



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 39/205 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/47 (2006.01)

C07K 14/145 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/205 (2006.01); A61K 2039/5258 (2006.01); C12N 7/00 (2006.01); C07K 14/005 (2006.01); C12N 15/8257 (2006.01); C12N 2760/20123 (2006.01); C12N 2760/20134 (2006.01); C12N 2750/12043 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2013154698, 13.06.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.06.2012

Дата регистрации:
28.05.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.06.2011 US 61/496,371;
21.12.2011 US 61/578,787

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2015 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 28.05.2018 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 13.01.2014

(86) Заявка РСТ:
CA 2012/000581 (13.06.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/171104 (20.12.2012)

Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.",
В.М.Угрюмову

(72) Автор(ы):

Д'АУ Марк-Андре (СА),
ЛАВУА Пьер-Оливье (СА),
ВЕЗИНА Луи-Филипп (СА),
КУТЮР Манон (СА)

(73) Патентообладатель(и):
МЕДИКАГО ИНК. (СА)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 1993001833 A1, 04.02.1993. WO
2009009876 A1, 22.01.2009. WO 2010006452
A1, 21.01.2010. WO 2006016380 A2, 16.02.2006.
WO 1997043428 A1, 20.11.1997. MCGARVEY
P.B. ET AL. Expression of the rabies virus
glycoprotein in transgenic tomatoes.
Biotechnology. 1995. V.13. No13. P.1484-1487.
RU 2008355 C1, 28.02.1994.

(54) Получение вирусоподобной частицы вируса бешенства в растениях

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области биотехнологии. Предложены способы получения вирусоподобной частицы вируса бешенства (VLP) в растении или части растения, вирусоподобные частицы (VLP), полученные с их помощью, композиция, содержащая указанные вирусоподобные частицы (VLP), и способ индукции иммунитета к инфекции, вызванной вирусом бешенства. Указанные вирусоподобные частицы вируса бешенства содержат нативный

гликопротеин (G) вируса бешенства и липид, полученный из плазматической мембраны растения, при этом нативный гликопротеин (G) вируса бешенства может содержать растение-специфические N-гликаны или модифицированные N-гликаны. Предложенные вирусоподобные частицы вируса бешенства и композиция, их содержащая, могут быть использованы в медицине для индукции иммунного ответа у субъекта против вируса бешенства. 7 н. и 18 з.п.

R U 2 6 5 5 4 3 3 C 2

R U 2 6 5 5 4 3 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 39/205 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/47 (2006.01)
C07K 14/145 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/205 (2006.01); *A61K 2039/5258* (2006.01); *C12N 7/00* (2006.01); *C07K 14/005* (2006.01); *C12N 15/8257* (2006.01); *C12N 2760/20123* (2006.01); *C12N 2760/20134* (2006.01); *C12N 2750/12043* (2006.01)

(21)(22) Application: **2013154698**, **13.06.2012**

(24) Effective date for property rights:
13.06.2012

Registration date:
28.05.2018

Priority:

(30) Convention priority:
13.06.2011 US 61/496,371;
21.12.2011 US 61/578,787

(43) Application published: **20.07.2015** Bull. № 20

(45) Date of publication: **28.05.2018** Bull. № 16

(85) Commencement of national phase: **13.01.2014**

(86) PCT application:
CA 2012/000581 (13.06.2012)

(87) PCT publication:
WO 2012/171104 (20.12.2012)

Mail address:
**119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11, "Gouling
VLG (Interneshnl) Ink.", V.M.Ugryumovu**

(72) Inventor(s):

**D`AU Mark-Andre (CA),
LAVUA Per-Olive (CA),
VEZINA Lui-Filipp (CA),
KUTYUR Manon (CA)**

(73) Proprietor(s):

MEDIKAGO INK. (CA)

(54) PRODUCTION OF RABIES VIRUS-LIKE PARTICLE IN PLANTS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: proposed group of inventions relates to biotechnology. Disclosed are methods of producing a rabies virus-like particle (VLP) in a plant or part of a plant, virus-like particles (VLP) obtained using same, a composition comprising said virus-like particles (VLP), and a method for inducing immunity to an infection caused by a rabies virus. Said rabies virus-like particles contain native rabies virus glycoprotein (G)

and a lipid derived from the plant's plasma membrane, wherein the native rabies virus glycoprotein (G) may contain plant-specific N-glycans or modified N-glycans.

EFFECT: disclosed rabies virus-like particles and composition containing same can be used in medicine to induce an immune response in a subject against a rabies virus.

25 cl, 31 dwg, 2 tbl, 4 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к получению нативных вирусных белков в растениях. В частности, настоящее изобретение также относится к получению вирусоподобных частиц, содержащих нативный структурный белок вируса бешенства, в растениях. Техническим результатом заявленного изобретения является получение вирусоподобных частиц вируса бешенства (VLP) в растении, и применение указанных VLP для индукции защитного иммунного ответа против инфекции, вызванной вирусом бешенства.

Уровень техники

Вакцинация обеспечивает защиту от заболеваний, вызванных инфекционным агентом, путем индукции субъекта для установления защиты перед инфекцией. Обычно это выполняется посредством применения живых ослабленных или цельных инактивированных форм инфекционных агентов в качестве иммуногенов. Для того, чтобы избежать опасности использования цельного вируса (например, убитых или ослабленных вирусов) в качестве вакцины, рекомбинантные вирусные белки, например субъединицы, используют в качестве вакцин. Как пептидные, так и субъединичные вакцины подвержены ряду потенциальных ограничений. Субъединичные вакцины могут проявлять слабую иммуногенность вследствие неправильного сворачивания, слабой презентации антигена или различий в углеводном и липидном составе. Главной проблемой является трудность гарантии того, что конформация сконструированных белков имитирует конформацию антигенов в их природном окружении. Пригодные адъюванты и, в случае пептидов, белки-носители должны использоваться для стимулирования иммунного ответа. Кроме того, эти вакцины индуцируют прежде всего гуморальные ответы и, следовательно, могут не вызывать эффективного иммунитета. Субъединичные вакцины часто являются неэффективными в отношении заболеваний, в которых инактивированный цельный вирус может продемонстрировать обеспечение защиты.

Вирусоподобные частицы (VLP) являются потенциальными кандидатами для включения в иммуногенные композиции. Вирусоподобные частицы (VLP) имеют сходство со зрелыми вирионами, но не содержат генетический материал вируса. Таким образом, VLP являются нереплицируемыми по природе, что делает их безопасными для введения в качестве вакцины. Кроме того, VLP могут быть сконструированы для экспрессии вирусных гликопротеинов на поверхности VLP, что является их самой нативной физиологической конфигурацией. Более того, так как VLP имеют сходство с интактными вирионами и представляют собой поливалентные дисперсные структуры, VLP могут быть более эффективными в отношении индукции нейтрализующих антител к гликопротеину, чем растворимые оболочечные белковые антигены.

В настоящее время VLP получены для более 30 различных вирусов, которые инфицируют человека и других животных. Одной из самых поразительных особенностей этой группы является то, что группа сильно различается по структуре отдельных вирусов. Группа включает вирусы, которые содержат один капсидный белок, множество капсидных белков, а также вирусы с липидными оболочками и без них.

Технические трудности формирования VLP для вирусов с липидной оболочкой отличаются от трудностей формирования VLP для вирусов со множеством капсидов. Для этих вирусов выбор системы экспрессии может быть важным для эффективности формирования VLP. Например, вирус Хантаан легко формирует VLP, когда экспрессируется в клетках млекопитающего из вектора на основе вируса осповакцины, но формирование VLP является относительно неэффективным в клетках насекомых

(Betenbaugh M с соавт. 1995, *Virus Res.* 38, 111-124).

Вирус бешенства (RV) является членом семейства рабдовирусов (*Rhabdoviridae*). Как и большинство членов данного семейства, вирус бешенства (RV) представляет собой вирус, содержащий нефрагментированную негативную однонитевую РНК, чей геном кодирует пять вирусных белков: РНК-зависимую РНК-полимеразу (L); нуклеопротеин (N); фосфорилированный белок (P); матриксный белок (М), локализованный на внутренней стороне оболочки вирусного белка; и гликопротеин (G), локализованный на внешней поверхности вируса. (Dietzschold B с соавт., 1991, *Crit. Rev. Immunol.* 10:427-439.)

Вакцины против бешенства, полученные на культуре клеток, ограничены выращиванием инаktivированных штаммов вируса в культурах клеток. Эти вакцины содержат вирус, выращенный в культурах клеток. Существующие в настоящее время биотехнологические подходы направлены на экспрессию гена поверхностного белка вируса бешенства для разработки безопасного рекомбинантного белка, который может быть использован в качестве активной вакцины. Стабильная экспрессия гликопротеина вируса бешенства была показана в клетках яичника китайского хомячка (Burger с соавт., 1991, *J Gen Virol.*, Feb; 72 (Pt 2):359-67). Был получен гликозилированный белок полной длины 67К, который комигрировал с G-белком, выделенным из инфицированных вирусом клеток.

Экспрессия гена гликопротеина вируса бешенства бакуловирусными векторами в клетках насекомых дает выходы белка до 18% от общего клеточного белка через 48 часов после заражения. Prehaud D Н с соавт., (1989, *Virology*, Dec; 173(2):390-9) описывает помещение последовательности, кодирующей G-белок штамма CVS, под контроль промотора полигедрина AcNPV и экспрессию конструкции с использованием линии клеток *Spodoptera fugiperda*. Белок, полученный от насекомых, проявил измененную электрофоретическую подвижность по сравнению с диким типом вследствие различий в гликановых компонентах.

Rupprecht с соавт. (1993, *Vaccine*, 11(9):925-8) демонстрирует, что гликопротеин (штамм ERA), полученный из рекомбинантных инфицированных бакуловирусом клеток насекомых, является эффективным в качестве пероральной вакцины у енотов. В WO/1993/001833 описано получение вирусоподобных частиц (VLP) в бакуловирусной системе экспрессии, содержащей РНК-геном, включающий 3' домен и филлер-домен, окруженный оболочкой N-белка вируса бешенства и М-белка вируса бешенства. Вирусоподобная частица (VLP) также включает липидную оболочку G-белка вируса бешенства. Ввиду относительно высокой стоимости систем на основе клеток насекомых и млекопитающих, указанные системы не являются предпочтительными для экспрессии G-белка как стратегии для разработки вакцины против вируса бешенства.

McGarvey с соавт. (1995, *Bio/Technology* Vol. 13, No. 13, pp. 1484-1487) описывает трансформацию котиледонов томатов с использованием кДНК полной длины, кодирующей гликопротеин G вируса бешенства (штамм ERA) под управлением промотора 35S' вируса мозаики цветной капусты. Белок был экспрессирован в томатах и характеризовался молекулярной массой 62 и 60 kDa по данным вестерн-блоттинга после иммунопреципитации по сравнению с 66 kDa, наблюдаемой для G-белка из вируса, выращенного в клетках ВНК. Предполагается, что различие в молекулярной массе по сравнению с природным гликопротеином обусловлено посттрансляционной модификацией белка (протеолитическое расщепление и/или модифицированное гликозилирование). Было обнаружено, что количество иммунопреципитированного G-белка составило приблизительно 1-10 нг/мг растворимого белка, т.е. от 0.0001% до

0.001% растворимого белка. Низкий уровень экспрессии может быть обусловлен использованием слабо разработанного гена. Например, ген, кодирующий нативный G-белок, использовали вместе с его нативным сигнальным пептидом.

Иммунный ответ растений на заболевания, такие как энтерит норок и бешенство, отражался экспрессией вирусных эпитопов на поверхности вирусов растений после заражения восприимчивого хозяина рекомбинантным модифицированным вирусом (Modelska с соавт., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2481-2485; Yusibov с соавт., 2002, Vaccine 20:3155-3164). Размер антигенного полипептида, экспрессирующегося на поверхности вирусного вектора, был ограничен 37 аминокислотами, и требовалось эпитопное картирование антигена. Такое глубокое знание антигена обычно недоступно, особенно в отношении вновь открытых заболеваний, в которых экспрессия белков полной длины может являться единственным выбором. В отдельных случаях могут потребоваться множественные эпитопы для обеспечения приемлемой защиты от заражения патогенным вирусом. Кроме того, заражение может рассматриваться как значительная проблема на сельскохозяйственном уровне, особенно в случае применения стабильных в окружающей среде вирусов растений, например, вируса мозаики табака (Tobacco Mosaic Virus).

В WO 97/43428 описан способ получения в растениях гликопротеина G вируса бешенства или вируса, родственного вирусу бешенства. Конструкция включала последовательность, кодирующую химерный G-белок, содержащий зрелый вирусный G-белок с N-концевым сигнальным пептидом, отличным от пептида, естественным образом связанного с вирусным G-белком. Гликопротеин имел молекулярную массу приблизительно 66 kDa и являлся практически нерастворимым. Детергенты, такие как додецилсульфат натрия (SDS) или Тритон X-100, были необходимы для экстракции и растворения гликопротеина. Авторы сделали вывод о том, что «нерастворимый» гликопротеин относился к присутствию C-концевого трансмембранного домена (участка из примерно от 40 до 60 аминокислот, расположенного на карбоксильном конце гликопротеина), который является важным для защитной реакции при использовании гликопротеина в качестве вакцины.

Оболочечные вирусы могут приобрести свою липидную оболочку при «отпочковывании» из инфицированной клетки, а мембрану из плазматической мембраны или из мембраны внутренних органелл. Например, во время процесса сборки в рабдовирусах комплекс N-P-L заключает в оболочку однонитевую геномную минус-РНК с образованием сердцевины рибонуклеопротеина (RNP). М-белок формирует капсулу или матрикс вокруг RNP, и комплекс RNP-М мигрирует в область плазматической мембраны, содержащей гликопротеиновые вставки. М-белок инициирует скручивание, и комплекс М-RNP связывается с гликопротеином, после чего готовый вирус выходит путем почкования из плазматической мембраны.

В центральной нервной системе (CNS) существует избирательный выход вирусных частиц путем почкования из плазматических мембран. Напротив, в слюнных железах вирус выходит путем почкования в основном из клеточной мембраны в ацинарный просвет. Вирусное почкование в слюнную железу и индуцированное вирусом агрессивное поведение хозяина-животного увеличивает шансы вирусной инфекции у нового хозяина. В системах на основе клеток млекопитающих или бакуловирусов, например, вирус бешенства почкуется из плазматической мембраны. Известно лишь несколько оболочечных вирусов, способных инфицировать растения (например, члены семейства топовирусов и рабдовирусов). Среди известных оболочечных вирусов растений они характеризуются почкованием из внутренних мембран клеток-хозяев, а не из

плазматической мембраны. Однако рекомбинантные VLP были получены в растениях-хозяевах из плазматической мембраны (WO 2011/035422; которая включена в настоящий документ путем отсылки).

Сборка/почкование в рабдовирусах управляется главным образом матриксным (М) белком. Белок М содержит поздний домен почкования, который опосредует рекрутинг белков хозяина, связанный с путем вакуолярной сортировки белков клетки, для облегчения разделения вирус-клетка. Без привязки к какой-либо теории полагают, что почкование оболочечных вирусов из клеточных мембран зависит от присутствия трансмембранных шиповидных белков, взаимодействующих с цитоплазматическими компонентами вируса. Например, клетки, инфицированные мутантами вируса бешенства, которые были лишены гликопротеина G или цитоплазматического концевой сегмента G-белка, высвобождали лишенные шиповидных отростков частицы рабдовируса, показывая, что вирусный поверхностный белок не требуется для управления процессом почкования. (Mebatsion T. С соавт., 1996, Cell, Mar 22:84(6):941-51). Напротив, инфекционные частицы, продуцированные мутантами вируса бешенства, лишенными М-белка, были преимущественно связанными с клетками, и выход бесклеточного инфекционного вируса был уменьшен не меньше чем в 500000 раз. Это демонстрирует значительную роль М-белка в почковании вируса. Супернатанты, полученные из клеток, инфицированных вирусом бешенства, лишенным М-белка, содержат скорее длинные палочкообразные вирионы, а не обычные пулеобразные частицы рабдовируса, дополнительно подтверждая нарушение процесса формирования вируса. Комплементация с М-белком, экспрессирующимся с плазмид, восстанавливала формирование рабдовируса. Таким образом, белок М играет важную роль в сжатии и нацеливании RNP на плазматическую мембрану, а также во встраивании G-белка в почкующиеся вирионы. (Mebatsion T. С соавт., 1999, J Virol Jan; 73(1):242-50).

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение относится к получению нативных вирусных белков в растениях. В частности, настоящее изобретение также относится к получению вирусоподобных частиц, содержащих нативный структурный белок вируса бешенства, в растениях.

В соответствии с настоящим изобретением предложен способ (А) получения вирусоподобной частицы (VLP) вируса бешенства в растениях, включающий:

а) введение первой нуклеиновой кислоты, содержащей первый регуляторный участок, активный в растении, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нативный структурный белок вируса бешенства, в растение или часть растения,

б) инкубацию растения или части растения в условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновых кислот, с получением, таким образом, VLP вируса бешенства.

Нативный структурный белок вируса бешенства может представлять собой гликопротеин. В случае, если нативный структурный белок вируса бешенства представляет собой не М-белок, то способ (А), описанный выше, может дополнительно включать стадию:

с) введение второй нуклеиновой кислоты, содержащей второй регуляторный участок, активный в растении и функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей матриксный белок.

Первая или вторая нуклеотидная последовательность, или обе могут дополнительно кодировать, содержать, или кодировать и содержать один или несколько элементов амплификации. Один или несколько элементов амплификации могут быть выбраны из

одного или нескольких элементов амплификации на основе геминивируса. Один или несколько элементов амплификации на основе геминивируса могут быть выбраны из длинной межгенной области вируса желтой карликовости бобовых (Bean Yellow Dwarf Virus, BeYDV LIR) и короткой межгенной области BeYDV (BeYDV SIR).

5 Первый регуляторный участок, активный в растении, и второй регуляторный участок, активный в растении, могут быть одинаковыми или различными.

Описанный выше способ может дополнительно содержать стадию:

d) сбора растения и экстракцию VLP.

Настоящее изобретение также включает способ (A), описанный выше, в котором
 10 первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторный участок, функционально связанный с одним или несколькими энхансерами на основе комовируса, и третью нуклеиновую кислоту, кодирующую супрессор сайленсинга, репликазу геминивируса или и то и другое, вводят в растение или часть растения. Альтернативно, первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторный участок,
 15 функционально связанный с одним или несколькими энхансерами на основе комовируса, вторую нуклеиновую кислоту, содержащую второй регуляторный участок, активный в растении и функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей матриксный белок, и третью нуклеиновую кислоту, кодирующую супрессор сайленсинга, репликазу геминивируса или и то и другое, вводят в растение или часть
 20 растения. В случае если третья нуклеиновая кислота содержит только супрессор сайленсинга, то в растение или часть растения может быть введена четвертая нуклеиновая кислота, кодирующая репликазу геминивируса. Один или несколько энхансеров на основе комовируса могут представлять собой нетранслируемую область (UTR) комовируса, например, UTR гипертранслируемого вируса мозаики коровьего
 25 гороха (Cowpea Mosaic Virus hypertranslatable, CPMV-HT), такую как 5' и/или 3'UTR CPMV-HT.

Настоящее изобретение также включает способ (A), описанный выше, в котором на стадии введения (стадия а) первая нуклеиновая кислота транзигентно экспрессируется в растении. Альтернативно, на стадии введения (стадия а) первая нуклеиновая кислота
 30 стабильно экспрессируется в растении.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ (B) получения вирусоподобных частиц вируса бешенства (VLP), включающий:

а) обеспечение растения или части растения, содержащего первую нуклеиновую кислоту, содержащую первый регуляторный участок, активный в растении,
 35 функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей один или более нативных структурных белков вируса бешенства,

б) инкубацию растения или части растения в условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновых кислот, с получением, таким образом, нативных VLP вируса бешенства.

40 Первый регуляторный участок, активный в растении, и второй регуляторный участок, активный в растении, могут быть одинаковыми или различными.

Нативный структурный белок вируса бешенства в способе (B) может представлять собой гликопротеин. В случае если нативный структурный белок вируса бешенства представляет собой не М (матриксный) белок, то в способе (B), описанном выше,
 45 растение может дополнительно содержать вторую нуклеиновую кислоту, содержащую второй регуляторный участок, активный в растении и функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей матриксный белок. В альтернативном варианте первая нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную

последовательность, кодирующую матриксный белок.

В способе, описанном выше (Способ В), первая нуклеиновая кислота или вторая нуклеиновая кислота, или обе могут дополнительно кодировать, содержать, или кодировать и содержать один или несколько элементов амплификации. Один или несколько элементов амплификации могут быть выбраны из одного или нескольких элементов амплификации на основе геминивируса. Один или несколько элементов амплификации на основе геминивируса могут быть выбраны из длинной межгенной области вируса желтой карликовости бобовых (Bean Yellow Dwarf Virus, BeYDV LIR) и короткой межгенной области BeYDV (BeYDV SIR).

В описанных выше способах (Способы А или В) растение или часть растения может дополнительно содержать еще одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую супрессор сайленсинга, например, HcPro или p19, репликазу геминивируса, или и то, и другое. В альтернативном варианте растение или часть растения может содержать еще одну нуклеиновую кислоту, кодирующую репликазу геминивируса.

Настоящее изобретение также включает способ (В), описанный выше, в котором растение или часть растения транзигентно экспрессирует первую нуклеиновую кислоту. В альтернативном варианте первая нуклеиновая кислота стабильно экспрессируется в растении или части растения.

Способ (В), описанный выше, может дополнительно содержать стадию:

d) сбора растения и экстракцию VLP.

Настоящее изобретение обеспечивает VLP, полученную способами (А) и/или (В), описанными выше. Вирусоподобная частица (VLP) может дополнительно содержать один или несколько липидов, полученных из растения. Один или более нативных структурных белков вируса бешенства, состоящих из VLP, могут содержать растение-специфические N-гликаны или модифицированные N-гликаны. Настоящее изобретение также обеспечивает поликлональное антитело, приготовленное с использованием VLP.

Настоящее изобретение включает композицию, содержащую эффективную дозу VLP, полученных описанными выше способами (А) или (В), для индукции иммунного ответа, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также включает способ индукции иммунитета к инфекции, вызванной вирусом бешенства, у субъекта, включающий введение VLP, как описано выше, субъекту. Вирусоподобную частицу (VLP) можно вводить субъекту перорально, внутрикожно, интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

Настоящее изобретение также обеспечивает растительный материал, содержащий VLP, полученную описанными выше способами (А) и/или (В). Растительный материал может быть использован для индукции иммунитета к инфекции, вызванной вирусом бешенства у субъекта. Растительный материал может быть также примешан в пищу в качестве пищевой добавки.

Данное краткое описание изобретения не обязательно описывает все признаки изобретения.

Краткое описание чертежей

Приведенные выше и прочие признаки изобретения будут более понятными из последующего подробного описания, в котором содержатся ссылки на прилагаемые чертежи, на которых:

Фигура 1 показывает анализ методом Вестерн-блоттинга транзигентной экспрессии G-белка вируса бешенства в *Nicotiana benthamiana*. Экспрессия G-белка вируса бешенства проходила под контролем CPMV-НТ с системой амплификации ДНК на основе

содержащего (1091) или не содержащего (1071) BeYDV (смотри таблицу 2 в Примерах для конструкций). Числа в скобках относятся к количеству культуры *Agrobacterium* в миллилитрах, используемой в приготовлении инокулюма бактерий. Растения, инфильтрованные AGL1/1091, собирали через 3 или 4 дня после инфильтрации (DPI).

5 Листья инфильтрованных растений собирали и механически экстрагировали. Белковые экстракты разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием мышиных моноклональных антител к G-белку вируса бешенства (Santa-Cruz SC-57995).

10 Фигура 2 показывает сравнение содержания G-белка вируса бешенства в белковых экстрактах, полученных биохимическим и механическим методами экстракции G-белка вируса бешенства. Белковые экстракты разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием мышиных моноклональных антител к G-белку вируса бешенства (Santa-Cruz SC-57995). Числа в скобках относятся к количеству культуры *Agrobacterium* в миллилитрах, используемой в приготовлении инокулюма бактерий (смотри таблицу 2 для конструкций).

Фигура 3А показывает анализ методом Вестерн-блоттинга содержания G-белка вируса бешенства после разделения методом эксклюзионной хроматографии (SEC) 20 концентрированных белковых экстрактов, полученных из растений, инфильтрованных AGL1/1091. Элюированные фракции после SEC разделяли методом SDS-PAGE и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием мышиных моноклональных антител к G-белку вируса бешенства (Santa-Cruz SC-57995). Фигура 3В показывает анализ с помощью Вестерн-блоттинга содержания G-белка вируса бешенства после разделения методом эксклюзионной хроматографии (SEC) 25 концентрированных белковых экстрактов, полученных из растений, инфильтрованных AGL1/1091 + AGL1/1086. Элюированные фракции после SEC разделяли методом SDS-PAGE и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием мышиных моноклональных антител к G-белку вируса бешенства (Santa-Cruz SC-57995).

30 Фигура 4А показывает праймер IF-RabM-S3.c (SEQ ID NO: 1). Фигура 4В показывает праймер IF-RabM-S1-4.r (SEQ ID NO: 2). Фигура 4С показывает последовательность, кодирующую синтезированный М-белок (соответствующую nt 2496-3104 из Genbank accession number FJ 913470) (SEQ ID NO: 3). Фигура 4D показывает схематическое изображение конструкции номер 1191. Сайты ферментов рестрикции SacII и StuI, 35 используемые для линейаризации плазмиды, указаны на изображении. Фигура 4Е показывает конструкцию номер 1191 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-NT/NOS с экспрессионной кассетой Пластоцианин-P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга) (SEQ ID NO: 4). Фигура 4F показывает кассету экспрессии номер 1066 от промотора 2X35S до терминатора NOS. Открытая рамка считывания 40 М-белка из штаммов ERA вируса бешенства подчеркнута (SEQ ID NO: 5). Фигура 4G показывает аминокислотную последовательность М-белка из штамма ERA вируса бешенства (SEQ ID NO: 6). Фигура 4H показывает схематическое изображение конструкции номер 1066.

Фигура 5А показывает схематическое изображение конструкции номер 1193. Сайты ферментов рестрикции SacII и StuI, используемые для линейаризации плазмиды, указаны на изображении. Фигура 5В показывает конструкцию номер 1193 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-NT/NOS в систему амплификации BeYDV + Репликаза с экспрессионной кассетой Пластоцианин-TBSV P19-Пластоцианин

(супрессор сайленсинга) (SEQ ID NO: 7). Фигура 5С показывает экспрессионную кассету номер 1086 от левого LIR BeYDV до правого LIR BeYDV. Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута. (SEQ ID NO: 8). Фигура 5D показывает схематическое изображение конструкции номер 1086.

5 Фигура 6А показывает праймер IF-RabG-S2+4.c (SEQ ID NO: 9). Фигура 6В показывает праймер IF-RabG-S1-4.r (SEQ ID NO: 10). Фигура 6С показывает последовательность, кодирующую синтезированный G-белок вируса бешенства (соответствующую nt 3317-4891 из Genbank accession number EF 206707), (SEQ ID NO: 11). Фигура 6D показывает схематическое изображение конструкции номер 1192. Сайты ферментов рестрикции
10 SacII и StuI, используемые для линейаризации плазмиды, указаны на изображении. Фигура 6Е показывает конструкцию номер 1192 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-NT/PDISP/NOS с экспрессионной кассетой Пластоцианин-P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга) (SEQ ID NO: 12). Фигура 6F показывает экспрессионную кассету номер 1071 от промотора 2X35S до терминатора NOS. Открытая
15 рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута. (SEQ ID NO: 13). Фигура 6G показывает аминокислотную последовательность PDISP-белок G из штамма ERA вируса бешенства (SEQ ID NO: 14). Фигура 6H показывает схематическое изображение конструкции номер 1071.

Фигура 7А показывает схематическое изображение конструкции номер 1194. Сайты
20 ферментов рестрикции SacII и StuI, используемые для линейаризации плазмиды, указаны на изображении. Фигура 7В показывает конструкцию номер 1194 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-NTVPDISP/NOS в систему амплификации BeYDV + Репликаза с экспрессионной кассетой Пластоцианин-P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга) (SEQ ID NO: 15). Фигура 7С показывает экспрессионную кассету
25 номер 1091 от левого LIR BeYDV до правого LIR BeYDV. Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута. (SEQ ID NO: 16). Фигура 7D показывает схематическое изображение конструкции номер 1091.

Фигура 8А показывает SDS-PAGE при окрашивании Кумаси (Precast 4-12% от BioRad) G-белка препарата VLP. 1) препарат Rab-VLP, 2) маркер молекулярной массы. Фигура
30 8В показывает ответы нейтрализующих антител (МЕ/мл) в группе мышей (5 особей на группу), иммунизированных внутримышечно (i.m.) тремя дозами (D0, D7 и D28) 0.1 мл NG-VLP (Нативный G-белок VLP) вакцины с адьювантом и без него (Alhydrogel (Alhy)). Образцы крови брали на День 44, через 16 дней после 3-х доз. В методе тестирования использовали: тест RFFIT (быстрый тест на ингибирование флуоресцентного свечения):
35 рассчитывали среднее геометрическое титра (GMT) с использованием индивидуальных значений, полученных для каждого животного, и указывали респондеров с положительным ответом. Столбцы представляют GMT с 95% CI. Статистический анализ Анова выполняли между всеми лечебными группами и статистически значимых различий не наблюдалось.

40 Подробное описание изобретения

Приведенное далее описание относится к предпочтительному варианту осуществления изобретения.

Настоящее изобретение относится к вирусоподобным частицам (VLP), содержащим один или более нативных структурных белков вируса бешенства, и способам получения
45 VLP вируса бешенства в растениях. Вирусоподобные частицы (VLP) вируса бешенства могут содержать один или более нативных структурных белков вируса бешенства, например, один или более гликопротеинов, один или более матричных белков, или оба. Вирусоподобная частица (VLP) не содержит белки вируса из вируса растения.

Настоящее изобретение к тому же обеспечивает способ получения вирусоподобных частиц (VLP) вируса бешенства в растениях. Способ может включать введение нуклеиновой кислоты, содержащей регуляторный участок, активный в растениях, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нативный структурный белок вируса бешенства, и одного или нескольких элементов амплификации в растение или часть растения. Далее следует инкубация растения или части растения в условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновых кислот, с получением, таким образом, VLP.

Нативный структурный вирусный белок вируса бешенства (также называемый как нативный структурный вирусный белок вируса бешенства) может относиться ко всей или части последовательности нативного структурного белка вируса бешенства, выделенного из вируса бешенства, присутствующего в любом природном или вариантном штамме вируса бешенства, или изоляте. Таким образом, термин нативный структурный белок вируса бешенства и тому подобное включает природные варианты последовательности нативного структурного белка вируса бешенства, полученные путем мутации в течение жизненного цикла вируса или в ответ на селективное давление (например, лекарственную терапию, расширение тропизма клетки хозяина или инфекционность, и т.д.). Специалисту в данной области будет понятно, что такие последовательности нативного структурного белка вируса бешенства и его варианты могут быть также получены с использованием рекомбинантных технологий. Нативный структурный вирусный белок вируса бешенства не включает химерные белки, в которых, например, трансмембранный домен и/или цитоплазматический концевой сегмент заменены на гетерологичный трансмембранный домен и/или цитоплазматический концевой сегмент по отношению к нативному структурному белку вируса бешенства.

Неограничивающим примером нативного структурного белка вируса бешенства является белок гликопротеин (G) вируса бешенства, фрагмент G-белка, матриксный (M) белок, фрагмент M-белка или их комбинация. Неограничивающие примеры G-белка или фрагментов G-белка, которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением, включают G-белки из штамма ERA вируса бешенства. Пример G-белка, который не должен рассматриваться как ограничивающий, представлен в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14. Кроме того, нативный структурный белок вируса бешенства может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 90-100% сходство с таковой, включая любой процент сходства в указанном диапазоне, например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% сходства последовательности с таковой.

Подобие аминокислотных последовательностей или идентичность может быть вычислена с использованием программ BLASTP и TBLASTN, которые используют BLAST (основное средство поиска, основанное на локальных выравниваниях) алгоритм 2.0. Методики для вычисления сходства аминокислотных последовательностей или идентичности хорошо известны специалистам в данной области, и использование алгоритма BLAST описано в ALTSCHUL с соавт. (1990, J Mol. Biol. 215:403-410) и ALTSCHUL с соавт. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

Нативный структурный вирусный белок может существовать в виде мономера, димера, тримера или их комбинации. Тример представляет собой макромолекулярный комплекс, образованный тремя белками, обычно соединенными нековалентной связью. Без привязки к какой-либо теории полагают, что домен тримеризации белка может быть важным для образования таких тримеров. Таким образом, вирусный белок или его фрагмент может содержать домен тримеризации.

Под «матриксным белком» (также называемым как вирусный коровый белок) понимается белок, который участвует в сборке и стабилизирует структуру вириона. Вирусные матриксные белки обычно напрямую взаимодействуют с клеточными мембранами и могут быть вовлечены в процесс почкования. Вирусные коровые белки представляют собой белки, которые составляют часть нуклеокапсида и обычно напрямую связаны с вирусной нуклеиновой кислотой. Примерами вирусного матриксного или корового белка являются М-белок вируса бешенства, белок М1 вируса гриппа, белок М респираторно-синтициального вируса (RSV) и gag-белок ретровирусов. Примеры матриксных белков, которые можно использовать, как описано в настоящем документе, включают, но без ограничения, М-белок вируса бешенства.

Неограничивающий пример последовательностей, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включает М-белок из штамма ERA вируса бешенства. Иллюстративный М-белок состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6. Кроме того, нативный структурный вирусный белок вируса бешенства может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 90-100% сходство последовательности с таковой, включая любой процент сходства внутри этих диапазонов, например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% сходство последовательности с таковой.

Вирус везикулярного стоматита (семейство рабдовирусов, к которому относится вирус бешенства) и вирус простого герпеса (вирус герпеса, к которому относится вирус ветряной оспы) почкуются VSP4-зависимым образом (Taylor с соавт. J. Virol 81:13631-13639, 2007; Crump с соавт., J. Virol 81:7380-7387, 2007). Так как VSP4 взаимодействует с поздним доменом матриксного белка, можно сделать вывод о том, что матриксный белок необходим для почкования и, как следствие, для продукции VLP. Однако, как описано в настоящем документе, VLP нативного вируса бешенства могут быть получены в растениях с коэкспрессией матриксного белка или без нее. Таким образом, VLP нативного вируса бешенства, продуцированные в растениях из нативных структурных белков, полученных из вируса, в соответствии с настоящим изобретением могут содержать или могут не содержать вирусный матриксный (или вирусный коровый) белок.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения вирусоподобных частиц VLP вируса бешенства в растении, при этом нуклеиновая кислота (первая нуклеиновая кислота), кодирующая нативный структурный белок вируса бешенства, например G-белок вируса бешенства, коэкспрессируется со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей вирусный матриксный белок, например, но без ограничения, матриксный белок вируса бешенства. Нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота могут быть введены в растение на одной стадии или могут быть введены в растение последовательно.

Как описано более подробно ниже, VLP могут быть получены в растении путем экспрессии нуклеиновой кислоты (первой нуклеиновой кислоты), кодирующей один или более нативных структурных белков вируса бешенства, например G-белок вируса бешенства. Вторая нуклеиновая кислота, кодирующая матриксный белок, например, но без ограничения, матриксный белок вируса бешенства, может коэкспрессироваться в растении. Нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота могут быть введены в растение на одной стадии, или могут быть введены в растение последовательно. Нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота могут быть введены в растение транзientным или стабильным образом.

К тому же, растение, которое экспрессирует первую нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более нативных структурных белков вируса бешенства, например G-белок вируса бешенства, может быть трансформировано матричным белком, например, но без ограничения, матричным белком вируса бешенства (второй нуклеиновой кислотой) таким образом, что обе, первая и вторая нуклеиновые кислоты коэкспрессируются в растении. В альтернативном варианте растение, которое экспрессирует матричный белок, например, но без ограничения, матричный белок вируса бешенства (вторую нуклеиновую кислоту), может быть трансформировано первой нуклеиновой кислотой, кодирующей один или более нативных структурных белков вируса бешенства, например G-белок вируса бешенства, таким образом, что обе, первая и вторая нуклеиновые кислоты могут коэкспрессироваться в растении.

К тому же, первое растение, экспрессирующее первую нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более нативных структурных белков вируса бешенства, например G-белок вируса бешенства, может быть скрещено со вторым растением, экспрессирующим вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую матричный белок, например, но без ограничения, матричный белок вируса бешенства, для получения потомственного растения, которое коэкспрессирует первую и вторую нуклеиновые кислоты, кодирующие нативный структурный белок вируса бешенства и матричный белок, соответственно.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения VLP вируса бешенства в растении, который включает введение в растение или часть растения одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих один или более нативных структурных белков вируса бешенства, оперативно связанных с регуляторной областью, активной в растениях, и одного или нескольких элементов амплификации. Растение или часть растения затем инкубируют в условиях, которые обеспечивают экспрессию одной или более нуклеиновых кислот, с получением, таким образом, VLP вируса бешенства. Один или более нативных структурных белков вируса бешенства могут представлять собой один или более G-белков вируса бешенства, фрагмент G-белка, один или более М-белков, фрагмент М-белка или их комбинацию.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает VLP, содержащие один или более нативных структурных белков вируса бешенства, например, но без ограничения, один или более гликопротеинов вируса бешенства, один или более матричных белков, или и то и другое. Вирусоподобные частицы (VLP) могут быть получены способом, который предложен в настоящем изобретении.

Термин «вирусоподобная частица» (VLP) или «вирусоподобные частицы», или «VLP» относится к самоорганизующимся структурам, содержащим один или более структурных белков, таких как, например, нативный структурный белок вируса бешенства, например, но без ограничения, G-белок вируса бешенства. Обычно VLP морфологически и антигенно сходны с вирионами, образующимися при инфекции, но не несут генетической информации, достаточной для репликации, и поэтому неинфекционны. Вирусоподобные частицы (VLP) могут быть получены в пригодных клетках-хозяевах, в том числе клетках растения-хозяина. После экстракции из клетки-хозяина и непосредственно после изоляции и дополнительной очистки в надлежащих условиях, VLP могут быть выделены в виде интактных структур.

Размер (т.е. диаметр) указанных выше VLP может быть измерен, например, с помощью методов динамического светорассеяния (DLS) или электронной микроскопии (ЕМ) и обычно составляет от 40 до 300 нм или любой размер в указанном диапазоне. В отдельных вариантах осуществления размер интактной структуры VLP может

изменяться от примерно 40 нм до примерно 300 нм, или составлять любой размер в указанном диапазоне, например, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм, 120 нм, 130 нм, 140 нм, 150 нм, 160 нм, 170 нм, 180 нм, 190 нм, 200 нм, 210 нм, 220 нм, 230 нм, 240 нм, 250 нм, 260 нм, 270 нм или 280 нм, или любой размер в диапазоне указанных значений. В одном варианте осуществления размер интактной структуры VLP может изменяться от примерно 170 нм до примерно 200 нм, или составлять любой размер в указанном диапазоне, такой как 175 нм, 180 нм, 185 нм, 190 нм, 195 нм, или любой размер в диапазоне указанных значений.

Настоящее изобретение также обеспечивает нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более нативных структурных белков вируса бешенства, оперативно связанных с регуляторным участком, активным в растении. К тому же, один или более нативных структурных белков вируса бешенства могут быть оперативно связаны с одним или несколькими элементами амплификации. Один или более нативных структурных белков вируса бешенства могут представлять собой, например, один или более G-белков вируса бешенства, один или более М-белков, или оба.

Последовательность нуклеиновой кислоты, на которую сделано обращение в настоящем изобретении, может быть «гомологична по существу» или «сходна по существу» последовательности или комплементу последовательности, если последовательность нуклеиновой кислоты гибридизируется с одной или более чем одной нуклеотидной последовательностью или комплементом последовательности нуклеиновой кислоты, как определено в настоящем документе, в жестких условиях гибридизации. Последовательности «гомологичны по существу», «сходны по существу», если по меньшей мере примерно 70% или между 70 и 100%, или любой промежуточный процент, например 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100%, или любой промежуточный процент нуклеотидов совпадают на протяжении определенной длины нуклеотидной последовательности, при условии, что такие гомологичные последовательности проявляют одно или несколько свойств последовательности или кодированного продукта, как описано в настоящем документе. Правильный фолдинг белка может быть важным для стабильности белка, формирования мультимеров, формирования VLP и функционирования. На сворачивание белка могут влиять один или более факторов, включая, но без ограничения, последовательность белка, относительное содержание белка, степень внутриклеточного краудинга, наличие кофакторов, которые могут быть связаны или транзитивно ассоциированы со свернутым, частично свернутым или несвернутым белком.

Такое сходство последовательностей может быть определено с помощью программы сравнения нуклеотидных последовательностей, например, программы, поставляемой в пакете DNASIS (с использованием, например, но без ограничения, следующих параметров: GAP penalty (штраф за пропуск в последовательности) 5, # of top diagonals (число совпадающих к-плетов) 5, fixed GAP penalty (фиксированная коррекция пропуска) 10, k-tuple (размер идентичного участка) 2, floating gap (плавающий пропуск) 10 и window size (размер окна) 5). Однако другие методы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области, например, алгоритмы Смита и Ватермана (Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482), Нидлемана и Вунша (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970), Пирсона и Липмана (Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444), и компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и BLAST, находящиеся в открытом доступе в Национальных институтах здравоохранения, NIH), либо выравнивание вручную и визуальный осмотр

(смотри, например, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel с соавт., eds. 1995 supplement), либо использование Саузерн или Нозерн гибридизации в жестких условиях (смотри Maniatis с соавт., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Предпочтительно, последовательности, которые являются по-существу
 5 гомологичными, проявляют, по меньшей мере, примерно 80% и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, примерно 90% сходства последовательностей на протяжении определенной длины молекулы.

Примером одного из таких жестких условий гибридизации может являться гибридизация в течение ночи (в течение около 16-20 часов) в 4×SSC при 65°C с
 10 последующей отмывкой в 0.1×SSC при 65°C в течение часа или 2 отмывок в 0.1×SSC при 65°C, каждой в течение 20 или 30 минут. Альтернативно, примером жесткого условия гибридизации может служить гибридизация в течение ночи (16-20 часов) в 50%-ном формамиде, 4×SSC при 42°C с последующей отмывкой в 0.1×SSC при 65°C в течение часа или 2 отмывок в 0.1×SSC при 65°C, каждой в течение 20 или 30 минут, или в течение
 15 ночи (16-20 часов), или гибридизация в водном фосфатном буфере Черча (7% SDS; буфер 0.5 M NaPO₄ pH 7.2; 10 mM EDTA) при 65°C с 2 отмывками либо при 50°C в 0.1×SSC, 0.1% SDS по 20 или 30 минут, либо 2 отмывками при 65°C в 2×SSC, 0.1% SDS по 20 или 30 минут для индивидуальных участков последовательности.

Нуклеиновая кислота, кодирующая нативный структурный полипептид вируса бешенства или нативный структурный белок вируса бешенства, может быть описана
 20 как «нуклеиновая кислота вируса бешенства», «нуклеотидная последовательность вируса бешенства», «нативная нуклеиновая кислота вируса бешенства» или «нативная нуклеотидная последовательность вируса бешенства». Например, что не должно рассматриваться как ограничение, вирусоподобная частица, содержащая один или
 25 более нативных структурных белков вируса бешенства или нативных структурных полипептидов вируса бешенства, может быть описана как «VLP вируса бешенства» или «нативная VLP вируса бешенства».

Нативный структурный белок или полипептид вируса бешенства может включать
 30 сигнальный пептид, который является таким же или является гетерологичным по отношению к остальной части полипептида или белка. Термин «сигнальный пептид» хорошо известен в данной области и относится обычно к короткой (примерно 5-30 аминокислот) последовательности аминокислот, находящейся обычно на N-конце полипептида, которая может направлять транслокацию вновь транслированного полипептида в конкретную органеллу, или способствовать позиционированию
 35 специфических доменов полипептидной цепи относительно других. В качестве неограничивающего примера, сигнальный пептид может нацеливать транслокацию белка в эндоплазматический ретикулум и/или способствовать позиционированию N-концевого проксимального домена относительно мембранного якорного домена растущего полипептида для содействия отщеплению и сворачиванию зрелого белка,
 40 например, что не должно рассматриваться как ограничение, нативного структурного белка вируса бешенства.

Сигнальный пептид (SP) может быть нативным для белка или белка вируса, или
 45 сигнальный пептид может быть гетерологичным по отношению к первичной последовательности белка или белка вируса, который экспрессируется. Например, нативный сигнальный пептид нативного G-белка вируса бешенства или нативного M-белка вируса бешенства может быть использован для экспрессии нативного структурного белка вируса бешенства в растительной системе.

Сигнальный пептид может быть также ненативным, например, из белка, вирусного

белка или нативного структурного белка вируса, отличного от белка вируса, или из растительного, животного или бактериального полипептида. Неограничивающим примером сигнального пептида, который может быть использован, является протеиндисульфидизомераза люцерны (PDI SP; нуклеотиды 32-103 входящий No. Z11499).

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает нативный структурный белок вируса бешенства, содержащий нативный или ненативный сигнальный пептид, и нуклеиновые кислоты, кодирующие такие структурные белки вируса бешенства.

Элемент амплификации

Нативный структурный белок или полипептид вируса бешенства может экспрессироваться в системе экспрессии, включающей систему экспрессии на основе вирусной ДНК или РНК, например, но без ограничения, экспрессионную кассету на основе комовируса, и элемент амплификации на основе геминивируса.

Система экспрессии, описанная в настоящем документе, может содержать экспрессионную кассету на основе двухкомпонентного вируса или вируса с двухкомпонентными геном. Например, двухкомпонентные вирусы могут принадлежать семейству Comoviridae. Родовая принадлежность семейства Comoviridae включает комовирус, неповирус, фабавирус, черавирус и садзавирус. Комовирусы включают вирус мозаики коровьего гороха (Cowpea mosaic virus, CPMV), серьезный вирус мозаики коровьего гороха (Cowpea severe mosaic virus, CPSMV), вирус мозаики кабачка (Squash mosaic virus, SqMV), вирус крапчатости красного клевера (Red clover mottle virus, RCMV), вирус крапчатости бобов (Bean pod mottle virus, BPMV), вирус кольцевой пятнистости капусты полевой (Turnip ringspot virus, TuRSV), вирус мозаики кормовых бобов (Broad bean true mosaic virus, BBtMV), вирус пятнистости кормовых бобов (Broad bean stain virus, BBSV), вирус мозаики редиса (Radish mosaic virus, RaMV). Примеры последовательностей РНК-2 комовируса, содержащие элементы энхансера, которые могут быть полезными для различных аспектов изобретения, включают, но без ограничения: CPMV РНК-2 (GenBank Accession No. NC_003550), RCMV РНК-2 (GenBank Accession No. NC_003738), BPMV РНК-2 (GenBank Accession No. NC_003495), CPSMV РНК-2 (GenBank Accession No. NC_003544), SqMV РНК-2 (GenBank Accession No. NC_003800), TuRSV РНК-2 (GenBank Accession No. NC_013219.1), BBtMV РНК-2 (GenBank Accession No. GU 810904), BBSV РНК-2 (GenBank Accession No. FJ 028650), RaMV (GenBank Accession No. NC_003800).

Сегменты двухкомпонентного комовирусного генома РНК называются РНК-1 и РНК-2. РНК-1 кодирует белки, вовлеченные в репликацию, тогда как РНК-2 кодирует белки, необходимые для межклеточного движения, и два капсидных белка. Могут быть использованы любые пригодные кассеты на основе комовируса, включая CPMV, CPSMV, SqMV, RCMV или BPMV, например, экспрессионная кассета может быть основана на CPMV.

«Экспрессионная кассета» относится к нуклеотидной последовательности, содержащей представляющую интерес нуклеиновую кислоту под контролем или функционально (или оперативно) связанную с соответствующим промотором или другими регуляторными элементами для транскрипции представляющей интерес нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине.

Система экспрессии может также содержать элементы амплификации из геминивируса, например, элемент амплификации из вируса желтой карликовости бобовых (BeYDV). BeYDV принадлежит роду Mastreviruses, адаптированному к двудольным растениям. BeYDV является однокомпонентным, имеющим кольцевой однонитчатый ДНК-геном, и может реплицироваться с образованием большого числа копий путем механизма

репликации по типу разматывающегося рулона. Векторные системы на основе репликона ДНК, полученного из BeYDV, использовали для быстрой продукции белка в растениях с высоким выходом.

Используемое в настоящем документе выражение «элементы амплификации» относятся к сегменту нуклеиновой кислоты, содержащему, по меньшей мере, часть одной или нескольких длинных межгенных областей или длинных межгенных повторов (LIR) генома геминивируса. Используемая в настоящем документе «длинная межгенная область» или «длинный межгенный повтор» относится к участку длинной межгенной области, который содержит участок связывания Rep-белка, способный опосредовать вырезание и репликацию Rep-белком геминивируса. В отдельных аспектах сегмент нуклеиновой кислоты, содержащий один или более LIR, может дополнительно содержать короткую межгенную область или малую межгенную область (SIR) генома геминивируса. Используемая в настоящем документе «короткая межгенная область» или «малая межгенная область» относится к комплементарной цепи (короткой IR (SIR) Mastreviruses). Любой пригодный элемент амплификации на основе геминивируса может быть использован в настоящем документе. Смотри, например, WO 2000/20557; WO 2010/025285; Zhang X. с соавт. (2005, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 93, 271-279), Huang Z. с соавт. (2009, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 103, 706-714), Huang Z. с соавт. (2009, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 106, 9-17); которые включены в настоящий документ путем отсылки. Если в конструкции используется больше, чем один LIR, например, два LIR, то промотор, участки CMPV-NT и представляющая интерес последовательность нуклеиновой кислоты, и терминатор являются охваченными каждым из двух LIR. Кроме того, элемент амплификации может, например, происходить из последовательности, описанной в Halley-Stott с соавт. (2007) Archives of Virology 152: 1237-1240, доступной в Gen Bank accession number DQ 458791, включенном в настоящий документ путем отсылки. Сегмент нуклеиновой кислоты, содержащий LIR, представляет собой объединенные нуклеотиды с 2401 по 2566 и с 1 по 128. Сегмент нуклеиновой кислоты, содержащий SIR, представляет собой нуклеотиды с 1154 по 1212.

Как описано в настоящем документе, совместная доставка вектора, полученного из вируса желтой карликовости бобовых (BeYDV), и доставляющего вектора Rep/RepA путем агроинфильтрации листьев *Nicotiana benthamiana* привело к эффективной амплификации репликона и устойчивому продуцированию белка.

Экспрессионная кассета на основе комовируса и элемент амплификации, полученный из геминивируса, могут содержаться на отдельных векторах или компонентные части могут быть включены в один вектор. При использовании двух векторов, первый и второй векторы могут быть введены в клетку растения одновременно или по отдельности.

Вирусная репликаза может быть также включена в систему экспрессии, как описано в настоящем документе, для увеличения экспрессии представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Неограничивающим примером репликазы служит репликаза BeYDV (pRE110), кодирующая Rep и RepA BeYDV (C2/C1; Huang с соавт., 2009, Biotechnol. Bioeng. 103, 706-714; который включен в настоящий документ путем отсылки). Другой неограничивающий пример репликазы описан в Halley-Stott с соавт. (2007) Archives of Virology 152:1237-1240, из Gen Bank accession number DQ 458791, который включен в настоящий документ путем отсылки. Сегмент нуклеиновой кислоты, содержащий ген C1:C2, представляет собой нуклеотиды с 1310 по 2400.

Под «коэкспрессированные» подразумевают, что экспрессия двух или более нуклеотидных последовательностей происходит в растения примерно в одно и то же

время, причем в одной и той же ткани растения. Однако экспрессия нуклеотидных последовательностей не обязана происходить строго одновременно. Экспрессия двух или более нуклеотидных последовательностей должна осуществляться таким образом, чтобы была возможность взаимодействия между кодированными продуктами.

- 5 Коэкспрессия двух или более нуклеотидных последовательностей может иметь место в системе транзientной экспрессии, при этом две или более последовательностей вводят в растение приблизительно одновременно, в условиях, когда происходит экспрессия обеих последовательностей. В альтернативном варианте растение-платформа, содержащее одну из нуклеотидных последовательностей, может быть трансформировано
- 10 стабильным образом, с дополнительной последовательностью, кодирующей представляющий интерес белок, например, нативный структурный белок вируса бешенства, введенной в растение-платформу транзientным образом.

Шаперон

- Правильный фолдинг экспрессированного нативного структурного белка вируса
- 15 бешенства может быть важным для стабильности белка, формирования мультимеров, формирования VLP, функционирования нативного структурного белка вируса бешенства и распознавания нативного структурного белка вируса бешенства антителом, помимо других характеристик. На фолдинг и накопление белка могут оказывать влияние один или более факторов, включая, но без ограничения, последовательность белка,
- 20 относительное содержание белка, степень межклеточного краудинга, pH в клеточном компартменте, наличие кофакторов, которые могут связывать или быть транзientно ассоциированными со свернутым, частично свернутым или несвернутым белком, присутствие одного или более белков-шаперонов, и т.п.

- Белки теплового шока (Hsp) или стресс-белки являются примерами белков-шаперонов,
- 25 которые могут принимать участие в различных клеточных процессах, в том числе синтезе белка, внутриклеточной миграции, предотвращении неправильного сворачивания, предотвращении агрегации белка, сборке и диссоциации белковых комплексов, сворачивании белка и дезагрегации белка. Примерами таких белков теплового шока служат, но без ограничения, Hsp60, Hsp65, Hsp70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-
- 30 30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, циклофилины, ClpP, GrpE, убиквитин, калнексин, и протеиндисульфидизомеразы (смотри, например, Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25:59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27:437-496 (1993); патент США №5232833). Как описано в настоящем документе, белки теплового шока, например, но без ограничения, Hsp40 и Hsp70, могут
- 35 быть использованы для обеспечения сворачивания белка вируса бешенства.

- Примеры Hsp70 включают Hsp72 и Hsc73 клеток млекопитающих, DnaK бактерий, в частности микобактерий, таких как *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* (например, Bacille-Calmette Guerin: называемый в настоящем документе Hsp71). DnaK из *Escherichia coli*, дрожжей и других прокариот, и BiP и Grp78
- 40 эукариот, таких как *A. thaliana* (Lin с соавт. 2001 (Cell Stress and Chaperones 6:201-208). Конкретным примером Hsp70 является *A. thaliana* Hsp70 (кодирован Genbank ref: AY120747.1). Hsp70 способен специфически связывать АТФ, а также несвернутые полипептиды и пептиды, участвуя, таким образом, в сворачивании и разворачивании белка, а также в сборке и разборке белковых комплексов.

- 45 Примеры Hsp40 включают DnaJ прокариот, таких как *E. coli* и микобактерий, и HsJ1, HDJ1 и Hsp40 эукариот, таких как люцерна (Frugis с соавт., 1999. Plant Molecular Biology 40:397-408). Конкретным примером Hsp40 является *M. sativa* MsJ1 (Genbank ref: AJ000995.1). Hsp40 играет роль молекулярного шаперона в сворачивании белка,

термоустойчивости и репликации ДНК, наряду с другими клеточными активностями.

Среди Hsp, Hsp70 и его кошаперон Hsp40 связаны со стабилизацией трансляции и вновь синтезированными полипептидами до завершения синтеза. Без привязки к какой-либо теории полагают, что Hsp40 связывается с гидрофобными участками развернутых (находящихся на стадии возникновения или вновь перенесенных) полипептидов, способствуя, таким образом, взаимодействию комплекса Hsp70-АТР с полипептидом. Гидролиз АТР приводит к формированию стабильного комплекса между полипептидом, Hsp70 и ADP, и высвобождению Hsp40. Связь комплекса Hsp70-ADP с гидрофобными участками полипептида предотвращает их взаимодействие с другими гидрофобными участками, предотвращая неправильное сворачивание и образование агрегатов с другими белками (рассмотрено в Hartl, FU. 1996. Nature 381:571-579).

Нативные белки-шапероны могут способствовать правильному сворачиванию низких уровней рекомбинантного белка, но по мере увеличения уровней экспрессии содержание нативных шаперонов может стать ограничивающим фактором. Высокие уровни экспрессии нативного структурного белка вируса бешенства в агроинфицированных листьях могут привести к накоплению нативного структурного белка вируса бешенства в цитозоле, и коэкспрессия одного или нескольких белков-шаперонов, таких как Hsp70, Hsp40, или обоих, Hsp70 и Hsp40, может понизить уровень искаженных или агрегированных белков и увеличить количество белков, проявляющих третичные и четвертичные структурные характеристики, которые обеспечивают формирование вирусоподобных частиц.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает способ получения VLP вируса бешенства в растении, при этом первая нуклеиновая кислота, кодирующая нативный структурный белок вируса бешенства, коэкспрессируется со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей шаперон. Первая и вторая нуклеиновые кислоты могут быть введены в растение за одну стадию, или могут быть введены в растение последовательно.

Регуляторный элемент

Под терминами «регуляторный участок», «регуляторный элемент» или «промотор» в настоящем описании подразумевается часть нуклеиновой кислоты, как правило, но не всегда, расположенная ранее участка гена, кодирующего белок, и состоящая из ДНК или РНК, или обеих, ДНК и РНК. Если регуляторный участок является активным и оперативно ассоциирован или оперативно связан с представляющим интерес геном, это может привести к экспрессии представляющего интерес гена. Регуляторный элемент может влиять на органоспецифичность или регулировать временную активацию гена или активацию в ходе развития. «Регуляторный участок» включает элементы промоторов, коровые регуляторные элементы, проявляющие базовую промоторную активность, элементы, способные индуцироваться в ответ на внешнее воздействие, элементы, опосредующие промоторную активность, такие как негативные регуляторные элементы или усилители транскрипции. Используемый в настоящем документе «регуляторный участок» может также включать элементы, которые активны после транскрипции, например регуляторные элементы, модулирующие экспрессию генов, такие как усилители трансляции и транскрипции, репрессоры трансляции и транскрипции, расположенные ранее активирующие последовательности (upstream activating sequences) и детерминанты нестабильности мРНК. Некоторые из последних упомянутых элементов могут быть расположены вблизи кодирующей области.

В рамках данного описания термин «регуляторный элемент» или «регуляторный участок», как правило, относится к последовательности ДНК, обычно, но не всегда,

расположенной ранее (5') кодирующей последовательности структурного гена, которая регулирует экспрессию кодирующей области за счет распознавания РНК-полимеразы и/или других факторов, необходимых для начала транскрипции на определенном участке. Однако следует учитывать, что другие нуклеотидные последовательности, расположенные в интронах или 3' последовательности могут также участвовать в регулировании экспрессии представляющей интерес кодирующей области. Примером регуляторного элемента, осуществляющего распознавание РНК-полимеразы или других факторов транскрипции, что обеспечивает ее начало в определенной позиции, является элемент промотора. Большая часть, но не все, регуляторные элементы эукариотов содержат ТАТА-бокс, то есть консервативную последовательность нуклеиновой кислоты, состоящую из пар азотистых оснований аденозин и тимидин, обычно расположенных приблизительно за 25 пар нуклеотидов ранее сайта начала транскрипции. Элемент промотора содержит базальный элемент промотора, ответственный за инициирование транскрипции, а также другие регуляторные элементы (как указано выше), модифицирующие экспрессию генов.

Существует несколько типов регуляторных участков, в том числе активные в ходе развития, индуцируемые или конститутивные. Регуляторный участок, активный в ходе развития или управляющий дифференциальной экспрессией гена, активируется в определенных органах или тканях органа в определенные моменты времени в процессе развития данного органа или ткани. Тем не менее, некоторые регуляторные участки, которые активны в ходе развития, могут быть предпочтительно активны в определенных органах или тканях на определенных стадиях развития, они могут также быть активны либо в ходе развития, либо на базовом уровне в других органах или тканях растения. Примерами тканеспецифических регуляторных участков, например, see-специфических регуляторных участков, являются промотор напина и промотор круциферина (Rask с соавт., 1998, J. Plant Physiol. 152:595-599; Bilodeau с соавт., 1994, Plant Cell 14:125-130). Примером промотора, специфического для листьев, является промотор пластоцианина (смотри патент США 7125978, который включен в настоящий документ путем отсылки).

Индуктируемым является регуляторный участок, который способен прямо или косвенно активировать транскрипцию одной или более последовательностей ДНК или гена под действием индуктора. В отсутствие индуктора транскрипции последовательности ДНК или гена не происходит. Как правило, белковый фактор, который специфически связывается с индуцируемым регуляторным участком для активации транскрипции, может присутствовать в неактивной форме, которая затем прямо или косвенно превращается в активную под действием индуктора. Однако белковый фактор может также и отсутствовать. В качестве индуктора может служить химический агент, такой как белок, метаболит, регулятор роста, гербицид или фенольное соединение, или физиологический стресс, оказываемый непосредственно теплом, холодом, солью или токсичными элементами, или косвенно при действии патогенного или болезнетворного агента, например вируса. Действие индуктора на клетку растения, содержащую индуцируемый регуляторный участок, может происходить за счет внешнего воздействия, например, опрыскивания, полива, нагревания или прочих способов. Индуцируемые регуляторные элементы могут иметь происхождение из генов как растительного, так и нерастительного происхождения (например, Gatz, C. and Lenk, L.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358; включенный в настоящий документ посредством отсылки). Примеры возможных индуцируемых промоторов включают, но без ограничения, индуцируемый тетрациклином промотор (Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89-108; включенный в настоящий документ путем отсылки),

индуцируемый стероидами промотор (Aoyama, T. and Chua, N.H., 1997, Plant 1. 2, 397-404; включенный в настоящий документ путем отсылки) и индуцируемый этанолом промотор (Salter, M.G., с соавт, 1998, Plant Journal 16, 127-132; Caddick, M.X., с соавт, 1998, Nature Biotech. 16, 177-180, включенные в настоящий документ путем отсылки),
 5 гены IB6 и SKI1, индуцируемые цитокином (Brandstatter, I. and Kieber, J., 1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982-985; включенные в настоящий документ путем отсылки), и индуцируемый ауксином элемент DR5 (Ulmasov, T., с соавт., 1997, Plant Cell 9, 1963-1971; включенный в настоящий документ путем отсылки).

Конститутивный регуляторный участок управляет экспрессией гена в различных
 10 частях растения и постоянно в ходе его развития. Примерами известных конститутивных регуляторных элементов являются промоторы, связанные с транскриптом CaMV 35S (Odell с соавт., 1985, Nature, 313:810-812), гены актина риса 1 (Zhang с соавт, 1991, Plant Cell, 3:1155-1165), актина 2 (An с соавт., 1996, Plant J., 10:107-121) или тропомиозина 2 (патент США №5,428,147, включенный в настоящий документ путем отсылки), и
 15 триозофосфатизомеразы 1 (Xu с соавт., 1994, Plant Physiol. 106:459-467), ген убиквитина кукурузы 1 (Cornejo с соавт., 1993, Plant Mol. Biol. 29:637-646), гены убиквитина Arabidopsis 1 и 6 (Holtorf с соавт., 1995, Plant Mol. Biol. 29:637-646), и фактора гена инициации трансляции табака 4A (Mandel с соавт., 1995, Plant Mol. Biol. 29:995-1004).

Используемый в настоящем документе термин «конститутивный» не означает
 20 обязательно, что экспрессия гена под управлением конститутивного регуляторного участка осуществляется на одном и том же уровне во всех типах клеток, но то, что экспрессия осуществляется в широком интервале типов клеток, хотя часто в различном количестве. Конститутивные регуляторные элементы могут быть связаны с другими последовательностями для дополнительного усиления транскрипции и/или трансляции
 25 нуклеотидной последовательности, с которой они оперативно связаны. Например, система CPMV-НТ получена из нетранслируемых областей вируса мозаики коровьего гороха (CPMV) и демонстрирует усиленную трансляцию связанной кодирующей последовательности. Под «нативный» понимается, что нуклеиновая кислота или аминокислотная последовательность имеет природное происхождение или является
 30 «дикого типа». Под «функционально связанный» понимается, что определенные последовательности, например регуляторный элемент и представляющая интерес кодирующая область, взаимодействуют прямо или косвенно для осуществления заданной функции, такой как опосредование или модуляция экспрессии генов. Взаимодействие оперативно связанных последовательностей может, например, осуществляться за счет
 35 белков, которые взаимодействуют с оперативно связанными последовательностями.

Изобретение также обеспечивает VLP, которые приобретают липидную оболочку из плазматической мембраны клетки, в которой происходит экспрессия VLP. Например, если экспрессия одного или более нативных структурных белков вируса бешенства происходит в системе на основе растения, то полученные VLP могут приобрести
 40 липидную оболочку из плазматической мембраны клетки растения.

В общем случае термин «липид» относится к растворимым в жирах (липофильным) природным молекулам. Вирусоподобные частицы (VLP), полученные в растении согласно некоторыми аспектами изобретения, могут образовывать комплексы с липидами растительного происхождения. Липиды растительного происхождения могут
 45 присутствовать в форме липидного бислоя и могут дополнительно содержать оболочку, окружающую VLP. Липиды растительного происхождения могут содержать липидные компоненты плазматической мембраны растения, в котором были получены VLP, в том числе фосфолипиды, три-, ди- и моноглицериды, а также жирорастворимый стерин

или метаболиты, содержащие стерин. Примеры включают фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, гликофинголипиды, фитостерины или их комбинации. Липид растительного происхождения может также быть назван «растительным липидом». Примеры фитостеринов включают кампестерин, стигмастерин, эргостерин, брассикастерин, дельта-7-стигмастерин, дельта-7-авенастерин, даукостерин, ситостерин, 24-метилхолестерин, холестерин или бета-ситостерин - смотри, например, Mongrand с соавт., 2004. Специалисту в данной области будет понятно, что липидный состав плазматической мембраны клетки может изменяться в зависимости от культуры или условий выращивания клеток или организма, или разновидностей, из которых получают клетку. Как правило, наиболее распространенным фитостерином является бета-ситостерин.

Клеточные мембраны обычно содержат липидные бислои и белки, выполняющие различные функции. Определенные липиды могут быть локализованы в липидном бислое, образуя так называемые «липидные рафты». Микродомены этих липидных рафтов могут быть обогащены сфинголипидами и стеринами. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, можно полагать, что липидный рафт играет значительную роль в эндо- и экзоцитозе, входе или выходе вирусов или других возбудителей инфекции, межклеточной сигнальной трансдукции, взаимодействии с другими структурными компонентами клетки или организма, такими как внутриклеточные и внеклеточные матрицы.

Вирусоподобная частица (VLP), полученная в растении, может индуцировать нативный структурный белок вируса бешенства, содержащий растение-специфические N-гликаны. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает вирусоподобную частицу (VLP), содержащую нативный структурный белок вируса бешенства, содержащий растение-специфические N-гликаны.

Кроме того, модификация N-гликана в растениях известна (смотри, например, патент США 60/944344; который включен в настоящий документ путем отсылки), и возможно получение нативных структурных белков вируса бешенства, содержащих модифицированные N-гликаны. Возможно получение нативных структурных белков вируса бешенства с модифицированным паттерном гликозилирования, например, с пониженным уровнем фукозилирования, ксилозилирования или как фукозилирования, так и ксилозилирования N-гликанов, либо получение нативных структурных белков вируса бешенства с модифицированным паттерном гликозилирования, где в белке уменьшен уровень фукозилирования, ксилозилирования или и того, и другого, но присутствует повышенный уровень галактозилирования. Кроме того, модулирование пост-трансляционной модификации, например, присоединение терминальной галактозы, может привести к снижению степени фукозилирования и ксилозилирования экспрессированных нативных структурных белков вируса бешенства по сравнению с растением дикого типа, экспрессирующим нативный структурный белок вируса бешенства.

Например, что не следует рассматривать как ограничение, синтез нативных структурных белков вируса бешенства с модифицированным паттерном гликозилирования можно осуществить при коэкспрессии нативных структурных белков вируса бешенства с нуклеотидной последовательностью, кодирующей бета-1,4-галактозилтрансферазу (GalT), например, но без ограничения, GalT млекопитающих или GalT человека, однако также можно использовать GalT и из других источников. Каталитический домен GalT может быть также слит с доменом CTS (то есть цитоплазматическим хвостом, трансмембранным доменом, стволовым участком) N-

ацетилглюкозаминилтрансферазы (GNT1) с образованием гибридного фермента GNT1-GalT, и указанный гибридный фермент может выделяться при коэкспрессии с нативным структурным белком вируса бешенства. Также может быть использована коэкспрессия нативного структурного белка вируса бешенства с нуклеотидной последовательностью, кодирующей N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III), например, но без ограничения, GnT-III млекопитающих или GnT-III человека, однако также можно использовать GnT-III из других источников. Кроме того, можно также использовать гибридный фермент GNT1-GnT-III, состоящий из CTS GNT1, слитого с GnT-III.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к VLP, содержащим нативный структурный белок вируса бешенства с модифицированными N-гликанами.

Не желая ограничиваться конкретной теорией, считают, что наличие растительных N-гликанов на нативном структурном белке вируса бешенства может стимулировать иммунный ответ, способствуя связыванию нативного структурного белка вируса бешенства антигенпредставляющими клетками. Стимулирование иммунного ответа с помощью растительных N-гликанов было предложено Saint-Jore-Dupas с соавт. (2007). Кроме того, конформация VLP может быть выгодной для представления антигена и повышать адъювантное действие VLP в комплексе с липидным слоем растительного происхождения.

Возникновение VLP может быть обнаружено с использованием любого подходящего способа, например, градиентов сахарозы или эксклюзионной хроматографии. VLP могут быть оценены в отношении структуры и размера с помощью, например, электронной микроскопии или эксклюзионной хроматографии.

Для проведения эксклюзионной хроматографии суммарные растворимые белки экстрагируют из ткани растения путем гомогенизации (Polytron) образца растительного материала, измельченного в замороженном виде, в экстракционном буфере, и нерастворимый материал удаляют центрифугированием. Хорошие результаты могут быть получены и при осаждении ледяным ацетоном или PEG. Проводят количественное определение растворимого белка и экстракт пропускают через колонку Sephacryl, например, колонку Sephacryl™ S500. Декстран голубой (Blue Dextran 2000) может быть использован в качестве калибровочного стандарта. После хроматографии фракции можно дополнительно анализировать методом иммуноблоттинга для определения белкового состава фракции.

Отделенная фракция может представлять собой, например, супернатант (в случае центрифугирования, седиментации или осаждения) или фильтрат (в случае фильтрации) и является обогащенной белками или супраструктурными белками, такими как, например, розетковидные структуры или высшего порядка, более высокой молекулярной массы частицы, такие как VLP. Отделенная фракция может быть подвергнута дальнейшей обработке с использованием, например, дополнительных стадий центрифугирования, осаждения, хроматографии (например, эксклюзионной хроматографии, ионного обмена, аффинной хроматографии), тангенциальной поточной фильтрации или их комбинации для изоляции, очистки, концентрирования или их комбинации белков или супраструктурных белков. Присутствие очищенных белков или супраструктурных белков может быть подтверждено, например, нативным или SDS-PAGE, Вестерн анализом с использованием соответствующего идентифицирующего антитела, капиллярного электрофореза, электронной микроскопии или любого другого метода, что будет очевидно для опытного специалиста в данной области.

На Фигуры 3А и 3В показан пример профиля элюирования анализа методом эксклюзионной хроматографии экстракта растения, содержащего VLP. В этом случае

VLP, содержащие нативные структурные белки вируса бешенства, элюируют во фракциях с 8 до приблизительно 11, розеткообразные и высокомолекулярные структуры элюируют во фракциях примерно с 12 до 14, и низкомолекулярную или растворимую форму нативного структурного белка вируса бешенства элюируют во фракциях примерно от 15 до 17.

Вирусоподобные частицы (VLP) могут быть очищены или экстрагированы с использованием любого подходящего способа, например, путем химической или биохимической экстракции. Вирусоподобные частицы (VLP) являются относительно чувствительными к обезвоживанию, нагреву, pH, поверхностно-активным веществам и детергентам. Таким образом, может быть полезным использовать способы, которые максимально повышают выход, максимально уменьшают загрязнение фракции VLP клеточными белками, сохраняют целостность белков или VLP и, при необходимости, связанной липидной оболочки или мембраны, способы ослабления клеточной стенки для высвобождения белков или VLP. Например, могут быть использованы способы получения протопласта и/или сферопластов (смотри, например, WO 2011/035422, которая включена в настоящий документ путем отсылки) для получения VLP, как описано в настоящем документе. Сведение к минимуму или исключение использования детергентов или поверхностно-активных веществ, таких как, например, SDS или Тритон X-100, может быть полезным для улучшения выхода при экстракции VLP. Затем VLP могут быть оценены в отношении структуры и размера с помощью, например, электронной микроскопии или эксклюзионной хроматографии, как указано выше.

Экспрессия одной или нескольких, или более генетических конструкций по настоящему изобретению может происходить в любом приемлемом растении-хозяине, трансформированном нуклеотидной последовательностью или конструкциями, или векторами в соответствии с настоящим изобретением. К таким хозяевам относятся, но без ограничения, сельскохозяйственные культуры, в том числе люцерна, канولا, *Brassica spp.*, кукуруза, *Nicotiana spp.*, люцерна, картофель, женьшень, горох, овес, рис, соя, пшеница, ячмень, подсолнечник, хлопчатник и т.п.

Одна или более генетических конструкций по настоящему изобретению могут также содержать 3'-нетранслируемую область. Указанная 3'-нетранслируемая область относится к той части гена, включающей сегмент ДНК, которая содержит сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК или экспрессию генов. Сигнал полиаденилирования обычно способствует присоединению треков полиадениловой кислоты к 3'-концу прекурсора мРНК. Сигналы полиаденилирования обычно распознаются по наличию гомологии с канонической формой 5'-ААТААА-3', несмотря на то, что вариации не являются редкими. Неограничивающими примерами подходящих 3'-областей являются нетранслируемые 3'-области транскрипции, содержащие сигнал полиаденилирования опухолееиндуцирующей Ti-плазмиды гена агробактерии *Agrobacterium*, например, нопалинсинтазы (NOS-ген), гены растений, такие как гены белков хранения сои и гены малой субъединицы рибулозо-1,5-бифосфат-карбоксилазы (ssRUBISCO; патент США 4962028; включенный в настоящий документ путем отсылки), промотор, используемый при регулировании экспрессии пластоцианина, описанный в патенте США 7125978 (который включен в настоящий документ путем отсылки).

Одна или более генетических конструкций по настоящему изобретению могут также включать при необходимости дополнительные энхансеры, как энхансеры трансляции, так и транскрипции. Энхансеры могут располагаться 5' или 3' к транскрибируемой последовательности. Энхансерные области хорошо известны специалистам в данной

области и могут включать иницирующий кодон АТГ, смежные последовательности и тому подобное. Иницирующий кодон, в случае присутствия, может быть в фазе с рамкой считывания («в рамке») кодирующей последовательности для обеспечения правильной трансляции транскрибируемой последовательности.

5 Конструкции по настоящему изобретению можно вводить в клетки растения методами Ti-плазмид, Ri-плазмид, векторов вирусов растений, прямой трансформации ДНК, микроинъекции, электропорации и т.д. Для ознакомления с этими методами, см., например, Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988); Geier and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988);
 10 и Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997). К другим методам относятся прямая абсорбция ДНК, применение липосом, электропорация, например, с помощью протопластов, микроинъекций, микроснарядов или вискерров, и вакуум инфильтрации. Смотри, например, Bilang с соавт. (*Gene* 100:247-
 15 250 (1991), Scheid с соавт. (*Mol. Gen. Genet.* 228:104-112, 1991), Guerche с соавт. (*Plant Science* 52:111-116, 1987), Neuhaus с соавт. (*Theor. Appl Genet.* 75:30-36, 1987), Klein с соавт., *Nature* 327:70-73 (1987); Howell с соавт. (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch с соавт. (*Science* 227:1229-1231, 1985), DeBlock с соавт., *Plant Physiology* 91:694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods*
 20 *in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu and Lomonosoff (*J Virol Meth*, 105:343-348, 2002), патенты США №№4945050; 5036006; и 5100792, заявки на патент США сер. №№08/438666, подана 10 мая 1995 года, и 07/951715, подана 25 сентября 1992 года (все документы включены в настоящий документ путем отсылки).

25 Как приведено в описании ниже, методы транзientной экспрессии могут служить для экспрессии конструкций по настоящему изобретению (смотри Liu and Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348; который включен в настоящий документ путем отсылки). В альтернативном варианте могут быть использованы методы транзientной экспрессии на основе вакуума, описанные Kapila с соавт. 1997, включенные
 30 в настоящий документ путем отсылки. Указанные методы могут включать, например, но без ограничения, методы агроинокуляции или агроинфильтрации, инфильтрации шприцем, однако, как было отмечено выше, также могут быть применены другие транзientные методы. Согласно способам агроинокуляции, агроинфильтрации или инфильтрации шприцем смесь агробактерий (*Agrobacterid*), содержащих заданную
 35 нуклеиновую кислоту, вводится в межклеточное пространство ткани, например, листья, надземную часть растения (включая стебель, листья и цветок), другие части растения (стебель, корни, цветок) или все растение. После перехода через эпидермис агробактерий (*Agrobacterid*) инфицируют копии t-ДНК и переносят их в клетки. Эпизомная транскрипция t-ДНК и трансляция мРНК приводят к продукции целевого белка в
 40 инфицированных клетках, однако проникновение t-ДНК внутрь ядра является транзientным.

Для более простой идентификации трансформированных клеток растения конструкции по настоящему изобретению можно далее изменять с включением селективируемых маркеров растений. К полезным селективируемым маркерам относятся ферменты,
 45 обеспечивающие устойчивость к химическим агентам, таким как антибиотики, например гентамицин, гигромицин, канамицин, или гербициды, например, фосфинотрицин, глифосат, хлорсульфурон и т.п. Аналогичную роль могут играть ферменты, осуществляющие получение соединения, которое обнаруживается по изменению цвета,

например бета-глюкуронидаза (GUS), или по свечению, например люцифераза или зеленый флуоресцентный белок (GFP).

Еще одним компонентом настоящего изобретения являются трансгенные растения, клетки или семена растений, содержащие конструкцию гена по настоящему изобретению.

5 Способы регенерации целого растения из его клеток также известны в данной области. В целом, трансформированные клетки растения культивируют в соответствующей среде, которая может содержать селективные агенты, такие как антибиотики, при этом селектируемые маркеры служат для идентификации трансформированных растительных клеток. После образования каллуса, формирование ростков можно стимулировать
10 действием соответствующих растительных гормонов известными способами, затем ростки переносят в субстрат для регенерации растения. Далее растения могут служить для производства следующих генераций, либо из семян либо методами вегетативного размножения. Трансгенные растения могут быть также получены без использования культур тканей.

15 Настоящее изобретение включает нуклеотидные последовательности:

20

25

30

35

40

45

Таблица 1: Перечень идентификационных номеров последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Таблица/Фигура
1	IF-RabM-S3.c	Фигура 4А
2	IF-RabM-S1-4.r	Фигура 4В
3	Последовательность, кодирующая синтезированный М-белок (соответствующая нуклеотидам 2496-3104 из Genbank, код доступа FJ913470)	Фигура 4С
4	Конструкция номер 1191 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-НТ/NOS с кассетой экспрессии Пластоцианин-P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)	Фигура 4Е
5	Кассета экспрессии номер 1066 от промотора 2X35S до терминатора NOS. Открытая рамка считывания М-белка из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута.	Фигура 4F
6	Аминокислотная последовательность М-белка из штамма ERA вируса бешенства	Фигура 4G
7	Конструкция номер 1193 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-НТ/NOS в систему амплификации BeYDV+Репликаза с кассетой экспрессии Пластоцианин-TBSV P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)	Фигура 5В
8	Кассета экспрессии номер 1086 от левого LIR BeYDV до правого LIR BeYDV. Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса	Фигура 5С

SEQ ID NO:	Описание	Таблица/Фигура
	бешенства подчеркнута.	
9	IF-RabG-S2+4.c	Фигура 6A
10	IF-RabG-S1-4.r	Фигура 6B
11	Последовательность, кодирующая синтезированный G-белок вируса бешенства (соответствующая нуклеотидам 3317-4891 из Genbank, код доступа EF206707)	Фигура 6C
12	Конструкция номер 1192 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS с кассетой экспрессии Пластоцианин-P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)	Фигура 6E
13	Кассета экспрессии номер 1071 от промотора 2X35S до терминатора NOS. Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута.	Фигура 6F
14	Аминокислотная последовательность PDISP-G-белка из штамма ERA вируса бешенства	Фигура 6G
15	Конструкция номер 1194 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS в систему амплификации BeYDV+Репликаза с кассетой экспрессии Пластоцианин-P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)	Фигура 7B
16	Кассета экспрессии номер 1091 от левого LIR BeYDV до правого LIR BeYDV. Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута.	Фигура 7C

Настоящее изобретение будет далее проиллюстрировано в следующих примерах.
Примеры
Конструкции

Таблица 2. Конструкции, содержащие последовательности, кодирующие нативный структурный белок вируса бешенства

Система экспрессии	Система амплификации	Сигнальный пептид	Структурный белок	Номер конструкции
CPMV HT	-	-	М вируса бешенства	1066
CPMV HT	BeYDV+rep	-	М вируса бешенства	1086
CPMV HT	-	Sp PDI	G вируса бешенства	1071
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	G вируса бешенства	1091

Пример 1: Сборка кассет экспрессии с белком вируса бешенства

А-2X35S/CPMV-НТ/М вируса бешенства/NOS (Конструкция номер 1066)

Последовательность, кодирующую М-белок из штамма ERA вируса бешенства, клонировали в систему экспрессии 2X35S/CPMV-НТ/NOS в плазмиду, содержащую кассету экспрессии Plasto_pro/P19/Plasto_ter, с использованием следующего метода на основе ПЦР. Фрагмент, содержащий полную последовательность, кодирующую М-белок, амплифицировали с помощью праймеров IF-RabM-S3.c (Фигура 4А, SEQ ID NO: 1) и IF-RabM-S1-4.r (Фигура 4В, SEQ ID NO: 2) с использованием синтезированного гена М (соответствующего nt 2496-3104 из Genbank accession number FJ 913470) (Фигура 4С, SEQ ID NO: 3) в качестве шаблона. Продукт ПЦР клонировали в системе экспрессии 2X35S/CPMV-НТ/NOS с использованием системы клонирования In-Fusion cloning system (Clontech, Mountain View, CA). Конструкцию 1191 (Фигура 4D) расщепляли ферментом рестрикции SacII и StuI, и линеаризованную плазмиду использовали для реакции сборки In-Fusion assembly. Конструкция номер 1191 представляет собой акцепторную плазмиду, предназначенную для клонирования «In Fusion» представляющих интерес генов в кассете экспрессии на основе CPMV-НТ. Это также включает конструкцию гена для коэкспрессии супрессора сайленсинга TBSV P19 под контролем промотора и терминатора гена пластоцианина люцерны. Основа конструкции номер 1191 представляет собой бинарную плазмиду pCAMBIA, и последовательность от левых до правых границ t-ДНК представлена на Фигуре 4Е (SEQ ID NO: 4). Полученной конструкции был присвоен номер 1066 (Фигура 4F, SEQ ID NO: 5). Аминокислотная последовательность М-белка из штамма ERA вируса бешенства представлена на Фигуре 4G (SEQ ID NO: 6). Изображение плазмиды 1066 представлено на Фигуре 4Н.

В-2X35S/CPMV-НТ/М вируса бешенства/NOS в систему амплификации BeYDV + Репликаза (Конструкция номер 1086)

Последовательность, кодирующую М-белок из штамма ERA вируса бешенства, клонировали в систему экспрессии 2X35S/CPMV-НТ/NOS, содержащую систему амплификации BeYDV + Репликаза в плазмиде, содержащей кассету экспрессии Plasto_pro/P19/Plasto_ter, с использованием следующего метода на основе ПЦР. Фрагмент, содержащий полную последовательность, кодирующую М-белок, амплифицировали с помощью праймеров IF-RabM-S3.c (Фигура 4А, SEQ ID NO: 1) и IF-RabM-S1-4.r (Фигура 4В, SEQ ID NO: 2) с использованием синтезированного гена М (соответствующего nt 2496-3104 из Genbank accession number FJ 913470) (Фигура 4С, SEQ ID NO: 3) в качестве шаблона. Продукт ПЦР клонировали в системе экспрессии 2X35S/CPMV-НТ/NOS с использованием системы клонирования In-Fusion cloning system (Clontech, Mountain View, CA). Конструкцию 1193 (Фигура 5А, SEQ ID NO: B1) расщепляли ферментом рестрикции

SacII и StuI, и линеаризованную плазмиду использовали для реакции сборки In-Fusion assembly reaction. Конструкция номер 1193 представляет собой акцепторную плазмиду, предназначенную для “In Fusion” клонирования представляющих интерес генов в cassette экспрессии на основе CPMV-NT в систему амплификации BeYDV. Это также включает

5 конструкции гена для коэкспрессии супрессора сайленсинга TBSV P19 под контролем промотора и терминатора гена пластоцианина люцерны. Основа конструкции номер 1193 представляет собой бинарную плазмиду pCAMBIA, и последовательность от левых до правых границ t-ДНК представлена на Фигуре 5B (SEQ ID NO: 7). Полученной конструкции был присвоен номер 1086 (Фигура 5C, SEQ ID NO: 8). Аминокислотная

10 последовательность М-белка из штамма ERA вируса бешенства представлена на Фигуре 4G (SEQ ID NO: 6). Изображение плазмиды 1086 представлено на Фигуре 5D.

C-2X35S/CPMV-NT/PDISP/G вируса бешенства/NOS (Конструкция номер 1071)

Последовательность, кодирующую G-белок из штамма ERA вируса бешенства, клонировали в систему экспрессии 2X35S-CPMV-NT-PDISP-NOS в плазмиде, содержащей

15 cassette экспрессии Plasto_pro/P19/Plasto_ter с использованием следующего метода на основе ПЦР. Фрагмент, содержащий последовательность, кодирующую G-белок, без его сигнального пептида дикого типа амплифицировали с помощью праймеров IF-RabG-S2+4.c (Фигура 6A, SEQ ID NO: 9) и IF-RabG-S1-4.r (Фигура 6B, SEQ ID NO: 10) с использованием синтезированного гена G (соответствующего nt 3317-4891 из Genbank

20 accession number EF 206707) (Фигура 6C, SEQ ID NO: 11) в качестве шаблона. Продукт ПЦР клонировали внутри рамки считывания с сигнальным пептидом люцерны PDI в системе экспрессии 2X35S/CPMV-NT/NOS с использованием системы клонирования In-Fusion cloning system (Clontech, Mountain View, CA). Конструкцию 1192 (Фигура 6D) расщепляли ферментом рестрикции SacII и StuI, и линеаризованную плазмиду

25 использовали для реакции сборки In-Fusion assembly reaction. Конструкция номер 1192 представляет собой акцепторную плазмиду, предназначенную для “In Fusion” клонирования представляющих интерес генов в рамке с сигнальным пептидом протеиндисульфидизомеразы (PDI) люцерны в cassette экспрессии на основе CPMV-NT. Это также включает конструкцию гена для коэкспрессии супрессора сайленсинга TBSV

30 P19 под контролем промотора и терминатора гена пластоцианина люцерны. Основа конструкции 1192 представляет собой бинарную плазмиду pCAMBIA, и последовательность от левых до правых границ t-ДНК представлена на Фигуре 6E (SEQ ID NO: 12). Полученной конструкции был присвоен номер 1071 (Фигура 6F, SEQ ID NO: 13). Аминокислотная последовательность PDISP/G-белок из штамма ERA вируса

35 бешенства представлена на Фигуре 6G (SEQ ID NO: 14). Изображение плазмиды 1071 представлено на Фигуре 6H.

D-2X35S/CPMV-NT/PDISP/G вируса бешенства/NOS в систему амплификации BeYDV + Репликаза (Конструкция номер 1091)

Последовательность, кодирующую G-белок из штамма ERA вируса бешенства, клонировали в 2X35S/CPMV-NT/PDISP/NOS, содержащую систему амплификации BeYDV

40 + репликаза в плазмиде, содержащей cassette экспрессии Plasto_pro/P19/Plasto_ter с использованием следующего метода на основе ПЦР. Фрагмент, содержащий последовательность, кодирующую G-белок вируса бешенства, без его сигнального пептида дикого типа, амплифицировали с помощью праймеров IF-RabG-S2+4.c (Фигура

45 6A, SEQ ID NO: 9) и IF-RabG-S1-4.r (Фигура 6B, SEQ ID NO: 10) с использованием синтезированного G гена (соответствующего nt 3317-4891 из Genbank accession number EF 206707) (Фигура 6C, SEQ ID NO: 11) в качестве шаблона. Продукт ПЦР клонировали в рамке с сигнальным пептидом протеиндисульфидизомеразы (PDI) люцерны в cassette

экспрессии 2X35S/CPMV-НТ/NOS в систему амплификации BeYDV с использованием системы клонирования In-Fusion cloning system (Clontech, Mountain View, CA). Номер конструкции 1194 (Фигура 7А) расщепляли ферментом рестрикции SacII и StuI, и

линеаризованную плазмиду использовали для реакции сборки In-Fusion assembly reaction. Конструкция номер 1194 представляет собой акцепторную плазмиду, предназначенную для “In Fusion” клонирования представляющих интерес генов в рамке с сигнальным пептидом протеиндисульфидизомеразы (PDI) люцерны в каскаде экспрессии на основе CPMV-НТ в систему амплификации BeYDV. Это также включает конструкцию гена для коэкспрессии супрессора сайленсинга TBSV P19 под контролем промотора и терминатора гена пластоцианина люцерны. Основа конструкции номер 1194 представляет собой бинарную плазмиду pCAMBIA, и последовательность от левых до правых границ t-ДНК представлены на Фигуре 7В (SEQ ID NO: 15). Полученной конструкции присвоили номер 1091 (Фигура 7С, SEQ ID NO: 16). Аминокислотная последовательность PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства представлена на Фигуре 6G (SEQ ID NO: 14). Изображение плазмиды 1091 представлено на Фигуре 7D.

Пример 2: Подготовка растительной биомассы, инокулята и агроинфильтрации

Термины «биомасса» и «растительный материал», используемый в настоящем описании, означают любой материал, полученный из растения. Биомасса или растительный материал может включать растение целиком, ткань, клетки или любую их фракцию. Кроме того, биомасса или растительный материал может включать внутриклеточные компоненты растения, внеклеточные компоненты растения, жидкие или твердые экстракты растений или их комбинацию. Кроме того, биомасса или растительный материал может включать растение, клетки растения, ткань, жидкий экстракт или их комбинацию, из листьев растения, стеблей, плодов, корней или их комбинации. Часть растения может включать растительный материал или биомассу.

Растения *Nicotiana benthamiana* выращивали из семян в плоских поддонах, заполненных имеющимся в продаже субстратом из торфяного мха. Растения выращивали в теплице при световом периоде 16/8 и температурном режиме 25°C днем/20°C ночью. По истечении трех недель после посева семян отдельные ростки собрали, пересаживали в горшки и оставляли для роста в теплице еще в течение трех недель в тех же условиях окружающей среды.

Агробактерий (*Agrobacteria*), трансфецированные каждой конструкцией, выращивали в среде YEB, дополненной 10 mM 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 20 мкМ ацетосирингона, 50 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл карбенициллина, pH 5.6, до момента достижения плотности клеток OD₆₀₀ между 0.6 и 1.6. Взвеси агробактерий (*Agrobacterium*) центрифугировали перед использованием, и ресуспендировали в среде инфильтрата (10 mM MgCl₂ и 10 mM MES, pH 5.6), и хранили в течение ночи при 4°C.

В день выполнения инфильтрации партии культур разбавляли до 2.5 объемов культуры, и оставляли для нагревания перед использованием. Цельные растения *N. benthamiana* помещали на 2 минуты вверх корнями в бактериальную суспензию в герметичную емкость из нержавеющей стали под вакуумом 20-40 Torr. Растения возвращали в теплицу на период инкубации в течение 2-6 дней перед сбором.

Штаммы *A. tumefaciens*, содержащие различные конструкции, описанные в настоящем документе, называются с использованием префикса «AGL1». Например, *A. Tumefaciens*, содержащий конструкцию под номером 1091, называется «AGL1/1091».

Отбор образцов листьев и экстракция общего белка (механическая экстракция)

После инкубации надземную часть растений собирали, замораживали при -80°C и

измельчали на кусочки. Общие растворимые белки экстрагировали путем гомогенизации (Polytron) каждого образца замороженного раздробленного растительного материала в 3 объемах холодного 50 мМ Трис, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 0.1% Тритон X-100 и 1 мМ фенилметансульфонилфторида. После гомогенизации взвеси центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин при 4°C, и эти осветленные сырые экстракты (супернатант) сохраняли для анализа.

Сбор листьев и экстракция общего белка (биохимическая экстракция)

После инкубации надземную часть растений собирали и разрезали на маленькие кусочки (3 мм квадратные) с помощью вращающегося ножа и предпринимали особые меры для того, чтобы не разрушать листья. Разрезанную биомассу инкубировали в течение 15-17 часов в 2.5 объемах 200 мМ маннитола, 125 мМ цитрата, 75 мМ NaPO₄, 500 мМ NaCl, 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 1% (об/об) Multifect CX CG (Genencor, Cat. No. A03140G190), 1% (об/об) Multifect CX B (Genencor, номер по каталогу A03042G190) и 1% (об/об) Multifect Pectinase FE (Genencor, номер по каталогу A02080G190), pH 6.5 при 21°C при перемешивании со скоростью 100-200 об/мин. Разложенную биомассу затем фильтровали через нетканый материал Miracloth (Calbiochem, номер по каталогу 475855) и центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин при 4°C. Супернатант переносили в чистую пробирку и снова центрифугировали в тех же условиях, и супернатант хранили для анализа.

Анализ белка методом иммуноблоттинга

Общее содержание белка в осветленных сырых экстрактах определяли при помощи анализа Брэдфорда (Bio-Rad, Hercules, CA) с использованием альбумина бычьей сыворотки в качестве стандартного образца. Белки отделяли при помощи SDS-PAGE и электропереносили на мембраны из поливиниленафторид (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) для иммунодетекции. Перед проведением иммуноблоттинга мембраны были блокированы 5% снятым молоком и 0.1% Твин-20 в Трис-буферном солевом растворе (TBS-T) в течение 16-18 ч при 4°C. Иммуноблоттинг выполняли путем инкубации с 0.25 мкг/мкл первичного антитела Santa Cruz SC-57995 в 2% снятом молоке в TBS-Твин 20 0.1%. Хемилюминесцентное обнаружение проводили после инкубации с козьим анти-мышинным вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой (JIR, 115-035-146), разбавленным 1:10000 в 2% снятом молоке в TBS-Твин 20 0.1%. Иммунореактивные комплексы были обнаружены при помощи хемилюминесценции с использованием люминола в качестве субстрата (Roche Diagnostics Corporation).

Эксклюзионная хроматография экстрактов белка

Для проведения эксклюзионной хроматографии (SEC) супернатант из биохимически экстрагированной биомассы концентрировали путем центрифугирования при 70000 г в течение 20 мин при 4°C и полученные гранулы ресуспендировали в 1/50 объема холодного 50 мМ Трис pH 8.0, 150 мМ NaCl. Колонки для эксклюзионной хроматографии заполняли 32 мл фазы Sephacryl™ S-500 высокого разрешения (S-500 HR: GE Healthcare, Упсала, Швеция, номер по каталогу 17-0613-10) и приводили в равновесие выфавнивающим/элюирующим буфером (50 мМ Трис pH8, 150 мМ NaCl). Полтора миллилитра концентрированного экстракта наносили на колонку, после чего элюировали 45 мл выравнивающего/элюирующего буфера. Элюат собирали в виде фракций объемом по 1.5 мл, и относительное содержание белка в элюированных фракциях контролировали, смешивая 10 мкл фракции с 200 мкл разбавленного реагента-красителя на белок Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Двести микролитров из каждой фракции осаждали путем добавления 5 объемов ледяного ацетона с последующим замораживанием в течение ночи при -20°C. Осажденные белки пеллетировали путем

центрифугирования при 20000 г в течение 10 мин (4°C) и ресуспендировали в 50 мкл горячего буфера для нанесения образцов SDS-PAGE. Колонку промывали двукратным объемом по отношению к объему колонки 0.2N NaOH, а затем десятикратным объемом по отношению к объему колонки смеси 50 mM Трис pH8, 150 mM NaCl, 20% этанол.

5 После каждого разделения проводили градуировку колонки красителем декстран голубой 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, США). Профили элюирования декстрана голубого 2000 и растворимых белков хозяина при каждом разделении сравнивали для обеспечения однородности профилей элюирования для каждой из используемых колонок.

10 Пример 3: Оценка экспрессии G-белка вируса бешенства и стратегии коэкспрессии.

Растения *Nicotiana benthamiana* агроинфильтровали инокулятами AGL1/1071 (с или без AGL1/1066) или AGL1/1091 (с или без AGL1/1086) при различной концентрации, и листья собирали через 5 дней после инфильтрации (DPI) для 1071- и 1071+1066-инфильтрованных растений, или через 3-4 дня после инфильтрации (DPI) для 1091- и 15 1091+1086-инфильтрованных растений. Вестерн-блоттинг экстрактов белков листьев от трансформированных растений показал, что элементы BeYDV требовались для достижения обнаруживаемого уровня накопления G-белка (сравнение 1071- и 1091-инфильтрованных растений на фигуре 1). Уровень максимального накопления достигался на 3 день после инфильтрации (DPI) для растений, инфильтрованных AGL1/ 20 1091 с коэкспрессией M-белка или без нее (AGL1/1086) (Фигура 1).

Способ биохимической экстракции сравнивали с механической экстракцией в отношении способности высвобождать G-белок вируса бешенства из листьев трансформированных растений. Вестерн-блоттинг экстрактов, полученных путем биохимической экстракции и механической экстракции на 1091- и 1091+1086- 25 инфильтрованных растениях, показал, что белковые экстракты, полученные путем биохимической экстракции, содержали значительно больше G-белка, чем экстракт, полученный путем механической экстракции (Фигура 2).

Белковые экстракты из 1091- и 1091+1086-инфильтрованных растений подвергали эксклюзионной хроматографии для оценки их сборки в высокомолекулярные структуры. 30 Элюированные фракции собирали и аликвоту каждой фракции концентрировали путем осаждения ацетоном и анализировали на содержание G-белка путем вестерн-блоттинга. Как показано на фигуре 3А, содержание G-белка достигает максимума в SEC элюированных фракциях с 8 по 10, соответствуя объему пустот колонки, где предполагается обнаружение оболочечных VLP. Аналогичный профиль элюирования 35 был получен при разделении с помощью SEC белковых экстрактов из растений, экспрессирующих G-белок вируса бешенства с M-белком (1091+1086-инфильтрованные растения, фигура 3В).

Пример 4: Исследования на животных

Быстрая очистка вирусоподобных частиц вируса бешенства (Rab-VLP) из растений

40 Растения *N. benthamiana* были агроинфильтрованы AGL1/1091, как описано, например в WO/2011/035422, которая включена в настоящий документ путем отсылки.

Экстракцию Rab-VLP (также называемую как NG-VLP, нативный G-белок VLP, G-VLP или G-белок VLP) проводили, как описано выше. Вкратце, листья собирали на 4 день после инфильтрации, разрезали на кусочки размером ~1 см² и расщепляли в течение 45 15 ч при комнатной температуре на орбитальном встряхивателе. Расщепляющий буфер содержал 1.0% (об/об) Multifect Pectinase FE, 1.0% (об/об) Multifect CX CG и/или 1.0% (об/об) Multifect CX B (все от Genencor), каждый в буферном растворе, содержащем 200 mM маннитола, 75 mM цитрата, 0.04%, 500 mM NaCl бисульфита натрия, pH 6.0 с

использованием соотношения биомасса: расщепляющий буфер 1:2.5 (масса/объем).

После расщепления апопластическую фракцию фильтровали через нейлоновый фильтр 400 мкм для удаления грубой нерасщепленной растительной ткани (<5% от исходной биомассы). Фильтрованный экстракт затем центрифугировали при комнатной температуре в течение 15 мин при 5000 × g для удаления протопластов и внутриклеточных загрязняющих компонентов (белков, ДНК, мембран, везикул, пигментов и т.д.). Затем супернатант подвергали глубинной фильтрации (для осветления) с использованием фильтра из стекловолокна 1.2 мкм (Sartorius Stedim) и фильтра 0.45/0.2 мкм (Sartorius Stedim) перед подверганием хроматографии.

Для подготовки к проведению хроматографии экстракт может быть концентрирован подходящими способами, известными в данной области, например, экстракт может быть центрифугирован и гранулы ресуспендированы в соответствующем буфере и объеме, или экстракт может быть концентрирован и диафильтрован на системе тангенциальной поточной фильтрации (TFF), оснащенной соответствующей мембраной перед нанесением на среду для хроматографии. Мембраны могут представлять собой плоские или полые волокна, размер пор может изменяться в диапазоне между 100, 300, 500, 750 kDa или 1 мк границы отсечки по молекулярному весу задерживаемых компонентов. Размер просвета может быть выбран в соответствии с производственной линией поставщика, как правило, размер просвета от 0.75 до 1 мм является предпочтительным. Скорости сдвига могут быть установлены между 2000 с⁻¹ до 10000 с⁻¹ с соответствующими скоростями потоков сохраненного вещества и растворенного вещества.

Осветленную апопластическую фракцию наносили на катионообменную колонку (Porous HS Applied Biosystems), приведенную в состояние равновесия уравнивающим/элюирующим буфером (50 mM NaPO₄, 100 mM NaCl, 0.005% Твин 80 pH 6.0). После возвращения UV к нулю экстракт ступенчато элюировали уравнивающим/элюирующим буфером, содержащим возрастающие концентрации NaCl (500 mM). При необходимости хроматографические фракции концентрировали 10 раз с использованием устройств Amicon™, оснащенных 10 kDa MWCO. Анализ белка проводили, как описано в предыдущих примерах.

В заключение, последним подходом может быть замена буфера конечной кандидатной вакцины способами, известными в данной области. Например, для этой цели может быть использована стадия центрифугирования или TFF, как описано выше.

В условиях, описанных выше, может быть получен состав вакцин Rab-VLP с чистотой 75% или больше с качеством, достаточным для исследования иммуногенности. Как проиллюстрировано на фигуре 8А, G-белок мигрирует при предполагаемой молекулярной массе 55 kDa. Размер Rab-VLP установлен между 175-190 нм путем динамического светорассеяния (Zeta sizer 90, Malvern instrument), размер частиц сходен с размером, описанным для вируса бешенства.

Исследования иммунизации у мышей

Иммуногенность Rab-VLP оценивали на модели мышей линии Balb/c. Вкратце, группы самок мышей линии BALB/c (возраст 8-10 недель; Charles River Laboratories, USA) иммунизировали всего тремя инъекциями (0.05 мл/участок) в каждый день иммунизации (Дни исследования 0, 7 и 28) в мышцу левой и правой задней конечности внутримышечно (i.m.) в общем инъецируемом объеме 0.1 мл, который содержал разные дозы вакцины Rab-VLP (1 или 5 мкг - с адъювантами или без них). Дозы были основаны на концентрациях G-белка, определенных при помощи анализа на основе бицинхониновой

кислоты (BCA) в сочетании с оценкой чистоты путем денситометрии. В качестве адъюванта использовали Alhydrogel® при конечной концентрации 1%. Группу плацебо иммунизировали аналогично кандидатной вакцине с использованием такого же способа и схемы введения. Использовали пятнадцать мышей на группу для обеспечения адекватной статистической мощности. Образцы сыворотки собирали перед иммунизацией (преиммунная сыворотка) и на день 7, 21 и 44. Пять животных на группу умерщвляли на день 7, 21 и 44 для выполнения быстрого теста на ингибирование флуоресцентного свечения (RFFIT) для оценки защитного антитела в сыворотке. Защитная доза, установленная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для вакцин против бешенства, составляет 0.5 международных единиц (IU) на мл. Как показано на фигуре 8b, безадъювантная вакцина Rab-VLP при дозах до 1 мкг обеспечивает достижение более высоких титров, чем стандартные титры, установленные ВОЗ.

Все цитируемые материалы включены в настоящий документ посредством отсылки.

Настоящее изобретение описано в отношении одного или более осуществлений. Однако для специалиста в данной области будет очевидно, что могут быть сделаны различные варианты и модификации без отступления от объема изобретения, представленного в формуле изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения вирусоподобной частицы вируса бешенства (VLP) в растении или части растения, включающий:

а) введение нуклеиновой кислоты, содержащей регуляторный участок, активный в растении, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нативный гликопротеин (G) вируса бешенства, в растение или часть растения, при этом нуклеотидная последовательность, кроме того, кодирует, содержит или кодирует и содержит один или более чем один элемент амплификации, содержащий одну или несколько длинных межгенных областей или длинный межгенный повтор генома геминивируса.

б) инкубацию растения или части растения в условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновой кислоты, с получением таким образом VLP вируса бешенства, при этом VLP вируса бешенства содержат нативный гликопротеин (G) вируса бешенства,

с) сбор растения и

д) экстракцию VLP,

при этом VLP содержат липид, полученный из плазматической мембраны растения.

2. Способ получения вирусоподобной частицы вируса бешенства (VLP) в растении или части растения, включающий:

а) обеспечение растения или части растения, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую регуляторный участок, активный в растении, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нативный гликопротеин (G) вируса бешенства, при этом нуклеотидная последовательность, кроме того, кодирует, содержит или кодирует и содержит один или более чем один элемент амплификации, содержащий одну или несколько длинных межгенных областей или длинный межгенный повтор генома геминивируса,

б) инкубацию растения или части растения в условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновой кислоты, с получением таким образом VLP вируса бешенства, при этом VLP вируса бешенства содержат нативный гликопротеин (G) вируса бешенства,

с) сбор растения и

d) экстракцию VLP,

при этом VLP содержит липид, полученный из плазматической мембраны растения.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором один или более элементов амплификации выбраны из длинного межгенного участка вируса желтой карликовости фасоли (BeYDV LIR) и короткого межгенного участка вируса желтой карликовости фасоли (BeYDV SIR).

4. Способ по п. 1, в котором стадия а) дополнительно включает введение дополнительной нуклеиновой кислоты, содержащей регуляторный участок, активный в растении и функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей матриксный белок (М) вируса бешенства или его фрагмент, и где нуклеиновая кислота экспрессируется при инкубации растения или части растения на стадии b).

5. Способ по п. 2, в котором растение или часть растения на стадии а) дополнительно содержит дополнительную нуклеиновую кислоту, содержащую регуляторный участок, активный в растении и функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей матриксный белок (М) вируса бешенства или его фрагмент, и экспрессируют при инкубации растения или части растения на стадии b).

6. Способ по п. 1, в котором на стадии введения (стадия а) нуклеиновую кислоту транзистентно экспрессируют в растении.

7. Способ по п. 1, в котором на стадии введения (стадия а) нуклеиновую кислоту стабильно экспрессируют в растении.

8. Способ по п. 1 или 2, в котором VLP экстрагируют путем биохимической экстракции.

9. Способ по п. 1 или 4, в котором стадия а) дополнительно включает введение дополнительной нуклеиновой кислоты, при этом добавочная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую супрессор сайленсинга, репликазу геминивируса или и то и другое.

10. Способ по п. 9, в котором супрессор сайленсинга и репликаза геминивируса кодируются двумя различными дополнительными нуклеиновыми кислотами, которые вводят в растение или часть растения.

11. Способ по п. 9, в котором супрессор сайленсинга выбран из группы HcPro и p19.

12. Способ по любому из пп. 1, 2, 4 и 5, в котором нативный гликопротеин (G) вируса бешенства имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

13. Способ по любому из пп. 1, 2, 4 и 5, в котором нативный гликопротеин (G) вируса бешенства имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

14. Способ по п. 4 или 5, в котором матриксный белок (М) вируса бешенства имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6.

15. Способ по п. 4 или 5, в котором матриксный белок (М) вируса бешенства имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

16. Способ по любому из пп. 1, 2, 4 или 5, в котором нуклеиновая кислота, содержащая регуляторный участок, дополнительно функционально связана с одним или несколькими энхансерами на основе комовируса.

17. Способ по п. 16, в котором один или несколько энхансеров на основе комовируса представляют собой UTR комовируса.

18. Способ по п. 17, в котором UTR комовируса представляет собой UTR вирус мозаики коровьего гороха (CPMV).

19. Способ по п. 1 или 2, в котором VLP не содержит вирусный матриксный или

коровый белок.

20. Вирусоподобная частица (VLP), полученная способом по п. 1 или 2, для применения в индукции иммунного ответа у субъекта против вируса бешенства, при этом VLP вируса бешенства содержит один или более нативный гликопротеин (G) вируса бешенства и один или более липидов, полученных из плазматической мембраны растения.

21. Вирусоподобная частица (VLP), полученная способом по п. 1 или 2, для применения в индукции иммунного ответа у субъекта против вируса бешенства, при этом VLP вируса бешенства содержит один или более нативный гликопротеин (G) вируса бешенства, при этом нативный гликопротеин (G) вируса бешенства содержит растение-специфические N-гликаны или модифицированные N-гликаны.

22. Композиция для применения в индукции иммунного ответа у субъекта против вируса бешенства, при этом композиция содержит эффективную дозу VLP по п. 20 или 21 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Способ индукции иммунитета к инфекции, вызванной вирусом бешенства, у субъекта, включающий введение эффективного количества композиции по п. 22.

24. Способ по п. 23, в котором композицию вводят субъекту перорально, внутрикожно, интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

25. Вирусоподобная частица (VLP) растительного происхождения для индукции иммунитета к инфекции, вызванной вирусом бешенства, у субъекта, при этом VLP содержит один или более нативных гликопротеинов (G) вируса бешенства, при этом VLP содержит липид, полученный из плазматической мембраны растения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МЕДИКАГО ИНК.
 Д'АУ, Марк-Андре
 ЛАВУА, Пьер-Оливье
 ВЕЗИНА, Луи-Филипп
 КУТЮР, Манон

<120> Получение вирусоподобной частицы вируса бешенства в растениях

<130> V83990wo

<150> US 61/496,371
 <151> 2011-06-13

<150> US 61/578,787
 <151> 2011-12-21

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IF-RabM-S3.c

<400> 1
 aaatttgtcg ggcccatgaa ctttctacgt aagatag 37

<210> 2
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IF-RabM-S1-4.r

<400> 2
 actaaagaaa ataggccttt attctagaag cagagagga 39

<210> 3
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized M protein coding sequence

<400> 3
 atgaactttc tacgtaagat agtgaaaaat tgcagggacg aggacactca aaaaccctct 60
 cccgtgtcag cccctctgga tgacgatgac ttgtggcttc caccctga atacgtcccg 120
 ctgaaagaac ttacaagcaa gaagaacatg aggaactttt gtatcaacgg aggggttaaa 180
 gtgtgtagcc cgaatgggta ctcgttcagg atcctgcggc acattctgaa atcattcgac 240
 gagatatatt ctgggaatca taggatgatc gggttagtca aagtagttat tggactggct 300

ttgtcaggat ctccagtccc tgagggcatg aactgggtat acaaattgag gagaaccttt	360
atcttcaggt gggctgattc caggggccct cttgaagggg aggagttgga atactctcag	420
gagatcactt gggatgatga tactgagttc gtcggattgc aaataagagt gattgcaaaa	480
cagtgtcata tccagggcag aatctggtgt atcaaatga acccgagagc atgtcaacta	540
tggctctgaca tgtctcttca gacacaaagg tccgaagagg acaaagattc ctctctgctt	600
ctagaataa	609

<210> 4
 <211> 4903
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Construct number 1191

<400> 4	
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg	60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatatatta tatgttgtca	120
aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa	180
aatattcacc tactactggt ataatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg	240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttggt gcaacatttg agaaaatttt	300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata	360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac	420
aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggtaattgct tgtaataaaa	480
taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaatth ttggcaagtc attaaaaaga	540
aagaataaat tttttttaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta	600
atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt	660
taatttgaca tttgatcttt tcttatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta	720
tatttcatag atcaataaag agaaataacg gtatattaat ccttccaaaa aaaaaaacg	780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata	840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttaa gccacgcat	900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa	960
accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt	1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag	1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctaggaac aagctaacag tgaacgttgg	1140
gatggaggat caggaggtag cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg	1200

actgagtggc	ggctacataa	cgatgagacg	aattcgaatc	aagataatcc	ccttggtttc	1260
aaggaaagct	ggggtttcgg	gaaagttgta	tttaagagat	atctcagata	cgacaggacg	1320
gaagcttcac	tgcacagagt	ccttggtatct	tggacgggag	attcgggttaa	ctatgcagca	1380
tctcgatttt	tcggtttcga	ccagatcggg	tgtacctata	gtattcgggt	tcgaggagtt	1440
agtatcaccg	tttctggagg	gtcgcgaact	cttcagcatc	tctgtgagat	ggcaattcgg	1500
tctaagcaag	aactgctaca	gcttgcccca	atcgaagtgg	aaagtaatgt	atcaagagga	1560
tgccctgaag	gtactcaaac	cttcgaaaaa	gaaagcgagt	aagttaaaat	gcttcttcgt	1620
ctcctattta	taatatggtt	tgttattggt	aattttgttc	ttgtagaaga	gcttaattaa	1680
tcgttgttgt	tatgaataac	tatttgtatg	agatgaactg	gtgtaatgta	attcatttac	1740
ataagtggag	tcagaatcag	aatgtttcct	ccataactaa	ctagacatga	agacctgccg	1800
cgtacaattg	tcttatattt	gaacaactaa	aattgaacat	cttttgccac	aactttataa	1860
gtggttaata	tagctcaaat	atatggtcaa	gttcaataga	ttaataatgg	aaatatcagt	1920
tatcgaaatt	cattaacaat	caacttaacg	ttattaacta	ctaattttat	atcatccctt	1980
ttgataaatg	atagtagacc	aattaggaag	gagcatgctc	gcctaggaga	ttgtcgtttc	2040
ccgccttcag	tttgcaagct	gctctagccg	tgtagccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	2100
cgcgttggga	attactagcg	cgtgtcgaca	agcttgcgat	ccggtcaaca	tggaggagca	2160
cgacacactt	gtctactcca	aaaatatcaa	agatacagtc	tcagaagacc	aaagggcaat	2220
tgagactttt	caacaaaggg	taatatccgg	aaacctcctc	ggattccatt	gcccagctat	2280
ctgtcacttt	attgtgaaga	tagtggaaaa	ggaaggtggc	tcctacaaat	gccatcattg	2340
cgataaagga	aaggccatcg	ttgaagatgc	ctctgccgac	agtgggtcca	aagatggacc	2400
cccaccacg	aggagcatcg	tggaaaaaga	agacgttcca	accacgtctt	caaagcaagt	2460
ggattgatgt	gataacatgg	tggagcacga	cacacttgtc	tactccaaaa	atatcaaaga	2520
tacagtctca	gaagacaaaa	gggcaattga	gacttttcaa	caaagggtaa	tatccggaaa	2580
cctcctcgga	ttccattgcc	cagctatctg	tcactttatt	gtgaagatag	tggaaaagga	2640
aggtggtccc	tacaaatgcc	atcattgcga	taaaggaaag	gccatcgttg	aagatgcctc	2700
tgccgacagt	gggtccaaaag	atggaccccc	accacgagg	agcatcgtgg	aaaaagaaga	2760
cgttccaacc	acgtcttcaa	agcaagtgga	ttgatgtgat	atctccactg	acgtaaggga	2820
tgacgcacaa	tcccactatc	cttcgcaaga	cccttcctct	atataaggaa	gttcatttca	2880
tttgagaggg	tattaaaatc	ttaataggtt	ttgataaaag	cgaacgtggg	gaaaccgaa	2940
ccaaaccttc	ttctaaactc	tctctcatct	ctcttaaagc	aaacttctct	cttgtctttc	3000
ttgcgtgagc	gatcttcaac	gttgtcagat	cgtgcttcgg	caccagtaca	acgttttctt	3060
tcactgaagc	gaaatcaaag	atctctttgt	ggacacgtag	tgcggcgcca	ttaaataacg	3120

```

tgtacttgtc ctattcttgt cgggtgggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct 3180
gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct 3240
acttctgctt gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggg 3300
tctataagaa atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttggg 3360
gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggcccgcg gatggcgaaa 3420
aacgttgcca ttttcggctt attgttttct cttcttgtgt tggttccttc tcagatcttc 3480
gcctgcaggc tcctcagcca aaacgacacc cccatctgtc tatccactgg cccctggatc 3540
tgctgcccaa actaactcca tggtgaccct gggatgcctg gtcaagggtt atttcctga 3600
gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc ggtgtgcaca ccttcccagc 3660
tgtcctgcag tctgacctct acactctgag cagctcagtg actgtcccct ccagcacctg 3720
gcccagcgag accgtcacct gcaacgttgc ccacccggcc agcagcacca aggtggacaa 3780
gaaaattgtg cccaggggatt gtggttgtaa gccttgcata tgtacagtcc cagaagtatc 3840
atctgtcttc atcttcccc caaagcccaa ggatgtgctc accattactc tgactcctaa 3900
ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc gaggtccagt tcagctggtt 3960
tgtagatgat tgagggtgc acacagctca gacgcaaccc cgggaggagc agttcaacag 4020
cactttccgc tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag gactggctca atggcaagga 4080
gcatcgctc accatcacca tcaccatcac catcaccatt aaaggcctat tttctttagt 4140
ttgaatttac tgttattcgg tgtgcatttc tatgtttggt gagcggtttt ctgtgctcag 4200
agtgtgttta ttttatgtaa ttttaatttct ttgtgagctc ctgttttagca ggtcgtccct 4260
tcagcaagga cacaaaaaga ttttaatttt attaaaaaaa aaaaaaaaaa agaccgggaa 4320
ttcgatatca agcttatcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa 4380
gattgaatcc tgttgccggg cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta 4440
agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta 4500
gagtgccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg 4560
ataaattatc gcgcgcgggt tcatctatgt tactagatct ctagagtctc aagcttggcg 4620
cgccacgtg actagtggca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg 4680
gcgttaccga acttaatcgc cttgcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg 4740
aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgctaga 4800
gcagcttgag cttggatcag attgtcgttt cccgccttca gtttaaaacta tcagtgtttg 4860
acaggatata ttggcgggta aacctaagag aaaagagcgt tta 4903

```

<210> 5

<211> 2349
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Expression cassette number 1066

<400> 5
 gtcaacatgg tggagcacga cacacttgct tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60
 gaagacaaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
 ttccattgcc cagctatctg tcaactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
 tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgctg aagatgcctc tgccgacagt 240
 ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgctg aaaaagaaga cgttccaacc 300
 acgtcttcaa agcaagtggg ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
 tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420
 agggtaatat ccggaacact cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg 480
 aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgagataa aggaaaggcc 540
 atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cagaggagc 600
 atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
 tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata 720
 taaggaagtt catttcattt ggagaggat taaaatctta atagggtttg ataaaagcga 780
 acgtggggaa acccgaaaca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
 cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgt cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
 cagtacaacg ttttcttca ctgaagcga atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
 ggcgccatta aataacgtgt acttgctcta ttcttgctcg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
 gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
 gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttcttct 1140
 tcttcttctt gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttccc 1200
 tggttttcga acttgagaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg 1260
 gcccatgaac tttctacgta agatagttaa aaattgcagg gacgaggaca ctcaaaaacc 1320
 ctctcccgtg tcagcccctc tggatgacga tgacttgctg cttccacccc ctgaatacgt 1380
 cccgctgaaa gaacttaca gcaagaagaa catgaggaa ttttgatca acggaggggt 1440
 taaagtgtgt agcccgaatg gttactcgtt caggatcctg cggcacattc tgaaatcatt 1500
 cgacgagata tattctggga atcataggat gatcgggtta gtcaaagtag ttattggact 1560
 ggctttgtca ggatctccag tccctgagg catgaactgg gtatacaaat tgaggagaa 1620
 ctttatcttc cagtgggctg attccagggg ccctcttgaa ggggaggagt tggaaatactc 1680

```

tcaggagatc acttgggatg atgatactga gttcgtcggg ttgcaaataa gagtgattgc 1740
aaaacagtgt catatccagg gcagaatctg gtgtatcaac atgaacccga gagcatgtca 1800
actatggtct gacatgtctc ttcagacaca aagggtccga gaggacaaag attcctctct 1860
gcttctagaa taaaggccta ttttcttttag tttgaattta ctgttattcg gtgtgcattt 1920
ctatgtttgg tgagcgggtt tctgtgctca gagtgtgttt attttatgta atttaatttc 1980
tttgtgagct cctgttttagc aggtcgtccc ttcagcaagg acacaaaaag attttaattt 2040
tattaaaaaa aaaaaaaaaa aagaccggga attcgatadc aagcttatcg acctgcagat 2100
cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg 2160
attatcatat aatttctgtt gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg 2220
acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtccgcg aattatacat ttaatacgcg 2280
atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcattctatg 2340
ttactagat 2349

```

```

<210> 6
<211> 202
<212> PRT
<213> Rabies virus

```

```

<400> 6

```

```

Met Asn Phe Leu Arg Lys Ile Val Lys Asn Cys Arg Asp Glu Asp Thr
1 5 10 15

```

```

Gln Lys Pro Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Asp Asp Asp Leu Trp
20 25 30

```

```

Leu Pro Pro Pro Glu Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Thr Ser Lys Lys
35 40 45

```

```

Asn Met Arg Asn Phe Cys Ile Asn Gly Gly Val Lys Val Cys Ser Pro
50 55 60

```

```

Asn Gly Tyr Ser Phe Arg Ile Leu Arg His Ile Leu Lys Ser Phe Asp
65 70 75 80

```

```

Glu Ile Tyr Ser Gly Asn His Arg Met Ile Gly Leu Val Lys Val Val
85 90 95

```

```

Ile Gly Leu Ala Leu Ser Gly Ser Pro Val Pro Glu Gly Met Asn Trp
100 105 110

```

```

Val Tyr Lys Leu Arg Arg Thr Phe Ile Phe Gln Trp Ala Asp Ser Arg
115 120 125

```

7

Gly Pro Leu Glu Gly Glu Glu Leu Glu Tyr Ser Gln Glu Ile Thr Trp
130 135 140

Asp Asp Asp Thr Glu Phe Val Gly Leu Gln Ile Arg Val Ile Ala Lys
145 150 155 160

Gln Cys His Ile Gln Gly Arg Ile Trp Cys Ile Asn Met Asn Pro Arg
165 170 175

Ala Cys Gln Leu Trp Ser Asp Met Ser Leu Gln Thr Gln Arg Ser Glu
180 185 190

Glu Asp Lys Asp Ser Ser Leu Leu Glu
195 200

<210> 7
<211> 6789
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Construct No. 1193

<400> 7
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atccccggct ggtatatatta tatgttgtca 120
aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta ctgaacaaa 180
aatattcacc tactactggt ataatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt 300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggtaattgct tgtaataaaa 480
taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540
aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660
taatttgaca ttgtatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta 720
tatttcatag atcaaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaaa aaaaaaacg 780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttta gccacgcat 900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960

accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt	1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag	1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg	1140
gatggaggat caggaggtag cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg	1200
actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc	1260
aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta ttttaagagat atctcagata cgacaggacg	1320
gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcgggtta ctatgcagca	1380
tctcgatttt tcgggttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcgggt tcgaggagtt	1440
agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg	1500
tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga	1560
tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt	1620
ctctatttta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa	1680
tcgttgttgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac	1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg	1800
cgtacaattg tcttatatth gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa	1860
gtggtaata tagctcaa atatatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt	1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatccctt	1980
ttgataatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc	2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg ttagccaat acgcaaaccg cctctcccg	2100
cgcggtggga attactagcg cgtgtcgaca cgcggtggcg gccctagcag aaggcatgtt	2160
gttgtgactc cgaggggttg cctcaaatc tatcttataa ccggcggtgga ggcatggagg	2220
caagggcatt ttggtaattt aagtgttag tggaaaatga cgtcatttac ttaaagacga	2280
agtcttgca caaggggggc ccacgccgaa ttttaatat accggcggtg cccacaccta	2340
tcgcgagtg ttttagcacga gcggtccaga tttaaagtag aaaagtccc gccactagg	2400
gttaaagggtg ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat ggtatttgat aaagcgtata	2460
ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtaca agcttcttaa gccggtcaac	2520
atggtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctcagaagac	2580
caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat	2640
tgccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtg ctcctacaaa	2700
tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc	2760
aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaa aagacgttcc aaccacgtct	2820
tcaaagcaag tggattgatg tgataacatg gtggagcacg acacacttgt ctactccaaa	2880

aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca acaaagggtg	2940
atatccggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata	3000
gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcggt	3060
gaagatgcct ctgccgacag tggccccaaa gatggacccc caccacagag gagcatcgtg	3120
gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact	3180
gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ctttcgcaag acccttcctc tatataagga	3240
agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaatagggt tttgataaaa gcgaacgtgg	3300
ggaaaccgga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc tctcttaaag caaacttctc	3360
tcttgtcttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga tcgtgcttcg gcaccagtac	3420
aacgttttct ttcactgaag cgaaatcaaa gatctctttg tggacacgta gtgcggcgcc	3480
attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt cttgggaaaa gaaagcttgc	3540
tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat tctgctgact ttcggcgggt	3600
gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttcctg tacttcttctc ttcttcttct	3660
tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa acagagtttt cccgtggttt	3720
tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatatcttg cccaaatttg tcgggcccg	3780
ggctcctcag ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc	3840
caaactaact ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagt	3900
acagtgacct ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtg acaccttccc agctgtcctg	3960
cagtctgacc tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc	4020
gagaccgtca cctgcaacgt tgcccaccg gccagcagca ccaagggtgga caagaaaatt	4080
gtgcccaggg attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc	4140
ttcatcttcc ccccaaagcc caaggatgtg ctaccatta ctctgactcc taaggtcacg	4200
tgtgttggtg tagacatcag caaggatgat cccgaggctc agttcagctg gttttagat	4260
gatgtggagg tgcacacagc tcagacgcaa cccggggagg agcagttcaa cagcactttc	4320
cgctcagtca gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggaaggccta	4380
ttttctttag tttgaattta ctgttattcg gtgtgcattt ctatgttttg tgagcggttt	4440
tctgtgtca gagtgtgttt attttatgta atttaatttc tttgtgagct cctgttttagc	4500
aggctgtccc ttcagcaagg acacaaaaag attttaattt tattaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aagaccggga attcgatata aagcttatcg acctgcagat cgttcaaaca tttggcaata	4620
aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt	4680
gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt	4740

ttttatgatt agagtcccg	aattatacat ttaatacgcg	atagaaaaca aaatatagcg	4800
cgaaactag gataaattat	cgcgcgcggt gtcactatg	ttactagatc tctagagtct	4860
caagcttggc gcgggggtacc	gagctcgaat tccgagtgtg	cttcaagtca gttggaaatc	4920
aataaaatga ttatttttatg	aatatatttc attgtgcaag	tagatagaaa ttacatatgt	4980
tacataacac acgaaataaa	caaaaaaaca caatccaaaa	caaacacccc aaacaaaata	5040
acactatata tatcctcgta	tgaggagagg cacgttcagt	gactcgacga ttcccagca	5100
aaaaaagtct ccccgtcaca	catatagtgg gtgacgcaat	tatcttcaaa gtaatccttc	5160
tgttgacttg tcattgataa	catccagtct tcgtcaggat	tgcaagaat tatagaaggg	5220
atcccacctt ttattttctt	cttttttcca tatttaggg	tgacagtga atcagactgg	5280
caacctatta attgcttcca	caatgggacg aacttgaagg	ggatgtcgtc gatgatatta	5340
taggtggcgt gttcatcgta	gttggtgaag tcgatggtcc	cgttccagta gttgtgtcgc	5400
ccgagacttc tagcccaggt	ggcttttccg gtacgagttg	gtccgcagat gtagaggctg	5460
gggtgtctga cccagtcct	tccctcatcc tggtagatc	ggccatccac tcaaggtcag	5520
attgtgcttg atcgtaggag	acaggatgta tgaaagtgtg	ggcatcgatg cttacatgat	5580
ataggtgcgt ctctctccag	ttgtgcagat cttcgtggca	gcggagatct gattctgtga	5640
agggcgacac gtactgtca	ggttggtggag gaaataattt	gttggtgaa tattccagcc	5700
attgaagctt tgttgcccat	tcatgaggga attcttctt	gatcatgtca agatactcct	5760
ccttagacgt tgcagcttg	ataatagttc gccatcgtgc	gtcagatttg cgaggagaga	5820
ccttatgac tcggaatct	cctctggtt taatatctcc	gtcctttgat atgtaatcaa	5880
ggacttggtt agagtttcta	gctggctgga tattaggggtg	atttccttca aaatcgaaaa	5940
aagaaggatc cctaatacaa	ggttttttat caagctggat	aagagcatga tagtgggtag	6000
tgccatcttg atgaagctca	gaagcaacac caaggaagaa	aataagaaaa ggtgtgagtt	6060
tctcccagag aaactggaat	aatcatctc tttagatga	gcacttgggg taggtaagga	6120
aaacatatat agattggagt	ctgaagttct tgctagcaga	aggcatgttg ttgtgactcc	6180
gaggggttgc ctcaactct	atcttataac cggcgtggag	gcatggaggc aagggcattt	6240
tggtaattha agtagttagt	ggaaaatgac gtcatttact	taaagacgaa gtcttgcgac	6300
aaggggggcc cacgccgaat	tttaatatta ccggcgtggc	cccaccttat cgcgagtgt	6360
ttagcacgag cggtcagat	ttaaagtaga aaagtcccc	cccactaggg ttaaagggtg	6420
tcacactata aaagcatata	cgatgtgatg gtatttgatg	gagcgtatat tgtatcaggt	6480
atttccgtcg gatacgaatt	attcgtacgg ccggccacta	gtggcactgg ccgtcgtttt	6540
acaacgtcgt gactgggaaa	accctggcgt tacccaactt	aatcgccttg cagcacatcc	6600
ccctttcgcc agctggcgta	atagcgaaga ggcccgacc	gatcgccctt cccaacagtt	6660

gcgagcctg aatggcgaat gctagagcag cttgagcttg gatcagattg tcgtttcccg 6720
 ctttcagttt aaactatcag tgtttgacag gatattttgg cgggtaaacc taagagaaaa 6780
 gagcgttta 6789

<210> 8
 <211> 4379
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Expression cassette number 1086

<400> 8
 ctagcagaag gcatgttgtt gtgactccga ggggttgccct caaactctat cttataaccg 60
 gcgtggaggc atggaggcaa gggcattttg gtaatttaag tagttagtgg aaaatgacgt 120
 catttactta aagacgaagt cttgcgacaa ggggggcccc cgccgaattt taatattacc 180
 ggcgtggccc caccttatcg cgagtgttt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa 240
 agttcccgcc cactaggggtt aaagggtgtc acactataaa agcatatacg atgtgatggt 300
 atttgataaa gcgtatattg tatcagggtat ttccgtcggg tacgaattat tcgtacaagc 360
 ttcttaagcc ggtcaacatg gtggagcagc acacacttgt ctactccaaa aatatcaaag 420
 atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa 480
 acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg 540
 aagggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct 600
 ctgccgacag tgggtccaaa gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag 660
 acgttccaac cagctcttca aagcaagtgg attgatgtga taacatggtg gagcacgaca 720
 cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga 780
 cttttcaaca aagggttaata tccggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc 840
 actttattgt gaagatagtg gaaaagggaag gtggctccta caaatgccat cattgcgata 900
 aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac 960
 ccacgaggag catcgttgaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt 1020
 gatgtgatat tcctactgac gtaagggatg acgcacaatc cactatcct tcgcaagacc 1080
 cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggta ttaaaatctt aataggtttt 1140
 gataaaagcg aacgtgggga aaccgaacc aaaccttctt ctactctc tctcatctct 1200
 cttaaagcaa acttctctct tgtctttctt gcgtgagcga tcttcaacgt tgtcagatcg 1260
 tgcttcggca ccagtacaac gttttctttc actgaagcga aatcaaagat ctctttgtgg 1320
 acacgtagtg cggcgccatt aaataacgtg tacttgctct attcttgtcg gtgtggtctt 1380

gggaaaagaa agcttgctgg aggctgctgt tcagcccat acattacttg ttacgattct	1440
gctgactttc ggcggtgca atatctctac ttctgcttga cgaggatttg ttgcctgtac	1500
ttctttcttc ttcttcttgc tgattgggtc tataagaaat ctagtatttt ctttgaaaca	1560
gagttttccc gtggttttcg aacttggaga aagattgtta agcttctgta tattctgccc	1620
aaatttgctg ggcccatgaa ctttctacgt aagatagtga aaaattgcag ggacgaggac	1680
actcaaaaac cctctcccgt gtcagcccct ctggatgacg atgacttggt gcttccaccc	1740
cctgaatacg tcccgtgaa agaacttaca agcaagaaga acatgaggaa cttttgtatc	1800
aacggagggg ttaaagtgtg tagccgaat ggttactcgt tcaggatcct gcggcacatt	1860
ctgaaatcat tcgacgagat atattctggg aatcatagga tgatcgggtt agtcaaagta	1920
gttattggag tggctttgtc aggatctcca gtccctgagg gcatgaactg ggtatacaaa	1980
ttgaggagaa cttttatctt ccagtgggct gattccaggg gccctcttga aggggaggag	2040
ttggaatact ctcaggagat cacttgggat gatgatactg agttcgtcgg attgcaaata	2100
agagtgattg caaaacagtg tcatatccag ggcagaatct ggtgtatcaa catgaaccg	2160
agagcatgtc aactatggtc tgacatgtct cttcagacac aaagggtccg agaggacaaa	2220
gattcctctc tgcttctaga ataaaggcct attttcttta gtttgaattt actgttattc	2280
ggtgtgcatt tctatgtttg gtgagcgggt ttctgtgctc agagtgtgtt tattttatgt	2340
aatttaattt ctttgtgagc tcctgtttag caggctgtcc cttcagcaag gacacaaaaa	2400
gattttaatt ttattaaaaa aaaaaaaaaa aaagaccggg aattcgatat caagcttatc	2460
gacctgcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg	2520
gtcttgcatg gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca	2580
tgtaatgcat gacgttatct atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca	2640
tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcg	2700
tgatcatctat gttactagat ctctagagtc tcaagcttg cgcggggtac cgagctcgaa	2760
ttccgagtg acttcaagtc agttggaaat caataaaatg attattttat gaatatattt	2820
cattgtgcaa gtagatagaa attacatatg ttacataaca cacgaaataa acaaaaaaac	2880
acaatccaaa acaaacaccc caaacaatat aacactatat atatcctcgt atgaggagag	2940
gcacgttcag tgactcgacg attcccagc aaaaaaagtc tcccgtcac acatatagtg	3000
ggtgacgcaa ttatcttcaa agtaatcctt ctgttgactt gtcattgata acatccagtc	3060
ttcgtcagga ttgcaaagaa ttatagaagg gatcccacct tttattttct tcttttttcc	3120
atatttaggg ttgacagtga aatcagactg gcaacctatt aattgcttcc acaatgggac	3180
gaacttgaag gggatgtcgt cgatgatatt ataggtggcg tggtcatcgt agttggtgaa	3240
gtcgtggtc ccgttccagt agttgtgtcg cccgagactt ctagcccagg tggcttttcc	3300

```

ggtacgagtt ggtccgcaga thtagaggct ggggtgtctg accccagtcc ttccctcatc 3360
ctggttagat cggccatcca ctcaagggtca gatttgtgctt gatcgtagga gacaggatgt 3420
atgaaagtgt aggcacatgat gcttacatga tatagggtgcg tctctctcca gttgtgcaga 3480
tcttcgtggc agcggagatc tgattctgtg aagggcgaca cgtactgctc aggttgtgga 3540
ggaaataatt tgttggctga atattccagc cattgaagct ttgttgccca ttcagagggg 3600
aattcttctt tgatcatgtc aagatactcc tccttagacg ttgcagtctg gataatagtt 3660
cgccatcgtg cgtagatgtt gcgaggagag accttatgat ctcgaaatc tcctctggtt 3720
ttaatatctc cgtcctttga tatgtaatca aggacttggt tagagtttct agctggctgg 3780
atattagggg gatcttcttc aaaatcgaaa aaagaaggat ccctaataca aggtttttta 3840
tcaagctgga taagagcatg atagtgggta gtgccatctt gatgaagctc agaagcaaca 3900
ccaaggaaga aaataagaaa aggtgtgagt ttctcccaga gaaactggaa taaatcatct 3960
ctttgagatg agcacttggg gtaggtaagg aaaacatatt tagattggag tctgaagttc 4020
ttgctagcag aaggcatggt gttgtgactc cgaggggttg cctcaaactc tatcttataa 4080
ccggcgtgga ggcattggag caagggcatt ttggtaattt aagtagttag tggaaaatga 4140
cgtcatttac taaagacga agtcttgca caaggggggc ccacgccgaa ttttaattt 4200
accggcgtgg cccacctta tcgcgagtgc tttagcacga gcggtccaga tttaaagtag 4260
aaaagtcccc gccactagg gttaaagggt ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat 4320
ggtatttgat ggagcgata ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtac 4379

```

```

<210> 9
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> IF-RabG-S2+4.c

```

```

<400> 9
tctcagatct tcgccaaatt ccctatttac acgataccag ac 42

```

```

<210> 10
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> IF-RabG-S1-4.r

```

```

<400> 10
actaaagaaa ataggccttc acagtctggt ctcaccccca ctcttggtg 48

```

```

<210> 11

```

<211> 1575
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized Rabies G protein coding sequence

```

<400> 11
atggttcctc aggcctcctc gtttgtagcc cttctggttt ttccattgtg ttttgggaaa      60
ttccctatct acacgatacc agacaagctt ggtccctgga gcccattga catacatcac      120
ctcagctgcc caaacaattt ggtagtggag gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc      180
tcctacatgg aacttaaagt tgatacatc ttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc      240
acaggcggtg tgacggaggc tgaaacctac actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg      300
ttcaaaagaa agcatttcctg cccaacacca gatgcatgta gagccgcgta caactggaag      360
atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg      420
cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat      480
ttggacccat atgacagatc cttcactcag agggctctcc ctacgaggaa gtgctcagga      540
gtagcgggtg cttctaccta ctgtccact aaccacgatt acaccatttg gatgcccag      600
aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt ttaccaata gtagagggaa gagagcatcc      660
aaaggagtg agacttgctg cttttagat gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga      720
gcatgcaaac tcaagttagt tggagttcta ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc      780
gcatgcaaaa catcaaatga aaccaaatgg tgccctcccg atcagttggt gaacctgcac      840
gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt gttgtagagg agttggtcag gaagagagag      900
gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc      960
agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc     1020
ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctcccttca     1080
aaagggtgtt taagagttgg ggggaggtgt catcctcatg tgaacggggt gtttttcaat     1140
ggtataatat taggacctga cggcaatgtc ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc     1200
cagcaacata tggagttggt ggaatcctcg gttatcccc ttgtgcaccc cctggcagac     1260
ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttgttgaagt tcaccttccc     1320
gatgtgcaca atcaggcttc aggagttgac ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta     1380
ttactgagtg caggggccct gactgccttg atgttgataa ttttcctgat gacatgttgt     1440
agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggagggt     1500
tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt     1560
gagaccagac tgtga                                     1575

```

<210> 12
 <211> 4897
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Construct number 1192

<400> 12
 tggcaggata tatttgtgtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60
 gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atccccggct ggtatattta tatgttgtca 120
 aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa 180
 aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240
 ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt 300
 gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360
 aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
 aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggtaattgc tgtaaataaa 480
 taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540
 aagaataaat tattttttaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
 atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660
 taatttgaca ttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta 720
 tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaa aaaaaaacg 780
 gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg tagggagata 840
 acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttta gccacgcat 900
 ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaa 960
 accaatccac atctttatca ccatttctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
 gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
 aaaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaaac aagctaacag tgaacgttgg 1140
 gatggaggat caggaggtag cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
 actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
 aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta ttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
 gaagcttcac tgcacagagt ccttgatctt tggacgggag attcgggtta ctatgcagca 1380
 tctcgatttt tcggtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tcgaggagtt 1440
 agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
 tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
 tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt 1620

ctcctattta taatatggtt tgttattggt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa	1680
tcgttggtgt tatgaatac tatttgtagt agatgaactg gtgtaatgta attcatttac	1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg	1800
cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa	1860
gtggttaata tagctcaa ataggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt	1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatccctt	1980
ttgataaatg atagtagacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc	2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctcccg	2100
cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgcatg ccggtcaaca tggaggagca	2160
cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat	2220
tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat	2280
ctgtcacttt attgtgaaga tagtgaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg	2340
cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggccca aagatggacc	2400
ccccccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt	2460
ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacactgtc tactccaaaa atatcaaaga	2520
tacagtctca gaagaccaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa	2580
cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga	2640
aggtggctcc taaaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc	2700
tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgttg aaaaagaaga	2760
cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtggg ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga	2820
tgacgcaca tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gtccatttca	2880
tttgagaggg tattaataatc ttaataggtt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa	2940
ccaaaccttc ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc	3000
ttgcgtgagc gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt	3060
tcactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg	3120
tgtacttgct ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct	3180
gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct	3240
acttctgctt gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt	3300
tctataagaa atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga	3360
gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggcccatg gcgaaaaacg	3420
ttgcgatttt cggcttattg ttttctcttc ttgtgttggg tccttctcag atcttcgccg	3480
cggctctcca gccaaaacga caccctctc tgtctatcca ctggcccctg gatctgtgc	3540

```

ccaaactaac tccatggtga ccctgggatg cctggtcaag ggctatttcc ctgagccagt 3600
gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct 3660
gcagtctgac ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag 3720
cgagaccgtc acctgcaacg ttgccaccc gccagcagc accaagggtg acaagaaaat 3780
tgtgcccagg gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt 3840
cttcatcttc ccccaaaagc ccaaggatgt gtcaccatt actctgactc ctaaggtcac 3900
gtgtgttggt gtagacatca gcaaggatga tcccagagtc cagttcagct ggttttaga 3960
tgatgtggag gtgcacacag ctacagcga acccgggag gagcagttca acagcacttt 4020
ccgctcagtc agtgaacttc ccacatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagcgtc 4080
gctcaccatc accatcacca tcaccatcac cattaaaggc ctattttctt tagtttgaat 4140
ttactgttat tcggtgtgca tttctatgtt tggtagcgg ttttctgtgc tcagagtgtg 4200
tttattttat gtaatttaat ttctttgtga gtcctgttt agcagggtcgt cccttcagca 4260
aggacacaaa aagattttaa ttttattaaa aaaaaaaaaa aaaaagaccg ggaattcgat 4320
atcaagctta tcgacctgca gatcgttcaa acatttggca ataaagtgtt ttaagattga 4380
atcctgttgc cggctctgcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg 4440
taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc 4500
cgcaattata catttaatac gcgatagaac aaaaatata gcgcgcaaac taggataaat 4560
tatcgcgcg cggtgtcatct atgttactag atctctagag tctcaagctt ggcgcgcca 4620
cgtgactagt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtta 4680
cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 4740
cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgc tagagcagct 4800
tgagcttgga tcagattgtc gtttcccgcc ttcagtttaa actatcagtg tttgacagga 4860
tatattggcg ggtaaaccta agagaaaaga gcgttta 4897

```

```

<210> 13
<211> 3330
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Expression cassette No. 1071

```

```

<400> 13
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60
gaagacaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccgaaa cctcctcgga 120
ttcattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180

```

tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcggtg aagatgcctc tgccgacagt	240
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgagg aaaaagaaga cgttccaacc	300
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggagg agcacgacac acttgtctac	360
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa	420
agggtaatat ccggaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg	480
aagatagtggt aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc	540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc	600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc	660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata	720
taaggaagt ctttcatctt ggagaggat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga	780
acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa	840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac	900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc	960
ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttcttgcggt tgtggtcttg ggaaaagaaa	1020
gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg	1080
gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttcttct	1140
tcttcttctt gattggttct ataagaaatc tagtatcttc tttgaaacag agttttcccg	1200
tggttttcga acttgagaaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcggt	1260
gcccattggg aaaaacgttg cgattttcgg cttattgttt tctcttcttg tgttggttcc	1320
ttctcagatc ttccgcaa at tccctattta cacgatacca gacaagcttg gtccctggag	1380
cccattgac atacatcacc tcagctgccc aaacaatttg gtagtgagg acgaaggatg	1440
caccaacctg tcagggttct cctacatgga acttaaagtt ggatacatct tagccataaa	1500
aatgaacggg ttcacttgca caggcgttgt gacggaggct gaaacctaca ctaacttcgt	1560
tggttatgtc acaaccacgt tcaaaagaaa gcatttccgc ccaacaccag atgcatgtag	1620
agccgcgtac aactggaaga tggccgtgga cccagatat gaagagtctc tacacaatcc	1680
gtaccctgac taccgctggc ttcgaactgt aaaaaccacc aaggagtctc tcgttatcat	1740
atctccaagt gtggcagatt tggaccata tgacagatcc cttcactcga gggctctccc	1800
tagcgggaag tgctcaggag tagcgggtgc ttctacctac tgctccacta accacgatta	1860
caccatttgg atgcccga at cccgagact agggatgtct tgtgacattt ttaccaatag	1920
tagaggggaag agagcatcca aaggagtgga gacttgccgc tttgtagatg aaagaggcct	1980
atataagtct ttaaaaggag catgcaaaact caagtattgt ggagttctag gacttagact	2040
tatggatgga acatgggtcg cgatgcaaac atcaaataaa accaaatggt gccctcccga	2100

```

tcagttggtg aacctgcacg actttcgctc agacgaaatt gagcaccttg ttgtagagga 2160
gttggtcagg aagagagagg agtgtctgga tgcactagag tccatcatga caaccaagtc 2220
agtgagtttc agacgtctca gtcatttaag aaaacttgct cctggggttg gaaaagcata 2280
taccatattc aacaagacct tgatggaagc cgatgctcac tacaagtcag tcagaacttg 2340
gaatgagatc ctcccttcaa aagggtgttt aagagttggg gggagggtgc atcctcatgt 2400
gaacgggggtg tttttcaatg gtataatatt aggacctgac ggcaatgtct taatcccaga 2460
gatgcaatca tccctcctcc agcaacatat ggagttgttg gaatcctcgg ttatccccct 2520
tgtgcacccc ctggcagacc cgtctaccgt tttcaaggac ggtgacgagg ctgaggattt 2580
tgttgaagtt caccttcccg atgtgcacaa tcaggtctca ggagttgact tgggtctccc 2640
gaactggggg aagtatgtat tactgagtgc aggggcctg actgccttga tgttgataat 2700
tttcctgatg acatgttgta gaagagtcaa tcgatcagaa cctacgcaac acaatctcag 2760
agggacaggg agggaggtgt cagtcactcc ccaaagcggg aagatcatat cttcatggga 2820
atcacacaag agtgggggtg agaccagact gtgaaggcct attttcttta gtttgaattt 2880
actgttattc ggtgtgcatt tctatgtttg gtgagcggtt ttctgtgctc agagtgtgtt 2940
tattttatgt aatttaattt ctttgtgagc tcctgttttag caggtcgtcc cttcagcaag 3000
gacacaaaaa gattttaatt ttattaaaaa aaaaaaaaaa aaagaccggg aattcgatat 3060
caagcttadc gacctgcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat 3120
cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta 3180
ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg 3240
caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta 3300
tcgcgcgcgg tgcctatctat gttactagat 3330

```

<210> 14
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Rabies virus

<400> 14

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro
 20 25 30

Asp Lys Leu Gly Pro Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys
 35 40 45

20

Pro Asn Asn Leu Val Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly
 50 55 60
 Phe Ser Tyr Met Glu Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met
 65 70 75 80
 Asn Gly Phe Thr Cys Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr
 85 90 95
 Asn Phe Val Gly Tyr Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg
 100 105 110
 Pro Thr Pro Asp Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly
 115 120 125
 Asp Pro Arg Tyr Glu Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg
 130 135 140
 Trp Leu Arg Thr Val Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser
 145 150 155 160
 Pro Ser Val Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg
 165 170 175
 Val Phe Pro Ser Gly Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Cys Ser Thr Asn His Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg
 195 200 205
 Leu Gly Met Ser Cys Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala
 210 215 220
 Ser Lys Gly Ser Glu Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Lys Ser Leu Lys Gly Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly
 245 250 255
 Leu Arg Leu Met Asp Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu
 260 265 270
 Thr Lys Trp Cys Pro Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe Arg
 275 280 285
 Ser Asp Glu Ile Glu His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg
 290 295 300

Glu Glu Cys Leu Asp Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val
 305 310 315 320
 Ser Phe Arg Arg Leu Ser His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly
 325 330 335
 Lys Ala Tyr Thr Ile Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His
 340 345 350
 Tyr Lys Ser Val Arg Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys
 355 360 365
 Leu Arg Val Gly Gly Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe
 370 375 380
 Asn Gly Ile Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met
 385 390 395 400
 Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val
 405 410 415
 Ile Pro Leu Val His Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp
 420 425 430
 Gly Asp Glu Ala Glu Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His
 435 440 445
 Asn Gln Val Ser Gly Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr
 450 455 460
 Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
 465 470 475 480
 Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His
 485 490 495
 Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly
 500 505 510
 Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
 515 520 525
 Leu
 <210> 15
 <211> 6861

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Construct No. 1194

<400> 15
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60
 gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atccccggct ggtatattta tatgttgtca 120
 aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa 180
 aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240
 ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt 300
 gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360
 aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
 aatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggtaattgc tgtaataaaa 480
 taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540
 aagaataaat tttttttaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
 atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660
 taatttgaca ttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta 720
 tttttcatag atcaaaataag agaataacg gtatattaat ccttccaaaa aaaaaaacg 780
 gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840
 acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttta gcccacgcat 900
 ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960
 accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
 gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
 aaaaatggaac gagctataca aggaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140
 gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
 actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
 aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
 gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcgggtta ctatgcagca 1380
 tctcgatttt tcggtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tcgaggagtt 1440
 agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
 tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
 tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaat gcttcttcgt 1620
 ctctatttta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680

tcgttgttgt	tatgaaatac	tatttgtatg	agatgaactg	gtgtaatgta	attcatttac	1740
ataagtggag	tcagaatcag	aatgtttcct	ccataactaa	ctagacatga	agacctgccg	1800
cgtacaattg	tcttatattt	gaacaactaa	aattgaacat	cttttgccac	aactttataa	1860
gtggttaata	tagctcaa	atatgggtcaa	gttcaataga	ttaataatgg	aaatatcagt	1920
tatcgaaatt	cattaacaat	caacttaacg	ttattaacta	ctaattttat	atcatcccct	1980
ttgataaatg	atagtacacc	aattaggaag	gagcatgctc	gcctaggaga	ttgtcgtttc	2040
ccgccttcag	tttgcaagct	gctctagccg	tgtagccaat	acgcaaaccg	cctctccccg	2100
cgcgttggga	attactagcg	cgtgtcgaca	cgcgtggcgc	gccctagcag	aaggcatggt	2160
gttgtgactc	cgaggggttg	cctcaaac	tatcttataa	ccggcgtgga	ggcatggagg	2220
caagggcatt	ttgtaattt	aagtagttag	tggaaaatga	cgtcatttac	ttaaagacga	2280
agtcttgcca	caaggggggc	ccacgccgaa	ttttaatatt	accggcgtgg	ccccacctta	2340
tcgcgagtgc	tttagcacga	gcggtccaga	tttaaagtag	aaaagtcccc	gccactagg	2400
gttaaagggtg	ttcacactat	aaaagcatat	acgatgtgat	ggtattttgat	aaagcgtata	2460
ttgtatcagg	tatttccgtc	ggatacgaat	tattcgtaca	agcttcttaa	gccgggtcaac	2520
atggtggagc	acgacacact	tgtctactcc	aaaaatatca	aagatacagt	ctcagaagac	2580
caaagggcaa	ttgagacttt	tcaacaaaag	gtaatatccg	gaaacctcct	cggattccat	2640
tgcccagcta	tctgtcactt	tattgtgaag	atagtggaaa	aggaagggtg	ctcctacaaa	2700
tgccatcatt	gcgataaagg	aaaggccatc	gttgaagatg	cctctgccga	cagtgggtccc	2760
aaagatggac	ccccaccac	gaggagcatc	gtggaaaaag	aagacgttcc	aaccacgtct	2820
tcaaagcaag	tggattgatg	tgataacatg	gtggagcacg	acacacttgt	ctactccaaa	2880
aatatcaaag	atacagtctc	agaagaccaa	agggcaattg	agacttttca	acaagggtta	2940
atatccggaa	acctcctcgg	attccattgc	ccagctatct	gtcactttat	tgtgaagata	3000
gtggaaaagg	aaggtggctc	ctacaaatgc	catcattgcg	ataaaggaaa	ggccatcggt	3060
gaagatgcct	ctgccgacag	tgggtccaaa	gatggacccc	caccacagag	gagcatcgty	3120
gaaaaagaag	acgttccaac	cacgtcttca	aagcaagtgg	attgatgtga	tatctccact	3180
gacgtaagg	atgacgcaca	atcccactat	ccttcgcaag	acccttcctc	tatataagga	3240
agttcatttc	atttgagag	gtattaaaat	cttaataggt	tttgataaaa	gcgaacgtgg	3300
ggaaaccga	accaaacctt	cttctaaact	ctctctcatc	tctcttaaag	caaacttctc	3360
tcttgtcttt	cttgctgag	cgatcttcaa	cgttgtcaga	tcgtgcttcg	gcaccagtac	3420
aacgttttct	ttactgaag	cgaaatcaaa	gatctctttg	tggacacgta	gtgcgcgccc	3480
attaaataac	gtgtacttgt	cctattcttg	tcggtgtggt	cttgggaaaa	gaaagcttgc	3540
tgagggtctg	tgttcagccc	catacattac	ttgttacgat	tctgctgact	ttcggcggggt	3600

gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgccctg tacttctttc ttcttcttct	3660
tgctgattgg ttctataaga aatctagtat ttcttttgaa acagagtttt cccgtggttt	3720
tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg cccaaatttg tcgggcccac	3780
ggcgaaaaac gttgcgattt tcggcttatt gttttctctt cttgtgttggt ttcttctca	3840
gatcttcgcc gcggctctc agccaaaacg acacccccat ctgtctatcc actggccctt	3900
ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg accctgggat gcctggtcaa gggctatttc	3960
cctgagccag tgacagtac ctggaactct ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc	4020
ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc	4080
acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac gttgccacc cggccagcag caccaagggtg	4140
gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa	4200
gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag cccaaggatg tgctcaccat tactctgact	4260
cctaaggta cgtgtgtgtt ggtagacatc agcaaggatg atcccagggt ccagttcagc	4320
tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca gctcagcgc aaccccgga ggagcagttc	4380
aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt cccatcatgc accaggactg gctcaatggc	4440
aaggaaggcc tatttctttt agtttgaatt tactgttatt cgggtgtgcat ttctatgttt	4500
ggtagcgggt tttctgtgct cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tctttgtgag	4560
ctctgttta gcaggtcgtc ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat ttattaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaagaccgg gaattcgata tcaagcttat cgacctgag atcgttcaaa	4680
catttgcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat	4740
ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt	4800
tatgagatgg gtttttatga ttagagctcc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa	4860
caaatatag cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga	4920
tctctagagt ctcaagcttg gcgcggggta ccgagctcga attccgagtg tacttcaagt	4980
cagttggaaa tcaataaaat gattatttta tgaatatatt tcattgtgca agtagataga	5040
aattacatat gttacataac acacgaaata aacaaaaaaa cacaatcaa aacaaacacc	5100
ccaaacaaaa taacactata tatatcctcg tatgaggaga ggcacgttca gtgactcgac	5160
gattcccag caaaaaaagt ctccccgtca cacatatagt gggtagcgca attatcttca	5220
aagtaatcct tctgttgact tgcattgat aacatccagt cttcgtcagg attgcaaaga	5280
attatagaag ggatcccacc ttttattttc ttcttttttc catatttagg gttgacagtg	5340
aaatcagact ggcaacctat taattgcttc cacaatggga cgaacttgaa ggggatgtcg	5400
tcgatgatat tatagggtggc gtgttcacg tagttggtga agtcgatggt cccgttccag	5460

```

tagttgtgtc gcccgagact tctagcccag gtggtctttc cggtagcagt tggcccgag 5520
atgtagaggc tggggtgtct gacccagtc cttccctcat cctgggttaga tcggccatcc 5580
actcaaggct agattgtgct tgatcgtagg agacaggatg tatgaaagtg taggcacga 5640
tgcttacatg atataggtgc gtctctctcc agttgtgcag atcttcgtgg cagcggagat 5700
ctgattctgt gaagggcgac acgtactgct cagggttggtg aggaaataat ttgttggtg 5760
aatattccag ccattgaagc tttgttgccc attcatgagg gaattcttct ttgatcatgt 5820
caagatactc ctccttagac gttgcagtct ggataatagt tcgccatcgt gcgtcagatt 5880
tgcgaggaga gaccttatga tctcggaat ctcctctggt ttaatatct ccgtccttg 5940
atatgtaac aaggacttgt ttagagtttc tagctggctg gatattaggg tgatttcctt 6000
caaatcgaa aaaagaagga tccctaatac aagggttttt atcaagctgg ataagagcat 6060
gatagtgggt agtgccatct tgatgaagct cagaagcaac accaaggaag aaaataagaa 6120
aagggtgtgag tttctcccag agaaactgga ataatcatc tctttgagat gagcacttg 6180
ggtaggtaag gaaaacatat ttagattgga gtctgaagtt cttgctagca gaaggcatgt 6240
tgtgtgtact ccgagggggt gcctcaaact ctatcttata accggcgtgg aggcattgg 6300
gcaagggcat tttgtaatt taagtagtta gtggaaaatg acgtcattta cttaaagacg 6360
aagtcttgctg acaagggggg cccacgccga attttaatat taccggcgtg gccccacctt 6420
atcgcgagtg ctttagcacg agcgggtccag atttaaagta gaaaagttcc cgccactag 6480
ggttaaagggt gttcacacta taaaagcata tacgatgtga tggattttga tggagcgtat 6540
attgtatcag gtatttccgt cggatacgaa ttattcgtag ggccggccac tagtggcact 6600
ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacccaac ttaatcgctt 6660
tgcagcacat cccctttctg ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca ccgatcgccc 6720
ttccaacag ttgcgagcc tgaatggcga atgctagagc agcttgagct tggatcagat 6780
tgtcgtttcc cgccttcagt ttaactatc agtgtttgac aggatattt ggcgggtaaa 6840
cctaagagaa aagagcgttt a 6861

```

```

<210> 16
<211> 5360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Expression cassette number 1091

```

```

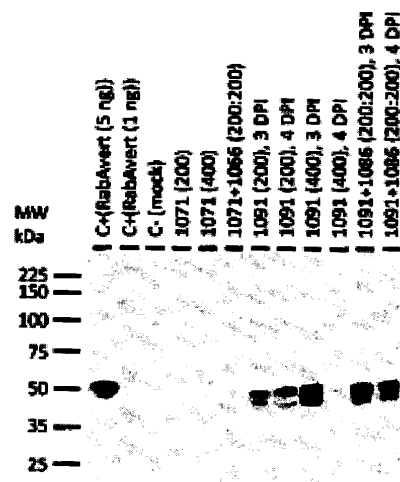
<400> 16
ctagcagaag gcatgttgtt gtgactccga ggggttgccct caaactctat cttataaccg 60
gcgtggaggc atggaggcaa gggcattttg gtaatttaag tagttagtgg aaaatgacgt 120
catttactta aagacgaagt cttgcgacaa ggggggcccc cgccgaattt taatattacc 180

```

ggcgtggccc	caccttatcg	cgagtgtttt	agcacgagcg	gtccagattt	aaagtagaaa	240
agttcccgcc	cactaggggt	aaaggtgttc	acactataaa	agcatatacg	atgtgatggt	300
atgtgataaa	gcgtatatgt	tatcagggtat	ttccgtcggg	tacgaattat	tcgtacaagc	360
ttcttaagcc	ggtcaacatg	gtggagcacg	acacacttgt	ctactccaaa	aatatcaaag	420
atacagtctc	agaagaccaa	agggaattg	agacttttca	acaaagggta	atatccggaa	480
acctcctcgg	attccattgc	ccagctatct	gtcactttat	tgtgaagata	gtggaaaagg	540
aagggtggctc	ctacaaatgc	catcattgcg	ataaaggaaa	ggccatcggt	gaagatgcct	600
ctgccgacag	tgggtccaaa	gatggacccc	caccacgag	gagcatcggt	gaaaaagaag	660
acgttccaac	cagctcttca	aagcaagtgg	attgatgtga	taacatgggt	gagcacgaca	720
cacttgtcta	ctccaaaaat	atcaaagata	cagtctcaga	agaccaaagg	gcaattgaga	780
cttttcaaca	aagggttaata	tccggaaacc	tcctcggatt	ccattgcccc	gctatctgtc	840
actttattgt	gaagatagtg	gaaaagggaag	gtggctccta	caaatgccat	cattgcgata	900
aaggaaaggc	catcgttgaa	gatgcctctg	ccgacagtgg	tcccaaagat	ggacccccac	960
ccacgaggag	catcgtggaa	aaagaagacg	ttccaaccac	gtcttcaaag	caagtggatt	1020
gatgtgatat	ctccactgac	gtaagggatg	acgcacaatc	ccactatcct	tcgcaagacc	1080
cttcctctat	ataaggaagt	tcatttcatt	tggagaggta	ttaaaatctt	aatagggttt	1140
gataaaagcg	aacgtgggga	aaccgaacc	aaaccttctt	ctaaactctc	tctcatctct	1200
cttaaagcaa	acttctctct	tgtctttctt	gcgtgagcga	tcttcaacgt	tgtcagatcg	1260
tgtctcggca	ccagtacaac	gttttctttc	actgaagcga	aatcaaagat	ctctttgtgg	1320
acacgtagtg	cggcgccatt	aaataacgtg	tacttgcctt	attcttgtcg	gtgtggctct	1380
gggaaaagaa	agcttgctgg	aggctgctgt	tcagcccat	acattacttg	ttacgattct	1440
gctgactttc	ggcgggtgca	atatctctac	ttctgcttga	cgaggatttg	ttgcctgtac	1500
ttctttcttc	ttcttcttgc	tgattgggtc	tataagaaat	ctagtatttt	ctttgaaaca	1560
gagttttccc	gtggttttcg	aacttgagga	aagattgtta	agcttctgta	tattctgccc	1620
aaatttgctg	ggcccatggc	gaaaaacgtt	gcgattttcg	gcttattggt	ttctcttctt	1680
gtgttggttc	cttctcagat	cttcgccaaa	ttccctattt	acacgatacc	agacaagcct	1740
ggtccctgga	gcccgaattga	catacatcac	ctcagctgcc	caaacaattt	ggtagtggag	1800
gacgaaggat	gcaccaacct	gtcaggggtc	tcctacatgg	aacttaaagt	tgatacatc	1860
ttagccataa	aatgaacgg	gttcacttgc	acaggcgttg	tgacggaggc	tgaaacctac	1920
actaacttcg	ttggttatgt	cacaaccacg	ttcaaaagaa	agcatttccg	cccaacacca	1980
gatgcatgta	gagccgcgta	caactggaag	atggccgggtg	acccagata	tgaagagtct	2040

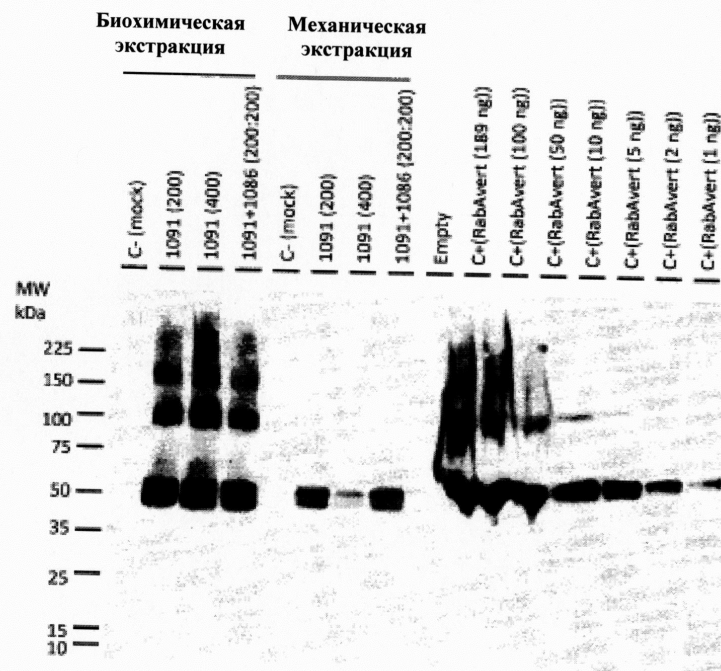
ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct	2100
ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat ttggacccat atgacagatc ccttcactcg	2160
agggctcttc ctagcgggaa gtgctcagga gtagcgggtg cttctaccta ctgctccact	2220
aaccacgatt acaccatttg gatgcccag aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt	2280
tttaccaata gtagagggaa gagagcatcc aaagggagtg agacttgagg cttttagat	2340
gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga gcatgcaaac tcaagttatg tggagtctta	2400
ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaatgg	2460
tgcctcccc atcagttggt gaacctgcac gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt	2520
gtttagaggg agttgggtcag gaagagagag gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg	2580
acaaccaagt cagtgaagtt cagacgtctc agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt	2640
ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca	2700
gtcagaactt ggaatgagat cctcccttca aaaggggtgt taagagttgg ggggaggtgt	2760
catcctcatg tgaacggggg gtttttcaat ggtataatat taggacctga cggcaatgtc	2820
ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc cagcaacata tggagttgtt ggaatcctcg	2880
gttatcccc ttgtgcaccc cctggcagac ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag	2940
gctgaggatt ttgttgaagt tcaccttccc gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac	3000
ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta ttactgagtg caggggccct gactgccttg	3060
atgttgataa ttttctgat gacatgttgt agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa	3120
cacaatctca gagggacagg gagggaggtg tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata	3180
tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt gagaccagac tgtgaaggcc tattttcttt	3240
agtttgaatt tactgttatt cgggtgtgcat ttctatgttt ggtgagcggg tttctgtgct	3300
cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tctttgtgag ctctgttta gcaggtcgtc	3360
ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat ttatttaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg	3420
gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcgttcaaa catttggaac taaagtttct	3480
taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg	3540
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga	3600
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaact	3660
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tctctagagt ctcaagcttg	3720
gcgcggggta ccgagctcga attccgagtg tacttcaagt cagttggaaa tcaataaaat	3780
gattatttta tgaatatatt tcattgtgca agtagataga aattacatat gttacataac	3840
acacgaaata aacaaaaaaaa cacaatccaa aacaaacacc ccaaacaaaa taacactata	3900
tatatcctcg tatgaggaga ggcacgttca gtgactcgac gattccccgag caaaaaaagt	3960

ctccccgtca cacatatagt gggtgacgca attatcttca aagtaatcct tctgttgact	4020
tgctattgat aacatccagt cttcgtcagg attgcaaaga attatagaag ggatcccacc	4080
ttttattttc ttcttttttc catatttagg gttgacagtg aaatcagact ggcaacctat	4140
taattgcttc cacaatggga cgaacttgaa ggggatgtcg tcgatgatat tataggtggc	4200
gtgttcacg tagttggtga agtcgatggt ccggttccag tagttgtgtc gcccagact	4260
tctagcccag gtggtctttc cggtagcagt tgggtccgag atgtagaggc tgggggtgtct	4320
gaccccgctc cttccctcat cctgggttaga tcggccatcc actcaagggtc agattgtgct	4380
tgatcgtagg agacaggatg tatgaaagt taggcatcga tgcttacatg atataggtgc	4440
gtctctctcc agttgtgcag atcttcgtgg cagcggagat ctgattctgt gaaggcgac	4500
acgtactgct caggttgtgg aggaaataat ttgttggtg aatattccag ccattgaagc	4560
tttgttgccc attcatgagg gaattcttct ttgatcatgt caagatactc ctccttagac	4620
gttgcagctc ggataatagt tcgccatcgt gcgtcagatt tgcgaggaga gaccttatga	4680
tctcgaaat ctcctctggt tttaatatct ccgtccttg atatgtaatc aaggacttgt	4740
ttagagtttc tagctggctg gatattaggg tgatttcctt caaaatcgaa aaaagaagga	4800
tccctaatac aaggtttttt atcaagctgg ataagagcat gatagtgggt agtgccatct	4860
tgatgaagct cagaagcaac accaaggaag aaaataagaa aagggtgag tttctcccag	4920
agaaactgga ataaatcatc tctttgagat gagcacttg ggtaggtaag gaaaacatat	4980
ttagattgga gtctgaagtt cttgctagca gaaggcatgt tgttgtagt ccgaggggtt	5040
gcctcaaaact ctatcttata accggcgtgg aggcattgg gcaagggcat tttggttaatt	5100
taagtagtta gtggaaaatg acgtcattta cttaaagacg aagtcttgcg acaagggggg	5160
cccacgccga attttaatat taccggcgtg gccccacctt atcgcgagtg ctttagcacg	5220
agcgggtccag atttaaagta gaaaagttcc cgccactag ggttaaagg gttcacacta	5280
taaaagcata tacgatgtga tggattttga tggagcgtat attgtatcag gtatttccgt	5340
cggatacgaa ttattcgtac	5360



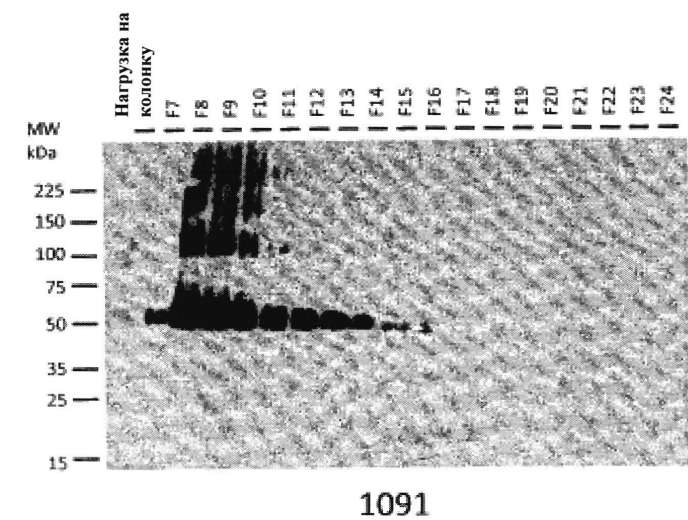
Фигура 1

2/26

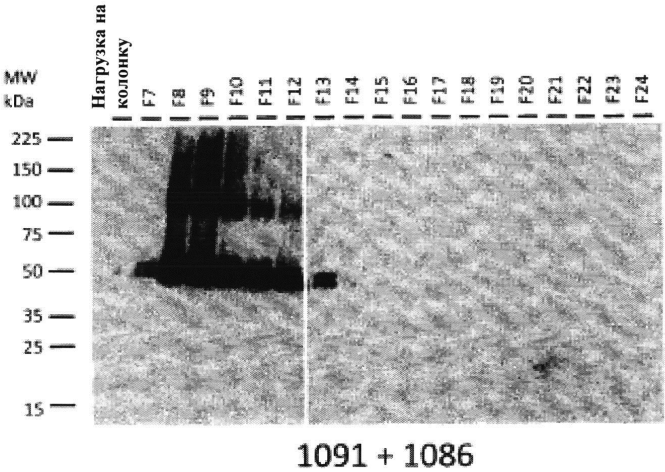


Фигура 2

Фигура 3А



Фигура 3В



Фигура 4

A-2X35S/CPMV-НТ/М вируса бешенства/NOS (Конструкция номер 1066)

Фигура 4A, SEQ ID NO: 1

IF-RabM-S3.c

AAATTTGTCGGGCCCATGAACTTTCTACGTAAGATAG

Фигура 4B, SEQ ID NO: 2

IF-RabM-S1-4.r

ACTAAAGAAAAATAGGCCTTTATTCTAGAAGCAGAGAGGA

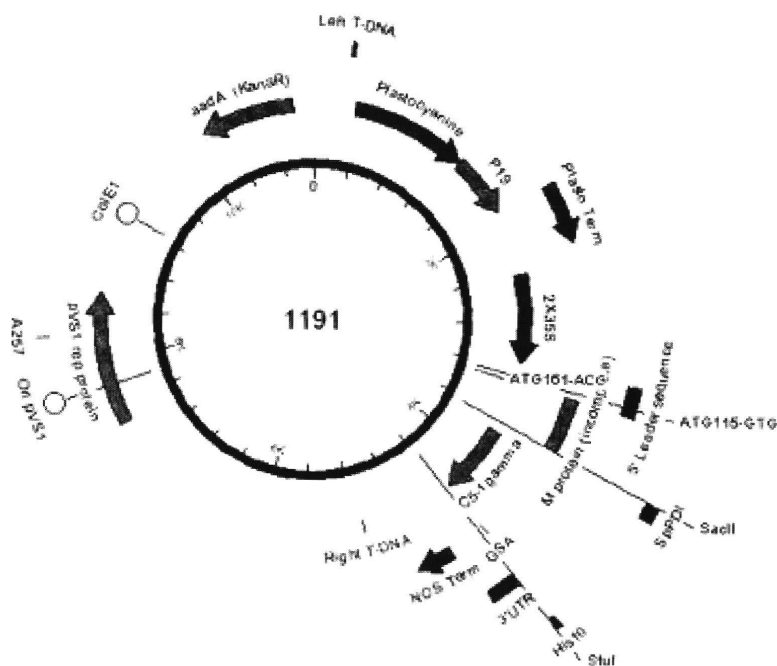
Фигура 4C, SEQ ID NO: 3

Последовательность кодирующая синтезированный М-белок (соответствующая nt2496-3104 из Genbank accession number FJ913470)

ATGAACTTTCTACGTAAGATAGTGA AAAATTGCAGGGACGAGGACACTCAAAAACC
CTCTCCCGTGTGACGCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCTGAATAC
GTCCCGCTGAAAGAACTTACAAGCAAGAAGAACATGAGGAACTTTGTATCAACCG
AGGGGTAAAGTGTGTAGCCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCCTGCCGCACATTCT
GAAATCATTCGACGAGATATATTCTGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAGT
AGTTATTGGACTGGCTTTGTCAGGATCTCCAGTCCCTGAGGGCATGAACTGGGTATA
CAAAATTGAGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGGCTGATTCCAGGGGCCCTCTTGAAGG
GGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCGTGG
ATTGCAAAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTATATCCAGGGCAGAATCTGGTGTAT
CAACATGAACCCGAGAGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCTTCAGACACAAAG
GTCCGAAGAGGACAAAGATTCTCTCTGCTTCTAGAATAA

Фигура 4D

Схематическое изображение конструкции номер 1191. Сайты ферментов рестрикции SacII и StuI, используемые для линейаризации плазмиды, показаны на изображении.



Фигура 4Е, SEQ ID NO: 4

Конструкция номер 1191 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-НТ/НOS с экспрессионной кассетой Палстоцианин-Р19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)

TGGCAGGATATATTGTTGGTGTAAACAAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATTCACCTACTACTGTATATAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTGACACAACATTTTGTG
CAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAAATAAAAAATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAATAAATTTATTTTAA
AATTAAGAGITGAGTCATTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
TGTATTAGTAATTAGAAATTTGGTGTCAAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTATATTTCATAGATCAAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AAAAAACGGTATATTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA

ACATCCAAATCCAAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCACTCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAGAG
 ACTAATTAATTAATTAATCATCTTTGAGAGAAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAAC
 AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAGGCTTCA
 CTGCACAGAGTCCCTGGATCTTGGACGGGAGATTCGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTCGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACTATAGTATTCGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCCGCAACT
 CTTGAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
 TGCTTCTCTCTCTATTTATAATATGGTTTGTATTTGTTAATTTGTTCTTGTAGAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACGGTGTAAATGTAAATTTACATAAGTGGAGTCA
 AGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAGACATGAAGACCTGCGCGGTACAAATTTGTTATATTGA
 ACAACTAAAAATGAACATCTTTGCCACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATAGGTCAAGTT
 CAATAGATTAAATATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTACTA
 ATTTATATATGATCCCTTGGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCTTCAGTTTGCAGCTGCTTACCGGTGTAGCCAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCG
 TTGGGAATTACTAGCGCGTGTGACAAGCTTGCATGCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCT
 ACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAGGGTAA
 TATCCGGAAACCTCTCGGATTCCAATGCCAGCTATCTGTCACTTTATTTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGA
 AGGTGGCTCTTACAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTTCCGACAGT
 GGTCCCAAGATGGACCCCAACCAAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAAGACGTTCCAAACCACTTCTTCA
 AAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGAT
 ACAGTCTCAGAAAGACCAAGGGCAATTTGAGACTTTTCAACAAGGGTAAATATCCGAAACCTCTCGGA
 TTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAAGGTGGCTCTTCAAAATGCC
 ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTTCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCC
 CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAAGACGTTCCAAACCACTTCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTG
 ATATCTCTTGTGGACACGTAGTGCAGCGCCATTAATAAACGTGTACTTGTCTTATCTTGTGGTGTGGTCT
 AAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAAATAGGTTTGTATAAAGCAAGCGTGGGAAACCGG
 AACCAAACTCTCTTAACTCTCTCTATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCTTTCTTGGGTGAGC
 GATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGTCTGGGACCACTACAACGTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAG
 ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCAGCGCCATTAATAAACGTGTACTTGTCTTATCTTGTGGTGTGGTCT
 TGGGAAAAAGAAAGCTTGTGTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACTTTC
 GGCAGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTGACGAGGTATTTGTTGCTGTACTTCTTCTCTTCTTCTGCTG
 ATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGATTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAG
 ATTGTTAAAGCTTCTGTATATCTGCCAAATTTGTGCGGCGCGCGATGGGAAAAACGTTGCGATTTCG
 GCTTATTTGTTTCTCTTCTTGTGTGTGTTCTCTCTCAGATCTTGGCTGCGAGGCTCTCAGCCAAAACGACA
 CCCCCATCTGTATCTCACTGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCT
 GGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC
 ACCTTCCCAGCTGTCTGCACTGTGACCTTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTTCAGCACCTG
 GCCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATTGT
 GCCCAGGGATTTGGTTGTAAGCTTGCATATGTACAGTCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCTTCTTCCCCC
 CAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCTTAAGGTCACTGTGTGTGTGGTAGACATCAAGAA
 GGATGATCCCGAGGTCCAGTTCACTGGTTTGTAGATGATGTGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCC
 CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCGGCTCAGTCACTGAACCTTCCATCATGCACAGGACTGGCTCA
 ATGGCAAGGAGCGATCGCTCAACATCACCATCACCATCACCATCAACATTAAGGCTTATTTCTTTAGTT
 TGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCAATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTT
 TATGTAATTAATTTCTTTGTGAGCTCTGTTTACGAGGTGCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTT
 AATTTTATTAATAAAAAAAGACCGGAAATTCATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTT
 CAAACATTTGGCAATAAAGTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTGGGATGATTATCATATAATTT
 CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAGTTATTTATGAGATGGGTTTTAT
 GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACCGGATAGAAAACAAAATAGCGCGCAAACTAGGATAA
 ATTATCGCGCGGGTGCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAG

7/26

TGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCCTTGC
 AGCAGATCCCCCTTTGGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
 CGCAGCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCTTCAGTTTA
 AACTATCAGTGTGTGACAGGATATATTGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAAGCGTTTA

Фигура 4F, SEQ ID NO: 5

Экспрессионная кассета номер 1066 от промотора 2X35S до терминатора NOS.

Открытая рамка считывания М-белка из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута.

GTCAACATGGTGGAGCAGCACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AAGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCTCGGATTCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTTGCCGATAAAGGAA
 AAGCCATCCTTGAAGATGCTCTGCGGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCCACCCAGGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGGAAGACGTTCCAAACACGCTTCAAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAG
 ACACACTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCTCGGATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGAAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTTGCCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCCACCCAGGAGGAGCATCGTGGAAAAAGGAAGACGTTCCA
 ACCACGCTTCAAAAGCAAGTGGATTGATGTGATACTCCACTGACGTAAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCTTTCGCAAGACCTCTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGGCAAGTGGGGAACCCGAACCAACCTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTCTCTCTCTTGTCTTCTTCTGCGTGAAGCATCTTCAACGTTGTGAGATCGTCTTCCGACACGTA
 ACGTTTCTCTCTCACTGAAGCGAAATCAAAAGATCTCTTGTGGACACGTAAGTCCGGCGCCATTAAATAACG
 TGTACTGTCTCTATCTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTGGTGGAGGCTGCTGTTACGCCCA
 TACATTACTGTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGGCAATATCTCTACTTCTGCTTGAAGAGTATTG
 TTGCTGTACTCTCTCTCTCTCTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTGAACACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCGCCCCAAATTTGTGGGC
 CCATGAACCTTCTACGTAAAGATAGTGAAGAAATTCAGGTAAGGAGGACACTCAAAAAACCTCTCTCTCTCT
AGCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCTGAATACGTTCCCGCTGAAAGAACTTACAAGC
AAGAAGAACATGAGGAACCTTTGTATCAACGGAGGGGTTAAAGTGTGTAGCCGAAATGGTTACTCTTCA
GGATCTTCCGACATCTTGAATCATTCGACGAGATATATTCGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGT
CAAACTAGTTATTGGACTGGCTTTGTGAGGATCTCCAGTCCCTGAGGACATGAACCTGGGTATACAAATTG
AGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGCTGATTCCAGGGGCCCTTGAAGGGGAGGAGTTGGAATACTCTC
AGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCTGTTGGAATTGCAAAATAAGAGTGAATTGCAAAACAGTGT
ATATCCAGGGCAGAACTTGGTGTATCAACATGAACCCGAGAGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTC
TCAGACACAAAGGTCGGAAGAGGACAAAGATTCTCTCTGCTTCTAGAATAAAGGCCTATTTCTTTAGT
 TGAATTTACTGTATTTCGGTGTGCAATTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATT
 TTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCTGTTTAGCAGGTCTGCTTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATT
 TAATTTTATTAAAAAAGGTTTCTTAAGATTGAATCTGTTGCCGCTTTCGGATGATTATCATATAATTT
 CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAAATGATGATGACGTTATTATGAGATGGGTTTAT
 GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAACTAGGATAA
 ATTAATCCGCGCGGTGTCTATGTACTAGAT

Фигура 4G, SEQ ID NO: 6

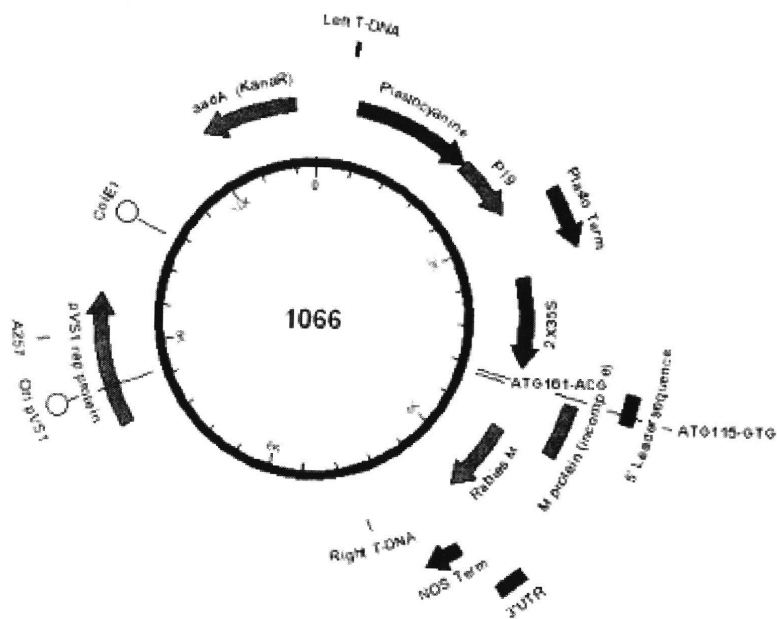
Аминокислотная последовательность М-белка из штамма ERA вируса бешенства

8/26

MNFLRKIVKNCRDEDTQKPSVSAPLDDDDLWLPPPEYVPLKELTSKKNMRFINGGV
 KVCSPNGYSFRILRHILKSFDEIYSGNHRMIGLVKVVIGLALSGSPVPEGMNWVYKLRR
 FIFQWADSRGPLEGEELEYSQEITWDDDTFVGLQIRVIKQCHIQRWCINMNPACQ
 LWSMSLQTRSEEDKDSSLLE*

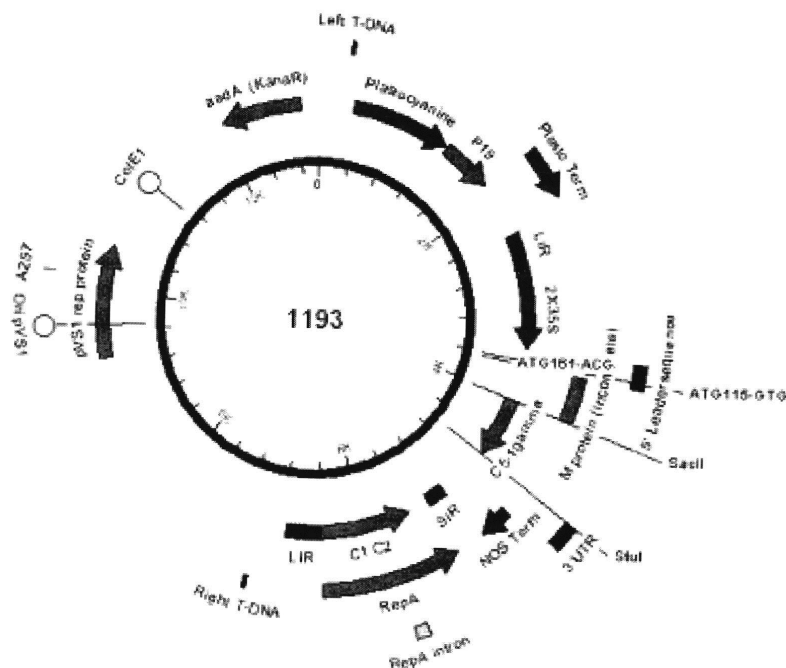
Фигура 4Н

Схематическое изображение конструкции номер 1066



B-2X35S/CPMV-HT/M вируса бешенства/NOS в систему амплификации
BeYDV+Репликаза (Конструкция номер 1086)

Схематическое изображение конструкции номер 1193. Сайты ферментов рестрикции SacII и StuI, используемые для линеаризации плазмиды, показаны на изображении.



Конструкция номер 1193 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-НТ/NOS в систему амплификации ВеYDV+Репликаза с экспрессионной кассетой Пластоцианин-TBSV P19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)

ATGCGAGGATATATTGTTGGTAAACAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTATATGTGTGCAAAATAACTCAAAAAACCATAAA
AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTACATTTTCTTTGACAAAAATATCACTACTACTGTTATAAATCATT
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAGAGTAGTGATATTTTGACAAACAAATTTGTTG
CAACATTGAGAAAAATTTGTTCTCTCTTTTCAFTGGTCAAAAACATAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTTAGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAAATTTGCTGTAATAAATAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAAATTTTGGCAAGCTATAAAAAGAAAGTAATATTTTAA
AATTAAGAGTTGAGTCATTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAGAGTTGGATTAAAGT

10/26

TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTITTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
 AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATA
 ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGGCATCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
 ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
 AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAG
 TCCGAGTTGGAGTGGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
 CTGCACAGAGTCCCTGGATCTTGGACGGGAGATTCTGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCAACGTTTCTGGAGGGTCGCGAAT
 CTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGTCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
 TGTCTCTTCGCTCTCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTGTCTTGTATGAAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTGTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACCTGGTAAATGATCTCAAATATATGTCAAGTT
 AGAATCAGAAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCTGACAATTTGCTTATATTTGA
 ACACTAAAAATGAACATCTTTTGCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGTCAAGTT
 CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTACTA
 ATTTTATATCATCCCTTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCCCTAGGAGATTG
 TGTCTTCCCGCTTCAGTTTGAAGCTGCTTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCG
 TTGGGAATTAAGTACGCGGTGTGCACACGGTGGCGCGCTTAGCAGAAAGGCATGTTGTGTGACTCCGAG
 GGGTTGCTCAAACTCTATCTTATAACCGCGTGGAGGCTGGAGGCAAGGGCATTTTGTAAATTTAAGT
 AGTTAGTGGAAATGAGCTCATTACTTAAAGACGAAGTCTTGGCAAGGGGGGCCACGCGCAATTTT
 AATATTACCGCGGTGGCCCCACCTTATCTGCGAGTGTCTTAGCAGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAA
 GTTCCCGCCCACTAGGTTTAAAGGTGTTACACTATAAAGCATATACGATGTGATGTTATTTGATAAAG
 CGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTGGATACGAATTAATCTGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGT
 GGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAGGGCAATTTGA
 GACTTTTCAACAAAGGGTAAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCATTGCCCCAGCTATCTGTCACTTTATTG
 TGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCTTCCGATAAAGGAAAGGCCATCTGTTG
 AAGATGCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCCACCCAGAGGAGCATGTTGGAAAAAGAAAG
 ACCTTCAACACAGCTCTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTA
 CTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAGGGCAATTTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAAT
 ATCCGGAAACCTCTCGGATTCATTTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAA
 GGTGGCTCTACAAATGCCATCTTCCGATAAAGGAAAGGCCATCTGTTGAAGATGCTCTGCCGACAGT
 GTCCCAAGATGGACCCCCACCCAGAGGAGCATCTGGAAAAAGAACGTTCCAAACAGCTCTTCAA
 AGCAAGTGGATTGATGTGATACTCCACTGACGTAAAGGATGACGACAAATCCCACTATCTTCCCAAGA
 CCTTCTCTATATAAGGAAGTTTCAATTTGAGAGGATTAAAACTTAAATAGGTTTGTATAAAGC
 GAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCT
 TGTCTTCTTGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATGCTTCCGACCACTACAACTTTTCTTTCA
 CTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACAGTGTGCGGCCCATTAATAACGTGTACTTGTCTTA
 TTCTTGTGGGTGTTGTTCTTGGAAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCATACATTACTTGT
 ACGATTCTGCTGACTTTTGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCGTACTTCT
 TTTCTCTCTTCTTGTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGT
 TTTGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATTTCTGCCCAAAATTTGTGGGCCCCGGGCTCTCA
 GCCAAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCGTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGA
 CCTGGGATGCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTC
 CAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCC
 CCTCCAGCACCTGGCCCCAGGAGACCTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCCAGCAGCAACAAAGGTGG
 ACAAGAAAAATTTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCTTGCATATGTACAGTCCCAAGATATCATCTGT
 CTTCATCTTCCCCCAAGGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCTAAGGTACAGTGTGTGTGG
 TAGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGTCCAGTTCAAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGC
 TCAGACGCAACCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAAGTCAACTTCCCATCATGCAC
 CAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAAGGCTATTTCTTTAGTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCT

11/26

TATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCT
 GTTAGCAGGTCCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 GACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTCTTAAG
 AITGAATCCTGTGTCCGGTCTTCCGATGATTATCATATAATTTCTGTGTAATTACGTTAAGCATGTAATA
 TTAACATGTAAATGACATGACGTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA
 TACCGGATAGAAAAACAAATATAGCGCCCAAACTAGGATAAAATTTATCCGCGCGGTGTCTATGTTAC
 TAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTG
 GAAATCAATAAAATGATTATTTATGAATATATTCAITGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACAT
 AACACACGAAATAAAACAAAAAACACAATCCAAAAACAAACACCCCAACAAAAAATAACACTATATATATC
 CTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCAAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCGTCACACAT
 ATAGTGGTGAACCAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTGACTTGTCAITGATAACATCCAGTCTTCTGT
 CAGGATTGCAAGAATTATAGAAGGGATCCACCTTTATTTCTTCTTTTCCATATTTAGGGTTGACA
 GTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAAATGGCTTCCACAATGGGACGAACITGAAGGGGATGTCGTGATGA
 TATTATAGGTGGCGTGTTCATGATGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTCCAGTATTTGTGTCGCCCGAGA
 CTCTAGCCCGAGGTGGTCTTCCCGTACGAGTTGGTCCGAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAG
 TCCTCCCTCATCTCTGGTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTCAAGTGTGCTTGTATCGTAGGAGACAGGAT
 GTATGAAAGTGTAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTCCAGATCTTGTG
 CAGCGAGATCTGATCTGTGAAGGGGACACGTAAGTCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTGGCTG
 AATATCCAGCCATGAAAGCTTGTGTGCCATTATGAGGGAAATTTCTTTGTATCATGTCAAGATACTCC
 TCCTTAGAGCTTGCAGTCTGATAAATAGTTCGCCATCGTGCCTCAGATTTCGAGGAGAGACCTTATGAT
 CTCGAAATCTCTCTGTGTTTAAATATCTCCGTCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTAGAGTTCTAG
 CTGGCTGGATATTAGGGTGATTCTCTCAAAATCGAAAAAGAAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTATC
 AAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGTACTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAACACCAAGGAAGAA
 AATAAGAAAAAGGTGTGAGTTCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGG
 TAGGTAAAGGAAAAATATTTAGATGTGAGTCTGAAGTTCTTGTAGCAGAAAGCATGTTGTTGTGATCC
 GAGGGGTTGCTCAAACTCTATCTTAACCGGGCTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTA
 AGTAGTTAGTGGAAAAAGAGCTATTACTTAAAGACGAAGTCTTGCAGCAAGGGGGGCCACGCCGAA
 TTTTAATATTACCGCGTGGCCCCACCTTATCGGAGTGTCTTAGCAGGAGCGGTCCAGATTAAAGTAG
 AAAAGTTCGCCGCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTGAT
 GGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCGGTGGATACGAATTATTCGTACGGCCGCCACTAGTGGCACTG
 GCCGTCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATC
 CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGGCGAGCT
 GAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGGAGTGGATCAGATTGTGTTTCCCGCTTCAAGTTAAACTATCA
 GTGTTGACAGGATATTTGGCGGTAAACCTAAGAGAAAAAGAGCTTA

Фигура 5C, SEQ ID NO: 8

Экспрессионная кассета номер 1086 от левого LIR BeYDV до правого LIR BeYDV.
 Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства
 подчеркнута

CTAGCAGAAAGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGTTGCCCTCAAACTCTATCTTATAACCGCGGTGGAGGC
 ATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAAATGACGTCAATTACTTAAAGACGAAGT
 CTTCGCAGCAAGGGGGGCCACCGCGAATTTTAATATTACCGGGGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTT
 AGCAGCAGCGGTCCAGATTAAAGTAGAAAAAGTTCCCGCCCACTAAGGTTAAAGGTGTTCACTATAA
 AAGCATATACGATGTGATGGTATTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCGGTGGGATACGAATTA
 TTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGTTGGAGCAGCACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
 GATACAGTCTCAGAAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTC
 GGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
 GCCATCATTTGGGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAC
 CCCCACCCAGGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGAGCTTCCAAACAGCTTCAAGGCAAGTGGATTGAT
 GTGATAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAAGACC
 AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAAATATCCGAAACCTCCTGGATTCCATTGCCAGCTAT

12/26

CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGCTCTACAAATGCCATCATTOCGATAAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCTCTGCGGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATC
 GTGGAAAAAGAAAGACGTTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
 GGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTGGAG
 AGGTATTTAAATCTTAATAGGTTTGTATAAAAGCGAAGCTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTCTAAA
 CTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTCTTGGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGA
 TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAG
 TCGGCGCCCATTAATAACGTGTACTTGTCTTATCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAAGCTTGTCTG
 GAGGCTGCTGTTCAAGCCCATACATTACTTGTACGAATCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTAC
 TCTGCTTGACGAGGTATTTGTGCGCTGACTTCTTCTCTCTTCTTGTGCTGATGGTCTATAAGAAATCT
 AGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTTCAAACCTTGGAGAAAGATTGTTAAAGCTTCTGTATAT
 TCTGCCCAAATTTGTGCGGCCCATGAACCTTCTACGTAAGATAGTGA AAAATTCAGGGACGAGGACACT
CAAAAACCTCTCCCGTGTACGCCCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCTGAAATACGTCCTC
GCTGAAAAGAACTTACAAGCAAGAAAGAACATGAGGAACCTTGTATCAACGGAGGGGTTAAAGTGTGTAG
CCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCTTCGGGCACATCTGAAATCATTCGACGAGATATATTTCTGGGAAT
CATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAAGTAGTTATTTGGACTGGCTTGTTCAGGATCTCCAGTCCCTGAGGGCA
TGAATCGGTATACAAATGAGGAGAACTTTATCTTCCAGTGGCTGATTCAGGGGCCCCCTCTTGAAGG
GGAGGAGTTTGGAACTCTTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCCTTCGGAATTCGAAATAG
AGTGATTTGCAAAACAGTGTATATCCAGGGCAGAACTTGGGTATCAACATGAACCCGAGAGCATGTCA
ACTATGGTCTGACATGTCTCTTCAGACACAAAGGTCGGAAGAGGACAAAGATTCTCTCTGCTCTAGAA
 TAAAGGGCTATTTCTTTAGTTTGAATTAATCTGTTATCTGGTGTGCAITTCATATGTTTGGTGAAGCGGTTTC
 TGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAAATTTAATTTCTTGTGAGCTCTGTTTAGCAGGTCTGCTCTCA
 GCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAAATTCGATATCAAG
 CTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGTCTT
 GCGATGATTATCATATAATTTCTGTGAATTAAGTAAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTT
 ATTTATGAGATGGGTTTATGATATGAGTCCCGCAATATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAAAA
 TAGCCCGCAAACTAGGATAAAATTAACGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGC
 TTGGCGCGGGTACCGAGCTCGAATTCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCAATAAAATGATTATTT
 TTATGAATATATTTCAATGTGCAAGTAGATAGAAATTAACATATGTTACATAACACAGAAATAACAAAA
 AAACACAATCCAAAAACAACACCCCAACAAAAAACAACACTATATATCTCTGATGAGGAGAGGCAAG
 TTCAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCGTCAACATATAGTGGGTGACGCAATTATC
 TTCAAAGTAATCCTCTGTTGACTTGTCTATTGATAACATCCAGTCTTCTGTCAGGATTCGAAAGAAATATAG
 AAGGGATCCCACTTTTATTTCTCTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCT
 ATTAATGTCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTGCTGATGATATATAGGTGGCGTGTTCAT
 CGTAGTTGGTGAAAGTCGATGGTCCCGTTTCCAGTAGTTGTGTGCGCCGAGACTTCTAGCCGAGGTGGTCTT
 CCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCTCTTCCCTCATCTCTGGTTAG
 ATCGCCCATCCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAGGCATCG
 ATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCTGGGCAGCGGAGATCTGATTCTGT
 GAAAGGGCAGACGTAATCTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTGGCTGAATATCCAGCCATTGAAGC
 TTTGTTGCCCAATTCATGAGGGAATTCCTTTGATCATGTCAAGATACTCTCTCTTAGACGTTGCAATCTG
 GATAATAGTTTCGCCATCGTGGTCAAGTTTCCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCTCTGTGTTT
 TAATATCTCCGCTCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGATATAGGGTGA
 TTTCTTCAAAATCGAAAAAGAAAGGATCCCTAATACAAGGTTTATTAAGCTGGATAAGAGCATGAT
 AGTGGGTAGTGCATCTTGTATGAAGCTCAGAAAGCAACACCAAGGAAGAAAAAAGAAAAAGGTGTAGTT
 TCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAAACATATTT
 AGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGTAGCAAGAGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTGCTTCAAACTCT
 ATCTTATAACCGGCTGAGGACATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTAAGTAATAGTGGAAAAATGAC
 GTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTCCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTAATAATTACCGCGTGGC
 CCCACCTTATCCGAGTGTCTTAGCAAGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAAGTTCCCGCCCATAGGG
 TTAAGGGTGTTCACACTATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGAGCGTATATTTATCAGGT
 ATTTCCGTGGATACGAATTAATCGTAC

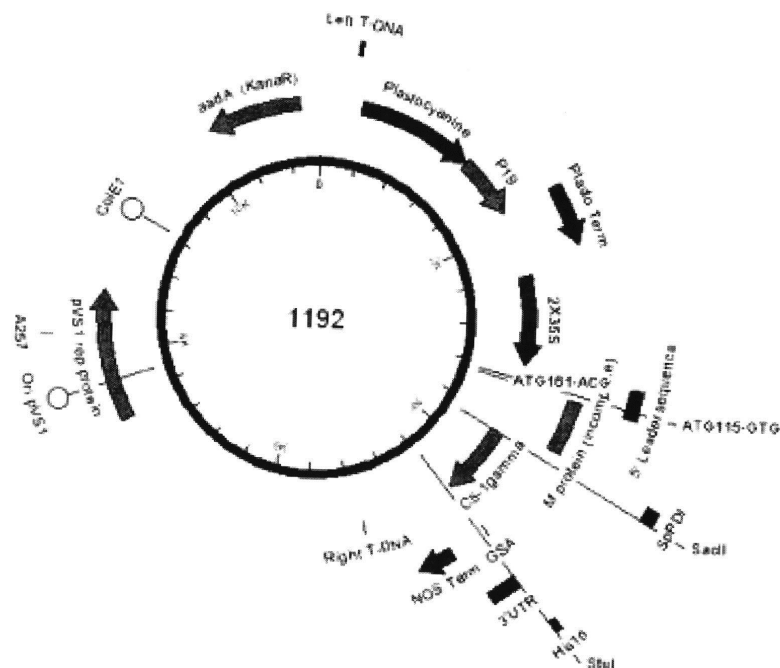
14/26

TAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAAGGTTCTCTACATGGAACTTAAAGTTGGATACATCTT
AGCCATAAAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTT
GGTTATGTCAACAACCGTTCAAAGAAAGCATTTCCGCCAACACAGATGCATGTAGAGCCCGTAC
AACTGGAAGATGGCCCGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACCGCTGGC
TTGGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCAAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATA
TGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGTCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTAC
TGCTCCACTAACCCAGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTT
TTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGAGTGAGACTTGGCGCTTTGTAGATGAAAGAGGCC
TATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGG
AACATGGGTCCCGATGCAAAACATCAAATGAAACCAAAATGGTGCCCTCCCGATCAGTTGGTGAACCTGCA
CGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGTGTCT
GGATGCACTAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACCTCTCAGTCATTTAAGAAAACTT
GTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATAACATATTCAAACAAGACCTTGAATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGT
CACTCAGAACTTGGAAATGAGATCCTCCCTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGAGGTGTCTCTCTCA
TGTGAACGGGGTGTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACCGCAATGTCTTAATCCAGAGATGCAA
TCATCCCTCCTCCAGCAACATATGAGATTGTTGGAATCCTCGGTATCCCCCTTGTGCACCCCTGGCAGA
CCCGTCTACCGTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATTTTGTGTAAGTTACCTTCCCGATGTGCAC
AATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGTGCAGGGGCCC
TGACTGCTTGTATGTGATAATTTCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTAAGCA
ACACAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCACTCACTCCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATG
GGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCACTGTGA

15/26

Фигура 6D

Схематическое изображение конструкции номер 1192. Сайты ферментов рестрикции SacII и StuI, используемые для линейаризации плазмиды, показаны на изображении.



Фигура 6E, SEQ ID NO: 12

Конструкция номер 1192 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-НТ/PDISP/NOS с экспрессионной кассетой Пластоцианин-Р19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)

TGGCAGGATATATTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTT
 ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
 AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
 TTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTG
 CAACATTTGAGAAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCAATGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
 GGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
 AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAAATGCTGTAAATAAATAAGGATGA
 CGCATTAGAGAGATGTACCAATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAAATAAATTTTAA
 AATTAAAAGTTGAGTCATTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAAGAGTTGGATTAAAGT
 TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTATATTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAAATCCCTCCAAAAA

45

17/26

CGCCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCCGCCACGTGACTAGTGGC
 ACTGGCCCTTCTTTTACAACCTCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCA
 CATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCCA
 GCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCCTTTCCCGCCTTCAGTTAACT
 ATCAGTGTGTCAGGATATATTGGCGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTA

Фигура 6F, SEQ ID NO: 13

Экспрессионная кассета номер 1071 от промотора 2X35S до терминатора NOS.

Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства подчеркнута.

GTCAACATGTTGGAACACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCTCGGATTCATTCGCCAGCTATCT
 GTCATTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGTGGCTCTTACAAATGCCATCATTCGATATAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGGATCG
 TGGAAAAAGAGACGTTCCAAACACGTTCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAGGGTAATATCCGAAACCTCTCGGATTCATTCGCCAGCTATCTGTCATTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAAGAGGTGGCTCTTACAAATGCCATCATTCGATATAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGGATCGTGGAAAAAGAGACGTTTCCA
 ACCACGTTCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTTCACTGACGTAAGGATGACGACAAATCCCACT
 ATCTTGGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGTATTAAAAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTCTTGGGTGAGCGATCTTCAAGTGTGTCAGATCGTGGCTTCCGACACAGTACA
 ACGTTTCTTCTCACTGAAGCGAAATCAAGATCTCTTGTGGACAGTAGTGGCGGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATCTTGTGGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTTCAGCCCA
 TACATTACTTGTACGATCTGCTGACTTTCGCGCGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGCAGGAGGTATTG
 TGGCTGTACTTCTTCTCTCTTCTGCTGATTGGTCTTATAAGAAATCTAGTATTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTGGAGAAAGATTGTAAGCTTCTGTATATCTTCCCAAAATTTGTGGGC
 CCATGGCCGAAAAAGCTTTCGATTTTGGCTTATTGTTCTCTCTCTTGTGTTGCTTCTCTCAGATCTTCG
 CCAATTCCTTATTACAGATACCAAGACCAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTCAGATACATCACTCAG
 CTGGCCCAACAAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGCTTCTCTACATGGAACT
 AAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGCGGTTGTGACGGAGGCTGAA
 ACTACACTAACTTCGTTGGTTATGTTCACAACCACTTCAAAAGAAAGCAATTCGCGCCAACACAGATG
 CATGTAGAGCCCGGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCGGT
 ACCCTGACTACCGCTGGCTTCAACTGTAAAAACCAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGT
 GGCAGATTGTGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGTCTAGGAGTA
 GCGGTGTCTTCTACTCTCTCTCACTAACCAGGATTACCACTTTGGATGCCCGAGAAATCCGAGACTAG
 GATGTCTGTGTGACATTTTACCAATAGTAGGGGAAGAGAGCATCAAAAGGAGTGTAGACTTGGCGCTT
 TGTAGATGAAGAGAGCCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGGAGTCTTAGGA
 CTTAGACTTATGGATGGAAACATGGGTGGCGATGCAAAACATCAAAATGAACCAAAATGGTTCCTCCGATC
 AGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCCTCAGACGAAATTTAGCACCTTGTGTAGAGGAGTTGTTCAGGAA
 GAGAGAGGAGTGTCTGGATGCTACAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAGTGAAGTTTCAGACGCTCAGT
 CATTTAAGAAAACTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCG
 ATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGAATGAGATCTCTCTTCAAAAGGGGTGTTAAGAGTTGGGGG
 GAGGTGTCTATCTCATGTGAACCGGGTGTCTTCAATGTATATAATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTA
 ATCCAGAGATGCAATCATCCCTCTCCAGCAACATATGGAGTGTGTGGAATCTTGGTTATCCCTCTGT
 GCACCTCTGGCAGACCCGTCTACCTTTTCAAGGACCGGTGACGAGGCTGAGGATTTGTGGAAGTTCAC
 CTTCCTCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTCAGTTCGCTCTCCGAACTGGGGGAAGTATGTATTAC
 TGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCCTTGATGTGATTAATTTCTGTATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCG
 ATCAGAACTACGCAACACAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCAGTCACTCCCAAGCGGAA
 GATCATATCTTCAATGGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAAGACTGTGAAGCCCTATTCTTTAGT

18/26

TTGAATTACTGTTATTCCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATT
 TTATGTAATTAAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATT
 TAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAQCTTATCGACCTGCAGATCGTT
 CAAACATTTGGCAATAAAGTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGGATGATTATCATATAATTT
 CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT
 GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACCGGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
 ATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Фигура 6G, SEQ ID NO: 14

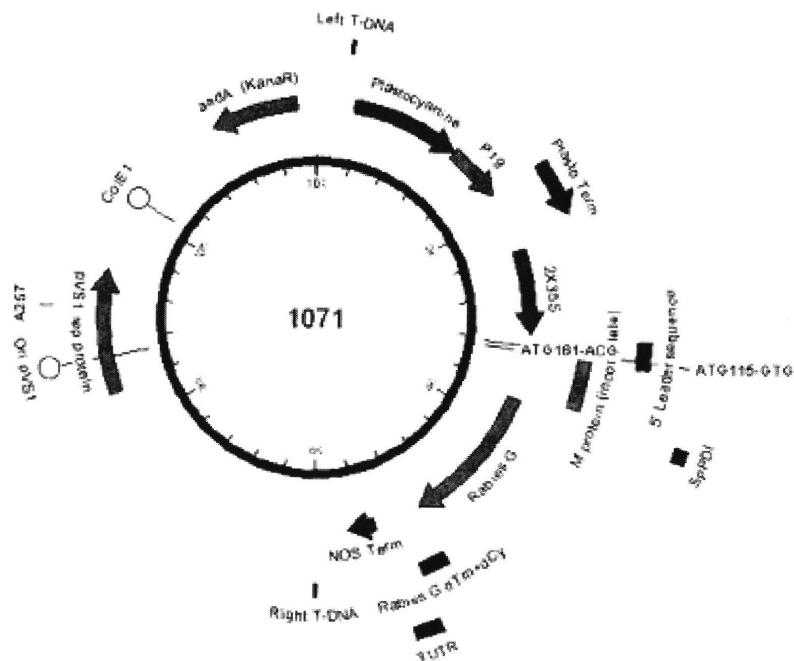
Аминокислотная последовательность PDISP-белок G из штамма ERA вируса бешенства

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFAKFPIYTIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNL
 SGFSYMECLKVGYILAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYYVTTTFKRKHFRPTPDACRAA
 YNWKMAGDPRYEESLHNPYPDYRWLRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPS
 GKCSGVAVSSTYCSNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGL
 YKSLKQACKLKLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPDQLVNLHDFRSDEIEHLV
 VEELVRKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPQFGKAYTIFNKTLMHEADAHYKSV
 RTWNEILPSKQCLRVGGRCRPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELLESSI
 PLVHPLADPSTVFVKDGEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTAL
 MLIIFLMTCCRRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESHKSGGETRL*

19/26

Фигура 6H

Схематическое изображение конструкции номер 1071

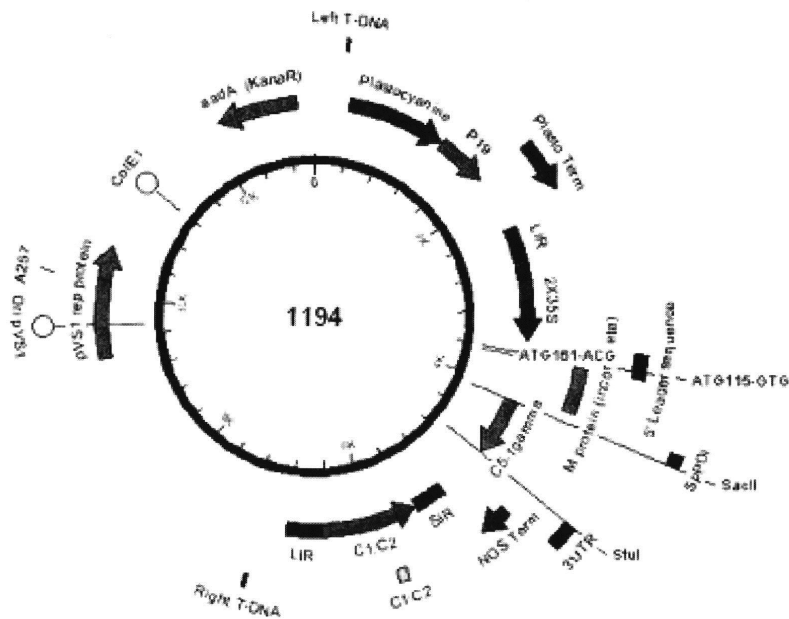


D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/G вируса бешенства/NOS в систему амплификации
BeYDV+Репликаза (Конструкция номер 1091)

Фигура 7A

Схематическое изображение конструкции номер 1194. Сайты ферментов рестрикции SacII и StuI, используемые для линеаризации плазмиды, показаны на изображении.

20/26



Фигура 7В, SEQ ID NO: 15

Конструкция номер 1194 от левых до правых границ t-ДНК (подчеркнуто). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS в систему амплификации ВеYDV+Репликаза с экспрессионной кассетой Пластоцианин-Р19-Пластоцианин (супрессор сайленсинга)

TGGCAGGATATATTGTTGGTGTAAACAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
 ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
 AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTATATAATCATTA
 TTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTACTGATAATTTGACAACAATTTGTTG
 CAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
 GGGAGAAATAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
 AAATATCATTTGAGGAATTTGACAAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTTGCTGTAATAATAAGGATGA
 CGCATTAGAGAGATGTACCATAGAGAAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAAATAAATATTTTAA
 AATTAAGTTGAGTCAATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
 TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
 AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATGA
 ACATCCAAATCCAAACATCACAACAACTCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATCTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTATCAC
 CCATTTCTAATAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
 ACTAAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
 AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAAATCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC

50

22/26

ATAACACACGAAATAAACAAAAAACACAATCCAAAAACACCCCAACAAAAATAACACTATATAT
 ATCTCTGATGAGGAGAGGACGTTCACTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCGTCACAC
 ATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCTTCTGTGACTTGTCATTGATAACATCCAGTCTTC
 GTCAGGATTGCAAAAGAAATTATAGAAGGGATCCCACTTTTATTTCTCTCTTTTCCATATTTAGGGTTGA
 CAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAAATGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTGTCGAT
 GATATTATAGGTGCGGTGTCATCTGATGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTCCAGTAGTGTGTGTCGCGCA
 GACTTCTAGCCCAAGGTGCTCTTCCGGTACGAGTTGGTCCGCAATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCC
 AGTCCCTCCCTCATCTGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTGTGATCGTAGGAGACAG
 GATGTATGAAGGTGATAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCG
 TGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTGCTCAAGTTGTGGAGGAAAATAATTTGTGTG
 CTGAATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGAAATCTCTTTGATCATGTCAAGATAC
 TCTCTCTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCCGCACTCGTGGTCAGATTGTGCGAGGAGAGACCTTAT
 GATCTCGGAAATCTCTCTGTTTAAATATCTCCCTCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTC
 TAGCTGCTGATATTAAGGTGATTTCCTTCAAAATCGAAAAAGAAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTT
 ATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGGCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAA
 GAAAAAAGAAAAAGGTGTGAGTTCTCCAGAGAACTGGAAATAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTG
 GGTAGGTAAAGGAAAAACATATTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGAC
 TCCGAGGGGTTCCTCAAACTCTATCTTATAACCGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAAT
 TTAAGTATGTTAGTGAATAAGCTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCC
 GAATTTAATATTACGGCGGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGTCTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAG
 TAGAAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAAAAAACATATACGATGTGATGTTATTT
 GATGGAGCGTATATTGTATCAAGGTATTTCGTCGGATACGAATTTATTCGTACGGCCCGCCACTAGTGCCA
 CTGGCCGTGCTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCCCTTGCAGCAC
 ATCCCCCTTCCCAAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGGCGAG
 CTTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTGCTTCCCGCTTCAGTTAAACTAT
 CAGTGTGTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAAGACGTTTA

Фигура 7С, SEQ ID NO: 16

Экспрессионная кассета номер 1091 от левого LIR BeYDV до правого LIR BeYDV.
 Открытая рамка считывания PDISP/G-белок из штамма ERA вируса бешенства
 подчеркнута.

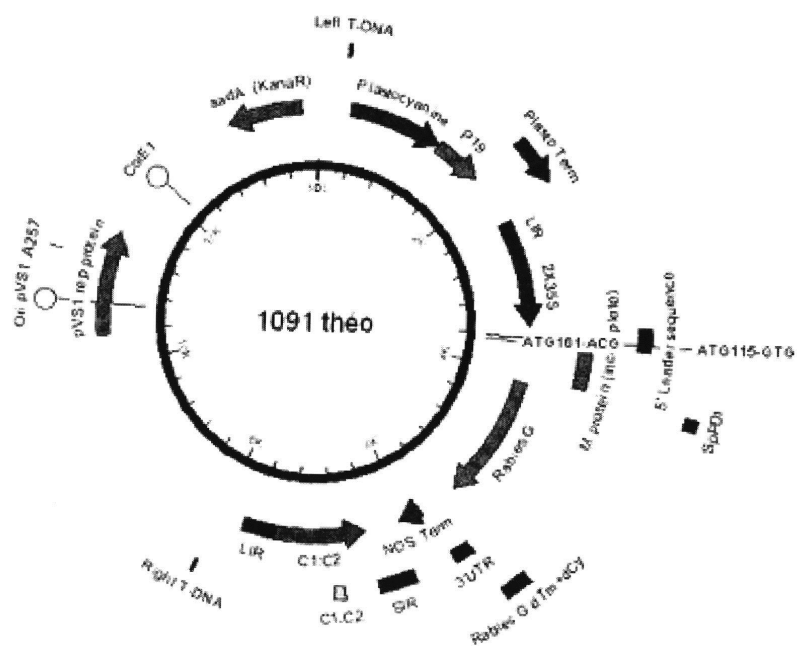
CTAGCADAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGCGGTGGAGGC
 ATGGAGGCAAGGGCATTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAAATGACOTCATTTACTTAAAGACGAAGT
 CTTGCCAACAAGGGGGGCCACCGCAATTTAATATTACCGCGGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGTCTT
 AGCAGCAGCGGTCCAGATTAAAGTAQAAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTTCACTATAA
 AAGCATATACGATGTGATGGTATTGATAAAGCGTATATTGTATCAAGTATTCCGTGGGATACGAATTA
 TTGATACAAGCTTCTTAAGCCGTTCAACATGTTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
 GATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAAATATCCGAAACCTCTC
 GGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAAGTGAAGGAAAGGTGCTCTACAAAT
 GCCATCATGCGGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCTCTGCGGACAGTGGTCCCAAGATGGAC
 CCCCACCAAGGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGAGCTTCCAACCAAGTCTTCAAGCAAGTGGATTGAT
 GTGATAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
 AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCTCGGATTCCATTGCCAGCTAT
 CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAGGTGGTCTTCAAAATGCCATCATTCGGATAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCTCTGCGGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAAGGAGGAGCATC
 GTGAAAAAAGAGAGCGTTCCAACCAAGTCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
 GGGATGACGACAAATCCCACTATCTCTGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTGAGAG
 AGGTATTAAAAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAAACCAACCTTCTTAAA
 CTCCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCTTTCTTGGGTGAGCGATCTCAACGTTGTGAGA
 TCGTGTCTCGGCACCAAGTACAAGGTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAAGATCTCTTGTGGACAGGTAG
 TCGCGGCCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTGTG

GAGGCTGCTGTTGAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTGGCGGGTGCAATATCTCTAC
 TTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCGTGACTTCTTCTCTCTCTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCT
 AGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCTGTTGTTTTCGAACCTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATAT
 TCTGCCAAATTTGTGCGGCCCATGGCGAAACCGTTGCGATTTCGGCTTATTTGTTTCTCTCTCTGTT
 GGTCTCTCTCAGATCTTCGCCAAATTCCTATTTACACATACCCAGACAAGCTTGGTCTCTGGAGCCGA
 TTGACATACATCAGCTCAGCTGCCCAACAAATTTGGTAGTGGAGGAGCAAGGATGCACCAACCTGTCCAGG
 GTTCTCTACATGGAACCTTAAAGTTGGATACATTTAGCCATAAAAAATGAACCGGTTCACCTGACAGGC
 GTTGTGACCGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCCTTGGTTATGTACACACACACCTTCAAAAGAAAGCAT
 TCCGCCCAACACCCAGATGCATGTAGAGCCCGGTACAACCTGGAAGATGGCCCGGTGACCCAGATATGAAG
 AGTCTCTACACAATCCGTACCTGACTACCGCTGGCTTCGAACCTGTAACCAACCAAGGAGTCTCTCTGT
 TATCATATCTCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTGAGGGTCTCTCTAGCC
 GGAAGTGTCTAGGAGTGGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCCAGATTACACCATTTGGATGCC
 CGAGAAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGG
 GAGTGGAGCTTCCGCTTTGTAGATGAAGAGGCTTATATAAGTCTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAA
 GTTATGTGGAGTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCCGGATGCAAAACATCAATGAAGCC
 AAATGGTCCCTCCCGATCAGTTTGTGGAACCTGCACGACTTTCCTCAGACGAAATAGGACCTTGTGTG
 TAGAGGAGTGTGTGAGGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCAGTACAGTCCATCATGACACCAAGTCAG
 TGAGTTTACAGAGTCTCAGTCAATTAAGAAAACCTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAA
 CAAGACTTGTATGGAAGCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGAATGAGATCTCTCTCAAAA
 GGGTGTAAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCTCATGTGAACCGGGTGTCTTCAATGTGTATAATATTAG
 GACCTGACCGCAATGTCTTAAATCCAGAGATGCAATCATCTCTCTCCAGCAACATATGAGTTGTGTGA
 ATCTCTGGTTATCCCTCTTGTGACCCCTTGGCAGACCCGCTTACCGTTTCAAGGACCGGTGACGAGCT
 GAGGATTTTGTGGAAGTTCACCTTCCCGATGTGCACAAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGA
 ACTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGTGCAGGGGCTTCACTTCTTGTATGTATATTTCTCTGATGAC
 ATTTGTGAGAGAGTCAATCATCAGAACCTACCGAACACAAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTC
 AGTCACTCCCAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCACACAAGAGTGGGGTGGAGACAGACT
 GTGAAGCCCTATTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTCTATGTTTGGTGAACCGTTT
 CTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCTGTTTACGAGGTGCTGCTTC
 AGCAAGGACACAAAAAGATTATTAATTTTATTAACAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAA
 CTTATGCACTGCGAGATCGTTCAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATGGAATCTGTTCCGGTCT
 TCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGT
 TATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTAACATTTAATACCGGATAGAAAAACAAAT
 ATAGCGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTTCGAAG
 CTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCGGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCAATAAAATGATTAT
 TTTATGAATATATTTCAATTTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATAACACACGAAATAACAAA
 AAAACACAAATCCAAACAAACACCCCAACAAATAACACTATATATCTCTGATGAGGAGAGCGAC
 GTTCAGTGACTCGACGATTTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTAT
 CTTCAAAGTAATCTCTCTGTTGACTTGTCAATTGATAACATCCAGTCTTCTGTCAGGATTTGCAAGAAATTATA
 GAAGGGATCCCACTTTTATTTCTCTCTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACC
 TATTAATTTGCTTCCCAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCTGTCGATGATATTATAGGTGGCTGTCTCA
 TCGTAGTTGGTGAAGTGGATGGTCCCGTTCCAGTGTGTTGTCGCGGAGACTTCTAGCCAGGTGGTCTT
 TCCGATACGAGTTGTGTCGAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCCACTCTCTCTCATCTGTGTTA
 GATCGGCCATCCACTCAAGGTGAGATTGTGCTTGTATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAGGCATC
 GATGCTTACATGATATAGGTGCTCTCTCTCAGTTGTGACATCTCTGTGCAACCGGAGATCTGATTCTG
 TGAAGGGGACACGTACTGCTCAGTTGTGGAAGAAATTAATTTGTGGCTGAATATTCAGCCATTGAAAG
 CTTTGTGCCCATTTCATGAGGAAATCTCTTTGATCATGTCAAGATACTCTCTCTAGACGTTGACAGTCT
 GGATAATAGTTCCGCATCGTGGTCAGATTGTGCAAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCTCTGT
 TTTAATATCTCCGTCTTTGATATGTAATCAAGGACTTTTATAGAGTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGT
 GATTCTCTTCAAAATCGAAAAAAGAGGATCCCTAATAACAGTTTATTAACAGCTGGATAAGAGCATG
 ATAGTGGGTAGTGCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAAAAGGAAAGGTGTGAG
 TTTCTCCAGAGAAATGGAATAAATCATCTCTTGAAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAAATAT
 TTAGATTGAGTCTGAAGTTCTTGTACGAGAAAGCATTTGTTGTGACTCCGAGGGGTGGCTCAAACT
 CTATCTTATAACCGCGGTGGAGGATGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTATGTTGAAAAATG
 ACGTCAATTAATAAGACGAAGTCTTGCACAGGGGGGCCCAACCGCGAATTTAATATTACCGCGGTG

GCCCACCTTATCGCGAGTGCCTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAAGTTCCTCCGCTACTAG
 GGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTAATTGATGGAGCGTATATTGTATCAG
 GTAATTCGTCGGGATACGAATTATTCGTAC

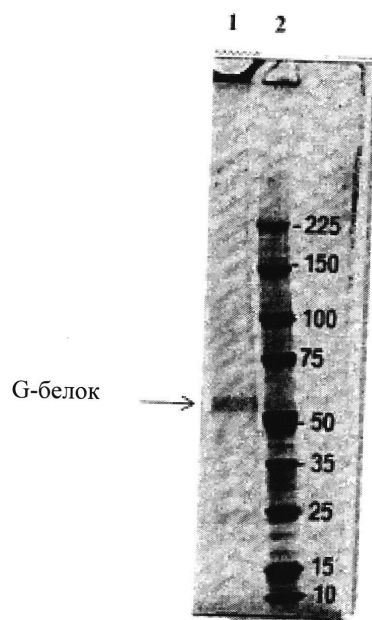
Фигура 7D

Схематическое изображение конструкции номер 1091



25/26

Фигура 8А



Фигура 8В

