



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82647 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
C12N 15/09  
C12N 5/10  
C12N 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

### (54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЦИРКОВІРУСУ ССАВЦЯ

1

(21) 2003109561  
(22) 27.03.2002  
(24) 12.05.2008  
(86) PCT/CA02/00413, 27.03.2002  
(31) 60/279,173  
(32) 27.03.2001  
(33) US  
(46) 12.05.2008, Бюл.№ 9, 2008 р.  
(72) ЛІУ КІАНГ, ТІКУ СЬЮРЕШ К., УІЛЛСОН ФІЛІП,  
БЕБЬЮК ЛОРН А.  
(73) ЮНІВЕРСИТЕТ ОФ САСКАЧЕВАН  
(56) WO0116330 A, 08.03.2001  
WO0001409 A, 13.01.2000  
REDDY P S ET AL: "Replication-defective bovine  
adenovirus type 3 as an expression vector"  
JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN  
SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no.  
11, November 1999 (1999-11), pages 9137-9144  
P. SESHIDHAR REDDY, NEERAJA IDAMAKANTI,  
LORNE A. BABIUK, MAJID MEHTALI AND SURESH  
K. TIKOO: "Porcine adenovirus-3 as a helper-  
dependent expression vector " JOURNAL OF  
GENERAL VIROLOGY (1999), 80, 2909-2916  
ALLAN G M ET AL: "PORCINE CIRCOVIRUSES: A  
REVIEW" JOURNAL OF VETERINARY  
DIAGNOSTIC INVESTIGATION, AAVLD,  
COLUMBIA, MO, US, vol. 12, no. 1, January 2000  
(2000-01), pages 3-14  
LIU ET AL.: "Nuclear localization of the ORF2 protein  
encoded by porcine circovirus type 2." VIROLOGY,  
vol. 285, no. 1, 20 June 2001 (2001-06-20), pages  
91-99  
KENNEDY S ET AL: "REPRODUCTION OF  
LESIONS OF POSTWEANING MULTISYSTEMIC  
WASTING SYNDROME BY INFECTION OF  
CONVENTIONAL PIGS WITH PORCINE  
CIRCOVIRUS TYPE 2 ALONE OR IN  
COMBINATION WITH PORCINE PARVOVIRUS"  
JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY,  
ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 122, no. 1,  
January 2000 (2000-01), pages 9-24  
(57) 1. Спосіб культивування цирковірусу ссавця,  
який включає:  
а) одержання клітин ссавця, що експресують фун-  
кціональний білок Е1 аденовірусу ссавця, причому

2

зазначені клітини є пермісивними для реплікації  
цирковірусу ссавця;  
b) введення геному цирковірусу ссавця чи його  
частини, здатної реплікуватися, до зазначених  
клітин ссавця; і  
c) культивування зазначених клітин ссавця в умо-  
вах, придатних для реплікації зазначеного цирко-  
вірусу ссавця.  
2. Спосіб за п. 1, який додатково включає видобу-  
вання зазначеного цирковірусу із зазначених куль-  
тивованих клітин.  
3. Спосіб за п. 1, де зазначеним цирковірусом сса-  
вця є цирковірус свиней.  
4. Спосіб за п. 3, де зазначеним цирковірусом сви-  
ней є цирковірус свиней типу 2.  
5. Спосіб за п. 3, де зазначеним цирковірусом сви-  
ней є цирковірус свиней типу 1.  
6. Спосіб за п. 1, де зазначені клітини ссавця по-  
ходять від свині.  
7. Спосіб за п. 1, де зазначеними клітинами ссавця  
є клітини сітківки свині.  
8. Спосіб за п. 1, де зазначеною функцією Е1 аде-  
новірусу ссавця є Е1 функція аденовірусу людини.  
9. Спосіб за п. 1, де зазначеною функцією Е1 аде-  
новірусу ссавця є функція Е1 аденовірусу свиней.  
10. Спосіб за п. 1, де зазначені клітини ссавця, що  
експресують функціональний білок Е1 аденовірусу  
ссавця, є стабільно трансформованими послідов-  
ністю гена Е1 аденовірусу ссавця.  
11. Спосіб за п. 10, де зазначеною послідовністю  
гена Е1 є послідовність гена Е1 аденовірусу люди-  
ни.  
12. Спосіб за п. 10, де зазначена послідовність  
гена Е1 є гетерологічною стосовно зазначеної клі-  
тини ссавця.  
13. Спосіб за п. 1, де зазначеною функцією Е1 є  
функція Е1А та/або Е1В.  
14. Спосіб за п. 1, де зазначений цирковірус сви-  
ней містить химерну нуклеотидну послідовність.  
15. Реконбінантна клітина ссавця, що експресує  
функціональний білок Е1 аденовірусів ссавця і  
містить геном цирковірусу свиней чи його частину,  
здатну до реплікації, причому зазначена клітина є  
пермісивною для реплікації зазначеного циркові-  
русу свиней.

(13) C2

(11) 82647

(19) UA

16. Рекombінантна клітина ссавця за п. 15, де зазначеною функцією E1 аденовірусу є функція E1 аденовірусу людини.

17. Рекombінантна клітина ссавця за п. 15, де зазначеною функцією E1 аденовірусу є функція E1 аденовірусу свиней.

18. Рекombінантна клітина ссавця за п. 15, де зазначена клітина походить від свині.

19. Рекombінантна клітина ссавця за п. 15, де зазначеною клітиною є клітина сітківки свині.

20. Рекombінантна клітина ссавця за п. 15, де клітина ссавця, що експресує функціональний білок E1 аденовірусу ссавця, є стабільно трансформованою послідовністю гена E1 аденовірусу ссавця.

21. Рекombінантна клітина ссавця за п. 20, де зазначеною послідовністю гена E1 є послідовність гена E1 аденовірусу людини.

22. Рекombінантна клітина ссавця за п. 20, де зазначена послідовність гена E1 аденовірусу ссавця є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.

23. Спосіб одержання рекombінантної клітини ссавця, що містить функцію E1 аденовірусу ссавця і геном цирковірусу свиней, який передбачає стадії: а) одержання клітини ссавця, що експресує функціональний білок E1 аденовірусу ссавця, і б) введення зазначеного геному цирковірусу свиней чи його частини, здатної реплікуватися, до цієї клітини ссавця.

24. Спосіб за п. 23, який додатково включає стадію культивування зазначеної клітини ссавця в умовах, придатних для реплікації зазначеного цирковірусу свиней.

25. Спосіб за п. 24, який додатково включає стадію видобування зазначеного цирковірусу із зазначених культивованих клітин.

26. Спосіб за п. 23, де зазначений цирковірус свиней є цирковірусом свиней типу 2.

27. Спосіб за п. 23, де зазначений цирковірус свиней є цирковірусом свиней типу 1.

28. Спосіб за п. 23, де зазначені клітини ссавця походять від свині.

29. Спосіб за п. 28, де зазначені клітини ссавця є клітинами сітківки свині.

30. Спосіб за п. 23, де зазначеною функцією E1 аденовірусу є функція E1 аденовірусу людини.

31. Спосіб за п. 23, де зазначеною функцією E1 аденовірусу є функція E1 аденовірусу свиней.

32. Спосіб за п. 23, де зазначений цирковірус свиней містить химерну нуклеотидну послідовність.

33. Спосіб за п. 23, де зазначена клітина ссавця, що містить функцію E1 аденовірусу ссавця, є стабільно трансформованою послідовністю гена E1 аденовірусу ссавця.

34. Спосіб за п. 23, де зазначена послідовність гена E1 аденовірусу ссавця є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.

35. Спосіб реплікації цирковірусу ссавця, який включає культивування клітини ссавця, яка містить геном цирковірусу ссавця чи його частину, здатну до реплікації в умовах, придатних для реплікації зазначеного цирковірусу ссавця, де клітина ссавця експресує функціональний білок E1 аденовірусу ссавця і є пермісивною для реплікації цирковірусу ссавця, та при необхідності видобування зазначеного цирковірусу ссавця із культивованої клітини.

36. Спосіб за п. 35, де зазначеним цирковірусом ссавця є цирковірус свиней.

37. Спосіб за п. 36, де зазначеним цирковірусом свиней є цирковірус свиней типу 2.

38. Спосіб за п. 36, де зазначеним цирковірусом свиней є цирковірус свиней типу 1.

39. Спосіб за п. 35, де зазначена клітина ссавця походить від свині.

40. Спосіб за п. 39, де зазначеною клітиною ссавця є клітина сітківки свині.

41. Спосіб за п. 35, де зазначеним функціональним білком E1 аденовірусу ссавця є функціональний білок E1 аденовірусу людини.

42. Спосіб за п. 35, де зазначеним функціональним білком E1 аденовірусу ссавця є функціональний білок E1 аденовірусу свині.

43. Спосіб за п. 35, де зазначена клітина ссавця, що експресує функціональний білок E1 аденовірусу ссавця, стабільно трансформована послідовністю гена E1 аденовірусу ссавця.

44. Спосіб за п. 43, де зазначеною послідовністю гена E1 є послідовність гена E1 аденовірусу людини.

45. Спосіб за п. 43, де зазначена послідовність гена E1 аденовірусу ссавця є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.

46. Спосіб за п. 35, де зазначеним функціональним білком E1 є функціональний білок E1A та/або E1B.

47. Спосіб за п. 36, де зазначений цирковірус свиней містить химерну нуклеотидну послідовність.

48. Спосіб одержання рекombінантної клітини ссавця, що включає введення геному цирковірусу ссавця чи його частини, здатної до реплікації, до клітини ссавця, що експресує функціональний білок E1 аденовірусу ссавця, де клітина є пермісивною для реплікації цирковірусу ссавця.

49. Спосіб одержання рекombінантної клітини ссавця, що включає введення області гена E1 аденовірусу ссавця до клітини ссавця, що містить геном цирковірусу ссавця чи його частини, здатної до реплікації, де клітина є пермісивною для реплікації цирковірусу ссавця.

50. Спосіб за п. 48 чи 49, що додатково включає стадію культивування зазначеної рекombінантної клітини ссавця в умовах, придатних для реплікації зазначеного цирковірусу свиней.

51. Спосіб за п. 50, що додатково включає стадію видобування зазначеного цирковірусу із зазначеної культивованої клітини.

52. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначеним цирковірусом є цирковірус свиней.

53. Спосіб за п. 52, де зазначеним цирковірусом свиней є цирковірус свиней типу 1 чи цирковірус свиней типу 2.

54. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначена клітина ссавця походять від свині.

55. Спосіб за п. 54, де зазначеною клітиною ссавця є клітина сітківки свині.

56. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначеним функціональним білком E1 аденовірусу ссавця є функціональний білок E1 аденовірусу людини.

57. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначеним функціональним білком E1 аденовірусу ссавця є функціональний білок E1 аденовірусу свині.

58. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначений цирковірус містить химерну нуклеотидну послідовність.
59. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначена клітина ссавця стабільно трансформована послідовністю гена E1 аденовірусу ссавця.
60. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначена послідовність гена E1 аденовірусу ссавця є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.
61. Спосіб за п. 48 чи 49, де зазначеним функціональним білком E1 є функціональний білок E1A та/або E1B.
62. Спосіб експресії геному цирковірусу ссавця чи його частини, що включає культивування клітини ссавця, що містить геном цирковірусу ссавця чи його частину, в умовах, сприятливих для експресії зазначеного геному цирковірусу ссавця чи його частини, де клітина ссавця експресує функціональний білок E1 аденовірусу ссавця, і при необхідності видобування зазначеного цирковірусу чи його частини із культивованої клітини.
63. Спосіб за п. 62, де зазначеним цирковірусом ссавця є цирковірус свиней.
64. Спосіб за п. 63, де зазначеним цирковірусом свиней є цирковірус свиней типу 2.
65. Спосіб за п. 63, де зазначеним цирковірусом свиней є цирковірус свиней типу 1.

66. Спосіб за п. 62, де зазначена клітина ссавця походить від свині.
67. Спосіб за п. 66, де зазначеною клітиною ссавця є клітина сітківки свині.
68. Спосіб за п. 62, де зазначеним функціональним білком E1 аденовірусу ссавця є функціональний білок E1 аденовірусу людини.
69. Спосіб за п. 62, де зазначеним функціональним білком E1 аденовірусу ссавця є функціональний білок E1 аденовірусу свині.
70. Спосіб за п. 62, де зазначена клітина ссавця стабільно трансформована послідовністю гена E1 аденовірусу ссавця.
71. Спосіб за п. 70, де зазначеною послідовністю гена E1 є послідовність гена E1 аденовірусу людини.
72. Спосіб за п. 70, де зазначена послідовність гена E1 аденовірусу ссавця є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.
73. Спосіб за п. 23 чи 62, де зазначеним функціональним білком E1 є функціональний білок E1A та/або E1B.
74. Спосіб за п. 62, де зазначений цирковірус свиней містить химерну нуклеотидну послідовність.

Даний винахід відноситься до області цирковірусів і забезпечує композиції та способи для культивування цирковірусів, зокрема, цирковірусу свиней. Зокрема, даний винахід відноситься до способів культивування цирковірусу свиней у клітинах ссавців, що експресують функцію гена E1 аденовірусу ссавців.

Віруси сімейства *Circoviridae*, знайдені у ряді видів рослин та тварин і звичайно називані цирковірусами, характеризуються круглими віріонами, які не мають оболонки, із середнім діаметром 17-23,5 нм, що містять кільцеву одноланцюгову дезоксирибонуклеїнову кислоту (олДНК). олДНК геному цирковірусів є найкоротшим з відомих вірусних ДНК-репліконів. Як розкрито у WO 99/459566, щонайменше шість вірусів, відповідно до Шостого звіту Міжнародного комітету з таксономії вірусів, ідентифіковані як члени цього сімейства [Lukert, P.O. et al. 1995, *The Circoviridae*, pp. 166-168. У: F.A. Murphy, et al. (eds) *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Arch Virol. 10 Suppl.].

До вірусів тварин, включених у дане сімейство, відносяться цирковірус анемії курчат (*chicken anemia virus*, CAV), вірус захворювання дзьоба і пір'я (*beak and feather disease virus*, BFDV), цирковірус свиней (*porcine circovirus*, PCV) та цирковірус голубів (*pigeon circovirus*). PCV був спочатку виділений з культур клітин нирок свиней. PCV реплікується у клітинному ядрі й утворює великі внутрішньоядерні тіลечка включення. Див. Murphy et al. [1999, *Circoviridae* p.357-361, *Veterinary Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., Academic Press, San Diego]. На даний момент відомі два типи PCV: PCV типу 1 (PCV1) та PCV типу 2 (PCV2). PCV1, ізольований як стійкий кон-

тамінаит безперервної клітинної лінії нирок свині PK-15 (ATCC CCL31), не викликає детектованого цитопатичного ефекту в культурі клітин і не викликає клінічного захворювання свиней при експериментальному інфікуванні [див. Allan G., 1995, *Vet. Microbiol.* 44: 49-64; Tisher, I. et al., 1982, *Nature* 295: 64-66 та Tisher, I. et al., 1986, *Arch. Virol.* 91: 271-276]. PCV2, на відміну від PCV1, тісно асоційований із синдромом післявідлучного мультисистемного виснаження у відлучених поросят (PMWS) [див. Allan G. et al., 1998, *Europe J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 3-10; Ellis, J. et al., 1998, *Can. Vet. J.* 39: 44-51 та Morozov, I. et al., 1998, *J. Clin. Microbiol.* 36: 2535-2541]. Нуклеотидні послідовності для PCV1 описані в роботі Mankertz A. et al. [1997, *J. Virol.* 71: 2562-2566], а нуклеотидні послідовності для PCV2 описані в роботах Hamel, A.L., et al. [1998, *J. Virol.* 72: 5262-5267]; Mankertz, A. et al. [2000, *Virus Res.* 66: 65-77] та Meehan, B.M. et al. [1998, *J. Gen. Virol.* 79: 2171-2179]. Штами PCV2 описані у WO 00/01409 і були депоновані Європейською колекцією клітинних культур Центра прикладної мікробіології та досліджень [European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, United Kingdom]: номер доступу V97100219, номер доступу V9700218, номер доступу V97100217, номер доступу V98011608 і номер доступу 98011609. PCV2 також описується у WO 00/77216.

В опублікованих на даний момент дослідженнях з PCV2 використовувалися або гомогенат тканини, або культивовані віруси, одержані з польових ізолятів. Tisher et al. [1987, *Arch Virol.* 96:39-57] повідомляють, що при обробці D-

глюкозаміном відбувається стимуляція вступу клітин нирок свиней у S-фазу клітинного циклу. Однак, обробка клітин D-глюкозаміном повинна проводитися обережно, тому що D-глюкозамін є токсичним для культур клітин [див. Allan G. et al., 2000, J. Vet. Diagn. Investig. 12:3-14]. Залишається потреба у способах культивування цирковірусу, такого, наприклад, як PCV1 і PCV2, та інших цирковірусів, які дозволяють одержувати чистий цирковірус. Такі способи будуть корисні, зокрема, для одержання антигенів PCV2 як вакцини проти PMWS. Даний винахід націлений на задоволення цієї потреби.

Усі патенти і публікації включені до даного опису в їхньому повному виді за посиланням.

Даний винахід забезпечує способи культивування цирковірусів ссавців, які включають: а) одержання клітин ссавців, що експресують функцію гена E1 аденовірусу ссавців, причому зазначені клітини є пермісивними для реплікації цирковірусу ссавців; б) введення зазначеного геному цирковірусу ссавців чи його здатної реплікуватися частини до зазначених клітин; і с) культивування зазначених клітин ссавців в умовах, придатних для реплікації зазначеного цирковірусу ссавців.

У деяких втіленнях цей спосіб додатково включає видобування зазначеного цирковірусу із зазначених культивованих клітин.

В деяких втіленнях цирковірусом ссавців є цирковірус свиней, такий як, наприклад, цирковірус свиней 1 (PCV1) чи цирковірус свиней 2 (PCV2). У додаткових втіленнях цирковірус свиней містить хімерну нуклеотидну послідовність. В інших втіленнях клітини ссавця походять від свині. В інших додаткових втіленнях клітини ссавця є клітинами сітківки свині.

В інших втіленнях функція E1 аденовірусу ссавців є функцією E1 аденовірусу людини. В інших втіленнях функція E1 аденовірусу ссавців є функцією E1 аденовірусу свиней. У наступних додаткових втіленнях функція E1 є функцією E1A та/або E1B. В інших додаткових втіленнях клітина ссавця, що експресує функцію E1 аденовірусу ссавця, є стабільно трансформованою послідовністю гена E1 аденовірусу ссавців. В інших втіленнях послідовність гена E1 аденовірусу ссавців є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.

Даний винахід забезпечує рекомбінантні клітини ссавців, що експресують функцію E1 аденовірусу ссавців, і містять геном цирковірусу ссавців чи його частину, здатну реплікуватися, причому зазначені клітини є пермісивними для реплікації зазначеного цирковірусу ссавців. У деяких варіантах цирковірусом ссавців є цирковірус свиней, такий як, наприклад, цирковірус свиней 1 (PCV1) чи цирковірус свиней 2 (PCV2). У додаткових втіленнях цирковірус свиней містить хімерну нуклеотидну послідовність. У деяких втіленнях функція E1 аденовірусу є функцією E1 аденовірусу людини. В інших втіленнях функція E1 аденовірусу є функцією E1 аденовірусу свиней. В інших втіленнях клітина ссавця походять від свині. У наступних додаткових втіленнях клітина ссавця є клітиною сітківки свині. У додаткових втіленнях клітина ссавця, що експресує функцію E1 аденовірусу ссавців, є стабільно трансформованою послідовністю

гена E1 аденовірусу ссавців. В інших втіленнях послідовність гена E1 аденовірусу ссавців є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.

Даний винахід також забезпечує способи одержання рекомбінантних клітин ссавців, що експресують функцію E1 аденовірусу ссавців і містять геном цирковірусу ссавців, які передбачають стадії: а) одержання клітини ссавця, що експресує функцію E1 аденовірусу ссавців; і б) введення геному зазначеного цирковірусу ссавців чи його частини, здатної до реплікації, у зазначену клітину ссавця. У додаткових втіленнях спосіб включає додаткову стадію культивування рекомбінантної клітини ссавця в умовах, придатних для реплікації зазначеного цирковірусу ссавців. У наступних втіленнях спосіб включає видобування зазначеного цирковірусу із зазначених культивованих клітин. У деяких втіленнях цирковірус ссавця є цирковірусом свиней, таким як, наприклад, цирковірус свиней 1 (PCV1) чи цирковірус свиней 2 (PCV2). В інших втіленнях цирковірус свиней містить хімерну нуклеотидну послідовність. У наступних втіленнях клітини ссавця походять від свині. У наступних втіленнях клітини ссавця є клітинами сітківки свині. У додаткових втіленнях функція E1 аденовірусу є функцією E1 аденовірусу людини чи функцією E1 аденовірусу свиней. В інших додаткових втіленнях клітина ссавця, що експресує функцію E1 аденовірусу ссавців, є стабільно трансформованою послідовністю гена E1 аденовірусу ссавців. В інших втіленнях послідовність гена E1 аденовірусу ссавців є гетерологічною стосовно зазначеної клітини ссавця.

На фігурах 1A-1B показані характеристика і титрування вірусу PCV2, одержаного шляхом трансфекції та екстракції ДНК з інфікованих клітин VIDO R1 за способом Хірта. (А) ПЛР із використанням PCV2-специфічних праймерів та ДНК з PCV2-інфікованих клітин (доріжка 1) і псевдоінфікованих клітин (доріжка 2). Як контроль використовували плазмід, що містить геном PCV2 (доріжка 3). Маркер молекулярних розмірів ДНК (1-kb DNA ladder) фірми GIBCO BRL наносили на доріжку М. (В) Вірусні ДНК із клітин, інфікованих PCV2 (доріжки 1, 3 і 5) та псевдоінфікованих клітин (доріжки 2, 4 і 6) були гідролізовані рестриктазами NcoI і StuI (доріжки 1 і 2), EcoRI і StuI (доріжки 3 і 4), EcoRI і EcoRV (доріжки 5 і 6). Маркер молекулярних розмірів ДНК (1-kb-plus DNA ladder) фірми GIBCO BRL наносили на доріжку М.

Фігури 2A-2B показують титрування PCV2 шляхом імунопероксидазного забарвлювання. Через 72 год. після інфекції псевдоінфіковані (А) чи інфіковані вірусом PCV2 (В) клітини VIDO R1 інкубували з кролячими анти-OPC2 поліклональними антитілами і біотинільованим вторинним антитілом. Після внесення комплексу авідину та біотинільованої пероксидази хрому моношар проявляли діамінобензидинтетрахлоридом (DAB). Одна темна клітина відповідала інфікуванню одиничною вірусною частинкою.

Фігури 3A-3C показують нуклеотидну послідовність (А) та амінокислотні послідовності ORF1 (В) і ORF2 (3) цирковірусу свиней 2, описані в Genbank (реєстраційний номер AF086834).

Даний винахід відноситься до композицій і способів для культивування цирковірусів ссавців, зокрема, цирковірусу свиней. Даний винахід оснований на відкритті того, що клітини свині, які експресують функцію E1 аденовірусу людини, можуть бути трансфектовані геном вірусу PCV2 і продукують PCV2 вірус з високим вірусним титром. Клітинна лінія VIDO R1, депонована в ATCC під реєстраційним номером PTA-155, є лінією клітин сітківки свині, трансформованих геном E1 аденовірусу-5 людини (HAV5), що, як було показано, індукує вступ клітини в S-фазу клітинного циклу і трансактивує транскрипцію. [Див. Shenk, T. (1996). "Adenoviridae: the viruses and their replication" у: Fields Virology. 3<sup>rd</sup> ed. B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, pp.2111-2148]. Як описано тут у Прикладі 3, клітини VIDO R1 трансфектували геном PCV2 і одержували вірус з титром  $2 \times 10^7$  інфекційних одиниць (IO)/мл.

При здійсненні даного винаходу, якщо немає інших вказівок, застосовуються загальноприйняті способи традиційної мікробіології, імунології, вірусології, молекулярної біології і способи рекомбінантних ДНК, якими володіють фахівці. Ці методи цілком викладені в літературі. [Див., наприклад, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed. (1984)); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds. (1985)); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed. (1986)); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)); Ausubel, et al., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> Edition); vols. I, II & III (1989)].

Circoviridae, сімейство вірусів, що мають побавлені оболонки сферичні віріони із середнім діаметром 17-23,5 нм, що містять кільцеву одноланцюгову ДНК (олДНК), описані в Шостому звіті Міжнародного комітету з таксономії вірусів, як уже зазначалося вище. До членів цієї групи належать цирковіруси свиней: PCV1 і PCV2. Відомо, що деякі цирковіруси свиней є патогенними, такі як, наприклад, PCV2, що асоційований з PMWS.

Нуклеотидні послідовності PCV1 представлені в [роботах Mankertz, A., et al., 1997, J. Virol. 71:2562-2566 та Meehan, B.M. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:221-227. Нуклеотидні послідовності PCV2 представлені в роботах Hamel, A.L. et al. (1998, J. Virol. 72:5262-5267; Mankertz, A. et al., 2000, Virus Res. 66:65-77 та Meehan, B.M. et al., 1998, J. Gen. Virol. 79:2171-2179)]. Репрезентативні штами PCV2 депоновані в Європейській Колекції Клітинних Культур (Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, United Kingdom) під реєстраційними номерами V97100219, V9700218, V97100217, V98011608 і V98011609. Опис PCV2 дано також у WO 00/77216. Нуклеотидні послідовності PCV2 були також опубліковані в роботах Hamel et al., (1998), J. Virol. Vol.72, 6:5262-5267 (GenBank AF027217) і Morozov et al., (1998), J. Clinical Microb. Vol.36, 9:2535-2541,

а також GenBank AF086834, AF086835 і AF086836. Порівняння опублікованих нуклеотидних послідовностей PCV1 і PCV2 виявляє їх <80% ідентичність, незважаючи на те, що геноми мають подібну організацію, особливо у тому, що стосується взаємного розташування двох найдовших відкритих рамок зчитування (ORF) з гаданим сайтом ініціації реплікації ДНК.

Даний винахід включає способи культивування цирковірусів ссавців, зокрема, цирковірусу свиней (PCV). Даний винахід включає способи культивування PCV, що містить представлений чи тут відому фахівцям в даній області нуклеотидну послідовність PCV, або ORF з цієї послідовності чи її частини, здатні до реплікації. Даний винахід включає також способи культивування PCV, який містить нуклеотидну послідовність PCV, що відрізняється від представлених тут чи відомих у даній області вирожденістю генетичного коду, або її ORF чи її частини, здатні до реплікації. Даний винахід включає також способи культивування PCV, який містить варіації нуклеотидної послідовності PCV, що не змінюють функціональність чи штамову специфічність нуклеотидної послідовності, або її ORF чи її частини, здатні до реплікації. Даний винахід включає способи культивування PCV, який містить нуклеотидні послідовності PCV, здатні гібридизуватися в умовах від проміжної до високої суворості з послідовностями, представленими тут; і способи культивування PCV, який містить мутації нуклеотидної послідовності PCV, представленої чи тут відомої в даній області, наприклад, делеції чи точкові мутації, або її ORF чи її частини, здатні до реплікації.

Даний винахід включає також способи культивування PCV, який містить гетерологічні нуклеотидні послідовності. Даний винахід включає також способи культивування PCV, який містить хімерні нуклеотидні послідовності цирковірусів, такі як, наприклад, нуклеотидні послідовності цирковірусу свиней, злиті з нуклеотидними послідовностями інших патогенних вірусів, таких як, наприклад, патогенний для свиней вірус, у тому числі парвовірус.

В даному контексті гетерологічна нуклеотидна послідовність по відношенню до цирковірусу чи клітини ссавця позначає послідовність, що звичайно не зв'язана з послідовністю цирковірусу як частина геному цирковірусу, або послідовність, що звичайно не зв'язана з клітиною ссавця, відповідно. Гетерологічні нуклеотидні послідовності включають синтетичні послідовності. Реакції гібридизації можуть проводитися в умовах різної суворості. Умови, що збільшують суворість реакцій гібридизації, широко відомі й опубліковані в даній області. [Див., наприклад, Sambrook et al. (1989), стор.7.52], Приклади таких умов включають (у порядку зростання суворості): температури інкубації 25°C, 37°C, 50°C та 68°C; концентрації буфера 10xSSC, 6xSSC, 1xSSC, 0,1xSSC (де SSC позначає буфер з 0,15M NaCl і 15мМ цитрату) та їхні еквіваленти, що використовують інші буферні системи; концентрації формаміду 0%, 25%, 50%, і 75%; час інкубації від 5 хвилин до 24 годин; 1, 2 чи більше стадій промивання; час промивання 1, 2 чи 15 хвилин; і розчин для відмивання 6xSSC, 1xSSC,

0,1xSSC чи деіонізована вода. Прикладом суворих умов гібридизації є: 68°C і 0,1xSSC.

Геноми PCV кодують кілька поліпептидних послідовностей із приблизним розміром від 8 до 35кДа. Вважається рутинним визначення ORF цирковірусів свиней з використанням стандартних програм, таких як, наприклад, MacVector® [Oxford Molecular Group Inc., MD 21030]. Найбільша ORF (ORF1) двох типів PCV виявляє лише мінорну варіацію з ідентичністю 85% (виміряну з використанням програми Clustal), і як було показано, вона є білком Rep у PCV1 [Mankertz, A., et al., 1998, J. Gen. Virol. 79:381-384]. Не маючи наміру бути зв'язаним теорією, більш високий рівень варіабельності, що виявляється в послідовностях ORF2 PCV1 та PCV2 (ідентичність близько 65%), дозволяє припустити, що типоспецифічні ознаки PCV можуть визначатися відповідним білком ORF2. Кілька типоспецифічних епітопів PCV були картовані на послідовностях ORF2 PCV2. [Див. Mahe, D. et al., 2000, J. Gen. Virol. 81:1815-24. Інше недавнє дослідження ідентифікувало ORF2 PCV2 як головний структурний білок, здатний формувати капсидоподібні частинки в інфікованих рекомбінантним бакуловірусом клітинах комах, що експресують ORF2. Див. Nawagitgul, P. et al., 2000, J. Gen. Virol. 81:2281-2287].

У деяких ілюстративних втіленнях даного винаходу рекомбінантний вектор, що містить геном PCV або його ORF чи частину ORF, наприклад, антигенний район, конструюють рекомбінацією *in vitro* між плазмідною та геномом PCV. У деяких втіленнях геном PCV є геномом PCV2. В інших втіленнях рекомбінантний вектор, що містить геном PCV або його ORF чи частину ORF, наприклад, антигенний район, конструюють рекомбінацією *in vivo*. Способи рекомбінації *in vivo* відомі фахівцям і включають, наприклад, способи, описані в роботі Chartier, et al. [1996, J. Virol. 70:4805-4810]. Вектори для конструювання цирковірусних геномів включають, наприклад, бактеріальні плазмідні, що дозволяють одержувати безліч копій клонованої цирковірусної нуклеотидної послідовності. У деяких втіленнях цю плазмідну котрансфекують у придатні клітини-хазяїни для рекомбінації. Придатні клітини-хазяїни для рекомбінації включають будь-яку клітину, що буде підтримувати рекомбінацію між геномом PCV і плазмідною, що містить послідовність PCV, або між двома чи більш плазмідами, кожна з яких містить послідовності PCV. Рекомбінацію, як правило, проводять у клітинах прокариот, наприклад, у клітинах *E. coli*, тоді як одержання цирковірусу проводять переважно в клітинах ссавців, пермісивних для реплікації PCV, наприклад, у клітинах свині, зокрема, клітинах свині, здатних експресувати функцію E1 аденовірусу ссавців.

Даний винахід включає застосування будь-якої клітини-хазяїна ссавця, пермісивної для реплікації цирковірусу, зокрема, для реплікації PCV, такого як PCV1 і PCV2. Allan et al. [1995, Veterinary Microbiology 44: 49-64] повідомляють, що PCV реплікується в культурах моноцитів/макрофагів свиней і корів. Відповідно до результатів, одержаних Tischer et al. [1987, Arch. Virol. 96:39-57], для реплікації PCV у культурі клітин необхідна наявність

клітин, що активно діляться. Приклади клітин і клітинних ліній, які можна використовувати для реплікації PCV, включають клітини ссавців, що містять функцію E1 і є пермісивними для реплікації PCV, включаючи клітини свині, такі як моноцити/макрофаги і клітини сітківки, що експресують аденовірусну функцію E1. В ілюстративному втіленні, описаному тут, було показано, що клітини сітківки свині, що експресують функцію E1 аденовірусу людини, є пермісивними для реплікації PCV2 і дають вірус з  $2 \times 10^7$  Ю/мл. Лінії клітин свині можна одержати, наприклад, з Американської колекції типових культур [American Type Culture Collection (ATCC)]. Вирощування бактеріальних культур клітин, а також культивування і підтримання еукаріотичних клітинних ліній і ліній клітин ссавців є процедурами, добре відомими фахівцям у даній області.

Даний винахід включає способи культивування цирковірусів ссавців, зокрема, цирковірусу свиней, у клітинах-хазяїнах ссавців, трансфетованих послідовностями гена E1 аденовірусів ссавців. У деяких втіленнях клітини ссавця стабільно трансформують послідовностями гена E1 аденовірусу. У деяких втіленнях послідовності гена E1 інтегровані до геному клітини ссавця. В інших втіленнях послідовності гена E1 присутні на плазміді, що реплікується. В інших втіленнях послідовність гена E1 є гетерологічною для клітин ссавця. В описаному тут ілюстративному втіленні клітини свині трансформують послідовністю гена E1 аденовірусу-5 людини. Даний винахід включає використання будь-якої клітини ссавця чи лінії клітин ссавця, що експресують функцію E1, за умови, що клітина чи клітинна лінія, що експресує функцію E1, є пермісивною для реплікації цирковірусу, зокрема, цирковірусу свиней, наприклад, цирковірусу 1 свиней чи цирковірусу 2 свиней. У кращому втіленні клітини ссавця є клітиною чи клітинною лінією свині. Даний винахід охоплює використання функції E1 будь-якого аденовірусу ссавців, за умови, що клітина-хазяїн ссавців, що експресує функцію E1 аденовірусу ссавців, є пермісивною для реплікації цирковірусів, зокрема, PCV, такого як, наприклад, цирковірус 1 свиней чи цирковірус 2 свиней. Геноми аденовірусів ссавців відомі в даній області і приводяться, наприклад, у роботі Reddy et al. [1998, Journal of Virology, 72:1394], де описана нуклеотидна послідовність, організація геному і транскрипційна карта коров'ячого аденовірусу 3 (bovine adenovirus 3, BAV3); і в роботі Kleiboeker (1995, Virus Res. 36:259-268), де описана E1 область PAV-4. Даний винахід включає функцію E1 кожного з різних серотипів аденовірусу людини, таких як Ad2, Ad5, Ad12 і Ad40. В ілюстративному втіленні, описаному тут у прикладі 1, функцію E1 є функція E1 вірусу людини Ad5. Ген E1 людини експресується відразу ж після вірусної інфекції (0-2 години) і до того, як починають експресуватися будь-які інші вірусні гени (Flint (1982) Biochem.

Biophys. Acta 651:175-208; Flint (1986) Advances Virus Research 31:169-228; Grand (1987) Biochem. J. 241:25-38). Сайт ініціації транскрипції гена E1 Ad знаходиться при нуклеотиді в положенні 498, а стартовий кодон ATG білка E1 знаходиться при нуклеотиді в положенні 560 вірусного

генома. Білок E1 функціонує *in trans* і є необхідним для транспорту пізніх мРНК з ядра у цитоплазму. Промотор E1 Ad5 складається з одного високо-афінного сайту впізнавання Sp1 і TATA-блоку. Зокрема, послідовності генів E1A і E1B аденовірусу-5 людини розташовані при нуклеотидах 505-4034 нуклеотидної послідовності, представленої Chroboczek, J. et al. (1992, *Virology*, 186:280-285). В ілюстративному втіленні, приведеному тут у прикладах, клітиною-хазяїном ссавця є клітина-хазяїн свині, трансфегована послідовностями гена E1 аденовірусу-5 людини.

Геном PCV2 може бути виділений з віріонів PCV2 чи може бути представлений у виді геному PCV2, вбудованого в плазмиду, за допомогою стандартних методів молекулярної біології і біотехнології. Клонування повнорозмірного геному PCV2 у вектор pBluescript II KS(+) від Stratagene за допомогою ПЛР описано в роботі Yu, et al. (2000, *J. Clin. Microbiol.* vol.38:3474-3477). З одержаної плазмиди повнорозмірний геном PCV2 може бути вивільнений розщепленням рестриктазою SacII.

Введення нуклеотидних послідовностей цирковірусу в пермісивні клітини-хазяїни ссавців може бути досягнуто будь-яким відомим в даній області способом, включаючи, без обмеження, трансфекцію і трансформацію, у тому числі, без обмеження, мікроін'єкцію, електропорацію, преципітацію Са-РО<sub>4</sub>, DEAE-декстрановий спосіб, використання ліпосом, бомбардування частинками і т.д. Ілюстративний спосіб трансфекції нуклеотидних послідовностей PCV2 у клітини VIDO R1 описаний тут у прикладі 3.

Вважається, що способи культивування прокаріотичних клітин, наприклад, бактеріальних клітин, і еукаріотичних клітин, наприклад, клітин-хазяїнів ссавців, що експресують аденовірусну функцію E1, є рутинними для фахівців у даній області.

Наступні приклади приводяться для ілюстрації винаходу, але винахід ними не обмежується. Усі джерела і публікації патентів, приведені тут, включені в їхньому повному виді в опис за посиланням.

#### Приклади

Приклад 1: Одержання клітин сітківки свині, трансфегованих послідовностями гена E1 аденовірусу людини (клітини VIDO R1)

Первинні культури клітин сітківки ембріона свині трансфеговали 10мкг плазмиди pTG 4671 (Transgene, Strasbourg, France) способом із застосуванням фосфату кальцію. Плазміда pTG 4671 містить повні послідовності E1A і E1B (нуклеотиди 505-4034) вірусу HAV-5 разом з геном пуроміцинацетилтрансферази як селективним маркером. У цієї плазмиди область E1 знаходиться під контролем конститутивного промотору гена фосфогліцераткінази мишей, а ген пуроміцинацетилтрансферази контролюється конститутивним раннім промотором SV40. Трансформовані клітини піддавали селекції в ході трьох пасажів у середовищі, що містить 7мкг/мл пуроміцину, ідентифікували на основі зміни їхньої морфології від одиничних осередків (тобто, втрати контактного інгібування) і піддавали клонуванню з » одиничних клітин. Спочатку одержану клітинну лінію тестували на її здатність підтримувати ріст делеційних мутантів E1

HAV-5. Потім цю клітинну лінію додатково досліджували на присутність послідовності E1 у геномі за допомогою ПЛР, експресію білків E1A і E1B методом вестерн-блотування і час подвоєння в умовах клітинної культури. Були виявлені послідовності E1, і продукування білків E1A та E1B було продемонстровано за допомогою імунопреципітації. Час подвоєння був коротшим у порівнянні з часом подвоєння батьківської клітинної лінії.

Для оцінки стабільності експресії E1 клітини VIDO R1 культивували протягом більш ніж 50 пасажів (розведення 1:3 двічі на тиждень) і тестували на їхню здатність підтримувати реплікацію HAV-5 з делетованим геном E1. Експресію білків E1A і E1B з регулярними інтервалами часу також контролювали за допомогою вестерн-блотування. Результати показали, що лінія VIDO R1 зберігала здатність підтримувати ріст вірусу з делетованим геном E1 і експресувала білки E1 на подібному рівні на протязі більш ніж 50 пасажів у культурі. Таким чином, VIDO R1 може вважатися встановленою клітинною лінією. Клітинна лінія VIDO R1 була депонована в Американській колекції типових культур (American Type Culture Collection, ATCC) і має реєстраційний номер PTA-155.

#### Приклад 2

У прикладі 2 дано опис молекулярного клонування повнорозмірного геному PCV2.

Спочатку ДНК PCV2 ампліфікували за допомогою ПЛР із тотальної ДНК, екстрагованої з поросяти із синдромом PMWS. Клонування повнорозмірної геномної ДНК PCV2 у вектор pBluescript II KS(+) (Stratagene) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) описано в роботі Liu et al. (2000, *J. Clin. Microbiol.* 38:3474-3477). Послідовність PCV2 була депонована в GenBank (реєстраційний номер AF086834). Повнорозмірну геномну ДНК PCV2 виділяють з одержаної плазмиди розщепленням з використанням SadI.

#### Приклад 3

Приклад 3 описує трансфекцію клітин VIDO R1, описаних у Прикладі 1, плазмидою, що містить геном PCV2, сконструйованою як описано у Прикладі 2.

#### Матеріали і способи

##### Клітинна культура

Лінію клітин сітківки ембріона свині, VIDO R1, описану в Прикладі 1, і клітини Vero (ATCC) підтримували при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> у середовищі на основі MEM з додаванням 10% чи 5% інактивованої нагріванням фетальної бичачої сироватки (ФБС), відповідно.

##### Трансфекція та інфікування

Моношарові культури клітин VIDO R1, вирощені в 6-луночковому планшеті, трансфеговали клонуваною ДНК PCV2 з використанням Lipofectin відповідно до рекомендацій виробника (GIBCO BRL). Перед трансфекцією повнорозмірний геном PCV2 вирізували з плазмиди розщепленням рестриктазою SadI (Liu, Q., et al, 2000, *J. Clin. Microbiol.* 38:3474-3477). Для інфікування трансфеговані клітини VIDO R1 піддавали трьом циклам заморожування (-70°C) і відтаювання (37°C). Потім лізат клітин освітляли центрифугуванням і використовували для інфікування нових клітин VIDO R1. В опублікованих повідомленнях лінію клітин нирки

свині, що не містить PCV1, використовують для культивування вірусу PCV2. Для стимуляції вступу в S-фазу клітинного циклу клітини нирки свині завжди обробляють D-глюкозаміном [див. Tischer et al., (1987). Arch. Virol. 96:39-57]. Однак обробка повинна проводитися обережно, тому що D-глюкозамін є токсичним для клітинної культури [див. Allan et al., (2000). J. Vet. Diagn. Investigation. 12:3-14]. Навпроти, обробка використовуваної в цьому дослідженні лінії клітин VIDO R1 D-глюкозаміном не була необхідною, тому що вона була трансформована HAV5-E1, який здатний індукувати S-фазу.

#### Приклад 4

##### Очищення і титрування вірусу

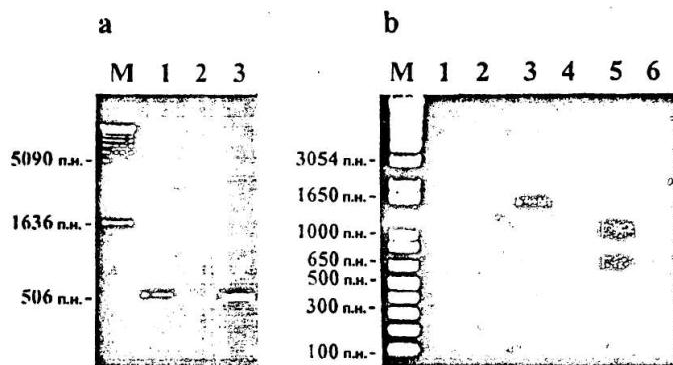
Для очищення вірусу PCV2 PCV2-інфіковані клітини VIDO R1 проінкубували з 0,5% Тритоном X-114 у забуференому фосфатом сольовому розчині (ЗФР) при 37°C протягом 45 хвилин, а потім екстрагували фреоном-113 (1,1,2-трихлортрифлуоретаном). Уламки клітин і мембран були осаджені центрифугуванням при 2000хд протягом 15 хвилин. Віруси в супернатанті осаджували при 35000хд протягом 3 годин крізь шар 20% сахарози. Осад вірусу суспендували у ЗФР і зберігали при -70°C. Титри вірусу визначали в інфекційних одиницях (ІО) кількісним імунопероксидазним забарвлюванням на білок ORF2. Для цього моношарові культури клітин у 12-лункових планшетах інфікували серійними розведеннями вірусу. Після адсорбції вірусу протягом 1 години клітини промивали і нашаровували зверху середовище MEM, що містить 2% ФБС і 0,7% агарози. На 3-й день після інфікування (д.п.і.) верхній агарозний шар видаляли і клітини фіксували і робили проникними сумішшю метанол/ацетон (1:1 за об'ємом) протягом 20 хвилин при -20°C. Після блокування 1% бичачим сироватковим альбуміном протягом 1

години при кімнатній температурі клітини інкубували з кролячою сироваткою проти ORF2 [Liu et al., 2001, Protein Expression and Purification, 21:115-120]. Після 2 годин інкубації планшети промивали ЗФР, а потім обробляли з використанням набору VECTASTAIN Elite ABC (Vector Laboratories). Реакцію проявляли 3,3'-діамінобензидинтетрахлоридом (ДAB) і спостерігали під мікроскопом. Підраховували позитивно забарвлені клітини і титр вірусу виражали в ІО, де 1 ІО визначали як 1 позитивно пофарбовану клітину/осередок клітин на 3 д.п.і.

##### Екстракція і характеристика вірусної ДНК

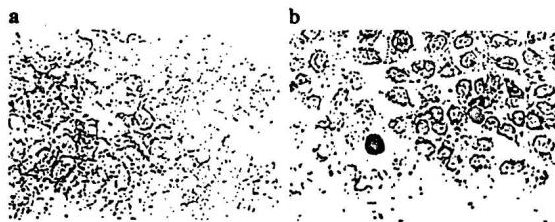
Вірусну ДНК виділяли з моношару клітин VIDO R1, інфікованих PCV2, за способом Хірта [1967, J. Mol. Biol. 26:365-369]. Потім вірусну ДНК характеризували з використанням рестрикційного аналізу і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), як описано в роботі Liu et al., (2000). J. Clin. Microbiol. 38: 3474-3477).

ПЛР із використанням як матриці ДНК, виділеної з інфікованих клітин, і PCV2-специфічних праймерів ампліфікувала продукт визначеного розміру, тоді як ніяка ДНК не ампліфікувалася з контрольних неінфікованих клітин. Відповідно до гаданої рестрикційної картини, розщеплення вірусної ДНК рестриктазами NcoI та StuI приводило до утворення двох фрагментів розміром 1291 п.н. і 477 п.н., відповідно; розщеплення за допомогою EcoRI та StuI приводило до утворення двох фрагментів розміром 1492 п.н. і 276 п.н., відповідно; і розщеплення за допомогою EcoRI і EcoRV давало два фрагменти розміром 1094 п.н. і 674 п.н., відповідно. Ці дані показують, що був одержаний вірус PCV2. З використанням способу імунозабарвлювання і підрахунку позитивно забарвлених клітин було визначено, що титр вірусу в препараті складає  $2 \times 10^7$  ІО/мл.



ФІГ. 1А - 1В





ФІГ. 2А - 2В

```

1 accagcgac ttccgagcg gcagcacctc ggcaacacct cagcagcaac atgcccagca
61 agaagaatgg aagaagcggg ccccaaccac ataaaagggtg ggtgttcacg ctgaataatc
121 cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg agctcccaat ctccctattt gattatttta
181 ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacacct cctccagggg ttcgctaatt
241 ttgtgaagaa gcaaaccttt aataaagtga agtgggtattt ggtgcccgcg tgcacatcgc
301 agaaagccaa aggaactgat cagcagaata aagaatattg tagtaagaaa ggcaacttac
361 ttattgaatg tggagctccg cgaatcgaag gacaaaggag tgacctgtct actgctgtga
421 gtaccttggt ggagagcggg attctggtga cgtttgcaaa gcagcacctc gtaacgtttg
481 tcaaaaattt ccgcccgtcg gctgaactct cgaagtgag cgggaaatg caaagcgtg
541 attggaatac caatgtacac ttcaattgtg ggccacctcg gttgggtaaa agcaaatggg
601 ctgctaattt tgcacaaccg gaaacacacat actggaaccc acctaaaaac aagtgggtgg
661 atggttacca tggtagaaaa gtggttgtta ttgatgactt ttatggctgg ctgcccgtgg
721 atgatctact gagactgtgt gatcgatctc cattgactgt aaaaactaaa ggtggaactg
781 tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca aaccccgttg gaatggtact
841 cctcaactgc tgcctccagc gtagaagctc tctatcggag gattacttcc ttggtatttt
901 ggaagaatgt tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gtttgcacc ctttccccc
961 catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagctct ttttatcact tctgaatggt
1021 ttttattatt catttagggg ttaagtgggg ggtctttaag attaaattct ctgaattgta
1081 catacatggt tacacggata ttgtagctct ggtcgtattt actgttttcc aacgcagtgc
1141 cgaggcctac gtggtccaca tttctagagg tttgtagcct cagccaaagc tgattccctt
1201 tgttatttgg ttggaagtaa tcaatagtggt agtcaagaac aggtttgggt gtgaagttaa
1261 gggagtggtg ggaagaagggt cgggggattg tatggcggga ggaatagtt acatatgggt
1321 cataggttag ggtgtggcc ttggtacaa agtctatcct tagaataaca gcagtggagc
1381 ccaactccct atcacctcgg gtgatggggg agcaggggcca gaattcaacc ttaaccttcc
1441 ttattctgta gtattcaag ggtatagaga tttgttgtt cccccctccc gggggaacaa
1501 agtcgtcaat attaaatctc atcatgtcca ccgcccaggga gggcgttgtg actgtggtag
1561 ccttgacagt atatccgaag gtgcgggaga ggcgggtgtt gaagatgcca ttttcccttc
1621 tccaacggta gcggtggcgg ggttggaaga gccaggggcg gcggcgagg atctggccaa
1681 gatggctcgc ggggcggtgt cttctctcgc ggttaacgctt ccttggaatac gtcatagctg
1741 aaaacgaag aagtcgctg taagtatt

```

ФІГ. 3А

```

MPSKKNGRSGPQPHKRWVPTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFI
VGERGNEEGRTPHLQGFANFVKQTFFNKVYLGARCHIEKAKGTDQONKEYCSKBN
LLIECGAPRSQGRSLLSTAVSTLLESGILVTVAQHPVTFVKNFRLAELLKVSQKM
QKRDNKTNVHFIIVGPPCCGSKWAANFANPETTYWKPKPKWKWDGYHGEKVVIDDFY
GNLPWDDLLRLCDRYPLTVKTKGGTVFPFLARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVBALYR
RITSLVFWKNTVTEQSTEEGGQFVTLSPFCPEFFPYEINY*

```

ФІГ. 3В

```

MTYPRRRYRRRRHPRSHLGOILRRRPWLHVRHRYRWRKQGI
FNTRLSTRTFGYTVKATTVTTPSWAVDMRNFNIDDFVPPGGGTNKISIPFEYIRIRVKV
VEFWPCSPITQDGRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYPYVNYSSRHTIPQPFYHSRY
FTPKPVLDSTIDYFQFNKNRNQLWLRLQTSRNVHVLGTAFENSKYDQYINIRVTMY
VQFREPNLKDPLKP*

```

ФІГ. 3С