И. Е. Костецкий, С. П. Шплевая, Л. И. Лихачева,
Л. Г. Жарова, Д. М. Иродов, В. С. Кириллова, В. А. Кордюм

Введение клонируемых генов в отдельные органы и ткани взрослого организма является важным средством изучения их функционирования, а также механизмов, регулирующих экспрессию этих генов, что позволяет охарактеризовать работы в этом направлении как поиск путей генной терапии. К настоящему времени достаточно хорошо разработаны методы трансформации эукариотических клеток *in vitro* (среди них Са-фосфатный, ДЭАЭ-декстрановый, электропорация, микроинъекция и др.). Поэтому один из подходов в генной терапии основан на трансформации *in vitro* извлеченных из организма животного клеток и после селекции — их обратная трансплантация тому же животному [1—4]. Однако наряду с очевидными достоинствами метода ретрансплантации клеток животных в ряде случаев он не может применяться с достаточной эффективностью, из-за чего прямая инъекция генетического материала непосредственно в орган или ткань может оказаться предпочтительнее. Так, при интраперитонеальной инъекции Са-фосфатного преципитата ДНК через сутки были обнаружены значительные количества чужеродной ДНК в животных тканях новорожденных крыс, особенно в печени и селезенке [5, 6]. Экзогенная ДНК активно транскрибировалась, и экспрессия генов инсулина, человеческого гормона роста прослеживалась по белковым продуктам в печени и селезенке или по соответствующим транскриптам.