



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0813724-2 A2



(22) Data do Depósito: 11/07/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) Título: PARTÍCULAS SIMILARES A VÍRUS DA GRIPE (VLPS) COMPREENDENDO HEMAGLUTININA PRODUZIDA NO INTERIOR DE UMA PLANTA

(51) Int. Cl.: C12N 15/82; A61K 39/145; A61P 31/16; A61P 37/04; C07K 14/11; (...).

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2007 US 61/013,272; 13/07/2007 US 60/959,414; 21/01/2008 CA 2,615,372; 22/01/2008 US 61/022,775; 27/11/2007 US 60/990,603.

(71) Depositante(es): MEDICAGO INC..

(72) Inventor(es): MARC-ANDRE D'AOUST; MANON COUTURE; FRÉDÉRIC ORS; SONIA TRÉPANIER; PIERRE-OLIVIER LAVOIE; MICHÈLE DARGIS; LOUIS-PHILIPPE VÉZINA; NATHALIE LANDRY.

(86) Pedido PCT: PCT CA2008001281 de 11/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/009876 de 22/01/2009

(85) Data da Fase Nacional: 13/01/2010

(57) Resumo: PARTÍCULAS SIMILARES A VÍRUS DA GRIPE (VLPS) COMPREENDENDO HEMAGLUTININA PRODUZIDA NO INTERIOR DE UMA PLANTA A presente invenção refere-se a um método para sintetização de partículas similares a vírus da gripe (VLPs) no interior de uma planta, ou uma porção desta é proporcionado. O método envolve expressão de HA da gripe em plantas, e a purificação por cromatografia de exclusão de tamanho. A invenção é também direcionada a uma VLP compreendendo proteína de HA da gripe e lipídeos de planta. A invenção é também direcionada a um ácido nucleico que codifica HA da gripe, bem como vetores. As VLPS podem ser usadas para formularem vacinas da gripe, ou podem ser usadas para injeções de vacinas existentes.

```
AGAGGTACCCGGGGCTGGTATATTTATATGTTGCAAAATAACTCAAAAACCCATA
AAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGACATTTTACTTGAACAAAAATTCCACTAC
TACTGTATAAATCAITATTAAAGATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAAC
AAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAAATTTGTT
GTTCTCTTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAAAAAGGAAGGGGAG
AATAAAAACATAAAGTGTAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAA
ATAGTTGTACAAAATCATTTAGAGAAATTTGACAAAAGCTACACAAATAGGGTT
AATTGCTGAAATAAAGGATGACGGATTAGAGAGATGTACCAATTAGAGAA
TTTTGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGATAAATTTTAAATTAAGTTGAG
TCATTTGATTAACATGTGATTTTAAATGAATTGATGAAGAGTTGGATTAAG
TTGTATTAGTAAATAGAAATTTGGTGTCAAAITTAATTTGACATTTGATCTTTTCT
ATATATTGCCCATAGAGTCACTTAACTCAITTTTATAITTTGATAGTAAATAA
GAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAACGGTATATTTACTAAA
AAATCTAAGCCAGTGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCA
ATCCAAACATCACAAATCCGTATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCACTC
TGTTGCAATCTAGATTTATCTAAATGACAGATTTCTCCACAGCTGAGCCACA
CAAAAACCAATCCACATCTTTATACCCATTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAG
TCTACATCTTGATCCCTTCAAACACATACAAAGAGAGAGACTAATTAATTAAT
TAATCATCTTGAGAGAAAAATGGGAAAAAGTTGGGATTTTGGCTTATTGTTT
TCTCTCTTGTGTTGGTTCTCTCAGATCT
```

```
GAGCTCTAAGTTAAATGCTCTTCGTCCTCCTATTATAATATGGTTGTTATTG
TTAATTTGTTCTTGTAGAAAGGCTTAATTAATCGTTGTTATGAAATGATATT
TGTATGAGATGAATGGTGTATGTAAATGATTTACATAAAGTGGAGTGAATC
AGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAAGACCTGCCCGTACAAATGTC
TTATTTGAAACACTAAAATGAACATCTTTGCCAACCTTTATAGTGGTTA
ATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATGAAATATCAGTTA
TCSAAATTCATAACAACTAACCTTAACTGTTAATTAACACTAATTTTATATCCTCC
CTTTGATAAATGATAGTACA
```

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PARTÍCULAS SIMILARES A VÍRUS DA GRIPE (VLPs) COMPREENDENDO HEMAGLUTININA PRODUZIDA NO INTERIOR DE UMA PLANTA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se à produção de partículas similares a vírus. Mais especificamente, a presente invenção é direcionada a produção de partículas similares a vírus compreendendo antígenos de gripe.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 A gripe é a causa condutora de morte em humanos devido a um vírus respiratório. Os sintomas comuns incluem febre, garganta dolorida, falta de ar, e músculo dolorido, entre outros. Durante a estação da gripe, os vírus da gripe infectam 10-20% da população ao redor do mundo, conduzindo a 250-500.000 mortes anualmente.

15 Os vírus da gripe são vírus envelopados que se originam da membrana de plasma de células de mamífero infectadas. Eles são classificados em tipos A, B, ou C, baseados nas nucleoproteínas e antígenos de proteína matriz presentes. Os vírus tipo A da gripe podem ser adicionalmente divididos em subtipos de acordo com a combinação de glicoproteínas de superfície de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) apresentada. HA
20 governa a capacidade do vírus se ligar e penetrar a célula hospedeira. A NA remove resíduos de ácido siálico terminal de cadeias glicans na célula hospedeira e proteínas de superfície viral, que previne agregação viral e facilita a mobilidade do vírus. Atualmente, 16 subtipos de HA (H1-H16) e 9 subtipos de NA (N1-N9) são reconhecidos. Cada vírus da gripe tipo A apresenta um
25 tipo de HA e um tipo de glicoproteína NA. Geralmente, cada subtipo exibe especificidade de espécies; por exemplo, todos os subtipos HA e NA são conhecidos por infectarem pássaros, enquanto alguns subtipos H1, H2, H3, H5, H7, H9, H10, N1, N2, N3 e N7 mostraram infectar humanos (Horimoto 2006; Suzuki 2005). Os vírus da gripe compreendendo H5, H7 e H9 são
30 considerados as formas mais altamente patogênicas de vírus de gripe A, e são causam mais provavelmente futuras pandemias.

As pandemias de gripe são usualmente causadas por vírus da

gripe altamente transmissíveis e virulentos, e podem conduzir a níveis elevados de doença e morte globalmente. A emergência de novos subtipos A de gripe resulta em 4 pandemias maiores no século 20. A gripe espanhola, causada pelo vírus H1N1, em 1918-1919, conduziu a mortes de cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do mundo entre 1917 e 1920. Atualmente, o risco da emergência de um novo subtipo, ou da transmissão a humanos de um subtipo endêmico em animais, está sempre presente. De interesse particular é uma forma altamente virulenta de gripe aviária (também denominada "gripe de pássaro"), deflagrações da qual foram reportadas em vários países ao redor do mundo. Em muitos casos, esta gripe de pássaro pode resultar em taxas de mortalidade se aproximando de 100% dentro de 48 horas. A difusão do vírus da gripe aviária (H5N1), primeiro identificado em Hong Kong em 1997, para outros países da Ásia e Europa, tinha sido postulada estar ligada aos modelos migratórios de pássaros selvagens.

O método atual de combater a gripe em humanos é por vacinação anual. A vacina é usualmente uma combinação de várias cepas que são prognosticadas para serem cepas dominantes para a "estação de gripe" entrante. O prognóstico é coordenado pela Organização Mundial de Saúde. Geralmente, o número de doses de vacina produzidas cada ano não é suficiente para vacinar a população mundial. Por exemplo, o Canadá e os Estados Unidos obtiveram doses de vacina bastante para imunizar cerca de um terço de sua população, enquanto somente 17% da população da União Européia puderam ser vacinada. É evidente que a produção mundial atual de vacina de gripe seria insuficiente em caso de uma pandemia de gripe no mundo. Mesmo se a produção anual necessária possa um tanto ser encontrada em um dado ano, as cepas dominantes mudam de ano para ano, desse modo o estoque em tempos necessários baixos no ano não é prático. A produção econômica de grande escala de uma vacina de gripe efetiva é de interesse significativo para o governo e a indústria privada.

Os estoques virais para uso nas vacinas são produzidos nos ovos fertilizados. As partículas de vírus são coletadas, e para uma vacina viral inativada, rompidas por detergente para inativar. Vacinas atenuadas

vivas são produzidas de vírus da gripe que foram adaptados para crescimento a baixa temperatura que significa que em temperatura corpórea normal, a vacina é atenuada. Tal vacina é licenciada nos Estados Unidos da América para uso em indivíduos de 5 a 49 anos de idade. Vacinas de vírus total inativadas são tornadas inofensivas pela inativação com agentes químicos, e elas foram produzidas em ovos embriônicos ou cultura de célula de mamífero. Todos estes tipos de vacina mostram algumas vantagens e desvantagens específicas. Uma vantagem de vacinas derivadas de vírus totais é o tipo de imunidade induzido por tais vacinas. Em geral, vacinas divididas induzem uma forte resposta de anticorpo, enquanto vacinas produzidas de vírus totais induzem ambas uma resposta de anticorpo (humoral) e celular. Mesmo embora uma resposta de anticorpo funcional seja um critério para licenciamento que se correlaciona com proteção induzida por uma vacina, existe evidência aumentada que uma resposta de célula T é também importante na imunidade da gripe, isto pode também proporcionar melhor proteção na idade avançada.

De modo a induzir uma resposta imune celular, vacinas produzidas de vírus totais foram desenvolvidas. Devido à alta patogenicidade da cepa da gripe (por exemplo, H5N1), estas vacinas são produzidas em facilidade BL3+. Para cepas de gripe altamente patogênicas, tais como H5N1, alguns fabricantes modificaram a sequência de gene de hemaglutinina de modo a reduzir a patogenicidade da cepa da gripe e torná-la avirulenta e mais facilmente produzida em ovos embriônicos ou cultura de célula de mamífero. Outros também usam cepas de gripe reclassificadas em que as sequências genéticas para as proteínas de hemaglutinina e neuraminidase são clonadas em uma cepa doadora de gripe patogênica de alta-baixa produção (A/PR/8/34; Quan F-S et al., 2007). Enquanto estes métodos podem produzir vacinas úteis, eles não proporcionam uma solução para a necessidade de produção de vacinas de alto volume, baixo custo e rápida na escala necessária para satisfazer a necessidade global em um ano normal, e quase certamente seria insuficiente no caso de pandemia.

Usando-se esta tecnologia genética reversa, pode-se também

necessitar mudar a sequência genética da proteína HA para torná-la avirulenta. Para cepas de gripe altamente patogênicas, a produção de vacinas de vírus total requer procedimentos de confinamento, ou as vacinas resultantes não se equiparam exatamente a sequência genética do vírus circulante. No caso de vacinas atenuadas vivas, existe ainda um risco que a vacina administrada pode recombinar com um vírus da gripe a partir do hospedeiro, conduzindo a um novo vírus da gripe.

Enquanto este método mantém o epítoto antigênico e modificações pós-translacionais, existe um número de problemas para este método, incluindo o risco de contaminação devido ao uso de vírus total e rendimentos variáveis dependendo da cepa de vírus. Níveis subótimos de proteção podem resultar de heterogeneidade genética no vírus devido a sua introdução nos ovos. Outras desvantagens incluem planejamento para obtenção de ovos, riscos de contaminação devido a químicos usados na purificação, e tempos longos de produção. Também, pessoas hipersensíveis a proteínas de ovo não podem ser candidatas qualificadas para recebimento da vacina.

No caso de uma pandemia, a produção de vacina dividida é limitada pela necessidade de adaptar a cepa para crescimento em ovos e os rendimentos de produção variáveis alcançados.

Embora esta tecnologia tenha sido usada por anos para a produção de vacinas sazonais, ela pode responder arduamente em uma estrutura de tempo razoável a uma pandemia e a capacidade de manufaturamento ao redor do mundo é limitada.

Para evitar o uso de ovos, os vírus da gripe foram também produzidos na cultura de célula de mamífero, por exemplo, em células MDCK ou PERC.6, ou similares. Outra aproximação é genéticas reversas, em que os vírus são produzidos por transformação de célula com genes virais. Estes métodos, contudo, também requerem o uso de vírus total, bem como elaboraram métodos e ambientes de cultura específicos.

Vários produtos recombinantes foram desenvolvidos como candidatas de vacina de gripe recombinante. Estas aproximações têm se focalizado na expressão, produção, e purificação de proteínas tipo A HA e NA da

gripe, incluindo expressão destas proteínas usando células de inseto infectadas de baculovírus (Crawford et al., 1999; Johansson, 1999), vetores virais, e constructo de vacina de DNA (Olsen et al., 1997).

Específicos de uma infecção de vírus da gripe são bem conhecidos. Brevemente, o ciclo infeccioso é iniciado pela fixação da proteína HA de superfície do vírion a um receptor celular contendo ácido siálico (glicoproteínas e glicolipídeos). A proteína NA media processamento do receptor de ácido siálico, e a penetração de vírus na célula depende da endocitose mediada por receptor dependente de HA. No limite ácido de endossomos internalizados contendo um vírion da gripe, a proteína HA suporta mudanças conformacionais que conduzem a fusão de membranas viral e de célula e vírus sem revestimento e liberação de M2-mediado de proteínas M1 de ribonucleoproteínas associadas a ribonucleoproteínas (RNPs), que migram no núcleo de célula para síntese de RNA viral. Anticorpos para proteínas HA previnem infecção de vírus por neutralização de infectividade de vírus, pelo que anticorpos para proteínas NA mediam seu efeito nas etapas anteriores de replicação viral.

Crawford et al. (1999) descrevem expressão de HA de gripe em células de inseto infectadas com baculovírus. As proteínas expressas são descritas como sendo capazes de prevenir doença de gripe letal causada por subtipos de gripe H5 e H7. Johansson et al. (1999) ensinam que proteínas HA e NA da gripe que expressam baculovírus induzem respostas imunes em animais superiores àqueles induzidos por uma vacina convencional. Imunogenicidade e eficácia de hemaglutinina expressa por baculovírus de vírus da gripe de equino foi comparada a um candidato de vacina de DNA homólogo (Olsen et al., 1997). Coletivamente, estes dados demonstram que um alto grau de proteção contra desafio de vírus da gripe pode ser induzido com proteínas HA ou NA recombinantes, usando-se várias aproximações experimentais e em diferentes modelos de animal.

Desde que pesquisa anterior tem mostrado que as glicoproteínas de gripe superficial, HA e NA, são os alvos principais para indução de imunidade protetora contra vírus da gripe, e que M1 proporciona um alvo

conservado para imunidade celular para gripe, uma nova vacina candidata pode incluir estes antígenos virais como uma partícula macromolecular de proteína, tais como partículas similares a vírus (VLPs). Os produtos de vacina, VLPs, oferecem a vantagem de serem mais imunogênicos do que antígenos de subunidade ou recombinante, e são capazes de estimularem ambas respostas imune humoral e celular (Grgacic e Anderson, 2006). Adicionalmente, a partícula com estes antígenos da gripe pode revelar epítopes conformacionais que induzem neutralização de anticorpos a cepas múltiplas de vírus da gripe.

10 A produção de uma cepa de vírus da gripe não-infecciosa para proposta de vacina é um modo de evitar infecção inadvertente. Alternativamente, partículas similares a vírus (VLPs) como substitutas para o vírus cultivado foram investigadas. VLPs imitam a estrutura do capsid viral, mas carece de um genoma, e, desse modo, não pode replicar ou proporcionar um
15 meio para uma infecção secundária.

Vários estudos têm demonstrado que proteínas de vírus recombinante autoagregadas em VLPs em cultura de célula usando plasmídeos de expressão de mamífero ou vetores de baculovírus (Gomez-Puertas et al., 1999; Neumann et al., 2000; Latham e Galarza, 2001). Gomez-Puertas et al.
20 (1999) descrevem que a formação eficiente de VLP de gripe depende dos níveis de expressão de várias proteínas virais. Neumann et al. (2000) estabeleceram um sistema baseado em plasmídeo de expressão de mamífero para geração de partículas similares a vírus da gripe infecciosas totalmente de cDNAs clonados. Latham e Galarza (2001) reportaram a formação de
25 VLPs de gripe em células de inseto infectadas com baculovírus recombinante coexpressando genes HA, NA, M1, e M2. Estes estudos demonstraram que proteínas de vírion da gripe podem se autoagregar sob coexpressão em células eucarióticas.

Gomez-Puertas et al.(2000) ensinam que, em adição a hemaglutinina (HA), a proteína matriz (M1) do vírus da gripe é essencial para VLP
30 que se origina de células de inseto. Contudo, Chen et al. (2007) ensinam que M1 pode não ser requerido para formação de VLP, e observaram que

liberação eficiente de M1 e VLPs requerem a presença de HA e atividade de sialidase provida pela NA. A NA cliva os ácidos siálicos das glicoproteínas na superfície das células que produzem as VLPs, e liberando as VLPs no meio.

5 Quan et al 2007 ensinam que a vacina de VLP produzida em um sistema de expressão de baculovírus (célula de inseto) induz uma imunidade protetora contra algumas cepas de vírus da gripe (A/PR8/34 (H1N1)). As VLPs estudadas por Quan foram observadas para se originarem a partir da membrana de plasma, e foram consideradas serem do tamanho e morfologia
10 corretos, similares àquelas obtidas em um sistema de mamífero (células de MDCK).

Os vírus envelopados podem obter seu envelope de lipídeo quando 'se originam' da célula infectada e obtêm a membrana a partir da membrana de plasma, ou daquela de uma organela interna. As partículas de
15 vírus da gripe e VLPs se originam a partir da membrana de plasma da hospedeira. Em sistemas de célula de mamífero ou baculovírus, por exemplo, a gripe se origina a partir da membrana de plasma (Quan et al 2007). Somente uns poucos vírus envelopados são conhecidos por infectarem plantas (por exemplo, membros de Topovírus e Rhabdovírus). Dos vírus envelopados de
20 planta conhecidos, eles são caracterizados por origem de membranas internas da célula hospedeira, e não a partir da membrana de plasma. Embora um número pequeno de VLPs recombinantes tenha sido produzido nos hospedeiros de planta, nenhuma foi derivada a partir da membrana de plasma, elevando a questão se VLPs derivadas de membrana de plasma, incluindo
25 VLPs da gripe, podem ser produzidas em plantas.

As tecnologias de produção de VLP da gripe atuais assentam na coexpressão de proteínas virais múltiplas, e esta dependência representa um problema destas tecnologias, visto que no caso de uma pandemia e de epidemias anuais, o tempo de resposta é crucial para vacinação. Um sistema
30 de produção de VLP mais simples, assentando na expressão de somente uma proteína viral, é desejável para acelerar o desenvolvimento de vacina.

De modo a proteger a população mundial da gripe e prevenir futuras pandemias, os fabricantes de vacina necessitariam desenvolverem métodos rápidos e efetivos de produção de doses de vacina. O uso atual de ovos fertilizados para produzir vacinas é insuficiente, e envolve um processo prolongado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objetivo da invenção proporcionar partículas similares a vírus da gripe (VLPs) aperfeiçoadas.

De acordo com a presente invenção é proporcionado um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica um antígeno de um vírus envelopado operativamente ligado a uma região regulatória ativa em uma planta. O antígeno pode ser uma hemaglutinina da gripe (HA).

A presente invenção também proporciona um método de produção de partículas similares a vírus da gripe (VLPs) em uma planta compreendendo:

- a) introdução de um ácido nucleico que codifica um antígeno de um vírus envelopado, por exemplo, uma hemaglutinina da gripe (HA), operativamente ligada a uma região regulatória ativa na planta, ou porção desta, e
- b) incubação da planta ou uma porção desta sob condições que permitem a expressão do nucleico, produzindo, desse modo, as VLPs.

O método pode ainda compreender as etapas de coletar a planta e purificar ou separar as VLPs a partir do tecido da planta.

A presente invenção inclui o método acima no qual, na etapa de introdução (etapa a), o ácido nucleico pode ser ou transientemente expresso na planta, ou estavelmente expresso na planta. Além disso, as VLPs podem ser purificadas usando-se cromatografia de exclusão de tamanho.

A presente invenção também proporciona uma partícula similar a vírus (VLP) compreendendo uma proteína HA de vírus da gripe e um ou mais do que um lipídeo de planta.

Também incluída na presente invenção está uma composição compreendendo uma dose efetiva de uma VLP compreendendo uma proteí-

na HA de vírus da gripe, um ou mais do que um lipídeo de planta, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção também contempla fragmentos ou porções de proteínas de HA que formam VLPs em uma planta.

5 A VLP pode compreender uma proteína de HA de um ou mais do que um subtipo, incluindo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ou H16, ou fragmento ou porção desta. Exemplos de subtipos compreendendo tais proteínas de HA incluem A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova York/1995, 10 A/gaivota de arenque/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/pato silvestre/MN/33/00, A/pato/Shanghai/1/2000, A/rabijunco do norte/TX/828189/02, A/Turquia/Ontário/6118/68(H8N4), A/shoveler/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949(H10N7), A/pato/Inglaterra/56(H11N6), A/pato/Alberta/60/76(H12N5),A/Gaivota/Maryland/704/77(H13N6), A/Pato 15 silvestre (mallard)/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99(H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Singapura/1/57 (H2N2), 20 A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), AA Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)).

Em um aspecto da invenção, a proteína de HA pode ser um sub-tipo H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9. Em um outro aspecto, a proteína de H1 25 pode ser a partir de cepa de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), ou A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1). A proteína H3 pode também ser a partir de cepa de A/Brisbane 10/2007 (H3N2) ou A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). Em um aspecto adicional da invenção, a proteína H2 pode ser a partir da cepa de A/Singapura/1/57 30 (H2N2). A proteína H5 pode ser a partir da cepa de A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), ou A/Indonésia/5/2005. Em um aspecto da invenção, a proteína H6 pode ser a partir da cepa de A/Cerceta/Hong

Kong/W312/97 (H6N1). A proteína H7 pode ser a partir da cepa de A/Equino/Praga/56 (H7N7). Em um aspecto da invenção, a proteína H9 pode ser a partir da cepa de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Em um outro aspecto da invenção, a proteína HA pode ser de um vírus da gripe que pode ser um
5 vírus tipo B, incluindo B/Malásia/2506/2004 ou B/Flórida/4/2006. Exemplos de sequências de aminoácido das proteínas HA de subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9 incluem SEQ ID NOs: 48-59.

A proteína HA de vírus da gripe pode ser H5 da Indonésia.

A presente invenção também proporciona moléculas de ácido
10 nucleico compreendendo sequências que codificam uma proteína HA. As moléculas de ácido nucleico podem compreender adicionalmente uma ou mais regiões regulatórias operativamente ligadas a sequência que codifica uma proteína HA. As moléculas de ácido nucleico podem compreender uma
15 sequência que codifica um H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ou H16. Em um aspecto da invenção, a proteína HA codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser um subtipo H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9. A proteína H1 codificada pela molécula de ácido nucleico é de cepa de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), ou A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1). Em um as-
20 pecto da invenção, a proteína H3 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser a partir da cepa de A/Brisbane 10/2007 (H3N2), ou A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). Em um aspecto adicional da invenção, a proteína H2 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser a partir da cepa de A/Singapura/1/57 (H2N2). A proteína H5 codificada pela molécula de
25 ácido nucleico pode também ser da cepa de A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), ou A/Indonésia/5/2005. Em um aspecto da invenção, a proteína H6 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser a partir da cepa A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1). A proteína H7 codifi-
30 cada pela molécula de ácido nucleico pode também ser a partir da cepa de A/Equino/Praga/56 (H7N7). Adicionalmente, a proteína H9 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser a partir da cepa de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Exemplos de sequências de moléculas de ácido nu-

cleico que codificam tais proteínas HA de subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9 incluem SEQ ID NOs: 36-47 e 60-73.

A sequência de ácido nucleico pode codificar a proteína HA de vírus da gripe H5 Indonésia.

5 Regiões regulatórias que podem ser operativamente ligadas a uma sequência que codifica uma proteína HA incluem aquelas que são operativas em uma célula de planta, uma célula de inseto ou uma célula. Tais regiões regulatórias podem incluir uma região regulatória plastocianina, uma região regulatória de Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBis-
10 CO), clorofill proteína de ligação a/b (CAB), ST-LS1, uma região regulatória polihedrin, ou uma região regulatória gp64. Outras regiões regulatórias incluem uma 5' UTR, 3' UTR ou sequências terminadoras. A região regulatória plastocianina pode ser uma região regulatória de alfa plastocianina; as 5' UTR, 3'UTR ou sequências terminadoras podem ser sequências de alfa.

15 Um método de indução de uma imunidade para uma infecção de vírus da gripe em um indivíduo, é também proporcionado, o método compreendendo administrar a partícula similar a vírus compreendendo uma proteína HA de vírus da gripe, um ou mais do que um lipídeo de planta, e um veículo farmacologicamente aceitável. A partícula similar a vírus pode ser administra-
20 da a um indivíduo oralmente, intradermalmente, intranasalmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, ou subcutaneamente.

A presente invenção também pertence a uma partícula similar a vírus (VLP) compreendendo uma ou mais do que uma proteína derivada de um vírus selecionado a partir do grupo consistindo em Gripe, Measles, Ebo-
25 la, Marburg, e HIV, e um ou mais do que um lipídeo derivado de uma célula de produção de hospedeiro de não-sialilatação. A proteína de HIV pode ser p24, gp120 ou gp41; a proteína de vírus Ebola pode ser VP30 ou VP35; a proteína de vírus de Marburg pode ser Gp/SGP; a proteína do vírus Measles pode ser H-proteína ou F-proteína.

30 Adicionalmente a presente invenção se refere a uma partícula similar a vírus (VLP) compreendendo uma proteína HA de vírus da gripe e um ou mais do que um lipídeo de hospedeiro. Por exemplo se o hospedeiro

é inseto, então a partícula similar a vírus (VLP) pode compreender uma proteína HA de vírus da gripe e um ou mais do que um lipídeo de inseto, ou se o hospedeiro é uma levedura, então a partícula similar a vírus (VLP) pode compreender uma proteína HA de vírus da gripe e um ou mais do que um lipídeo de levedura.

A presente invenção também se refere a composições compreendendo VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos de gripe. Os dois ou mais subtipos ou cepas podem ser selecionados a partir do grupo compreendendo: A/New Caledônia/20/99 (H1N1)A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova York/1995, A/gaivota de arenque/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/pato silvestre/MN/33/OO, A/pato/Shanghai/1/2000, A/rabijunco do norteLTX/828189/02, A/Turquia/Ontario/6118/68(H8N4), A/shoveler/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949(H10N7), A/pato/Inglaterra/56(H1N6), A/pato/Alberta/60/76(H12N5), A/Gaovota/Maryland/704/77(H13N6), A/Pato silvestre/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/pato silvestres da cabeça preta/Suécia/5/99(H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7) ou A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)). Os dois ou mais subtipos ou cepas de VLPs podem estar presentes em cerca de quantidades equivalentes; alternadamente um ou mais subtipos ou cepas podem ser a maioria das cepas ou subtipos representados.

A presente invenção pertence a um método para indução de imunidade a infecção de vírus da gripe em um animal ou organismo alvo compreendendo administrar uma dose efetiva de uma vacina compreendendo uma ou mais do que uma VLP, a VLP produzida usando um hospedeiro de não-sialiação, por exemplo, um hospedeiro de planta, um hospedeiro de inseto, ou um hospedeiro de levedura. A vacina pode ser administrada oralmente, intradermalmente, intranasalmente, intramuscularmente, intrape-

ritonealmente, intravenosamente, ou subcutaneamente. O organismo alvo pode ser selecionado a partir do grupo compreendendo humanos, primatas, cavalos, porcos, pássaros (aves), aves de água, pássaros migratórios, codorniz, pato, gansos, aves domésticas, galinha, camelo, canino, cães, felino, gatos, tigre, leopardo, gato da algália, marta, marta de pedra, furões, animais domésticos, camundongos, ratos, foca, baleias, e similares.

A presente invenção proporciona um método para produção de VLPs contendo hemaglutinina (HA) de cepas de gripe diferentes em um hospedeiro adequado capaz de produzir uma VLP, por exemplo, uma planta, inseto, ou levedura. As VLPs que são produzidas nas plantas contêm lipídeos de origem de planta, VLPs produzidas em células de inseto compreendem lipídeos a partir da membrana de plasma de células de inseto (geralmente referidas como "lipídeos de inseto"), e VLPs produzidas na levedura compreendem lipídeos a partir da membrana de plasma de células de levedura (geralmente referidas como "lipídeos de levedura").

A produção das VLPs em plantas apresenta várias vantagens sobre a produção destas partículas em cultura de célula de inseto. Os lipídeos de planta podem estimular células imunes específicas e aumentar a resposta imune induzida. As membranas de planta são produzidas de lipídeos, fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE), e também contêm glicosfingolipídeos que são únicos para plantas e algumas bactérias e protozoários. Esfingolipídeos são não-usuais em que eles não são PC ou PE similares a ésteres de glicerol, mas preferivelmente consistem em um amino álcool de cadeia longa que forma uma ligação de amida a uma cadeia de ácido graxo contendo mais do que 18 carbonos. PC e PE, bem como glicosfingolipídeos, podem se ligar a moléculas de CD1 expressas por células imunes de mamífero, tais como células dendríticas similares a células apresentando antígeno (APCs) e macrófagos e outras células incluindo linfócitos B e T no timo e fígado (Tsuji M., 2006). Além disso, em adição ao efeito adjuvante potencial da presença de lipídeos de planta, a capacidade de N-glicans de planta de facilitar a captura de antígenos de glicoproteína por células apresentando antígeno (Saint-Jore-Dupas, 2007), pode ser vantajosa da produ-

ção de VLPs em plantas.

Sem desejar estar ligado pela teoria, é antecipado que VLPs produzidas de planta induzirão uma reação imune mais forte do que VLPs produzidas em outros sistemas de fabricação, e que a reação imune por estas VLPs produzidas por planta serão mais fortes quando comparadas a reação imune induzida pelas vacinas de vírus totais vivas ou atenuadas.

Contrário as vacinas produzidas de vírus totais, as VLPs proporcionam a vantagem, visto que elas são não-infecciosas, contenção biológica restritiva não é, desse modo, uma emissão significante conforme seria operando como um vírus infeccioso total, e não é requerido para produção. As VLPs produzidas de planta proporcionam uma vantagem adicional novamente por permitir que o sistema de expressão seja crescido em uma estufa ou campo, sendo, desse modo, significativamente mais econômico e adequado para escala.

Adicionalmente, as plantas não compreendem as enzimas envolvidas na sintetização e adição de resíduos de ácido siálico a proteínas. As VLPs podem ser produzidas na ausência de neuraminidase (NA), e não existe necessidade de coexpressar NA, ou tratar as células de produção ou extrato com sialidase (neuraminidase), para assegurar produção de VLP nas plantas.

AS VLPs produzidas de acordo com a presente invenção não compreendem proteína M1 que é conhecida por ligar RNA. RNA é um contaminante da preparação de VLP e é indesejado quando se obtém aprovação regulatória para o produto de VLP.

Este sumário da invenção não descreve necessariamente todas as características da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Estas e outras características da invenção tornar-se-ão mais aparentes a partir da seguinte descrição em que referência é feita aos desenhos em anexo, nos quais:

A Figura 1A mostra uma sequência de um cassete de expressão baseado em alfafa plastocianina usada para a expressão de H1 de acordo

com uma concretização da presente invenção (SEQ ID NO:8). O peptídeo de sinal de proteína disulfeto isomerase (PDI) é sublinhado. Os locais de restrição BglII (AGATCT) e SacI (GAGCTC) usados para clonagem são mostrados em negrito. A Figura 1B mostra um diagrama esquemático de domínios funcionais de hemaglutinina da gripe. Após clivagem de HA0, HA1 e HA2, fragmentos permanecem ligados juntos por uma ponte de disulfeto.

A Figura 2A mostra uma representação de plasmídeo 540 agregado para a expressão de HA subtipo H1. A Figura 2B mostra uma representação de plasmídeo 660 agregado para expressão de HA subtipo H5.

A Figura 3 mostra uma cromatografia de exclusão de tamanho de extratos de proteína de folhas produzindo hemaglutinina H1 ou H5. A Figura 3A mostra o perfil de eluição de H1; Blue Dextran 2000 (triângulos) e proteínas (diamantes). A Figura 3B mostra imunodeteção (western blot; anti H1) de frações de eluição de H1 seguindo cromatografia de exclusão de tamanho (S500HR contas). A Figura 3C mostra o perfil de eluição de H5; Blue Dextran 2000 (triângulos) e proteínas (diamantes). A Figura 3D mostra imunodeteção (western blot; anti H5) de frações de eluição de H5 seguindo cromatografia de exclusão de tamanho (S500HR contas).

A Figura 4 mostra uma fotomicrografia microscópica de elétron de estruturas grandes de hemaglutinina H1 e H5 da fração de eluição 9 de uma coluna de exclusão de tamanho. A Figura 4A mostra uma ampliação de 50 000 vezes de uma VLP de H1 mostrando a presença de estruturas similares múltiplas (a barra representa 200 nm). A Figura 4B mostra uma ampliação de 150 000 vezes de uma VLP de H1 (a barra representa 100 nm).

A Figura 4C mostra uma ampliação de 50 000 vezes de uma VLP de H5 mostrando a presença de estruturas similares múltiplas (a barra representa 50 nm).

A Figura 5A mostra a sequência do fragmento Terminal-N de H1 (SEQ ID NO: 1). A Figura 5B mostra o fragmento Terminal-C de H1 (SEQ ID NO:2). A Figura 5C mostra a sequência completa que codifica HA0 de H1 (SEQ ID NO:28).

A Figura 6 mostra a sequência que codifica H5 flanqueado por

um local HindIII imediatamente a montante do ATG inicial, e um local SacI imediatamente a jusante do códon de parada (TAA) (SEQ ID NO:3).

A Figura 7A mostra a sequência do iniciador Plasto-443c (SEQ ID NO:4). A Figura 7B mostra a sequência de iniciador SpHA(Ind)-Plasto. (SEQ ID NO:5). A Figura 7C mostra a sequência de iniciador Plasto-SpHA(Ind). (SEQ ID NO:6). A Figura 7D mostra a sequência de iniciador HA(Ind)-Sac.r (SEQ ID NO:7).

A Figura 8A mostra a sequência de aminoácido da sequência de peptídeo HA1 (SEQ ID NO:9). A Figura 8B mostra a sequência de aminoácido da sequência de peptídeo HA5 (SEQ ID NO: 10). O peptídeo de sinal nativo é indicado em negrito.

A Figura 9 mostra a sequência de HA de gripe A subtipo H7 (SEQ ID No: 11).

A Figura 10A mostra a sequência de Gripe A HA, subtipo H2 (SEQ ID NO: 12). A Figura 10B mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H3 (SEQ ID NO: 13). A Figura 10C mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H4 (SEQ ID NO: 14). A Figura 10D mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H5 (SEQ ID NO: 15). A Figura 10E mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H6 (SEQ ID NO: 16). A Figura 10F mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H8 (SEQ ID NO: 17). A Figura 10G mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H9 (SEQ ID NO: 18). A Figura 10H mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H10 (SEQ ID NO: 19). A Figura 10I mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H11 (SEQ ID NO:20). A Figura 10J mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H12 (SEQ ID NO:21). A Figura 10K mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H13 (SEQ ID NO:22). A Figura 10L mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H14 (SEQ ID NO:23). A Figura 10M mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H15 (SEQ ID NO:24). A Figura 10N mostra a sequência de Gripe A HA subtipo H16 (SEQ ID NO:25). A Figura 10O mostra a sequência de Gripe B HA (SEQ ID NO:26). A Figura 10P mostra a sequência de Gripe C HA (SEQ ID NO:27). A Figura 10Q mostra a sequência de iniciador Xmal-pPlas.c (SEQ ID NO: 29). A Figura 10R mostra a sequência de iniciador SacI-ATG-pPlas.r (SEQ ID NO: 30). A Figura 10S

mostra a sequência de iniciador SacI-PlasTer.c (SEQ ID NO: 31). A Figura 10T mostra a sequência de iniciador EcoRI-PlasTer.r (SEQ ID NO: 32).

A Figura 11 mostra uma representação esquemática de várias constructo conforme aqui usadas. O constructo 660 compreende a sequência de nucleotídeo para codificar a HA subtipo H5 operativamente ligada ao promotor de plastocianina (plasto) e terminador (Pter); o constructo 540 compreende a sequência de nucleotídeo para codificar a HA subtipo H1 em combinação com um peptídeo de sinal de alfafa proteína disulfeto isomerase (SP PDI), e é operativamente ligada a um promotor de plastocianina (Plasto) e terminador (Pter); o constructo 544 agregada para a expressão de HA subtipo H1, a sequência de nucleotídeo que codifica H1 é combinada com um peptídeo de sinal de alfafa proteína disulfeto isomerase (SP PDI) e um zipper de leucina GCN4pII (no lugar da do domínio de transmembrana e calda citoplásmica de H1) e operativamente ligada ao promotor de plastocianina (Plasto) e terminador (Pter); e constructo 750 para a expressão de região de codificação de M1 de gripe A/PR/8/34 é combinada ao vírus etch de tabaco (TEV) 5'UTR, e operativamente ligada com o promotor duplo 35S e terminador Nos.

Figura 12 mostra imunodeteção de H5, usando anticorpos anti-H5 (Vietnã), em extratos de proteína de folhas de *N. benthamiana* transformadas com constructo 660 (raia 3). H5 comercial de gripe A/Vietnã/1203/2004 foi usada como controle positivo de detecção (raia 1), e um extrato de proteína de folhas transformadas com um vetor vazio foi usado como controle negativo (raia 2).

A Figura 13 mostra caracterização de estruturas de hemaglutinina por cromatografia de exclusão de tamanho. O extrato de proteína de biomassa separado produzindo H5, H1, H1 solúvel, ou H1 e M1, foi separado por filtração de gel em S-500 HR. H1 comercial na forma de invólucros foi também fracionado (invólucro H1). A Figura 13 A mostra frações de eluição analisadas para teor de proteína relativo (Nível de Proteína Relativo – um perfil de eluição de proteína padrão de um fracionamento de biomassa é mostrado). O pico de eluição de Blue Dextran 2000 (padrão de referência 2

MDa) é indicado. A Figura 13B mostra frações de eluição analisadas para a presença de hemaglutinina por imunoblotting com anticorpos anti-H5 (Vietnã) (para H5). A Figura 13C mostra frações de eluição analisadas para anticorpos antigripe A para H1. A Figura 13D mostra frações de eluição analisadas para anticorpos antigripe A para H1 solúvel. A Figura 13E mostra frações de eluição analisadas para anticorpos antigripe A para invólucro de H1. A Figura 13F mostra frações de eluição analisadas para anticorpos antigripe A para H1+M1.

A Figura 14 mostra concentração de estruturas H5 de gripe por centrifugação de gradiente de sacarose e exame de microscopia de elétron de frações concentradas de hemaglutinina. A Figura 14A mostra caracterização de frações de centrifugação de gradiente de densidade de sacarose. Cada fração foi analisada para a presença de H5 por imunoblotting usando anticorpos anti-H5 (Vietnã) (painel superior), e para seu teor de proteína relativo e capacidade de hemaglutinação (gráfico). A Figura 14B mostra exame de microscopia de elétron de transmissão de manchamento negativo de frações reunidas 17, 18 e 19 de centrifugação de gradiente de sacarose. A barra representa 100 nm.

A Figura 15 mostra purificação de VLPs de gripe H5. A Figura 15A mostra a análise de Coomassie Blue manchado SDS-PAGE de teor de proteína nas etapas de clareamento - raia 1, extrato bruto; raia 2, extrato ajustado a pH 6; raia 3, extrato tratado com calor; raia 4, extrato filtrado-DE; as etapas de purificação de afinidade de fetuin: raia 5, carga; raia 6, lavagem; raia 7, eluição (10X concentrado). A Figura 15B mostra exame de microscopia de elétron de transmissão de manchamento negativo da amostra de H5 VLP purificada. A barra representa 100 nm. A Figura 15 C mostra H5 VLP isolada ampliada para mostrar detalhes da estrutura. A Figura 15D mostra o produto de H5 VLP em um Coomassie-manchado de redução de SDS-PAGE (raia A) e Western blot (raia B) usando anticorpo policlonal de coelho elevado contra HA de cepa A/Vietnã/1203/2004 (H5N1).

A Figura 16 mostra uma sequência de nucleotídeo para vírus de Gripe A (A/Nova Caledônia/20/99(H1N1)) gene hemaglutinina (HA), CDs

completo. Nº de Acesso no Banco de Gene AY289929 (SEQ ID NO: 33).

A Figura 17 mostra uma sequência de nucleotídeo para *Medicago sativa* mRNA para proteína disulfeto isomerase. Nº de Acesso no Banco de Gene No. ZI 1499 (SEQ ID NO: 34). A Figura 18 mostra uma sequência de nucleotídeo para vírus da Gripe A (A/Porto Rico/8/34(H1N1)) segmento 7, sequência completa. Nº de Acesso no Banco de Gene No. NC_002016.1 (SEQ ID NO: 35).

A Figura 19 mostra localização de acúmulo de VLP por observação de microscopia de elétron de transmissão de manchamento positivo de tecido de produção de H5. CW: parede de célula, ch: cloroplasto, pm: membrana de plasma, VLP: partícula similar a vírus. A barra representa 100 nm.

A Figura 20 mostra indução de respostas de soro de anticorpo 14 dias após impulso em camundongos Balb/c vacinados com gripe VLP de grupe H5 produzida por planta ou HÁ recombinante solúvel. A Figura 20(A) respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de injeção intramuscular. Figura 20(B) respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de administração intranasal. As respostas de anticorpo foram medidas contra vírus de H5N1 totais inativados (A/Indonésia/5/05). GMT: titulação média geométrica. Os valores são o GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam *desvio médio*. * $p < 0,05$ comparado a HA solúvel recombinante.

A Figura 21 mostra resposta de anticorpo de inibição de hemaglutinação (HAI) 14 dias após impulso em camundongos Balb/c vacinados com VLP H5 produzida de planta ou HA solúvel recombinante. A Figura 21(A) respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de injeção intramuscular. A Figura 21(B) Respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de administração intranasal. As respostas de anticorpo de HAI foram medidas usando-se vírus de H5N1 totais inativados (A/Indonésia/5/05). GMT: titulação média geométrica. Os valores são o GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam *desvio médio*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado a HA solúvel recombinante.

A Figura 22 mostra o efeito de adjuvante na imunogenicidade dos camundongos das VLPs nos camundongos. A Figura 22(A) efeito de alume em camundongos imunizados através de injeção intramuscular. Figura 22(B) Efeito de Chitosan em camundongos imunizados através de administração intranasal. Respostas de anticorpo de HAI foram medidas usando-se vírus H5N1 totais inativados (A/Indonésia/5/05). GMT: titulação média geométrica. Os valores são o GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam *desvio médio*. * $p < 0,05$ comparado ao HA solúvel recombinante correspondente.

10 A Figura 23 mostra resposta de anticorpo para administração de VLP. Figura 23(A) isotipo de imunoglobulina anti-Indonésia/5/05 em camundongos vacinados com injeção intramuscular, 30 dias após impulso. Os valores são o GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco camundongos por grupo. ELIS A realizou usando vírus inativados totais como o agente de revestimento. As barras representam *desvio médio*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ comparado ao HA solúvel recombinante correspondente. Figura 15 23(B) Titulações de anticorpo contra vírus inativados totais. Todos os grupos são estatisticamente diferentes para controle negativo.

A Figura 24 mostra titulação de anticorpo contra vírus inativados totais homólogos (A/Indonésia/5/05), 2 semanas após primeira dose (semana 2), 14 dias após impulso (semana 5) ou 30 dias após impulso (semana 7). GMT: titulação média geométrica. Os valores são a GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco camundongos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a HA solúvel recombinante.

25 A Figura 25 mostra reatividade cruzada in vitro de anticorpos de soro. (A) titulações de anticorpo contra vírus inativados totais. (B) titulações de inibição de hemaglutinação contra vários vírus inativados totais. Os valores são a GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam *desvio médio*. Todos os grupos 30 são estatisticamente diferentes para controle negativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ comparado a HA solúvel recombinante correspondente.

A Figura 26 mostra eficácia da VLP H5 produzida por planta. (A)

Taxa de sobrevivência de camundongos após desafio com 10 LD₅₀ (4.09 x 10⁵ CCID₅₀) da cepa de gripe A/Turquia/582/06 (H5N1) (B) Peso corpóreo de camundongos imunizados após desafio. Os valores são o peso corpóreo médio de camundongos sobreviventes.

5 A Figura 27 mostra Origem de VLPs de gripe derivadas de planta. (A) Composição de lipídeo polar de VLPs de gripe purificada. Os lipídeos continham em um equivalente de 40 µg de proteínas, foram extraídos de VLP conforme descrito, separados por HP-TLC, e comparados ao perfil de migração de lipídeos isolados de membrana de plasma de tabaco altamente purificada (PM). As abreviações de lipídeo são as seguintes: DGDG, Digalactosildiacilglicerol; gluCER, glucosil-ceramida; PA, ácido fosfático; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; SG, Steril-glicoside. (B) Composição de lipídeo neutra de VLPs de gripe purificadas. Os lipídeos contidos em um equivalente de 15 20 µg de proteínas foram extraídos de VLP conforme descrito, separados por HP-TLC e comparados a migração de sitosterol. (C) Imunodetecção da bomba de próton do marcador da membrana de plasma ATPase (PMA) em VLPs purificadas e PM altamente purificado de folhas de tabaco (PM_L) e células de tabaco B Y2 (PM_BY2). Dezoito microgramas de proteína foram carregados em cada raia.

A Figura 28 mostra a sequência de rotação de locais DralII para SacI de clone 774 - sequência de nucleotídeo de A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 36). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória de plastocianina, começando com um local de restrição 25 DralII na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de SacI na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

A Figura 29 mostra a sequência de rotação dos locais DralII para SacI de clone 775 - sequência de nucleotídeo de A/Ilhas Salomão 3/2006 30 (H1N1) (SEQ ID NO: 37). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória de plastocianina, começando com um local de restrição DralII na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de SacI na

extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhados.

5 A Figura 30 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 776 - sequência de nucleotídeo de A/Brisbane 10/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 38). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória de plastocianina, começando com um local de restrição de Dralll na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

10 Figura 31 mostra a sequência de rotação de locais Dralll para Sacl de clone 777 - sequência de nucleotídeo de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (SEQ ID NO: 39). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória de plastocianina, começando com um local de restrição Dralll na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

20 A Figura 32 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 778 - sequência de nucleotídeo de B/Malásia/2506/2004 (SEQ ID NO: 40). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória plastocianina, começando com um local de restrição Dralll na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

25 A Figura 33 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 779 - sequência de nucleotídeo de B/Flórida/4/2006 (SEQ ID NO: 41). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória plastocianina, começando com um local de restrição Dralll na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

30

A Figura 34 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 780 - sequência de nucleotídeo de A/Singapura/1/57

(H2N2) (SEQ ID NO: 42). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória plastocianina, começando com um local de restrição na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

A Figura 35 mostra a sequência de rotação de locais Dralll para Sacl de clone 781 - sequência de nucleotídeo de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (SEQ ID NO: 43). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória plastocianina, começando com um local de restrição Dralll na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

A Figura 36 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 782 - sequência de nucleotídeo de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (SEQ ID NO: 44). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória, começando com um local de restrição na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhados.

A Figura 37 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 783 - sequência de nucleotídeo de AACerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (SEQ ID NO: 45). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória, começando com um local de restrição na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhados.

A Figura 38 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll para Sacl de clone 784 - sequência de nucleotídeo de A/Equino/Praga/56 (H7N7) (SEQ ID NO: 46). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória, começando com um local de restrição na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de Sacl na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhados.

A Figura 39 mostra a sequência de rotação de locais de Dralll

para SacI de clone 785 - sequência de nucleotídeo de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEQ ID NO: 47). A sequência de codificação é flanqueada por uma região regulatória, começando com um local de restrição na extremidade 5' e por um códon de parada e um local de SacI na extremidade 3'. Os locais de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhados.

Figura 40A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 48) do polipeptídeo translado de clone 774 (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)). A estrutura de leitura aberta do clone 774 começa com o ATG indicado na Figura 28. A Figura 40B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 49) do polipeptídeo translado de clone 775 (A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1)). A estrutura de leitura aberta do clone 775 começa com o ATG indicado na Figura 29.

A Figura 41A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 50) do polipeptídeo translado do clone 776 (A/Brisbane/10/2007 (H3N2)). A estrutura de leitura aberta 776 começa com o ATG indicado na Figura 30. A Figura 41B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 51) do polipeptídeo translado do clone 777 (A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)). A estrutura de leitura aberta do clone 777 começa com o ATG indicado na Figura 31.

A Figura 42A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 52) do polipeptídeo translado do clone 778 (B/Malásia/2506/2004). A estrutura de leitura aberta do clone 778 começa com o ATG indicado na Figura 32. A Figura 42B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 53) do polipeptídeo translado do clone 779 (B/Flórida/4/2006). A estrutura de leitura aberta do clone 779 começa com o ATG indicado na Figura 33.

A Figura 43 A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 54) do polipeptídeo translado do clone 780 (A/Singapura/1/57 (H2N2)). A estrutura de leitura aberta do clone 780 começa com o ATG indicado na Figura 34. A Figura 43B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 55) do polipeptídeo translado do clone 781 (A/Anhui/1/2005 (H5N1)). A estrutura de leitura aberta do clone 781 começa com o ATG indicado na Figura 35.

A Figura 44A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO:

56) do polipeptídeo transladado do clone 782 (A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)). A estrutura de leitura aberta do clone 782 começa com o ATG indicado na Figura 36. A Figura 44B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 57) do polipeptídeo transladado do clone 783 (A/Cerceta/Hong-kong/W312/97 (H6N1)). A estrutura de leitura aberta do clone 783 começa com o ATG indicado na Figura 37.

A Figura 45A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 58) do polipeptídeo transladado do clone 784 (A/Equino/Praga/56 (H7N7)). A estrutura de leitura aberta do clone 784 começa com o ATG indicado na Figura 38. A Figura 45B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 59) do polipeptídeo transladado do clone 785 (A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)). A estrutura de leitura aberta do clone 785 começa com o ATG indicado na Figura 39.

A Figura 46 mostra imunodeteccção (western blot) de frações de eluição de VLPs produzidas por planta, seguindo cromatografia de exclusão de tamanho. Subtipos de hemaglutinina H1, H2, H5, H6 e H9 são mostrados. Hemaglutinina é detectada em frações 7-14, correspondendo à eluição de VLPs.

A Figura 47 mostra uma análise de "imunoblot" de expressão de uma série de H1 hemaglutinina de cepas epidérmicas anuais. Dez e vinte microgramas de extratos de proteína foram carregados nas raias 1 e 2, respectivamente.

A Figura 48 mostra uma análise de "imunoblot" de expressão de uma série de H5 hemaglutinina de cepas pandêmicas potenciais. Dez e vinte microgramas de extratos de proteína foram carregados nas raias 1 e 2, respectivamente.

A Figura 49 mostra um "imunoblot" de H5 de cepa A/Indonésia/5/2005 em extratos de proteína de folhas de *Nicotiana tabacum*, agroinfiltradas com AGL1/660. Duas plantas foram infiltradas e 10 e 20 µg de proteína solúvel de cada planta foram carregados nas raias 1 e 2, respectivamente.

A Figura 50 mostra a reatividade cruzada *in vitro* de anticorpos

de soro. Titulações de inibição de hemaglutinação (H1) em soro de furão, 14 dias (A) após 1ª imunização e (B) após segundo impulso com VLP H5 da gripe produzida por planta. As respostas de anticorpo de HAI foram medidas usando-se os seguintes vírus H5N1 totais inativados: A/peru/Turquia/1/05, 5 A/Vietnã/1194/04, A/Anhui/5/05 e a cepa homóloga A/Indonésia/5/05. Os valores são o GMT (\log_2) de titulações de ponto final recíprocas de cinco furões por grupo. Faixa diagonal - A/Indonésia/6/06 (clade 2.1.3); verificada - A/peru/Turquia/1/05 (clade 2.2); barra branca - A/Vietnã/1194/04 (clade 1); barra negra A/Anhui/5/05. Respondedores são indicados. As barras representam *desvio médio*. 10

A Figura 51 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H5 de A/Indonésia/5/2005 (Construção # 660), alfafa plastocianina 3' UTR e se- 15 quências terminadoras.

A Figura 52 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H1 de A/Nava Caledônia/20/1999 (Constructo # 540), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências 20 terminadoras.

A Figura 53 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H1 de A/Brisbane/59/2007 (constructo #774), alfafa plastocianina 3' UTR e sequên- 25 cias terminadoras.

A Figura 54 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H1 de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (constructo #775), alfafa plastocianina 3' UTR e sequên- 30 cias terminadoras.

A Figura 55 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5'

UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H2 de A/Singapura/1/57 (H2N2) (constructo # 780), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

5 A Figura 56 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H5 de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (constructo* 781), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

10 A Figura 57 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H5 de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (constructo # 782), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

15 A Figura 58 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H6 de A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (constructo # 783), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

20 A Figura 59 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H9 de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (constructo # 785), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

25 A Figura 60 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H3 de A/Brisbane/10/2007 (H3N2), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

30 A Figura 61 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H3 de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências ter-

minadoras.

A Figura 62 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H7 de A/Equino/Praga/56 (H7N7), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

A Figura 63 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de HA de B/Malásia/2506/2004, alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

A Figura 64 mostra a sequência de ácido nucleico de um cassette de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de HA de B/Flórida/4/2006, alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras.

A Figura 65 mostra uma sequência de aminoácido de consenso (SEQ ID NO: 74) para HA de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (codificada por SEQ ID NO: 33), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 48), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 49) e SEQ ID NO: 9. XI (posição 3) é A ou V; X2 (posição 52) é D ou N; X3 (posição 90) é K ou R; X4 (posição 99) é K ou T; X5 (posição 111) é Y ou H; X6 (posição 145) é V ou T; X7 (posição 154) é E ou K; X8 (posição 161) é R ou K; X9 (posição 181) é V ou A; X10 (posição 203) é D ou N; X11 (posição 205) é R ou K; X12 (posição 210) é T ou K; X13 (posição 225) é R ou K; X14 (posição 268) é W ou R; X15 (posição 283) é T ou N; X16 (posição 290) é E ou K; X17 (posição 432) é I ou L; X18 (posição 489) é N ou D.

A Figura 66 mostra sequência de aminoácido de H1 Nova Caledônia (AAP34324.1) codificada por SEQ ID NO: 33.

A Figura 67 mostra a Sequência de aminoácido de H1 Porto Rico (NC_0409878.1) codificada por SEQ ID NO: 35

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção refere-se a produção de partículas similares

à vírus. Mais especificamente, a presente invenção é direcionada a produção de partículas similares à vírus compreendendo antígenos da gripe.

A seguinte descrição é de uma concretização preferida.

5 A presente invenção proporciona um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica um antígeno de um vírus envelopado, por exemplo, a hemaglutinina da gripe (HA), operativamente ligada a uma região regulatória ativa em uma planta.

10 Além disso, a presente invenção proporciona um método de produção de partículas similares a vírus (VLPs) em uma planta. O método envolve introdução de um ácido nucleico que codifica um antígeno operativamente ligado a uma região regulatória ativa na planta, ou porção da planta, e incubação da planta ou uma porção da planta sob condições que permitem a expressão do ácido nucleico, produzindo, desse modo, as VLPs.

15 As VLPs podem ser produzidas de vírus da gripe, contudo, VLPs podem também serem produzidas de outro vírus derivado da membrana de plasma incluindo, mas não limitado a, Measles, Ebola, Marburg, e HIV.

A invenção inclui VLPs de todos os tipos de vírus da gripe que possam infectar humanos, incluindo, por exemplo, mas não limitado a, o subtipo muito prevalente A (H1N1) (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)), o subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1) (SEQ ID NO: 60) e o tipo B menos comum (por exemplo, SEQ ID NO:26, Figura 10O), e tipo C (SEQ ID NO:27, Figura 10P), e para HAs obtidas de outros subtipos de gripe. VLPs de outros subtipos de gripe são também incluídos na presente invenção, por exemplo, A/Brisbane/59/2007 (H1N1; SEQ ID NO:48), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1; SEQ ID NO:49), A/Singapura/1/57 (H2N2; SEQ ID NO:54), A/Anhui/1/2005 (H5N1; SEQ ID NO:55), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1; SEQ ID NO:56), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1; SEQ ID NO:57), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2; SEQ ID NO:59), A/Brisbane/10/2007 (H3N2; SEQ ID NO:50), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2; SEQ ID NO:51),
25 A/Equino/Praga/56 (H7N7; SEQ ID NO:58), B/Malásia/2506/2004 (SEQ ID NO:52), ou B/Flórida/4/2006 (SEQ ID NO:53).

A presente invenção também pertence a vírus da gripe que in-

fectam outros mamíferos ou animais hospedeiros, por exemplo, humanos, primatas, cavalos, porcos, pássaros, aves de água, pássaros migratórios, codorniz, pato, gansos, animais domésticos, galinha, camelo, canino, cães, felino, gatos, tigre, leopardo, gato da algália, marta, marta de pedra, furões, animais domesticados, animais de fazenda, camundongos, ratos, foca, baleia, e similares.

Exemplos não-limitativos de outros antígenos que podem ser expressos em vírus derivados de membrana de plasma incluem, a proteína de capsídeo de HIV - p24; gp120, gp41 – proteínas envelopadas, as proteínas estruturais VP30 e VP35; Gp/SGP (uma proteína de membrana integral glicosilada) de Filovírus, por exemplo, Ebola ou Marburg, ou a proteína H, e proteína F de Paramyxovírus, por exemplo, Measles.

A invenção também inclui, mas não está limitada a, VLPs derivadas da gripe que obtêm um lipídeo envelope a partir da membrana de plasma da célula em que as proteínas de VLP são expressas. Por exemplo, se a VLP é expressa em sistema baseado em planta, a VLP pode obter um lipídeo envelope a partir da membrana de plasma da célula.

Geralmente, o termo "lipídeo" se refere a moléculas que ocorrem naturalmente solúveis em gordura (lipofílicas). O termo é também usado mais especificamente para se referir a ácidos graxos e seus derivados (incluindo tri-, di-, e monoglicerídeos e fosfolipídios), bem como outros metabólitos ou esteróis contendo esteroide solúvel em gordura. Os fosfolipídios são um maior componente de todas as membranas biológicas, junto com glicolipídeos, esteróis e proteínas. Exemplos de fosfolipídios incluem fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, e similares. Exemplos de esteróis incluem zoosteróis (por exemplo, colesterol) e fitoesteróis. Mais de 200 fitoesteróis foram identificados em várias espécies de planta, os mais comuns sendo campesterol, stigmasterol, ergosterol, brassicasterol, delta-7-stigmasterol, delta-7-avenasterol, daunosterol, sitosterol, 24-metilcolesterol, colesterol ou beta-sitosterol. Como um dos versados na técnica compreenderia, a composição de lipídeo da membrana de plasma de uma célula pode variar com a cultura ou condições de crescimento da célula

ou organismo do qual a célula é obtida.

As membranas de célula geralmente compreendem bicamadas de lipídeo, bem como proteínas para várias funções. As concentrações localizadas de lipídeos particulares podem ser encontradas na bicamada de lipídeo, referida como 'balsas de lipídeo'. Sem desejar estar ligado pela teoria, as balsas de lipídeo podem ter papéis significantes na endo e exocitose, entrada ou egresso de vírus ou outros agentes infecciosos, transdução de sinal inter-célula, interação com outros componentes estruturais da célula ou organismo, tais como matrizes intracelular e extracelular.

Com referência ao vírus da gripe, o termo "hemaglutinina" ou "HA", conforme aqui usado, se refere a uma glicoproteína encontrada no exterior de partículas virais da gripe. HA é uma membrana homotrimérica tipo I glicoproteína, geralmente compreendendo um peptídeo de sinal, um domínio de HA1, e um domínio de HA2 compreendendo um local de âncora de rotação de membrana no C-terminal e uma pequena calda citoplásmica (Figura IB).

As sequências de nucleotídeo que codificam HA são bem conhecidas e são disponíveis - vide, por exemplo, o BioDefence Public Health base (Vírus da gripe; vide URL: biohealthbase.org) ou National Center for Biotechnology Information (vide URL: ncbi.nlm.nih.gov), ambos dos quais são aqui incorporados por referência.

O termo "homotrímico" ou "homotrimérico" indica que um oligômero é formado por três moléculas de proteína de HA. Sem desejar estar ligado pela teoria, a proteína HA é sintetizada como proteína precursora monomérica (HA0) de cerca de 75 kDa, que se junta na superfície em uma proteína trimérica alongada. Antes da trimerização ocorrer, a proteína precursora é clivada em um local de clivagem de ativação conservada (também referido como peptídeo de fusão) em 2 cadeias de polipeptídeo, HA1 e HA2 (compreendendo a região de transmembrana), ligada por uma ligação de dissulfeto. O segmento de HA1 pode ser 328 aminoácidos de comprimento, e o segmento de HA2 pode ser 221 aminoácidos de comprimento.

Embora esta clivagem possa ser importante para infectividade do vírus, ela pode não ser essencial para a trimerização da proteína. A in-

serção de HA dentro da membrana do retículo endoplasmático (ER) da célula hospedeira, clivagem de peptídeo de sinal e glicosilação de proteína são eventos co-translacionais. O re-dobramento correto de HA requer glicosilação da proteína e formação de 6 ligações de dissulfeto de intra-cadeia. O trí-
5 mero de HA se junta dentro do complexo cis- e trans-Golgi, o domínio de transmembrana desempenhando um papel no processo de trimerização. As estruturas de cristal de proteínas de HA tratadas com bromelain, que carecem do domínio de transmembrana, têm mostrado uma estrutura altamente conservada contra cepas da gripe. Estabeleceu-se que HA suporta maiores
10 mudanças conformacionais durante o processo de infecção, que requer que o precursor HA0 seja clivado nas cadeias de 2 polipeptídeos HA1 e HA2. A proteína de HA pode ser processada (isto é, compreende domínios de HA1 e HA2), ou pode ser não-processada (isto é, compreende o domínio de HA0).

A presente invenção pertence ao uso de uma proteína de HA
15 compreendendo o domínio de transmembrana e inclui domínios de HA1 e HA2, por exemplo, a proteína de HA pode ser HA0, ou HA processada compreendendo HA1 e HA2. A proteína de HA pode ser usada na produção ou formação de VLPs usando uma planta, ou sistema de expressão de célula de planta.

20 A HA da presente invenção pode ser obtida de qualquer subtipo. Por exemplo, a HA pode ser de subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, ou H16. A HA recombinante da presente invenção pode também compreender uma sequência de aminoácido baseada na sequência de qualquer hemaglutinina conhecida na técnica- vide, por
25 exemplo, o BioDefence Public Health base (Gripe Vírus; vide URL: biohealthbase.org) ou National Center for Biotechnology Information (vide URL: ncbi.nlm.nih.gov). Além disso, a HA pode ser baseada na sequência de uma hemaglutinina que é isolada de um ou mais vírus da gripe emergente ou recentemente identificado.

30 A presente invenção também inclui VLPs que compreendem HAs obtidas de um ou mais do que um subtipo de gripe. Por exemplo, VLPs pode compreender um ou mais do que uma HA do subtipo H1 (codificado

por SEQ ID NO:28), H2 (codificado por SEQ ID NO: 12), H3 (codificado por SEQ ID NO: 13), H4 (codificado por SEQ ID NO: 14), H5 (codificado por SEQ ID NO: 15), H6 (codificado por SEQ ID NO: 16), H7 (codificado por SEQ ID NO: 11), H8 (codificado por SEQ ID NO: 17), H9 (codificado por SEQ ID NO: 18), H10 (codificado por SEQ ID NO: 19), H11 (codificado por SEQ ID NO:20), H12 (codificado por SEQ ID NO:21), H13 (codificado por SEQ ID NO:27), H14 (codificado por SEQ ID NO:23), H15 (codificado por SEQ ID NO:24), H16 (codificado por SEQ ID NO:25), ou uma combinação destes. Uma ou mais que uma HA dos um ou mais do que um subtipo de gripe pode ser coexpresso dentro de uma planta ou célula de inseto para assegurar que a síntese das uma ou mais do que uma HA resulta na formação de VLPs compreendendo uma combinação de HAs obtidas de um ou mais do que um subtipo de gripe. A seleção da combinação de HAs pode ser determinada pelo uso pretendido da vacina preparada a partir da VLP. Por exemplo uma vacina para uso na inoculação de pássaros pode compreender qualquer combinação de subtipos de HA, enquanto VLPs úteis para inoculação de humanos pode compreender subtipos de um ou mais do que um dos subtipos H1, H2, H3, H5, H7, H9, H10, N1, N2, N3 e N7. Contudo, outras combinações de subtipo de HA podem ser preparadas dependendo do uso do material usado na inoculação.

Portanto, a presente invenção é direcionada a uma VLP compreendendo um ou mais do que um subtipo de HA.

A presente invenção também proporciona ácidos nucleicos que codificam hemaglutininas que formam VLPs quando expressas em plantas.

As proteínas de HA da gripe exibem uma faixa de similaridades e diferenças com relação a peso molecular, ponto isoelétrico, tamanho, complemento de glican e similares. As propriedades físico-químicas das várias hemaglutininas podem ser úteis para permitir diferenciação entre as HAs expressas em uma planta, célula de inseto ou sistema de levedura, e podem ser de uso particular quando mais do que uma HA é coexpressa em um sistema simples. Exemplos de tais propriedades físico-químicas são proporcionadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de hemaglutinina da gripe

Clone Nº	Tipo	Cepas da gripe	HAO	AA HAI	HA2	C HAO	Gli- cans HAI	s HA2	HAO	Peso Molecular (kDA)			HA2 I	Ponto isoelétrico HAO		
										HAO HAI	HAI ' HA2	HAI ' HA2		HAI HA2	HAI HA2	
774	H1	A/Brisbane/59/2007	548	326	222	9	7	2	61	75	36	47	25	28	6,4	5,3
775	H1	A/Ilhas Salomão	548	326	222	9	7	2	61	75	36	47	25	28	6,1	6,7
776	H3	A/Brisbane/10/2007	550	329	221	12	11	1	62	80	37	54	25	27	8,5	9,6
777	H3	A/Wisconsin/67/2005	550	329	221	11	10	1	62	79	37	52	25	27	8,8	9,6
778	B	B/Malásia/2506/2004	570	347	223	12	8	4	62	80	38	50	24	30	8,0	9,7
779	B	B/Flórida/4/2006	569	346	223	10	7	3	62	77	38	48	24	29	8,0	9,7
780	H2	A/Singapura/1/57	547	325	222	6	4	2	62	71	36	42	25	28	6,0	7,5
781	H5	A/Anhui/1/2005	551	329	222	7	5	2	62	73	37	45	25	28	6,2	8,9
782	H5	A/Vietnã/1194/2004	552	330	222	7	5	2	63	74	38	45	25	28	6,4	*r*Jk 4,8
783	H6	A/Cerceta/Hong Kong/W312/97	550	328	222	8	5	3	62	75	37	45	25	30	5,7	5,9
784	H7	A/Equino/Praga/56	552	331	221	6	4	2	62	71	37	43	25	28	8,9	9,7
785	H9	A/Hong Kong/1073/99	542	320	199	9	7	2	61	75	36	46	23	26	8,4	9,5

A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeo SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO: 11, que codifica HA de H1, H5 ou H7, respectivamente, uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização estringentes para SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO: 11, ou uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização estringentes para um complemento de SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:1, no qual a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína de hemaglutinina que quando expressa forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo quando administrado a um indivíduo. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduras de um ou mais tipos de gripe ou subtipos. A VLP, quando administrada a um indivíduo, induz uma resposta imune.

A hibridização sob condições de hibridização estringentes é conhecida na técnica (vide, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. 1995 e suplementos; Maniatis *et al.*, in *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; Sambrook e Russell, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edição 2001; cada um do qual sendo aqui incorporado por referência). Um exemplo de uma tais condições de hibridização estringentes pode ser cerca de 16-20 horas de hibridização em 4 X SSC a 65°C, seguido por lavagem em 0,1 X SSC a 65°C por uma hora, ou 2 lavagens em 0,1 X SSC a 65°C cada para 20 ou 30 minutos.

Alternativamente, uma condição de hibridização estringente exemplar pode ser durante a noite (16-20 horas) em 50% de formamida, 4 X SSC a 42°C, seguido por lavagem em 0,1 X SSC a 65°C por uma hora, ou 2 lavagens em 0,1 X SSC a 65°C cada para 20 ou 30 minutos, ou durante a noite (16-20 horas), ou hibridização em tampão de fosfato aquoso Church (7% de SDS; 0,5M de tampão de NaPO₄ pH 7,2; 10 mM de EDTA) a 65°C, com 2 lavagens ou a 50°C em 0,1 X de SSC, 0,1% de SDS por 20 ou 30 minutos cada, ou 2 lavagens a 65°C em 2 X de SSC, 0,1% de SDS por 20 ou

30 minutos cada.

Adicionalmente, a presente invenção inclui sequências de nucleotídeo que são caracterizadas como tendo cerca de 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% ou qualquer quantidade entre estas, identidade de sequência, ou similaridade de sequência, com a sequência de nucleotídeo que codifica HA de H1 (SEQ ID NO:28), H5 (SEQ ID NO:3) ou H7 (SEQ ID NO: 11), no qual a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína de hemaglutinina que quando expressa forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HAO, HA1, ou HA2 madura. A VLP, quando administrada a um indivíduo, induz uma resposta imune.

Similarmente, a presente invenção inclui HAs associadas com os seguintes subtipos H1 (codificado por SEQ ID NO:28), H2 (codificado por SEQ ID NO: 12), H3 (codificado por SEQ ID NO: 13), H4 (codificado por SEQ ID NO: 14), H5 (codificado por SEQ ID NO: 15), H6 (codificado por SEQ ID NO: 16), H7 (codificado por SEQ ID NO:11), H8 (codificado por SEQ ID NO:17), H9 (codificado por SEQ ID NO:18), H10 (codificado por SEQ ID NO: 19), H11 (codificado por SEQ ID NO:20), H12 (codificado por SEQ ID NO:21), H13 (codificado por SEQ ID NO:27), H14 (codificado por SEQ ID NO:23), H15 (codificado por SEQ ID NO:24), H16 (codificado por SEQ ID NO:25); vide Figuras 10A a 10P), e sequências de nucleotídeo que são caracterizadas como tendo de cerca de 70 a 100% ou qualquer quantidade entre estas, 80 a 100% ou qualquer quantidade entre estas, 90-100% ou qualquer quantidade entre estas, ou 95-100% ou qualquer quantidade entre estas, identidade de sequência com H1 (SEQ ID NO:28), H2 (SEQ ID NO: 12), H3 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 11), H8 (SEQ ID NO: 17), H9 (SEQ ID NO: 18), H10 (SEQ ID NO: 19), H11 (SEQ ID NO:20), H12 (SEQ ID NO:21), H13 (SEQ ID NO:27), H14 (SEQ ID NO:23), H15 (SEQ ID NO:24), H16 (SEQ ID NO:25), no qual a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína de

hemaglutinina que quando expressa forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo. Por exemplo, expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HAO, HA1, ou HA2 madura. A VLP, quando administrada a um indivíduo, induz uma resposta imune.

Uma "resposta imune" geralmente se refere a uma resposta do sistema imune adaptativo. O sistema imune adaptativo geralmente compreende uma resposta humoral, e uma resposta mediada por célula. A resposta humoral é o aspecto de imunidade que é mediada por anticorpos secretados, produzidos nas células da linhagem de linfócito B (célula B). Anticorpos secretados se ligam a antígenos nas superfícies de micróbios de invasão (tais como vírus ou bactéria), que os sinalizam para destruição. A imunidade humoral é usada geralmente para se referir a produção de anticorpo e os processos que o acompanha, bem como as funções efetadoras de anticorpos, incluindo ativação de célula de Th2 e produção de citoquina, geração de célula de memória, promoção de opsonin de fagocitose, eliminação de patogenicia, e similares. Os termos "modular" ou "modulação" ou similares se referem a um aumento ou diminuição em uma resposta particular ou parâmetro, conforme determinado por qualquer de vários ensaios geralmente conhecidos ou usados, alguns dos quais são exemplificados aqui.

Uma resposta mediada por célula é uma resposta imune que não envolve anticorpos, mas preferivelmente envolve a ativação de macrófagos, células matadoras naturais (NK), linfócitos T citotóxicos específicos de antígeno, e a liberação de várias citoquinas em resposta a um antígeno. A imunidade mediada por célula é usada geralmente para se referir a alguma ativação de célula Th, ativação de célula Tc e respostas mediadas por célula T. A imunidade mediada por célula é de importância particular na resposta de infecções virais.

Por exemplo, a indução de linfócitos T positivos CD8 específicos de antígeno pode ser medida usando-se um ensaio ELISPOT; a estimulação de linfócitos T positivos CD4 pode ser medida usando-se um ensaio de proli-

feração. Titulações de anticorpo de antigripe podem ser quantificadas usando-se um ensaio ELISA; isotipos de anticorpos específicos de antígeno e reativos cruzados podem ser também medidos usando-se anticorpos anti-isotipo (por exemplo, anti-IgG, IgA, IgE ou IgM). Os métodos e técnicas para
5 realização de tais ensaios são bem conhecidos na técnica.

Uma inibição de ensaio de hemaglutinação (H1, ou HAI) pode também ser usada para demonstrar a eficácia de anticorpos induzida por uma vacina, ou composição de vacina pode inibir a aglutinação de células de sangue vermelhas (RBC) por HA recombinante. As titulações de anticorpo
10 inibitórias de hemaglutinação de amostras de soro podem ser avaliadas por microtitulação de HAI (Aymard et al 1973). Eritrócitos de qualquer de várias espécies podem ser usados - por exemplo, cavalo, peru, galinha, ou similares. Este ensaio dá informação indireta no conjunto do trimer de HA na superfície da VLP, confirmando a apresentação correta de locais antigênicos
15 em HAs.

A reatividade cruzada de titulações de HAI pode também ser usada para demonstrar a eficácia de uma resposta imune a outras cepas de vírus relacionadas ao subtipo de vacina. Por exemplo, o soro de um indivíduo imunizado com uma composição de vacina de uma primeira cepa (por
20 exemplo, VLPs of A/Indonésia 5/05) pode ser usado em um ensaio de HAI com uma segunda cepa de vírus total, ou partículas de vírus (por exemplo, A/Vietnã/1194/2004), e a titulação de HAI determinada.

A presença de citoquina ou níveis podem também ser quantificados. Por exemplo, uma resposta de célula auxiliadora T (Th1/Th2) será
25 caracterizada pela medição de células de secreção IFN- γ e IL-4 usando-se ELISA (por exemplo, kits BD Biosciences OptEIA). Células mononucleares de sangue periféricas (PBMC) ou esplenócitos obtidos de um indivíduo podem ser cultivadas, e o sobrenadante analisado. Os linfócitos T podem também ser quantificados por contagem de célula ativada por fluorescência
30 (FACS), usando-se etiquetas fluorescentes específicas marcadoras e métodos conforme são conhecidos na técnica.

Um ensaio de microneutralização pode também ser conduzido

para caracterizar uma resposta imune em um indivíduo, vide, por exemplo, os métodos de Rowe et al., 1973. As titulações de neutralização de vírus podem ser obtidas de vários modos, incluindo: 1) enumeração de placas de lysis (ensaio de placa), seguindo fixação/coloração de cristal violeta de células; 2) observação microscópica de lysis de célula na cultura; 3) detecção de ELISA e espectrofotométrica de proteína de vírus de NP (se correlaciona com infecção de vírus de células hospedeiras).

A identidade de sequência ou similaridade de sequência podem ser determinadas usando-se um programa de comparação de sequência de nucleotídeo, tal como provido dentro de DNASIS (por exemplo, usando, mas não limitado a, os seguintes parâmetros: penalidade GAP 5, # de diagonais superiores 5, penalidade de GAP fixada 10, k-tupla 2, folga de flutuação 10, e tamanho de janela 5).

Contudo, outros métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica, por exemplo, os algoritmos de Smith & Waterman (1981, Adv. Appl. Math. 2:482), Needleman & Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), Pearson & Lipman (1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444), e por implementações computadorizadas destes algoritmos (por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, e BLAST), ou por alinhamento manual e inspeção visual.

O termo "domínio de hemaglutinina" se refere a um peptídeo compreendendo ou o domínio de HA0, ou os domínios de HA1 e HA2. O domínio de hemaglutinina não inclui o peptídeo de sinal, domínio de membrana, ou a calda citoplásmica encontrada na proteína que ocorre naturalmente.

O termo "partícula similar a vírus" (VLP), ou "partículas similares à vírus" ou "VLPs" se referem a estruturas que se auto-montam e compreendem proteínas estruturais, tais como proteína de HA da gripe. As VLPs são geralmente morfológicamente e antigenicamente similares a virions produzidos em uma infecção, mas carecem de informação genética suficiente para replicar e, desse modo, são não-infecciosas. Em alguns exemplos, VLPs podem compreender uma espécie de proteína simples, ou mais do que

uma espécie de proteína. Para VLPs compreendendo mais do que uma espécie de proteína, a espécie de proteína pode ser a partir da mesma espécie de vírus, ou pode compreender uma proteína de uma espécie diferente, gênero, subfamília ou família de vírus (conforme designado pela nomenclatura ICTV). Em outros exemplos, uma ou mais das espécies de proteína compreendendo uma VLP podem ser modificadas a partir da sequência que ocorre naturalmente. As VLPs podem ser produzidas em células hospedeiras adequadas incluindo planta e células hospedeiras de inseto. Seguindo extração a partir da célula hospedeira e após isolamento e purificação adicional sob condições adequadas, as VLPs podem ser purificadas como estruturas intactas.

As VLPs produzidas de proteínas derivadas da gripe, de acordo com a presente invenção não compreendem proteína M1. A proteína M1 é conhecida por ligar RNA (Wakefield e Brownlee, 1989) que é um contaminante da preparação de VLP. A presença de RNA é indesejável quando se obtém aprovação regulatória para o produto de VLP, portanto, a preparação de VLP que carece de RNA pode ser vantajosa.

As VLPs da presente invenção podem ser produzidas em uma célula hospedeira que é caracterizada por carência da capacidade de sialilar proteínas, por exemplo, carecendo de sialidase, tal como uma célula de planta, uma célula de inseto, fungo, e outros organismos incluindo esponja, celenterado, anelida, artropoda, mollusca, nematelminto, trochelmintos, platelmintos, chaetognatha, tentaculate, chlamydia, spirochetes, bactéria gram-positiva, cianobactéria, archaeobacteria, conforme identificados em glycoforum (vide, por exemplo, o URL: glycoforum.gr.jp/science/word/evolution/ES-A03E.html). As VLPs produzidas conforme descrito aqui não compreendem tipicamente neuraminidase (NA). Contudo, NA pode ser coexpressa com HA deve VLPs compreendendo HA e NA serem desejados.

Uma VLP produzida em uma planta de acordo com alguns aspectos da invenção pode ser complexada com lipídeos derivados de planta. A VLP pode compreender um peptídeo de HAO, HA1 ou HA2. Os lipídeos

derivados de planta podem ser na forma de uma bicamada de lipídeo, e pode adicionalmente compreender um envelope circundando a VLP. Os lipídeos derivados de planta podem compreender componentes de lipídeo da membrana de plasma da planta onde a VLP é produzida, incluindo, mas não limitado a, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), glicosfingolipídeos, fitosteróis ou uma combinação destes. Um lipídeo derivado de planta pode alternadamente ser referido como um 'lipídeo de planta'. Exemplos de fitosteróis são conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol e colesterol - vide, por exemplo, Mongrand et al., 2004.

As VLPs podem ser avaliadas para estrutura e tamanho por, por exemplo, ensaio de hemaglutinação, microscopia de elétron, ou por cromatografia de exclusão de tamanho.

Para cromatografia de exclusão de tamanho, proteínas solúveis totais podem ser extraídas de tecido de planta por amostra de homogeneização (Polytron) de material de planta triturado congelado em tampão de extração, e material insolúvel removido por centrifugação. A precipitação com PEG pode também ser de benefício. A proteína solúvel é quantificada, e o extrato passado através de uma coluna Sephacryl[®]. Blue Dextran 2000 pode ser usado como um padrão de calibração. Seguindo cromatografia, frações podem ser adicionalmente analisadas por "imunoblot" para determinar o complemento da proteína da fração.

Sem desejar estar ligado pela teoria, a capacidade de HA se ligar a RBC de animais diferentes é acionada pela afinidade de HA para ácidos siálicos α 2,3 ou α 2,3 e a presença destes ácidos siálicos na superfície de RBC. HA equino e de aves de eritrócitos aglutinados de vírus da gripe de todas as várias espécies, incluindo perus, galinhas, patos, porquinhos da índia, humanos, ovelha, cavalos e vacas; pelo que HAs de humano se ligam a eritrócitos de perus, galinhas, patos, porquinhos da índia, humanos e ovelha (vide também Ito T. et al., 1997, *Virology*, vol 227, p493-499; e Medeiros R et al., 2001, *Virology*, vol 289 p.74-85). Exemplos da reatividade da espécie de HAs de cepas de gripe diferentes são mostrados nas Tabelas 2A

e 2B.

Tabela 2A: Espécies de RBC ligado por HAs de cepas de gripe sazonais selecionadas.

Sazonal	Cepa	No	Origem	Cavalo	Peru
H1	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	774	Humano	+	++
	A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)	775	Humano	+	++
H3	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	776	Humano	+	++
	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	777	Humano	+	++
B	B/Malásia/2506/2004	778	Humano	+	++
	B/Flórida/4/2006	779	Humano	+	++

Tabela 2B: Espécies de RBC ligado por HAs de cepas de gripe pandêmicas selecionadas

5

Pandemia	Cepa	No	Origem	Cavalo	Peru
H2	A/Singapura/1/57 (H2N2)	780	Humano	+	++
H5	A/Anhui/1/2005 (H5N1)	781	Hu-Av	++	+
	A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	782	Hu-Av	++	+
H6	A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1)	783	Ave	++	+
H7	A/Equino/Praga/56 (H7N7)	784	Equino	++	++
H9	A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	785	Humano	++	+

Conforme aqui usado, uma "proteína" se refere geralmente a uma haste de aminoácidos ligada por uma ligação de peptídeo, que pode ser ligada em estrutura secundária, terciária ou quaternária para alcançar uma morfologia particular. Alternadamente, os termos polipeptídeo, peptídeo ou 10 fragmentos de peptídeo podem ser usados em um contexto similar.

Um fragmento ou porção de uma proteína, proteína de fusão ou polipeptídeo incluem um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo um subconjunto do complemento de aminoácido de uma proteína ou polipeptídeo particular, provido que o fragmento pode formar uma VLP quando expresso. 15 O fragmento pode, por exemplo, compreender uma região antigênica, uma região de indução de resposta de estresse, ou uma região compreendendo

um domínio funcional da proteína ou polipeptídeo. O fragmento pode também compreender uma região ou domínio para proteínas da mesma família geral, ou o fragmento pode incluir sequência de aminoácido suficiente para identificar especificamente a proteína de comprimento total da qual ela é derivada.

Por exemplo, um fragmento ou porção pode compreender de cerca de 60% a cerca de 100% do comprimento do comprimento total da proteína, ou qualquer quantidade entre estas, provido que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa. Por exemplo, de cerca de 60% a cerca de 100%, de cerca de 70% a cerca de 100%, de cerca de 80% a cerca de 100%, de cerca de 90% a cerca de 100%, de cerca de 95% a cerca de 100% do comprimento do comprimento total da proteína, ou qualquer quantidade entre estas. Alternadamente, um fragmento ou porção pode ser de cerca de 150 a cerca de 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre estas, dependendo da HA, e provido que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa. Por exemplo, um fragmento pode ser de 150 a cerca de 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade ente estas, de cerca de 200 a cerca de 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre estas, de cerca de 250 a cerca de 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre estas, de cerca de 300 a cerca de 500 ou qualquer quantidade entre estas, de cerca de 350 a cerca de 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre estas, de cerca de 400 a cerca de 500 ou qualquer quantidade entre estas, de cerca de 450 a cerca de 500 ou qualquer quantidade entre estas, dependendo da HA, e provido que o fragmento pode formar uma VLP quando expresso. Por exemplo, cerca de 5, 10, 20, 30, 40 ou 50 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre estas, podem ser removidos do terminal C, o terminal N ambos os terminais N e C de uma proteína de HA, provido que o fragmento pode formar uma VLP quando expresso.

A numeração de aminoácidos em qualquer dada sequência é relativa a sequência particular, contudo um técnico pode determinar prontamente a 'equivalência' de um aminoácido particular em uma sequência baseada na estrutura e/ou sequência. Por exemplo, se 6 aminoácidos Termi-

nais-N foram removidos quando da construção de um clone para cristalografia, isto mudaria a identidade numérica específica do aminoácido (por exemplo, relativo ao comprimento total da proteína), mas não alteraria a posição relativa do aminoácido na estrutura.

5 As comparações de uma sequência ou sequências podem ser feitas usando-se um algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990. J. Mol Biol 215:403-410). Uma pesquisa BLAST permite comparação de uma sequência de questão com uma sequência específica ou grupo de sequências, ou com uma biblioteca maior ou base de dados (por exemplo, GenBank ou GenPept)

10 de sequências, e não identifica somente sequências que exibem 100% de identidade, mas também aquelas com graus menores de identidade. Sequências de ácido nucleico ou aminoácido podem ser comparadas usando-se um algoritmo BLAST. Além disso, a identidade entre duas ou mais sequências pode ser determinada pelo alinhamento das sequências juntas e

15 determinando a % de identidade entre as sequências. O alinhamento pode ser efetuado usando-se o Algoritmo BLAST, (por exemplo, conforme disponível através de GenBank; URL: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/ usando-se parâmetros de falta: Programa: blastn; Database: nr; Expect 10; filtro: falta; Alinhamento: par; Códigos genéticos de Questão: Padrão(1)), ou BLAST2

20 através de EMBL URL: [embl-heidelberg.de/Services/ index.html](http://embl-heidelberg.de/Services/index.html) usando parâmetros de falta: Matrix BLOSUM62; Filtro: falta, echofiltro: Expect: 10, corte: falta; Trançado: ambos; Descrições: 50, Alinhamentos: 50; ou FASTA, usando parâmetros de falta), ou por comparação manualmente das sequências e calculando a % de identidade.

25 A presente invenção descreve, mas não é limitada a, a clonagem de um ácido nucleico que codifica HA em um vetor de expressão de planta, e a produção de VLPs de gripe a partir da planta, adequadas para produção de vacina. Exemplos de tais ácido nucleicos incluem, por exemplo, mas não estão limitados a, um vírus da gripe A/Nova Caledônia/20/99

30 (H1N1) HA (por exemplo, SEQ ID NO: 61), um subtipo de HA de A/Indonésia/5/05 (H5N1) (por exemplo SEQ ID NO: 60), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (por exemplo SEQ ID NO: 36, 48,62), A/Ilhas Salomão/3/2006

(H1N1) (por exemplo SEQ ID NO: 37, 49, 63), A/Singapura/1/57 (H2N2) (por exemplo SEQ ID NO: 42, 54, 64), A/Anhui/1/2005 (H5N1) (por exemplo SEQ ID NO: 43, 55, 65), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (por exemplo SEQ ID NO: 44, 56, 66), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (por exemplo SEQ ID NO: 45, 57, 67), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (por exemplo SEQ ID NO: 47, 59, 68), A/Brisbane/10/2007 (H3N2) (por exemplo SEQ ID NO: 38, 50, 69), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (por exemplo SEQ ID NO: 39, 51, 70), A/Equino/Praga/56 (H7N7) (por exemplo SEQ ID NO: 46, 58, 71), B/Malásia/2506/2004 (por exemplo SEQ ID NO: 40, 52, 72), B/Flórida/4/2006 (por exemplo SEQ ID NO: 41, 53, 73). O clone correspondente ou números de constructo para estas cepas é provido na Tabela 1. Sequências de ácido nucleico que correspondem a SEQ ID NOs: 36-47 compreendem um plasto-

5
10
15

cianina a montante e operativamente ligada à sequência de codificação da HA para cada dos tipos ou subtipos, conforme ilustrado nas Figuras 28-39. As sequências de ácido nucleico que correspondem a SEQ ID NO: 60-73 compreendem um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de uma HA, alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras, conforme ilustrado nas Figuras 51-64.

20
25

As VLPs podem também serem usadas para produzir reagentes compreendidos de proteínas estruturais de gripe recombinantes que se auto-montam nas estruturas de proteína macromolecular funcional e imunogênica homotípica, incluindo partículas de gripe subviral e VLP de gripe, em células hospedeiras transformadas, por exemplo, células de planta ou células de inseto.

30

Portanto, a invenção proporciona VLPs, e um método para produção de VLPs virais em um sistema de expressão de planta, a partir da expressão de uma proteína envelope simples. As VLPs podem ser VLPs da gripe, ou VLPs produzidas de outros vírus derivados de membrana de plasma incluindo, mas não limitado a, Measles, Ebola, Marburg, e HIV.

Proteínas de outros vírus envelopados, por exemplo, mas não limitadas a, Filoviridae (por exemplo, vírus Ebola, vírus Marburg, ou simila-

res), Paramixoviridae (por exemplo, vírus Measles, vírus Mumps, vírus sinci-
tial Respiratório, pneumovírus, ou similares), Retroviridae (por exemplo, Ví-
rus-1 da Imunodeficiência Humana, Vírus-2 da Imunodeficiência Humana,
Vírus-1 da Leucemia de Célula T, ou similares), Flaviviridae (por exemplo,
5 Encefalite de West Nile, vírus da Dengue, vírus da Hepatite C, vírus da febre
amarela, ou similares), Bunyaviridae (por exemplo, Hantavírus ou similares),
Coronaviridae (por exemplo, coronavírus, SARS, ou similares), conforme
seriam conhecidos àqueles técnicos no assunto, podem também serem usa-
dos. Exemplos não-limitativos de antígenos que podem ser expressos em
10 vírus derivados de membrana de plasma incluem a proteína de capsídeo de
HIV - p24; HIV glicoproteínas gp120 ou gp41, proteínas Filovírus incluindo
VP30 ou VP35 de Ebolavírus ou Gp/SGP de vírus Marburg ou a proteína H
ou proteína F do Measles paramyxovírus. Por exemplo, P24 de HIV (por e-
xemplo, GenBank referência gi: 19172948) é a proteína obtida por transla-
15 ção e clivagem da sequência *gag* do do vírus HIV (por exemplo, GenBank
referência gi:9629357); gp 120 e gp41 de HIV são glicoproteínas obtidas por
translação e clivagem da proteína gp160 (por exemplo, GenBank referência
gi:9629363), codificado por *env do genoma de vírus HIV*. VP30 de Ebolaví-
rus (GenPept Referência gi: 55770813) é a proteína obtida por translação da
20 sequência *vp30 do genoma* Ebolavírus (por exemplo, GenBank Referência
gi:55770807); VP35 de Ebolavírus (GenPept Referência gi:55770809) é a
proteína obtida por translação da sequência *vp35 do genoma* Ebolavírus.
Gp/SGP de vírus de Marburg (GenPept Referência gi: 296965) é a proteína
obtida por translação da (sequência) do genoma de vírus de Marburg (Gen-
25 Bank Referência gi: 158539108). H proteína (GenPept Referência gi:
9626951) é a proteína da sequência H do genoma de vírus de Measles
(GenBank Referência gi: 9626945); proteína F (GenPept referência gi:
9626950) é a proteína da sequência F do genoma de vírus de Measles.

Contudo, outras proteínas revestidas podem ser usadas dentro
30 dos métodos da presente invenção conforme é conhecido por um versado
na técnica.

A invenção, portanto, proporciona uma molécula de ácido nucle-

ico compreendendo uma sequência que codifica HIV-p24, HIV-gp120, HIV-gp41, Ebolavírus-VP30, Ebolavírus-VP35, vírus de Marburg Gp/SGP, proteína de vírus de Measles H ou proteína F. A molécula de ácido nucleico pode ser operativamente ligada a uma região regulatória ativa em um inseto, levedura ou célula de planta, ou em um tecido de planta particular.

5 A presente invenção adicionalmente proporciona a clonagem de um ácido nucleico que codifica uma HA, por exemplo, mas não limitado a, vírus da gripe humana A/Indonésia/5/05 HA (H5N1) em uma planta ou vetor de expressão de inseto (por exemplo, vetor de expressão de baculovírus) e produção de candidatos de vacina da gripe ou reagentes compreendidos de proteínas estruturais de gripe recombinante que se automontam em estruturas de proteína macromolecular homotípica imunogênicas, incluindo partículas de gripe subviral e VLP da gripe, em células de planta transformadas ou células de inseto transformadas.

15 O ácido nucleico que codifica a HA de subtipos de gripe, por exemplo, mas não limitado a, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006 pode ser expresso, por exemplo, usando-se um Sistema de Expressão de Baculovírus em uma linha de célula apropriada, por exemplo, células *Spodopterafrugiperda* (por exemplo, linha de célula Sf-9; ATCC PTA-4047). Outras linhas de inseto podem também serem usadas.

25 O ácido nucleico que codifica a HA pode, alternadamente, ser expresso em uma célula de planta, ou em uma planta. O ácido nucleico que codifica HA pode ser sintetizado por transcrição reversa e reação de cadeia de polimerase (PCR) usando HA RNA. Como um exemplo, o RNA pode ser isolado de vírus da gripe humana A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) ou vírus da gripe humana A/Indonésia/5/05 (H5N1), ou outros vírus da gripe, por exemplo, A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1),

A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, ou de células infectadas com um vírus da gripe. Para transcrição reversa e PCR, iniciadores de oligonucleotídeo específicos para HA RNA, por exemplo, mas não limitados a, sequências de vírus HA da gripe humana A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) ou sequências de HA0 de vírus da gripe humana A/Indonésia/5/05 (H5N1), ou sequências HA de subtipos de gripe

10 A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006 podem

15 ser usados. Adicionalmente, um ácido nucleico que codifica HA pode ser quimicamente sintetizado usando-se métodos conforme conhecidos por um versado na técnica.

As cópias de cDNA resultantes destes genes podem ser clonadas em um vetor de expressão adequado conforme requerido pelo sistema de expressão de hospedeiro. Exemplos de vetores de expressão apropriados para plantas são descritos abaixo, alternativamente, vetor de expressão de baculovírus, por exemplo, pFastBacl (InVitrogen), resultando em plasmídeos baseados em pFastBacl, usando-se métodos conhecidos, e informação provida pelas instruções do fabricante pode ser usada.

20

25 A presente invenção é adicionalmente direcionada a uma construção de gene compreendendo um ácido nucleico que codifica HA, conforme descrito acima, operativamente ligado a um elemento regulatório que é operativo em uma planta. Exemplos de elementos regulatórios operativos em uma célula de planta e que podem ser usados de acordo com a presente

30 invenção incluem, mas não estão limitados a, região regulatória de plastocianina (US 7.125.978; que é aqui incorporada por referência), ou uma região regulatória de Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO; US

4.962.028; que é incorporada aqui por referência), proteína de ligação de clorofila a/b (CAB; Leutwiler et al; 1986; que é incorporado aqui por referência), ST-LS1 (associado com o complexo emitido de oxigênio de fotosistema II e descrito por Stockhaus et al. 1987,1989; que é aqui incorporado por referência). Um exemplo de uma região regulatória de plastocianina é uma sequência compreendendo nucleotídeos 10-85 de SEQ ID NO: 36, ou uma região similar de qualquer uma de SEQ ID NOS: de 37 a 47.

Se a construção é expressa em uma célula de inseto, exemplos de elementos regulatórios operativos em uma célula de inseto incluem, mas não estão limitados a, o promotor de poliedrina (Possee e Howard 1987. Nucleic Acids Research 15:10233-10248), o promotor gp64 (Kogan et al., 1995. J Virology 69:1452-1461) e similares.

Portanto, um aspecto da invenção proporciona um ácido nucleico compreendendo uma região regulatória e uma sequência que codifica uma HÁ da gripe. A região regulatória pode ser um elemento regulatório de plastocianina, e a HA da gripe pode ser selecionada a partir do grupo de cepas da gripe ou subtipos, compreendendo A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006. Sequências de ácido nucleico compreendendo um elemento regulatório de plastocianina e uma HA da gripe são exemplificadas aqui por SEQ ID NOS: de 36 a 47.

É conhecido que podem existir diferenças de sequência na sequência de hemaglutinina das sequências de aminoácidos da gripe, ou os ácidos nucleicos que as codificam, quando vírus da gripe é cultivado em ovos, ou células de mamífero, (por exemplo, células de MDCK), ou quando isolado de um indivíduo infectado. Exemplos não-limitativos de tais diferenças são ilustradas aqui, incluindo Exemplo 18. Além disso, como um versado na técnica compreenderá, variação adicional pode ser observada dentro da

hemaglutinina da gripe obtida de novas cepas a medida que mutações adicionais continuam a ocorrer. Devido a variabilidade de sequência conhecida entre hemaglutininas da gripe conhecidas, a presente invenção inclui VLPs que podem ser produzidas usando-se qualquer hemaglutinina de gripe provida que quando expressa em um hospedeiro conforme descrito aqui, a hemaglutinina da gripe forma uma VLP.

Os alinhamentos de sequência e sequências de consenso podem ser determinados usando-se qualquer de vários pacotes de software conhecidos na técnica, por exemplo, MULTALIN (F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890), ou sequências podem ser alinhadas manualmente e similaridades e diferenças entre as sequências determinadas.

A estrutura de hemaglutininas é bem estudada e as estruturas são conhecidas por serem altamente conservadas. Quando estruturas de hemaglutinina são superimpostas, um alto grau de conservação estrutural é observado (rmsd <2Å). Esta conservação estrutural é observada mesmo embora a sequência de aminoácido possa variar em algumas posições (vide, por exemplo, Skehel e Wiley, 2000 Ann Rev Biochem 69:531-69; Vaccaro et al 2005). As regiões de hemaglutininas são também bem conservadas, por exemplo:

• Domínios estruturais: a poliproteína HA0 é clivada para proporcionar HA madura. HA é um homotrímero com cada monômero compreendendo um domínio de ligação de receptor (HA1) e um domínio de ancoramento de membrana (HA2) ligado por uma ligação de dissulfeto simples; os 20 resíduos de terminal-N da subunidade HA2 podem também ser referidos como o domínio de fusão de HA ou sequência. Uma região de 'cauda' (interna à membrana envelope) está também presente. Cada hemaglutinina compreende estas regiões ou domínios. As regiões individuais ou domínios são tipicamente conservados em comprimento.

Todas as hemaglutininas contêm o mesmo número e posição de pontes de dissulfeto intra- e intermolecular. A qualidade e posição na sequência de aminoácido das cisteínas que participam na rede de fonte de dissulfeto são conservadas entre as HAs. Exemplos de estruturas ilustrando as

pontes de dissulfeto características intra- e intermolecular e outros aminoácidos conservados e suas posições relativas são descritos em, por exemplo, Gamblin et al. 2004 (Science 303:1838-1842). Estruturas exemplares e sequências incluem 1RVZ, 1RVX, 1RVT, 1RV0, 1RUY, 1RU7, disponíveis a partir do Banco de Dados de Proteína (URL: www.rcsb.org).

- Cauda citoplasmática – a maioria de hemaglutininas compreende 3 cisteínas em posições conservadas. Uma ou mais destas cisteínas podem ser plamitoiladas como uma modificação pós-translacional.

A variação de aminoácido é tolerada em hemaglutininas de vírus da gripe. Esta variação proporciona poucas cepas que são continuamente identificadas. A infectividade entre as novas cepas pode variar. Contudo, a formação de trímero de hemaglutinina, que subsequentemente formam VLPs é mantida. A presente invenção, portanto, proporciona uma sequência de aminoácido de hemaglutinina, ou a ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido de hemaglutinina, que forma VLPs em uma planta, e inclui sequências conhecidas e sequências variantes que podem se desenvolver.

A Figura 65 ilustra um exemplo de tal variação conhecida. Esta figura mostra uma sequência de aminoácido de consenso (SEQ ID NO: 74) para HA das seguintes cepas de H1N1:

A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (codificado por SEQ ID NO: 33),
 A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 48),
 A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 49) e
 SEQ ID NO: 9. XI (posição 3) é A ou V; X2 (posição 52) é D ou N; X3 (posição 90) é K ou R; X4 (posição 99) é K ou T; X5 (posição 111) é Y ou H; X6 (posição 145) é V ou T; X7 (posição 154) é E ou K; X8 (posição 161) é R ou K; X9 (posição 181) é V ou A; X10 (posição 203) é D ou N; X11 (posição 205) é R ou K; X12 (posição 210) é T ou K; X13 (posição 225) é R ou K; X14 (posição 268) é W ou R; X15 (posição 283) é T ou N; X16 (posição 290) é E ou K; X17 (posição 432) é I ou L; X18 (posição 489) é N ou D.

Como outro exemplo de tal variação, um alinhamento de sequência e sequência de consenso para HA of A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (codificado por SEQ ID NO: 33), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ

ID NO: 48), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 49), A/Porto Rico/8/34 (H1N1) e SEQ ID NO: 9 é mostrado abaixo na Tabela 3.

Tabela 3: Alinhamento de sequência e sequência de consenso para HA de cepas de H1N1 selecionadas

SEQ ID NO.	Sequência				
	1				50
75	MKAKLLVLLC	TFTATYADTI	CIGYHANNST	DTVDTVLEKN	VTVTHSVNLL
9	MKAKLLVLLC	TFTATYADTI	CIGYHANNST	DTVDTVLEKN	VTVTHSVNLL
48	MKVKLLVLLC	TFTATYADTI	CIGYHANNST	DTVDTVLEKN	VTVTHSVNLL
49	MKVKLLVLLC	TFTATYADTI	CIGYHANNST	DTVDTVLEKN	VTVTHSVNLL
76
Consenso	mkxkllvlle	tftatyadti	cigyhannst	dtvdtvlekn	vtvthsvnll
	51				100
75	EDSHNGKLCL	LKGIAPLQLG	NCSVAGWILG	NPECELLISK	ESWSYIVETP
9	EDSHNGKLCL	LKGIAPLQLG	NCSVAGWILG	NPECELLISK	ESWSYIVETP
48	ENSHNGKLCL	LKGIAPLQLG	NCSVAGWILG	NPECELLISK	ESWSYIVEKP
49	EDSHNGKLCL	LKGIAPLQLG	NCSVAGWILG	NPECELLISR	ESWSYIVEKP
76
Consenso	exshngklcl	lkgiaplqlg	ncsvagwilg	npecellis.	eswsyive.p
	101				150
75	NPENGTCPYG	YFADYBELRE	QLSSVSSFER	FEIFPKESSW	PNHTVTGVSA
9	NPENGTCPYG	YFADYBELRE	QLSSVSSFER	FEIFPKESSW	PNHTVTGVSA
48	NPENGTCPYG	HFADYBELRE	QLSSVSSFER	FEIFPKESSW	PNHTVTGVSA
49	NPENGTCPYG	HFADYBELRE	QLSSVSSFER	FEIFPKESSW	PNHTVTGVSA
76
Consenso	npengtcypg	xfadyeelre	qlssvssfer	feifpkessw	pnhtxtgvsa
	151				200
75	SCSHNGKSSF	YRNLLWLTGK	NGLYPNLSKS	YVMNKEKEVL	VLWGVHHPFN
9	SCSHNGKSSF	YRNLLWLTGK	NGLYPNLSKS	YVMNKEKEVL	VLWGVHHPFN
48	SCSHNGESSF	YRNLLWLTGK	NGLYPNLSKS	YANNKEKEVL	VLWGVHHPFN
49	SCSHNGESSF	YKNLLWLTGK	NGLYPNLSKS	YANNKEKEVL	VLWGVHHPFN
76
Consenso	scshngxssf	yxnlwltgk	nglypnlsks	yxnnkekevl	vlwgvhhpfn
	201				250
75	IGNQRALYHT	ENAYVSVVSS	HYSRRFTPEI	AKRPKVRDQE	GRINYWTLL
9	IGNQRALYHT	ENAYVSVVSS	HYSRRFTPEI	AKRPKVRDQE	GRINYWTLL
48	IGDQKALYHT	ENAYVSVVSS	HYSRKFTPEI	AKRPKVRDQE	GRINYWTLL
49	IGDQKALYHK	ENAYVSVVSS	HYSRKFTPEI	AKRPKVRDQE	GRINYWTLL
76MSLLT	EVETYVLSII	PSGPLKAEIA	QRLEDVFAGK
Consenso	igxqralyhx	enayvsvvss	hysrxftpei	akrpkvr#qe	gri#yywtll
	251				300
75	EPGDTIIFEA	NGNLIAPWYA	FALSRGFGSG	IITSNAPMDE	CDAKCQTPQG
9	EPGDTIIFEA	NGNLIAPWYA	FALSRGFGSG	IITSNAPMDE	CDAKCQTPQG
48	EPGDTIIFEA	NGNLIAPRYA	FALSRGFGSG	IINSNAPMDK	CDAKCQTPQG
49	EPGDTIIFEA	NGNLIAPRYA	FALSRGFGSG	IINSNAPMDE	CDAKCQTPQG
76	NTDLEVLMEW	...LKTRPIL	SPLTKGILGF	VFTLTVPSER	GLQRRRFVQN
Consenso	#pgdt!ifea	ngnLiapxya	faLsrGfgsg	!itsnaPm#x	cdakcqtpQg
	301				350
75	AINSSLPPQN	VHPVTIGCEP	KYVRSKLRM	VT.GLRNIPS	IQSRGLFGAI
9	AINSSLPPQN	VHPVTIGCEP	KYVRSKLRM	VT.GLRNIPS	IQSRGLFGAI
48	AINSSLPPQN	VHPVTIGCEP	KYVRSKLRM	VT.GLRNIPS	IQSRGLFGAI
49	AINSSLPPQN	VHPVTIGCEP	KYVRSKLRM	VT.GLRNIPS	IQSRGLFGAI

```

76 ALNG....N GDPNNMDKAV KLYRKLKREI TPHGAKEISL SYSAGALASC
Consenso AiNsslpfqN vhpvtigecp KyvRsaKlrm vtxGlr#Ips iqSrGlfgai

351 400
75 AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
9 AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
48 AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
49 AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
76 MGLIYNRM.G AVTTEVAFGL VCATCEQIAD SQHRSHROMV TTTNPLIRHE
Consenso agfIeggwtG mVdgygthh qneqsgyAa dQkstqnain gitNkvnsvi

401 450
75 EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER
9 EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER
48 EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLENER
49 EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLENER
76 NRMVLAStTA .KAMEQMAGS SEQAAEAMEV A.....S QARQMVAQR
Consenso #kMntqftav gKef#k$err mE#lnkkv#d gfdiwtyna #llv$l#ner

451 500
75 TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ L KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT
9 TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ L KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT
48 TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ L KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT
49 TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ L KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT
76 TIGTHPSSSA GLKNDLLENL QAYQKRMGVQ MQRFK.....
Consenso Tldfhd$nvk nLy#kvks#L knnaKeiGng cfeFyhkcnx ecmesvkngt

501 550
75 YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
9 YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
48 YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
49 YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
76 .....
Consenso ydypkysees klnrekidgv klesmgvyqi laiystvass lvllvslgai

551 566
75 SFWMCSNGSL QCRICI
9 SFWMCSNGSL QCRICI
48 SFWMCSNGSL QCRICI
49 SFWMCSNGSL QCRICI
76 .....
Consenso sfwmc$ngsl qcrici

```

A sequência de consenso indica no caso superior letras de aminoácidos comuns a tais sequências em uma posição designada; as letras do caso inferior indicam aminoácidos comuns a pelo menos metade, ou uma

5 maioria das sequências; o símbolo ! é qualquer um de I ou V; o símbolo \$ é qualquer um de L ou M; o símbolo % é qualquer um de F ou Y; o símbolo # é qualquer um de N, D, Q, E, B ou Z; o símbolo "." é nenhum aminoácido (por exemplo, uma anulação); X na posição 3 é qualquer um de A ou V; X na posição 52 é qualquer um de E ou N; X na posição 90 é K ou R; X na posição

10 99 é T ou K; X na posição 111 é qualquer um de Y ou H; X na posição 145 é qualquer um de V ou T; X na posição 157 é K ou E; X na posição 162 é R ou K; X na posição 182 é V ou A; X na posição 203 é N ou D; X na posição 205 é R ou K; X na posição 210 é T ou K; X na posição 225 é K ou Y; X na posição 333 é H ou uma anulação; X na posição 433 é I ou L; X na posição 49) é

N ou D.

Como outro exemplo de tal variação, um alinhamento de sequência e sequência de consenso para HA de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (SEQ ID NO: 55), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) e A/Indonésia/5/2006 (H5N1) (SEQ ID NO: 10) é mostrado abaixo na Tabela 4.

Tabela 4: Alinhamento de sequência e sequência de consenso para HA de cepas de H1N1 selecionadas

SEQ ID NO.	Sequência				
	1				50
10	MEKIVLLLA	VSLVKSQD	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV	TVTHAQDILE
56	MEKIVLLFA	VSLVKSQD	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV	TVTHAQDILE
55	MEKIVLLLA	VSLVKSQD	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV	TVTHAQDILE
Consenso	MEKIVLLLA	VSLVKSQD	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV	TVTHAQDILE
	51				100
10	KTHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN	PMCDEFINVP	ESYIIVEKAN
56	KTHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN	PMCDEFINVP	ESYIIVEKAN
55	KTHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN	PMCDEFINVP	ESYIIVEKAN
Consenso	KTHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN	PMCDEFINVP	ESYIIVEKAN
	101				150
10	PTNDLCYPGS	FNDYEELKHL	LSRINHFEKI	QIIPKSSWSD	HEASSGVSSA
56	PVNDLCYPGD	FNDYEELKHL	LSRINHFEKI	QIIPKSSWSS	HEASLGVSSA
55	PANDLCYPGN	FNDYEELKHL	LSRINHFEKI	QIIPKSSWSD	HEASSGVSSA
Consenso	PNDLCYPGX	FNDYEELKHL	LSRINHFEKI	QIIPKSSWSD	HEASSGVSSA
	151				200
10	CPYLGSPSFF	RNVVWLIKKN	STYPTIKRSY	NNTNQEDLLV	LWGIHHFNDA
56	CPYQKSSFF	RNVVWLIKKN	STYPTIKRSY	NNTNQEDLLV	LWGIHHFNDA
55	CPYQGTSPFF	RNVVWLIKKN	STYPTIKRSY	NNTNQEDLLI	LWGIHHSNDA
Consenso	CPYQGXpSFF	RNVVWLIKKN	STYPTIKrSY	NNTNQEDLLI	LWGIHHpNDA
	201				250
10	AEQTRLYQNP	TTYISIGTST	LNQRLVPKIA	TRSKVNGQSG	RMEFFWTILK
56	AEQTKLYQNP	TTYISVGTST	LNQRLVPRIA	TRSKVNGQSG	RMEFFWTILK
55	AEQTKLYQNP	TTYISVGTST	LNQRLVPKIA	TRSKVNGQSG	RMDFFWTILK
Consenso	AEQTKLYQNP	TTYISIGTST	LNQRLVPKIA	TRSKVNGQSG	RM#FFWTILK
	251				300
10	PNDAINFESN	GNFIAPEYAY	KIVKKGDSAI	MKSELEYGNC	NTKCQTPMGA
56	PNDAINFESN	GNFIAPEYAY	KIVKKGDSAI	MKSELEYGNC	NTKCQTPMGA
55	PNDAINFESN	GNFIAPEYAY	KIVKKGDSAI	VKSEVEYGNC	NTKCQTPIGA
Consenso	PNDAINFESN	GNFIAPEYAY	KIVKKGDSaI	mKSELEYGNC	NTKCQTPmGA
	301				350
10	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKS NRLVLA	TGLRNSPQRE	SRRKKRGLFG
56	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKS NRLVLA	TGLRNSPQRE	RRRKKRGLFG
55	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKS NKL VLA	TGLRNSPLRE	RRRK . RGLFG

```

Consenso  INSSMPFHNI HPLTIGECFK YVKSnrLVLA TGLRNSPqRE rRRKKRGLFG
          351                                     400
10  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
56  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
55  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
Consenso  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
          401                                     450
10  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
56  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
55  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
Consenso  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
          451                                     500
10  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDPAKELG NGCFEYHKC DNECMESVRN
56  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDPAKELG NGCFEYHKC DNECMESVRN
55  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDPAKELG NGCFEYHKC DNECMESVRN
Consenso  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDPAKELG NGCFEYHKC DNECMES!RN
          501                                     550
10  GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
56  GTYDYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMVA
55  GTYDYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMVA
Consenso  GTY#YPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGtY QILSIYSTVA SSLALAIMVA
          551                                     568
10  GLSLWMCNSG SLQCRICI
56  GLSLWMCNSG SLQCRICI
55  GLSLWMCNSG SLQCRICI
Consenso  GLSLWMCNSG SLQCRICI

```

A sequência de consenso indica no caso superior letras de aminoácidos comuns a todas as sequências em uma posição designada; as letras do caso inferior indicam aminoácidos comuns a pelo menos metade, ou

5 uma maioria das sequências; o símbolo ! é qualquer um de I ou V; o símbolo \$ é qualquer um de L ou M; o símbolo % é qualquer um de F ou Y; o símbolo # é qualquer um de N, D, Q, E, B ou Z; X na posição 102 é qualquer de T, V ou A; X na posição 110 é qualquer de S, D ou N; X na posição 156 é qualquer de S, K ou T.

10 Os alinhamentos ilustrados e descritos acima e sequências de consenso são exemplos não-limitativos de variantes em sequências de aminoácido de hemaglutinina que podem ser usadas em várias concretizações da invenção para a produção das VLPs em uma planta.

15 Um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido pode ser facilmente determinado, visto que os códons para cada aminoácido são conhecidos na técnica. A provisão de uma sequência de aminoácido, portanto, ensina a degenerar sequências de ácido nucleico que a codifica. A presente invenção, portanto, proporciona uma sequência de ácido nucleico

que codifica uma hemaglutinina daquelas cepas da gripe e subtipos aqui descritos (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova York/1995, A/pato silvestre de arenque/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/pato silvestre do hemisfério norte/MN/33/00, 5 A/pato/Shanghai/1/2000, A/rabijunco do norte/TX/828189/02, A/Peru/Ontario/6118/68(H8N4), A/shoveler/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949(H10N7), A/pato/Inglaterra/56(H11N6), A/pato/Alberta/60/76(H12N5),A/Pato silvestre /Maryland/704/77(H13N6), A/Pato silvestre do hemisfério norte/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 10 (H15N8), A/pato silvestre da cabeça preta/Suécia/5/99(H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 15 (H5N1), A/Cerceta/Hong-kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong-kong/1073/99 (H9N2)), bem como sequências degeneradas que codificam as hemaglutininas acima.

Adicionalmente, uma sequência de aminoácido codificada por um ácido nucleico pode ser facilmente determinada, como o códon ou có- 20 dons para cada aminoácido são conhecidos. A provisão de um ácido nucleico, portanto, ensina uma sequência de aminoácido codificado por ele. A invenção, portanto, proporciona sequências de aminoácido da hemaglutinina daquelas cepas da gripe e subtipos aqui descritos (por exemplo A/Nova Ca- ledônia/20/99 (H1N1)A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova York/1995, 25 A/pato silvestre de arenque/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/pato silvestre do hemisfério norte/MN/33/00, A/pato/Shanghai/1/2000, A/rabijunco do norte/TX/828189/02, A/Peru/Ontario/6118/68(H8N4), A/shoveler/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949(H10N7), A/pato/Inglaterra/56(H11N6), A/pato/Alberta/60/76(H 12N5), A/Pato silvestre 30 /Maryland/704/77(H13N6), A/Pato silvestre do hemisfério norte/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/pato silvestre do pes- çoço preto/Suécia/5/99(H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Ri-

co/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong-kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong-kong/1073/99 (H9N2)).

Nas plantas, as VLPs da gripe se originam a partir da membrana de plasma (vide Exemplo 5, e Figura 19); portanto, a composição de lipídeo das VLPs refletem sua origem. As VLPs produzidas de acordo com a presente invenção compreendem HA de um ou mais que um do tipo ou subtipo de gripe, complexados com lipídeos derivados de planta. Os lipídeos de planta podem estimular células imunes específicas e aumentam a resposta imune induzida. As membranas de planta são produzidas de lipídeos, fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE), e também contêm glicosfingolipídeos, saponins, e fitosteróis. Adicionalmente, balsas de lipídeo são também encontradas nas membranas de plasma de planta –estes microdomínios são enriquecidos em esfingolipídeos e esteróis. Em plantas, uma variedade de fitosteróis é conhecida por ocorrer, incluindo estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol e colesterol (Mongrand et al., 2004).

PC e PE, bem como glicosfingolipídeos, podem se ligar a moléculas de CD1 expressas por células imunes mamíferas tais como células dendríticas similares a células apresentando antígeno (APCs) e macrófagos, e outras células incluindo linfócitos B e T no timo e fígado (Tsuji M., 2006). Moléculas de CD1 são estruturalmente similares a moléculas complexas de maior histocompatibilidade (MHC) de classe I, e seu papel é apresentar antígenos de glicolipídeo para células de NKT (Natural Killer T cells). Após ativação, as células NKT ativam células imunes inatas tais como células NK e células dendríticas, e também ativam anticorpo similar a células imunes adaptativas que produzem células B e células T.

Uma variedade de ditosteróis pode ser encontrada em uma membrana de plasma – o complemento específico pode variar dependendo das espécies, condições de crescimento, fontes de nutrientes ou estado de

patogenia, para denominar uns poucos fatores. Geralmente, beta-sitosterol é o fitosterol mais abundante.

Os fitosteróis presentes em uma VLP da gripe complexada com uma bicamada de lipídeo, tal como envelope derivado de membrana de plasma, pode proporcionar uma composição de vacina vantajosa. Sem dese-
5 jar estar ligado pela teoria, as VLPs produzidas de planta complexadas com uma bicamada de lipídeo, tal como envelope derivado de membrana de plasma, pode induzir uma reação imune mais forte do que as VLPs produzidas em outros sistemas de expressão, e podem ser similares à reação imune
10 induzida por vacinas de vírus totais vivos ou atenuados.

Portanto, em algumas concretizações, a invenção proporciona uma VLP complexada com uma bicamada de lipídeo derivada de planta. Em algumas concretizações, a bicamada de lipídeo derivada de planta pode compreender o envelope da VLP.

15 A VLP produzida dentro de uma planta pode induzir uma HA compreendendo N-glicans específicas de planta. Portanto, esta invenção também proporciona uma VLP compreendendo HA tendo N-glicans específicas de planta.

Além disso, modificação de N-glican em plantas é conhecida
20 (vide, por exemplo, U.S. 60/944.344; que é aqui incorporada por referência) e HA tendo N-glicans modificadas podem ser produzidas. HA compreendendo um modelo de glicosilação modificado, por exemplo, com N-glicans fucosilatadas reduzidas, xilosilatadas, ou ambos, fucosilatadas e xilosilatadas podem ser obtidas, ou HA tendo um modelo de glicosilação modificado po-
25 dem ser obtidas, no qual a proteína carece de fucosilação, xilosilação, ou ambos, e compreendem galatosilação aumentada. Além disso, modulação de modificações pós-translacional, por exemplo, a adição de galactose terminal, pode resultar em uma redução de fucosilação e xilosilação da HA expressa quando comparada a HA de expressão de planta tipo selvagem.

30 Por exemplo, que não é para ser considerado limitante, a síntese de HA tendo um modelo de glicosilação modificado pode ser alcançada por coexpressão da proteína de interesse junto com uma sequência de nucleotí-

deo que codifica beta-1.4 galactosiltransferase (GalT), por exemplo, mas não limitado a mamífero GalT, ou GalT humano contudo GalT de outras fontes podem também ser usados. O domínio catalítico de GalT pode também ser fundido a um domínio de CTS (isto é, a cauda citoplásmica, domínio de transmembrana, região de haste) de N-acetilglucosaminil transferase (GNTI), para produzir uma enzima híbrida de GNTI-GalT, e a enzima híbrida pode ser coexpressa com HA. A HA pode também ser coexpressa junto com uma sequência de nucleotídeo que codifica N-acetilglucosaminiltrasnferase III (GnT-III), por exemplo, mas não limitado a mamífero GnT-III ou GnT-III humano, GnT-III de outras fontes podem também ser usados. Adicionalmente, uma enzima híbrida de GNTI-GnT-III, compreendendo a CTS de GNTI fundida a GnT-III pode também ser usada.

Portanto, a presente invenção também inclui VLP's compreendendo HA tendo N-glicans modificadas.

Sem desejar estar ligado pela teoria, a presença de N-glicans de planta em HA pode estimular a resposta imune pela promoção da ligação de HA por células que apresentam estímulo. O estímulo da resposta imune usando N-glican de planta foi proposto por Saint-jore-Dupas et al. (2007). Além disso, a conformação da VLP pode ser vantajosa para a apresentação do antígeno, e aumenta o efeito adjuvante da VLP quando complexada com uma camada de lipídeo derivada de planta.

Por "região regulatória" "elemento regulatório" ou "promotor" é significativo uma porção de ácido nucleico tipicamente, mas não sempre, a montante da região de codificação de proteína de um gene, que pode ser compreendida de DNA ou RNA, ou ambos DNA e RNA. Quando uma região regulatória é ativa, e em associação operativa, ou operativamente ligada, com um gene de interesse, isto pode resultar na expressão do gene de interesse. Um elemento regulatório pode ser capaz de mediar especificidade de órgão, ou controlar a ativação de gene desenvolvendo ou temporal. Uma "região regulatória" inclui elementos de promotor, elementos promotores de núcleo exibindo uma atividade promotora basal, elementos que são induzíveis em resposta a um estímulo externo, elementos que mediam atividade

de promotor, tais como elementos regulatórios negativos ou intensificadores transcrpcionais. A "região regulatória", conforme aqui usada, também inclui elementos que são ativos seguindo transcrição, por exemplo, elementos regulatórios que modulam expressão de gene, tais como intensificadores translacionais e transcrpcionais, repressores translacionais e transcrpcionais, sequências de ativação a montante, e determinantes de instabilidade de mRNA. Vários destes últimos elementos podem estar localizados proximais à região de codificação.

No contexto desta descrição, o termo "elemento regulatório" ou "região regulatória" tipicamente refere-se a uma sequência de DNA, usualmente, mas não sempre, a montante (5') a sequência de codificação de um gene estrutural, que controla a expressão da região de codificação pela provisão do reconhecimento de RNA polimerase e/ou outros fatores requeridos para transcrição para começar um local particular. Contudo, é para ser compreendido que outras sequências de nucleotídeo, localizadas dentro de introns, ou 3' da sequência, podem também contribuir para a regulação de expressão de uma região de codificação de interesse. Um exemplo de um elemento regulatório que proporciona o reconhecimento de RNA polimerase ou outros fatores transcrpcionais para assegurar iniciação em um local particular é um elemento promotor. Muitos, mas não todos, elementos promotores eucarióticos, contêm um caixa de TATA, uma sequência de ácido nucleico conservada compreendida de pares de base de nucleotídeo adenosina e timidina usualmente situados aproximadamente 25 pares bases a montante de um local de partida transcricional. Um elemento promotor compreende um elemento promotor basal, responsável pela iniciação de transcrição, bem como outros elementos regulatórios (conforme listado acima) que modificam a expressão de expressão.

Existem várias regiões regulatórias, incluindo aquelas que são desenvolvimentalmente reguladas, induzíveis ou constitutivas. Uma região regulatória que é regulada de maneira desenvolvida, ou controla a expressão diferencial de um gene sob seu controle, é ativada dentro de certos órgãos ou tecidos de um órgão em tempos específicos durante o desenvolvi-

mento daquele órgão ou tecido. Contudo, algumas regiões regulatórias que são desenvolve-se reguladas podem preferencialmente ser ativas dentro de certos órgãos ou tecidos em estágios desenvolvendo-se diferentes, elas podem também ser ativas em uma maneira desenvolvendo-se regulada, ou em

5 um nível basal em outros órgãos ou tecidos dentro de uma planta também. Exemplos de regiões regulatórias específicas de tecido, por exemplo, vide uma região regulatória específica, incluem promotor napin, e o promotor cruciferin (Rask et al., 1998, *J. Planta Physiol.* 152: 595-599; Bilodeau et al., 1994, *Planta Cell* 14: 125-130). Um exemplo de um promotor específico de

10 folha inclui o promotor plastocianina (Figura 1b ou SEQ ID NO:23); US 7.125.978, que é aqui incorporada por referência).

Uma região regulatória induzível é uma que é capaz de ativar diretamente ou indiretamente transcrição de uma ou mais sequências de DNA ou genes em resposta a um indutor. Na ausência de um indutor, as

15 sequências de DNA ou genes não serão transcritas. Tipicamente o fator de proteína que se liga especificamente a uma região regulatória induzível para ativar transcrição pode estar presente em uma forma inativa, que então é diretamente ou indiretamente convertida à forma ativa pelo indutor. Contudo, o fator de proteína pode também estar ausente. O indutor pode ser um agente

20 químico, tais como proteína, metabólito, regulador de crescimento, herbicida ou composto fenólico, ou um estresse fisiológico imposto diretamente por calor, frio, sal, ou elementos tóxicos, ou indiretamente através da ação de uma patogenicidade ou agente de doença tal como um vírus. Uma célula de planta contendo uma região regulatória induzível pode ser exposta a um in-

25 dutor por aplicação externamente do indutor à célula ou planta, tais como métodos de pulverização, irrigação, aquecimento ou similar. Elementos regulatórios induzíveis podem ser derivados de ou planta ou genes de não-planta (por exemplo, Gatz, C. e Lenk, I.R.P., 1998, *Trends Plant Sci.* 3, 352-358; que é incorporado por referência). Exemplos de promotores induzíveis po-

30 tenciais incluem, mas não estão limitados a, promotor induzível de tetraciclina (Gatz, C., 1997, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 89-108; que é incorporado por referência), promotor induzível de esteróide (Aoyama, T. e

Chua, N.H.,1997, *Plant J.* 2, 397-404; que é incorporado por referência), e promotor induzível de etanol (Salter, M.G., et al., 1998, *Plant Journal* 16, 127-132; Caddick, M.X., et al., 1998, *Nature Biotech.* 16, 177-180, que são incorporados por referência), genes de IB6 e CKI1 induzíveis de citocinin
 5 (Brandstatter, I. e Kieber, JJ.,1998, *Plant Cell* 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, *Science* 274, 982-985; que são incorporados por referência), e o elemento induzível de auxin, DR5 (Ulmasov, T., et al., 1997, *Plant Cell* 9, 1963-1971; que é incorporado por referência).

Uma região regulatória constitutiva direciona a expressão de um
 10 gene através de todas as várias partes de uma planta e continuamente através de todo o desenvolvimento da planta. Exemplos de elementos regulatórios constitutivos conhecidos incluem promotores associados com o transcrito CaMV 35S. (Odell et al., 1985, *Nature*, 313: 810-812), a actina 1 de arroz (Zhang et al., 1991, *Plant Cell*, 3: 1155-1165), actina 2 (An *et al.*,
 15 1996, *Plant J.*, 10: 107-121), ou tms 2 (U.S. 5.428.147, que é aqui incorporada por referência), e genes de triosefosfato isomerase 1 (Xu et. al., 1994, *Plant Physiol.* 106: 459-467), o gene ubiquitin 1 de milho (Cornejo et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), o *Arabidopsis* ubiquitin 1 e 6 genes (Holtorf et al., 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), e o fator de iniciação translacional de tabaco 4A (Mandel et al., 1995 *Plant Mol. Biol.* 29: 995-1004). O termo "constitutivo", conforme aqui usado, não indica necessariamente que um gene sob controle da região regulatória constitutiva é expresso no mesmo nível em todos os tipos de célula, mas que o gene é expresso em uma faixa ampla de tipos de célula mesmo embora variação em abundância seja
 25 frequentemente observada.

Por "operativamente ligado" é significativo que as sequências particulares, por exemplo, um elemento regulatório e uma região de codificação de interesse, interajam ou diretamente ou indiretamente para efetuar uma função pretendida, tal como mediação ou modulação de expressão de
 30 gene. A interação de sequências operativamente ligadas pode, por exemplo, ser mediada por proteínas que interagem com as sequências operativamente ligadas.

A uma ou mais seqüências de nucleotídeo da presente invenção podem ser expressas em qualquer hospedeiro de planta adequado que é transformado pela seqüência de nucleotídeo, ou construções, ou vetores da presente invenção. Exemplos de hospedeiros adequados incluem, mas não
5 estão limitados a, colheitas agrícolas incluindo alfafa, canola, *Brassica* spp., milho, *Nicotiana* spp., alfafa, batata, ginsém, ervilha, aveia, arroz, soja, trigo, cevada, girassol, algodão, e similares.

A uma ou mais construções genéticas quiméricas da presente invenção podem adicionalmente compreender uma região 3' não-
10 transladada. Uma região 3' não-transladada refere-se àquela porção de um gene compreendendo um segmento de DNA que contém um sinal de poliadenilação e quaisquer outros sinais regulatórios capazes de efetuar processamento de mRNA ou expressão de gene. O sinal de poliadenilação é usualmente caracterizado por efetuação da adição de rastros de ácido poliadenílico para a extremidade 3' do precursor de mRNA. Os sinais de poliadenilação são comumente reconhecidos pela presença de homologia para a forma canônica 5' AATAAA-3', embora variações não sejam incomuns. Uma ou
15 mais das construções genéticas quiméricas da presente invenção podem também incluir adicionalmente intensificadores, ou intensificadores de translação ou de transcrição, conforme podem ser requeridos. Estas regiões de intensificador são bem conhecidas àqueles versados na técnica, e podem incluir o códon de iniciação ATG e seqüências adjacentes. O códon de iniciação deve estar em fase com a estrutura de leitura da seqüência de codificação para assegurar translação da seqüência total.
20

Exemplos não-limitativos de regiões 3' adequadas são as regiões 3' transcritas não-transladadas contendo um sinal de poliadenilação de tumor *Agrobacterium* induzindo genes de plasmídeo (Ti), tais como nopalina sintase (gene Nos) e genes de planta, tais como genes de armazenagem de soja, um gene de subunidade pequena da ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase (ssRUBISCO; US 4.962.028; que é incorporada aqui por referência), o
30 promotor usado na regulação de expressão de plastocianina (Pwee e Gray 1993; que é aqui incorporado por referência). Um exemplo de um promotor

de plastocianina é descrito em US 7.125.978 (que é aqui incorporada por referência).

Conforme descrito aqui, promotores compreendendo sequências intensificadoras com eficiência demonstrada em expressão de folha verificaram-se serem efetivos em expressão transiente. Sem desejar estar ligado pela teoria, a fixação de elementos regulatórios a montante de um gene fotossintético por fixação à matriz nuclear pode mediar forte expressão. Por exemplo, até -784 do local de partida de translação do gene de plastocianina da ervilha podem ser usados para mediar forte expressão de gene relator.

Para auxiliar na identificação de células de planta transformadas, as construções desta invenção podem ser adicionalmente manipuladas para incluir marcadores selecionáveis de planta. Marcadores selecionáveis úteis incluem enzimas que proporcionam resistência a químicos tal como um antibiótico, por exemplo, gentamicina, higromicina, kanamicina, ou herbicidas, tais como fosfotricina, glifosato, clorosulfuron, e similares. Similarmente, enzimas proporcionando produção de um composto identificável por mudança de cor tal como GUS (beta-glucuronidase), ou luminescência, tal como luciferase ou GFP, podem ser usados.

Também considerada parte desta invenção são plantas transgênicas, células de planta ou sementes contendo a construção de gene quimérico da presente invenção. Métodos de regeneração de plantas totais de células de planta são também conhecidos na técnica. Em geral, células de planta transformadas são cultivadas em um meio apropriado, que pode conter agentes seletivos, tais como antibióticos, onde marcadores selecionáveis são usados para facilitar identificação de células de planta transformadas. Uma vez que o calo se forma, formação de broto pode ser encorajada pelo emprego dos hormônios de planta apropriados de acordo com métodos conhecidos, e os brotos são transferidos para meio de enraizamento para regeneração de plantas. As plantas podem então ser usadas para estabelecer gerações repetitivas, ou de sementes, ou usando técnicas de propagação vegetativas. As plantas transgênicas podem também ser geradas sem uso de culturas de tecido.

Também considerada parte desta invenção são plantas transgênicas, células de árvores, levedura, bactéria, fungos, inseto e animal contendo a construção de gene quimérico compreendendo um ácido nucleico que codifica HA0 recombinante para produção de VLP, de acordo com a presente invenção.

Os elementos regulatórios da presente invenção podem também ser combinados com região de codificação de interesse para expressão dentro de uma faixa de organismos hospedeiros que são responsáveis pela transformação, ou expressão transiente. Tais organismos incluem, mas não estão limitados a, plantas, ambas monocots e dicots, por exemplo, mas não limitadas a, milho, plantas de cereal, trigo, cevada, aveia, *Nicotiana* spp, *Brassica* spp, feijão-soja, feijão, ervilha, alfafa, batata, tomate, ginsém, e *Arabidopsis*.

Métodos para transformação estável e regeneração destes organismos são estabelecidos na técnica e conhecidos a um versado na técnica. O método de obtenção de plantas transformadas e regeneradas não é crítico para a presente invenção.

Por "transformação" é significativo a transferência específica estável de informação genética (sequência de nucleotídeo) que é manifestada genotipicamente, fenotipicamente, ou ambas. A transferência interespecífica de informação genética de uma construção quimérica para um hospedeiro pode ser herdada, e a transferência de informação genética considerada estável, ou a transferência pode ser transiente, e a transferência de informação genética não é hereditária.

Pelo termo "material de planta", é significativo qualquer material derivado de uma planta. A matéria de planta pode compreender uma planta total, tecido, células, ou qualquer fração dos mesmos. Adicionalmente, a matéria de planta pode compreender componentes de planta intracelular, componentes de planta extracelular, extratos líquidos ou sólidos de plantas, ou uma combinação dos mesmos. Adicionalmente, o material de planta pode compreender plantas, células de planta, tecido, um extrato líquido, ou uma combinação dos mesmos, de folhas de planta, caules, fruto, raízes, ou uma

combinação dos mesmos. A matéria de planta pode compreender uma planta ou porção da mesma que não tenha sido individualizada para quaisquer etapas de processamento. Contudo, é também contemplado que o material de planta possa ser individualizado para etapas de processamento mínimas conforme definido abaixo, ou processamento mais rigoroso, incluindo purificação de proteína parcial ou substancial usando técnicas comumente conhecidas dentro da técnica incluindo, mas não limitada a, cromatografia, eletroforese e similares.

Pelo termo "processamento mínimo" é significativo matéria de planta, por exemplo, uma planta ou porção da mesma compreendendo uma proteína de interesse que é parcialmente purificada para produzir um extrato de planta, homogenato, homogenato de fração de planta, ou similares (isto é, minimamente processada). Purificação parcial pode compreender, mas não é limitado a, rompimento das estruturas celulares da planta criando, desse modo, uma composição compreendendo componentes de planta solúveis, e componentes de planta insolúveis que podem ser separados, por exemplo, mas não limitado a, por centrifugação, filtração, ou uma combinação das mesmas. Neste particular, proteínas secretadas dentro do espaço extracelular de folha ou outros tecidos podem ser prontamente obtidas usando-se vácuo ou extração centrífuga, ou tecidos podem ser extraídos sob pressão por passagem através de rolos ou moagem ou similares para espremer ou liberar a proteína livre de dentro do espaço extracelular. Processamento mínimo pode também envolver preparação de extratos brutos de proteínas solúveis, visto que estas preparações teriam contaminação razoável de produtos de planta secundários. Adicionalmente, processamento mínimo envolve extração aquosa de uma proteína solúvel de folhas, seguido por precipitação com qualquer sal adequado. Outros métodos podem incluir maceração de grande escala e extração de suco de modo a permitir o uso direto do extrato.

O material de planta, na forma de material de planta ou tecido pode ser oralmente distribuído a um indivíduo. A matéria de planta pode ser administrada como parte de um suplemento dietético, junto com outros ali-

mentos, ou encapsulados. A matéria de planta ou tecido pode também ser concentrada para aperfeiçoar ou aumentar palatabilidade, ou provido com outros materiais, ingredientes, ou excipientes farmacêuticos, conforme requerido.

5 Exemplos de um indivíduo ou organismo alvo que as VLPs da presente invenção podem ser administradas incluem, mas não estão limitados a, seres humanos, primatas, pássaros, aves de água, pássaros migratórios, codorniz, pato, gansos, animais domésticos, galinha, suíno, ovelha, equino, cavalo, camelo, canino, cães, felino, gatos, tigre, leopardo, gato da
10 algália, marta, marta da pedra, furões, animais domésticos, animais de fazenda, coelhos, camundongos, ratos, porquinhos da índia, ou outros roedores, foca, baleia, e similares. Tais organismos alvos são exemplares, e não são para serem considerados limitantes às aplicações e aos usos da presente invenção.

15 É contemplado que uma planta compreendendo a proteína de interesse, ou que expressa a VLP compreendendo a proteína de interesse, pode ser administrada a um indivíduo ou organismo-alvo, em uma variedade de modos, dependendo da necessidade e da situação. Por exemplo, a proteína de interesse obtida a partir da planta pode ser extraída antes de seu uso
20 na forma ou crua, parcialmente purificada, ou purificada. Se a proteína é para ser purificada, então ela pode ser produzida em quaisquer plantas comestíveis ou não-comestíveis. Além disso, se a proteína é oralmente administrada, o tecido de planta pode ser coletado e alimentado diretamente ao indivíduo, ou o tecido coletado pode ser secado antes da alimentação, ou um animal pode ser permitido pastar na planta com nenhuma coleta anterior ocorrendo. É também considerado dentro do escopo desta invenção os tecidos de planta coletados a serem providos como um suplemento de alimentação dentro da alimentação do animal. Se o tecido de planta está sendo alimentado a um animal com pouco ou nenhum processamento adicional, é preferido
25 que o tecido de planta sendo administrado seja comestível.

30 Silenciamento de gene pós-transcricional (PTGS) pode ser envolvido na expressão de limitação de transgenes em plantas, e coexpressão

de um supressor de silenciamento a partir do vírus da batata Y (HcPro) pode ser usado para contra-agir a degradação específica de transgene mRNAs (Brigneti et al., 1998). Supressores alternados de silenciamento são bem-conhecidos na técnica e podem ser usados conforme descrito aqui (Chiba et al., 2006, *Virology* 346:7-14; que é aqui incorporado por referência), por exemplo, mas não limitado a, TEV -pI/HC-Pro (Tobacco etch vírus-pI/HC-Pro), BYV -p21, p19 de vírus de evolução fechada de tomate (TBSV p19), proteína de capsídeo de vírus de ruga de tomate (TCV -CP), 2b de Vírus de mosaico de pepino; CMV-2b), p25 de vírus da batata X (PVX-p25), p11 de Vírus da batata M (PVM-pI 1), pI 1 de Vírus da batata S (PVS-pI 1), p16 vírus de espécie de mirtilo, (BScV -pI6), p23 de vírus de Citrus tristexa (CTV-p23), p24 de vírus-2 associado a folha de videira, (GLRaV-2 p24), p10 de Vírus A de videira, (GVA-pIO), p14 de Vírus B de videira (GBV-p14), p10 de Vírus latente de *Heracleum* (HLV-pIO), ou pI6 de Vírus latente comum de Garlic (GCLV-pI6). Portanto, um supressor de silenciamento, por exemplo, mas não limitado a, HcPro, TEV -pI/HC-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-pI1, PVS-pI 1, BScV-pI6, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-pIO, GCLV-pI6 ou GVA-pIO, podem ser coexpressos junto com a sequência de ácido nucleico que codifica a proteína de interesse para assegurar adicionalmente altos níveis de produção de proteína dentro de uma planta.

Além disso, VLPs podem ser produzidas que compreendem uma combinação de subtipos HA. Por exemplo, VLPs podem compreender um ou mais do que uma HA a partir do subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, ou uma combinação das mesmas. A seleção da combinação de HAs pode ser determinada pelo uso pretendido da vacina preparada a partir da VLP. Por exemplo, uma vacina para uso na inoculação de pássaros pode compreender qualquer combinação de subtipo de HA, enquanto as VLPs úteis para inoculação de humanos pode compreender subtipos de um ou mais do que um dos subtipos H1, H2, H3, H5. Contudo, outras combinações de subtipo HA podem ser preparadas dependendo do uso da VLP. De modo a produzir VLPs compreendendo combinações de subtipos de HA, o subtipo de HA desejado pode ser coexpresso dentro da

mesma célula, por exemplo, uma célula de planta.

Além disso, VLPs produzidas conforme aqui descrito não compreendem neuraminidase (NA). Contudo, NA pode ser coexpressa com HA com VLPs compreendendo HA e NA podem ser desejadas.

5 Portanto, a presente invenção adicionalmente inclui um vetor adequado compreendendo a construção quimérica adequada para uso com sistemas de expressão ou estável ou transiente. A informação genética pode ser também provida dentro de uma ou mais do que uma construção. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de interesse pode ser introduzida em uma construção, e uma segunda sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína que modifica glicosilação da proteína de interesse pode ser introduzida usando-se uma construção separada. Estas sequências de nucleotídeos podem então ser coexpressas dentro de uma planta. Contudo, uma construção compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica ambas a proteína de interesse e a proteína que modifica perfil de glicosilação da proteína de interesse pode também ser usado. Neste caso a sequência de nucleotídeo compreenderia uma primeira sequência compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico que codifica a proteína de interesse operativamente ligada a um promotor ou região regulatória, e uma segunda sequência compreende uma segunda sequência de ácido nucleico que codifica a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse, a segunda sequência operativamente ligada a um promotor ou região regulatória.

25 Por "coexpresso" é significativo que duas ou mais do que duas sequências de nucleotídeos são expressas a cerca do mesmo tempo dentro da planta, e dentro do mesmo tecido da planta. Contudo, as sequências de nucleotídeo não necessitam ser expressas exatamente ao mesmo tempo. Preferivelmente, as duas ou mais sequências de nucleotídeo são expressas em uma maneira tal que os produtos codificados têm uma chance de interagirem. Por exemplo, a proteína que modifica glicosilação da proteína de interesse pode ser expressa antes do ou durante o período quando a proteína de interesse é expressa de modo que modificação da glicosilação da proteí-

na de interesse ocorre. Duas ou mais do que duas sequências de nucleotídeo podem ser coexpressas usando-se um sistema de expressão transiente, onde as duas ou mais sequências são introduzidas dentro da planta a cerca do mesmo tempo sob condições que ambas sequências são expressas. Alternativamente, uma planta de plataforma compreendendo uma das sequências de nucleotídeo, por exemplo, a sequência que codifica a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse, pode ser transformada, ou transientemente, ou em uma maneira estável, com uma sequência adicional que codifica a proteína de interesse. Neste caso, a sequência que codifica a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse pode ser expressa dentro do tecido desejado, durante um estágio desejado de desenvolvimento, ou sua expressão pode ser induzida usando-se um promotor induzível, e a sequência adicional que codifica a proteína de interesse pode ser expressa sob condições similares e no mesmo tecido, para assegurar que as sequências de nucleotídeo sejam coexpressas.

As construções da presente invenção podem ser introduzidas em células de planta usando os Ti plasmídeos, Ri plasmídeos, vetores de vírus de planta, transformação de DNA direta, microinjeção, eletroporação, etc.. Para revisões de tais técnicas, vide, por exemplo, Weissbach e Weissbach, *Métodos for Plant Molecular Biology*, Academy Press, Nova York VIII, pp. 421-463 (1988); Geierson e Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); e Miki e 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). Outros métodos incluem entendimento de DNA direto, o uso de lipossomos, eletroporação, por exemplo, usando protoplastos, microinjeção, microprojéteis ou "whiskers", e infiltração de vácuo. Vide, por exemplo, Bilang, et al. (*Gene* 100: 247-250 (1991), Scheid et al. (*Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (*Planta Science* 52: 111-116, 1987), Neuhauser et al. (*Theor. Appl Genet.* 75: 30-36, 1987), Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987); Howell et al. (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch et al. (*Science* 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., *Plant Physiology* 91: 694-701, 1989), *Métodos for Plant Mole-*

cular Biology (Weissbach e Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), Métodos in Plant Molecular Biology (Schuler e Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu e Lomonossoff (J. Virol Meth, 105:343-348, 2002,), Patentes dos Estados Unidos N^os 4.945.050; 5.036.006; e 5.100.792, pedido
5 de patente dos Estados Unidos N^os de Série 08/438.666, depositado em 10 de maio de 1995, e 07/951.715, depositado em 25 de setembro de 1992, (todas das quais são aqui incorporadas por referência).

Métodos de expressão transiente podem ser usados para expressar as construções da presente invenção (vide, Liu e Lomonossoff,
10 2002, Journal of Virological Métodos, 105:343-348; que é aqui incorporado por referência). Alternativamente, um método de expressão transiente baseado em vácuo, conforme descrito por Kapila et al. 1997 (aqui incorporado por referência) pode ser usado. Estes métodos podem incluir, por exemplo, mas não estão limitados a, um método de Agroinoculação ou Agroinfiltração,
15 contudo, outros métodos transientes podem também ser usados conforme notado acima. Com ou Agroinoculação ou Agroinfiltração, uma mistura de *Agrobacteria* compreendendo o ácido nucleico desejado entra nos espaços intercelulares de um tecido, por exemplo, as folhas, porção aérea da planta (incluindo caule, folhas e flor), outra porção da planta (caule, raiz, flor), ou a
20 planta total. Após cruzamento da epiderme, o *Agrobacterium* infecta e transfere cópias de t-DNA nas células. O t-DNA é episossomalmente transcrito e o mRNA transladado, conduzindo a produção da proteína de interesse em células infectadas; contudo, a passagem de t-DNA dentro do núcleo é transiente.

25 Se a sequência de nucleotídeo de interesse codifica um produto que é diretamente ou indiretamente tóxico para a planta, então pelo uso do método da presente invenção, tal toxicidade pode ser reduzida através de toda a planta por expressão seletivamente da sequência de interesse de nucleotídeo dentro de um tecido desejado ou em um estágio desejado de desenvolvimento de planta. Em adição, o período limitado de expressão resultante da expressão transiente pode reduzir o efeito quando se produz um
30 produto tóxico na planta. Um promotor induzível, um promotor específico de

tecido, ou um promotor específico de célula, podem ser usados para direcionar seletivamente expressão da sequência de interesse.

As VLPs de HA recombinantes da presente invenção podem ser usadas em conjunto com as vacinas da gripe existentes, para complementar
5 as vacinas, torná-las mais eficazes, e para reduzir as dosagens de administração necessárias. Conforme seria conhecido por um versado na técnica, a vacina pode ser direcionada contra um ou mais do que um vírus da gripe. Exemplos de vacinas adequadas incluem, mas não estão limitados a, aquelas comercialmente disponíveis de Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial,
10 Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi-Aventis, Serono, Shire Pharmaceuticals, e similares.

Se desejado, as VLPs da presente invenção podem ser misturadas com um adjuvante adequado conforme seria conhecido um versado na técnica. Além disso, a VLP pode ser usada em uma composição de vacina
15 compreendendo uma dose efetiva da VLP para o tratamento de um organismo alvo, conforme descrito acima. Além disso, a VLP produzida de acordo com a presente invenção pode ser combinada com VLPs obtidas usando proteínas de gripe diferentes, por exemplo, neuraminidase (NA).

Portanto, a presente invenção proporciona um método para indução de imunidade a infecção de vírus da gripe em um animal ou organismo
20 alvo compreendendo administrar uma dose efetiva de uma vacina compreendendo um ou mais do que uma VLP. A vacina pode ser administrada oralmente, intradermalmente, intranasalmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, ou subcutaneamente. A administração de
25 VLPs produzidas de acordo com a presente invenção é descrita no Exemplo 6. A administração de uma H5 VLP produzida de planta resulta em uma resposta significativamente mais alta quando comparada a administração de HA solúvel (vide Figuras 21A e 21B).

Conforme mostrado nas Figuras 26A e 26B, um indivíduo administrado com A/Indonésia/5/05 H5 VLPs proporciona proteção cruzada a um
30 desafio com gripe A/Peru/582/06 (H5N1; "Peru H5N1"). A administração de Indonésia H5 VLPs antes do desafio não resulta em qualquer perda de mas-

sa de corpo. Contudo, em indivíduo não administrado com H5VLPs, mas desafiado com Turkey H5N1, exibe perda significativa de massa de corpo, e vários indivíduos morrem.

Estes dados, portanto, demonstram que VLPs da gripe produzidas de planta compreendendo a proteína viral de H5 hemaglutinina induz uma resposta imune específica para cepas da gripe patogênicas, e que partículas similares a vírus podem se originar a partir de uma membrana de plasma de planta.

Portanto, a presente invenção proporciona uma composição compreendendo uma dose efetiva de uma VLP compreendendo uma proteína de HA de vírus da gripe, um ou mais do que um lipídeo de planta, e um transportador farmacologicamente aceitável. A proteína HA de vírus da gripe pode ser H5 Indonésia/5/2006. Também é proporcionado um método de indução de imunidade para uma infecção de vírus da gripe em um indivíduo. O método compreendendo administrar a partícula similar a vírus compreendendo uma proteína HA de vírus da gripe, um ou mais lipídeo de planta, e um transportador farmacologicamente aceitável. A partícula similar a vírus pode ser administrada a um indivíduo oralmente, intradermalmente, intranasalmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, ou subcutaneamente.

Composições de acordo com várias concretizações da invenção podem compreender VLPs de duas ou mais cepas da gripe ou subtipos. "Duas ou mais" refere-se a duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10 ou mais cepas ou subtipos. As cepas ou subtipos representadas podem ser de um subtipo simples (por exemplo, toda H1N1, ou toda H5N1), ou podem ser uma combinação de subtipos. Subtipo e cepas exemplares incluem, mas não estão limitados a, aqueles aqui descritos (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova York/1995, A/pato silvestre /DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/pato silvestre do hemisfério norte/MN/33/00, A/pato/Shanghai/1/2000, A/rabijunco do norte/TX/828189/02, A/Peru/Ontario/6118/68(H8N4), A/shoveler/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949(H10N7), A/pato/Inglaterra/56(H11N6),

A/pato/Alberta/60/76(H12N5), A/Pato silvestre /Maryland/704/77(H13N6), A/Pato silvestre do hemisfério norte/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/pato silvestre de cabeça preta/Suécia/5/99(H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1),
 5 A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Singapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong-kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong-kong/1073/99 (H9N2)).

10 A escolha de combinação de cepas e subtipos pode depender da área geográfica dos indivíduos provavelmente para serem expostos a gripe, proximidade de espécies de animal a uma população humana a ser imunizada (por exemplo, espécies de ave aquática, animais agrícolas tal como suíno, etc.) e as cepas que eles conduzem, são expostas a ou são
 15 provavelmente para serem expostos a prognósticos de subtipos antigênicos dentro de subtipos ou cepas, ou combinações destes fatores. Exemplos de combinações usadas nos anos passados são disponíveis (vide URL: [who.int/csr/doença/gripe/vacina/recomendações 1/en](http://who.int/csr/doença/gripe/vacina/recomendações/1/en)).

20 Algumas ou todas destas cepas podem ser empregadas nas combinações mostradas, ou em outras combinações, na produção de uma composição de vacina.

Mais particularmente, combinações exemplares podem incluir VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos selecionados a partir do grupo compreendendo: A/Brisbane/59/2007 (H1N1), um vírus similar a
 25 A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), um vírus similar a A/Brisbane/10/2007 (H3N2), B/Flórida/4/2006 ou um vírus similar a B/Flórida/4/2006.

30 Outra combinação exemplar pode incluir VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos selecionados a partir do grupo compreendendo A/Indonésia/5/2005, um vírus similar a A/Indonésia/5/2005, A/Vietnã/1194/2004, um vírus similar a A/Vietnã/1194/2004, A/Anhui/1/05, um vírus similar a A/Anhui/1/05, A/ganso/Guiyang/337/2006, vírus similar a

A/ganso/Guiyang/337/2006, A/galinha/Shanxi/2/2006, ou um vírus similar a A/galinha/Shanxi/2/2006. Outra combinação exemplar pode incluir VLPs de A/Galinha/Itália/13474/99 (H7 tipo) ou cepas de gripe de A/Galinha/British Columbia/04 (H7N3).

- 5 Outra combinação exemplar pode incluir VLPs de A/Galinha/Hong-kong/G9/97 ou A/Hong-kong/1073/99. Outra combinação exemplar pode compreender VLPs de A/Ilhas Salomão/3/2006. Outra combinação exemplar pode compreender VLPs de A/Brisbane/10/2007. Outra combinação exemplar pode compreender VLPs de A/Wisconsin/67/2005.
- 10 Outra combinação exemplar pode compreender VLPs das cepas ou subtipos B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006 ou B/Brisbane/3/2007.

As duas ou mais VLPs podem ser expressas individualmente, e as VLPs purificadas ou semipurificadas subsequentemente combinadas. Alternadamente, as VLPs podem ser coexpressas no mesmo hospedeiro, por exemplo, uma planta. As VLPs podem ser combinadas ou produzidas em uma proporção desejada, por exemplo, cerca de proporções equivalentes, ou podem ser combinadas de tal maneira que um subtipo ou cepa compreende a maioria das VLPs na composição.

15

Portanto, a invenção proporciona composições compreendendo VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos.

20

VLPs de vírus envelopados geralmente adquirem seu envelope a partir da membrana que elas originam. As membranas de plasma de planta têm um complemento de fitosterol que pode ter efeitos imunoestimulatórios. Para investigar esta possibilidade, VLPs H5 produzidas de planta foram administradas em animais na presença ou ausência de um adjuvante, e a HAI (resposta de anticorpo de inibição de hemaglutinação) determinada (Figuras 22A, 22B). Na ausência de VLPs H5 produzidas de planta adicionadas de adjuvante demonstra uma HAI significativa, indicativa de uma resposta imune sistêmica para administração do antígeno. Além disso, os perfis de isotipo de anticorpo de VLPs administradas na presença ou ausência de adjuvante são similares (Figura 23 A).

25

30

A Tabela 5 lista sequências providas em várias concretizações

da invenção.

Tabela 5: Descrição de sequência para identificadores de sequência.

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
1	Terminal-N H1 fragmento	Figura 5 a
2	Terminal-C H1 fragmento	Figura 5b
3	H5 sequência de codificação	Figura 6
4	iniciador Plato-443c	Figura 7a
5	iniciador SpHA(Ind)-Plasto.r	Figura 7b
6	iniciador Plasto-SpHA(Ind).c	Figura 7c
7	iniciador HA(Ind)-Sac.r	Figura 7d
8	Sequência do cassete de expressão baseado em alfafa plastocianina usado para a expressão de H1	Figura 1
9	HAI sequência de peptídeo (A/Nova Caledônia/20/99)	Figura 8a
10	HA5 sequência de peptídeo (A/Indonésia/5/2006)	Figura 8b
11	Gripe A Subtipo H7 sequência de codificação (A/galinha/Nova York/1995)	Figura 9
12	Gripe A Subtipo H2 sequência de codificação (A/pato silvestre de arenque/DE/677/88 (H2N8))	Figura 10a
13	Gripe A Subtipo H3 sequência de codificação (A/Texas/32/2003)	Figura 10b
14	Gripe A Subtipo H4 sequência de codificação (A/pato silvestre do hemisfério norte/MN/33/00)	Figura 10c
15	Gripe A Subtipo H5 sequência de codificação (A/pato/Shanghai/1/2000)	Figura 10d
16	Gripe A Subtipo H6 sequência de codificação (A/rabijunco do norte/TX/828189/02)	Figura 10e
17	Gripe A Subtipo H8 sequência de codificação (A/Peru/Ontario/6118/68(H8N4))	Figura 10f
18	Gripe A Subtipo H9 sequência de codificação (A/shoveler/Irã/G54/03)	Figura 10g

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
19	Gripe A Subtipo H10 sequência de codificação (A/galinha/Alemanha/N/1949(HiON 7))	Figura 10h
20	Gripe A Subtipo H11 sequência de codificação (A/pato/Inglaterra/56(H11N6))	Figura 10i
21	Gripe A Subtipo H12 sequência de codificação (A/pato/Alberta/60/76(H12N5))	Figura 10j
22	Gripe A Subtipo H13 sequência de codificação (A/Pato silvestre /Maryland/704/77(H13N6))	Figura 10k
23	Gripe A Subtipo H14 sequência de codificação (A/Pato silvestre do hemisfério norte/Gurjev/263/82)	Figura 10l
24	Gripe A Subtipo H15 sequência de codificação (A/pato/Austrália/341/83 (H15N8))	Figura 10m
25	Gripe A Subtipo H16 sequência de codificação (A/pato silvestre de cabeça preta/Suécia/5/99(H16N3))	Figura 10n
26	Gripe B HA sequência de codificação (B/Lee/40)	Figura 10o
27	Gripe C HA sequência de codificação (C/Johannesburg/66)	Figura 10p
28	Completa HAO H1 sequência	Figura 5c
29	Iniciador XmaI-pPlas.c	Figura 10q
30	Iniciador SacI-ATG-pPlas.r	Figura 10r
31	Iniciador SacI-PlasTer.c	Figura 10s
32	Iniciador EcoRI-PlasTer.r	Figura 10t
33	A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) GenBank Accession No. AY289929	Figura 16
34	M. Sativa proteína disulfide isomerase GenBank Accession No. Z11499	Figura 17
35	A/Porto Rico/8/34 (H1N1) GenBank Accession No. NC_002016.1	Figura 18

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
36	Clone 774: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de 59/2007 (H1N1)	Figura 28
37	Clone 775: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1)	Figura 29
38	Clone 776: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Brisbane 10/2007 (H3N2)	Figura 30
39	Clone 777: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	Figura 31
40	Clone 778: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de B/Malásia/2506/2004	Figura 32
41	Clone 779: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de B/Flórida/4/2006	Figura 33
42	Clone 780: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Singapura/1/57 (H2N2)	Figura 34

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
43	Clone 781: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Anhui/1/2005 (H5N1)	Figura 35
44	Clone 782: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	Figura 36
45	Clone 783: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Cerceta/Hong-kong/W312/97 (H6N1)	Figura 37
46	Clone 784: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Equino/Praga/56 (H7N7)	Figura 38
47	Clone 785: DNA de Dralll a SacI compreendendo região regulatória de plastocianina operativamente ligada a sequência que codifica HA de A/Hong-kong/107 3/99 (H9N2)	Figura 39
48	Clone 74 Sequência de aminoácido de HA A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	Figura 40A
49	Clone 775 HA sequência de aminoácido A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1)	Figura 40B
50	Clone 776 HA sequência de aminoácido A/Brisbane 10/2007 (H3N2)	Figura 41A
51	Clone 777 HA sequência de aminoácido A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	Figura 4 IB
52	Clone 778 HA sequência de aminoácido B/Malásia/2506/2004	Figura 42A
53	Clone 779 HA sequência de aminoácido B/Flórida/4/2006	Figura 42B

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
54	Clone 780 HA sequência de aminoácido /Singapura/1/57 (H2N2)	Figura 43A
55	Clone 781 HA sequência de aminoácido A/Anhui/1/2005 (H5N1)	Figura 43 B
56	Clone 782 HA sequência de aminoácido A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	Figura 44A
57	Clone 783 HA sequência de aminoácido A/Cerceta/Hong-kong/W312/97 (H6N1)	Figura 44B
58	Clone 784 HA sequência de aminoácido A/Equino/Praga/56 (H7N7)	Figura 45A
59	Clone 785 HA sequência de aminoácido A/Hong-kong/1073/99 (H9N2)	Figura 45B
60	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H5 de A/Indonésia/5/2005 (Construção # 660), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 51
61	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, hemaglutinina sequência de codificação of H1 de A/Nova Caledônia/20/1999 (Construção # 540) , alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 52
62	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H1 de A/Brisbane/59/2007 (construção #774), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 53

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
63	HA cassete de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H1 de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (construção #775), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 54
64	HA cassete de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H2 de A/Singapura/1/57 (H2N2) (construção # 780), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 55
65	HA cassete de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H5 de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (Construção* 781), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 56
66	HA cassete de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H5 de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (Construção # 782), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 57
67	HA cassete de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H6 de A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (Construção # 783), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 58

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
68	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H9 de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Construção #785), alfafa plastocianina 3' UTR e terminador de sequências	Figura 59
69	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H3 de A/Brisbane/10/2007 (H3N2), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 60
70	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H3 de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 61
71	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de H7 de A/Equino/Praga/56 (H7N7), alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 62
72	HA cassette de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de HA de B/Malásia/250672004, alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 63 - prognóstico

SEQ ID No	Descrição da Sequência	Na Revelação
73	HA cassete de expressão compreendendo promotor de alfafa plastocianina e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de HA de B/Flórida/4/2006, alfafa plastocianina 3' UTR e sequências terminadoras	Figura 64
74	Consenso de SEQ ID NO: 49,48, 33 e 9	Figura 65
75	Sequência de aminoácido de H1 Nova Caledônia (AAP34324.1) codificada por SEQ ID NO: 33	Figura 67
76	Sequência de aminoácido de H1 Porto Rico (NC_0409878.1) codificada por SEQ ID NO: 35	Figura 68

A invenção será agora descrita em detalhes por meio de referência somente aos seguintes exemplos não-limitativos.

Métodos e Materiais

1. Conjunto de cassetes de expressão

5 Todas as manipulações foram feitas usando os protocolos de biologia molecular gerais de Sambrook e Russell (2001; que é aqui incorporado por referência). A primeira etapa de clonagem consiste na montagem de um plasmídeo receptor contendo elementos regulatórios a montante e a jusante do gene de alfafa plastocianina. O promotor de plastocianina e

10 5'UTR sequências foram amplificados de DNA genômico de alfafa usando iniciadores de oligonucleotídeo XmaI-pPlas.c (SEQ ID NO: 29; Figura 10Q) e SacI-ATG-pPlas.r (SEQ ID NO: 30; Figura 10R). O produto de amplificação resultante foi digerido com XmaI e SacI e ligado em pCAMBIA2300 (Cambia, Canberra, Austrália), previamente digerido com as mesmas enzimas, para

15 criar pCAMBIApromo Plasto. Similarmente, as 3'UTR sequências e terminador do gene de plastocianina foram amplificados de DNA genômico de alfafa usando os seguintes iniciadores: SacI-PlasTer.c (SEQ ID NO: 31; Figura 10S) e EcoRI-PlasTer.r (SEQ ID NO: 32; Figura 10T), e o produto foi digerido com SacI e EcoRI antes de ser inserido nos mesmos locais de pCAMBI-

20 ApromoPlasto para criar pCAMBIAPlasto.

A estrutura de leitura aberta do H1 gene de cepa de Gripe A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) foi sintetizada em dois fragmentos (Planta Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canada). Um primeiro fragmento sintetizado corresponde a sequência de codificação H1 tipo selvagem (GenBank ace. No. AY289929; SEQ ID NO: 33; Figura 16) carecendo de sequência de codificação de peptídeo de sinal na 5' extremidade e a sequência de codificação de domínio de transmembrana na 3'extremidade. Um local de restrição BglIII foi adicionado na 5' extremidade da sequência de codificação e um local dual SacI/StuI foi adicionado imediatamente a jusante do códon de parada na 3' extremidade de terminal do fragmento, para produzir SEQ ID NO: 1 (Figura 5A). Um segundo fragmento que codifica a extremidade de terminal C da H1 proteína (compreendendo um domínio de transmembrana e cauda citoplásmica) a partir do local KpnI para o códon de parada, e flanqueada em 3' por locais de restrição SacI e StuI foi também sintetizada (SEQ ID NO. 2; Figura 5B).

O primeiro H1 fragmento foi digerido com BglIII e SacI e clonado nos mesmos locais de um vetor binário (pCAMBIAPlasto) contendo o promotor de plastocianina e 5'UTR fundido ao peptídeo de sinal de gene de alfafa proteína dissulfeto isomerase (PDI) (nucleotídeos 32-103; Accession No. Z11499; SEQ ID NO: 34; Figura 17) resultando em um gene quimérico PDI-H1 a jusante dos elementos regulatórios de plastocianina. A sequência do cassete baseado em plastocianina contendo o peptídeo de sinal PDI é apresentada na Figura 1 (SEQ ID NO:8). O plasmídeo resultante contém região de codificação H1 fundida ao peptídeo de sinal PDI e flanqueada pelos elementos regulatórios de plastocianina. A adição da região de codificação de extremidade de terminal C (que codifica o domínio de transmembrana e a cauda citoplásmica) foi obtida por inserção do fragmento sintetizado (SEQ ID NO: 2; Figura 5B) previamente digerida com KpnI e SacI, no plasmídeo de expressão H1. O plasmídeo resultante, denominado 540, é apresentado na Figura 11 (também vide Figura 2A).

2. Conjunto de cassete de expressão de H5

Um fragmento que codifica hemaglutinina de cepa de Gripe

A/Indonésia/5/05 (H5N1; Ace. No. LANLISDN125873) foi sintetizado por Epoch Biolabs (Sugar Land, TX, USA). O fragmento produzido, contendo a região de codificação completa de H5 incluindo o peptídeo de sinal nativo flanqueado por um local HindIII imediatamente a montante do ATG inicial, e
5 um local SacI imediatamente a jusante do códon de parada (TAA), é apresentado em SEQ ID NO: 3 (Figura 6). A região de codificação H5 foi clonada em um cassete de expressão baseado em plastocianina pelo método de ligação baseado em PCR apresentado em Darveau et al. (1995). Brevemente, uma primeira amplificação de PCR foi obtida usando iniciadores Plato-
10 443c (SEQ ID NO: 4; Figura 7A) e SpHA(Ind)-Plasto.r (SEQ ID NO:5; Figura 7B) e pCAMBIA promoPlasto como gabarito. Em paralelo, uma segunda amplificação foi realizada com iniciadores Plasto-SpHA(Ind).c (SEQ ID NO: 6; Figura 7C) e HA(Ind)-Sac.r (SEQ ID NO:7; Figura 7D) com fragmento de codificação de H5 como gabarito. A amplificação obtida de ambas reações
15 foram misturadas e a mistura serviu como gabarito para uma terceira reação (reação de agrupamento) usando Plato-443c (SEQ ID NO: 4; Figura 7A) e HA(Ind)-Sac.r (SEQ ID NO: 7; Figura 7D) como iniciadores. O fragmento resultante foi digerido com BamHI (no promotor de plastocianina) e SacI (na 3'extremidade do fragmento) e clonado em pCAMBIAPlasto previamente
20 digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, denominado 660, é apresentado na figura 2B (também vide Figura 11).

O cassete que codifica a forma solúvel de H1 foi preparado por substituição da região que codifica o domínio de transmembrana e a cauda citoplásmica no 540 por um fragmento que codifica o zipper de leucina zipper GCN4 p11 variante (Harbury et al., 1993, Science 1993; 262: 1401-
25 1407). Este fragmento foi sintetizado com flanqueamento de locais de KpnI e SacI para facilitar clonagem. O plasmídeo resultante desta substituição foi denominado 544 e o cassete de expressão é ilustrado na figura 11.

Uma fusão entre o vírus etch de tabaco (TEV)5'UTR e a estrutura de leitura aberta do gene da Gripe A/PR/8/34 MI (Ace. # NC_002016) foi
30 sintetizada com um flanqueamento de local SacI adicionado a jusante do códon de parada. O fragmento foi digerido com SwaI (no TEV 5'UTR) e SacI,

e clonado em um cassete de expressão baseado em 2X35S/TEV em um plasmídeo binário pCAMBIA. O plasmídeo resultante perfura a região de codificação M1 sob o controle de um promotor 2X35S/TEV e 5'UTR e o terminador NOS (construção 750; figura 11).

5 Uma construção HcPro (35HcPro) foi preparada conforme descrito em Hamilton et al. (2002). Todos os clones foram sequenciados para confirmar a integridade das construções.

Os plasmídeos foram usados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA) por eletroporação (Mattanovich et al., 1989). A integridade de todas as cepas *A. tumefaciens* foi confirmada por mapeamento de restrição.

3. Preparação de biomassa de planta, inoculum, agroinfiltração, e coleta

Plantas de Nicotiana benthamiana ou *Nicotiana tabacum* foram crescidas de sementes em superfícies planas preenchidas com um substrato de musgo de turfa comercial. As plantas foram permitidas crescerem na estufa sob um fotoperíodo 16/8 e um regime de temperatura de 25°C dia/20°C noite. Três semanas após semeadura, as plantinhas individuais foram captadas, transplantadas em potes e deixadas crescerem na estufa por três semanas adicionais sob as mesmas condições ambientais. Antes da transformação, mudas apicais e axilares foram removidas em vários momentos conforme indicado abaixo, ou por aperto das mudas a partir da planta, ou por tratamento químico da planta.

Agrobacterium transfectada com construções 660, 540, 544, 750 ou 35SHcPro foram crescidas em um meio YEB suplementado com ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfônico a 10 mM (MES), acetosiringone a 20 µM, 50 µg/ml de kanamicina e 25 µg/ml de carbenicillin pH 5,6 até eles alcançarem um OD600 entre 0,6 e 1,6. Suspensões de *Agrobacterium* foram centrifugadas antes de uso e ressuspensas em meio de infiltração (MgCl₂ a 10 mM e MES a 10 mM pH 5,6). Infiltração em seringa foi realizada conforme descrito por Liu e Lomonossoff (2002, *Journal of Virological Métodos*, 105:343-348). Para infiltração de vácuo, suspensões de *A. tumefaciens* foram centrifugadas, ressuspensas no meio de infiltração e armazenadas durante a noite a

4°C. No dia de infiltração, as bateladas de cultura foram diluídas em 2,5 volumes de cultura e permitidas aquecer antes de uso. As plantas totais de *N. benthamiana* ou *N. tabacum* foram colocadas de cabeça para baixo na suspensão bacteriana em um tanque de aço inoxidável hermético a ar sob um vácuo de 2,67 kPa a 5,14 kPa (20-40 Torr) por 2 min. Em seguida a infiltração de seringa ou vácuo, as plantas foram retornadas para a estufa por 4 a 5 dias de período de incubação até coleta.

4. Amostragem de folha e extração de proteína total

Em seguida à incubação, a parte aérea das plantas foi coletada, congelada a -80°C, trituradas em peças. As proteínas solúveis totais foram extraídas por homogeneização (Polytron) cada amostra de material triturado congelado de material de planta em 3 volumes de frio 50 mM de Tris pH 7,4, NaCl a 0,15 M, e fluoreto de fenilmetanossulfonila a 1 mM. Após homogeneização, as pastas fluidas foram centrifugadas a 20.000 g por 20 min a 4°C e estes extratos brutos clareados (sobrenadante) mantidos para análise. O teor de proteína total de extratos brutos clareados foi determinado por ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albumina de soro bovino como o padrão de referência.

5. Cromatografia de exclusão de tamanho de extrato de proteína

Gotas de alta resolução de colunas de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) de 32 ml Sephacryl® S-500 (S-500 HR : GE Healthcare, Uppsala, Suécia, Cat. No. 17-0613-10) foram acondicionadas e equilibradas tampão de equilíbrio/eluição (Tris a 50 mM pH8, NaCl a 150 mM). Um mililitro e meio de extrato de proteína bruto foi carregado na coluna, seguido por uma etapa de eluição com 45 ml de tampão de equilíbrio/eluição. A eluição foi coletada em frações de 1,5 ml de teor relativo de proteína de frações eluídas foi monitorado por mistura de 10 µL da fração com 200 µL de reagente de corante de proteína Bio-Rad diluído (Bio-Rad, Hercules, CA). A coluna foi lavada com 2 volumes de coluna de NaOH 0,2 N, seguido por 10 volumes de coluna de Tris a 50 mM pH8, NaCl a 150 mM, 20% de etanol. Cada separação foi seguida por uma calibração da coluna com Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). Os perfis de

eluição de Blue Dextran 2000 e proteínas solúveis hospedeiras foram comparados entre cada separação para assegurar uniformidade dos perfis de eluição entre as colunas usadas.

6. Análise de Proteína e "Imunoblotting"

5 As concentrações da proteína foram determinadas pelo ensaio de proteína BCA (Pierce Biochemicals, Rockport IL). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE sob condições de redução e manchadas com Coomassie Blue. Os géis manchados foram escaneados e análise de densitometria realizada usando-se ImageJ Software (NIH).

10 As proteínas de fração de eluição de SEC foram precipitadas com acetona (Bollag et al., 1996), ressuspensas em 1/5 volume em tampão de equilíbrio/eluição e separadas por SDS-PAGE sob condições de redução e eletrotransferidas em membranas de polivinileno difluoreto (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) para imunodeteção. Antes de
15 imunoblotting, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite escumado e 0,1% de Tween-20 em solução salina Tris-tamponada (TBS-T) por 16-18 horas a 4°C.

"Imunoblotting" foi realizado por incubação com um anticorpo adequado (Tabela 6), em 2 µg/ml em 2% de leite escumado em TBS-Tween
20 0,1%. Os anticorpos secundários usados para detecção de quimiluminescência foram conforme indicado na Tabela 4, diluídos conforme indicado em 2% de leite escumado em TBS-Tween 20 0,1 %. Complexos imunorreativos foram detectados por quimiluminescência usando luminol como o substrato
25 bano de anticorpo IgG humano foi efetuada pelo uso do kit de conjugação EZ-Link Plus® Peroxidase Ativada (Pierce, Rockford, IL).

Tabela 6: Condições de eletroforese, anticorpos, e diluições para "imunoblotting" de proteínas expressas.

HA Subtipo	Cepa de gripe	Condição de eletroforese	Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
H1	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	Redução	FII10-150	4 µg/ml	Cabra anti-mundongo (JIR 115-035-146)	1:100
H1	A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)	Redução	NIBSC 07/104	1:2000	Coelho anti-ovelha (JIR 313-035-045)	1:100
H1	A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)	Redução	FII 10-150	4 Ug/ml	Cabra anti-mundongo (JIR 115-035-146)	1:100
H2	A/Singapura/1/57 (H2N2)	Não-redução	NIBSC 00/440	1:1000	Coelho anti-ovelha (JIR 313-035-045)	1:100
H5	A/Indonésia/5/2005 (H5N1)	Redução	ITC IT-003-005V	1:4000	Cabra anti-Coelho (JIR 111-035-144)	1:100
H5	A/Anhui/1/2005 (H5N1)	Redução	NIBSC 07/338	1:750	Coelho anti-ovelha (JIR 313-035-045)	1:100

HA Subtipo	Cepa de gripe	Condição de eletroforese	Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
H5	A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	Não-redução	itc rr-003-005	1:2000	Cabra anti-Coelho (JIR 111-035-144)	1:100
H6	A/Cerceta/Hong Kong/W3 12/97 (H6N1)	Non-redução	BEINR 663	1:500	Coelho anti-ovelha (JIR 313-035-045)	1:100
H9	A/Hong Kong/107 3/99 (H9N2)	Redução	NIBSC 07/146	1:1000	Coelho anti-ovelha (JIR 313-035-045)	1:10 000

FII: Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA;

NISBIC: National Institute for Biological Standards e Control;

JIR: Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA;

BEINR: Biodefense e emerging infections research resources

5 repository;

ITC: Immune Technology Corporation, Woodside, NY, USA;

Ensaio de hemaglutinação para H5 foi baseado em um método descrito por Nayak. e Reichl (2004). Brevemente, diluições duplas em série das amostras de teste (100 µL) foram feitas em placas de microtitulação de 10 96 cavidades de fundo em V contendo 100 µL de PBS, deixando 100 µL de amostras diluídas por cavidade. Cem microlitros de uma suspensão de células de sangue vermelhas de peru 0,25% (Bio Link Inc., Syracuse, NY) foram adicionados a cada cavidade, e as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. A recíproca da diluição mais alta mostrando hemaglu-
15 tinação completa registrada como atividade de HA. Em paralelo, um padrão de HA recombinante (A/Vietnã/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) foi diluído em PBS e operado como um controle em cada

placa.

7. Ultracentrifugação de gradiente de sacarose

Um mililitro de frações 9, 10 e 11 eluiu a partir de cromatografia de filtração de gel em biomassa contendo H5 foram reunidas, carregadas em
5 um gradiente de densidade de sacarose descontínua de 20-60% (p/v), e centrifugadas 17,5 horas a 125 000 g (4°C).

O gradiente foi fracionado em 19 3-ml de frações começando da parte superior, e dializado para remover sacarose antes da análise imunológica e ensaios de hemaglutinação.

10 8. Microscopia de elétron

Frações de eluição de SEC a serem observadas por microscopia de elétron (EM) foram primeiro concentradas usando-se 30 MWCO de unidades de ultrafiltração (Millipore, Billerica, MA, USA). As frações concentradas foram fixadas em PBS pH 7,4 contendo 2% de glutaraldeído por 24 horas a 4°C. Uma vez fixadas, as amostras foram adsorvidas em grades de níquel de malha 200 revestidas com Formvar (Canemco, Lakefield, Canada)
15 por 2 min, e as grades foram lavadas duas vezes com água deionizada antes de serem manchadas em 1% de ácido fosfotungstênico. A observação foi realizada sob transmissão de microscopia de elétron em ampliações variando de 10.000X a 150.000X (para imagens nas Figuras 4A e 4B).
20

Alternadamente, cem microlitros das amostras a serem examinadas foram colocadas em um tubo de centrifugação Airfuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Uma grade foi colocada no fundo do tubo que foi então centrifugado 5 min a 120 000 g. A grade foi removida, brandamente
25 secada, e colocada em uma gota de 3% de ácido fosfotungstênico a pH 6 para manchamento. As grades foram examinadas em um microscópio de elétron de transmissão Hitachi 7100 (TEM) (para imagens nas Figuras 14B, 15B e 15C).

Para imagens na Figura 19, blocos de Folha de aproximadamente 1 mm³ foram fixados em PBS contendo 2,5% de glutaraldeído e lavados em PBS contendo 3% de sacarose antes de uma etapa de pós-fixação em 1,33% de tetróxido de ósmio. Amostras fixadas foram embutidas em resina
30

Spurr e camadas ultradelgadas foram assentadas em uma grade. As amostras foram positivamente manchadas com 5% de uranil acetato e 0,2% de citrato de chumbo antes da observação. As grades foram examinadas em um microscópio de elétron de transmissão Hitachi 7100 (TEM).

5 9. Análise de lipídeo de membrana de plasma

Membranas de plasma (PM) foram obtidas de folhas de tabaco e células BY2 cultivadas após fracionamento de célula de acordo com Mongrand *et al.* por divisão de um sistema de duas fases de polímero aquoso com polietileno glicol 3350/dextran T- 500 (6,6% cada). Todas as etapas foram realizadas a 4 °C. Os lipídeos foram extraídos e purificados de frações diferentes de acordo com Bligh e Dyer. Lipídeos polares e neutros foram separados por HP-TLC monodimensional usando os sistemas de solvente descritos em Lefebvre *et al.*

Os lipídeos de frações de PM foram detectados após mancha-mento com acetato de cobre conforme descrito por Macala *et al.* Os lipídeos foram identificados por comparação de seu tempo de migração com aqueles de padrões (todos os padrões foram obtidos de Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, exceto para SG que foi obtido de Matreya, Pleasant Gap, PA, USA).

10. Purificação de H5 VLP

660 folhas infiltradas congeladas de *N. benthamiana* foram homogeneizadas em 1,5 volumes de 50 mM de Tris pH 8, NaCl 150 mM e 0,04% de sódio meta-bisulfeto usando um misturador comercial. O extrato resultante foi suplementado com 1 mM de PMSF e ajustado a pH 6 com ácido acético 1 M antes de ser aquecido a 42°C por 5 min. Terra diatomácea (DE) foi adicionada ao extrato tratado com calor para adsorver os contaminantes precipitados pela alteração do pH e tratamento de calor, e a pasta fluida foi filtrada através de um filtro de papel Whatman. O extrato clareado resultante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minuto à temperatura ambiente para remover DE residual, passado através de 20 filtros 0.8/0.2 urn Acropack e carregado em uma coluna de afinidade de fetuin-agarose (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Em seguida a etapa de lavagem em 400 mM de NaCl, 25 mM de Tris pH 6, proteínas ligadas foram eluídas com 1,5 M NaCl,

50 mM de MES pH 6. A VLP eluída foi suplementada com Tween-80 a uma concentração final de 0,0005% (v/v). A VLP foi concentrada em uma membrana de 100 kDa MWCO Amicon, centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e ressuspensa em PBS pH 7,4 com 0,01% de Tween-80 e 0,01% de timerosal. As VLPs suspensas foram filtradas-esterilizadas antes de uso.

11. Estudos de animal

Camundongos

Estudos na resposta imune a administração de VLP de Gripe foram realizados com camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas de idade (Charles River Laboratories). Setenta camundongos foram aleatoriamente divididos em quatorze grupos de cinco animais. Todos os grupos foram usados para imunização intramuscular e seis grupos foram usados para testar rota intranasal de administração. Todos os grupos foram imunizados em um regimento de duas doses, a imunização de impulso sendo feita 3 semanas em seguida a primeira imunização.

Para administração intramuscular em pernas de corça, camundongos não-anestesiados foram imunizados com a vacina VLP H5 produzida de planta (0,1, 1, 5 ou 12 corte), ou um antígeno (HA) de hemaglutinina de controle. O HA de controle compreende hemaglutinina solúvel recombinante produzida baseada na cepa A/Indonésia/5/05 H5N1 e purificado de 293 culturas de célula (Immune Technology Corp., Nova York, USA) (usada a 5 µg por injeção a menos que de outro modo indicado). Controle de tampão foi PBS. Estes antígeno consiste de aminoácidos 18-530 da proteína de HA, e tem uma His-etiqueta e um local de clivagem modificado. A microscopia de elétron confirmou que este produto comercial não está na forma de VLPs.

Para medir o efeito de adjuvante, dois grupos de animais foram imunizados com 5 µg de vacina de VLP H5 produzida por planta mais um volume Alhidrogel 2% (alume, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US) ou com 5 µg de hemaglutinina recombinante purificada de 293 culturas de célula mais 1 volume de alume. Setenta camundongos foram aleatoriamente divididos em quatorze grupos de cinco animais. Oito grupos foram usados para imunização intramuscular e seis grupos foram

usados para testar rota intranasal de administração. Todos os grupos foram imunizados de acordo com um regime de impulso, a imunização de impulso realizada 3 semanas em seguida a primeira imunização.

5 Para administração intramuscular em pernas de corça, camundongos não-anestesiados foram imunizados com a VLP H5 produzida de planta (0,1, 1, 5 ou 12 µg), ou o antígeno de hemaglutinina de controle (HA) (5 µg) ou PBS. Todas as preparações de antígeno foram misturadas com Alhidrogel 1% (alume, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US) em uma proporção de volume de 1:1 antes das imunizações. Para
10 medir o efeito de adjuvante, dois grupos de animais foram imunizados com ou 5 vacina de VLP H5 produzida de planta de corte ou com 5 µg de antígeno de HA de controle sem qualquer adjuvante.

Para administração intranasal, camundongos foram brevemente anestesiados por inalação de isoflurano usando uma câmara de indução automática. Eles foram em seguida imunizados por adição de 4 µl de gota/nostiril com a vacina de VLP produzida de planta (0,1 ou 1 µg), ou com antígeno de HA de controle (1 µg) ou com PBS. Todas as preparações de antígeno foram misturadas com chitosan glutamato 1% (Protosan, Novamatrix/ FMC BioPolymer, Norway) antes das imunizações. Os camundongos em
15 seguida respiraram nas soluções. Para verificar o efeito de adjuvante com a rota intranasal de administração, dois grupos de animais foram imunizados com 1 µg de vacina de VLP H5 produzida de plantas ou com 1 µg de antígeno HA de controle.
20

Furões

25 Dez grupos de 5 furões (macho, 18-24 semanas de idade, massa de aproximadamente 1 kg) foram usados. O tratamento para cada grupo é conforme descrito na Tabela 7. O adjuvante usado foi Alhidrogel (alume) (Superfos Biosector, Denmark) 2% (final=1%). A composição de vacina foi VLPs de A/Indonésia/5/05 (H5N1) associadas a membrana produzidas conforme descrito. O controle de vacina (controle positivo) foi um recombinante de H5 ligado a membrana glicosilado de cepa de Indonésia produzida usando-se adenovírus em 293 culturas de célula por Immune Technology
30

Corporation (ITC).

Tabela 7. Grupos de tratamento

Grupo	n	Produto injetado aos animais	Rota de administração	Adjuvante
1	5	PBS (controle negativo)	i.m.*	-
2	5	Vacina-planta, 1 µg	i.m.	-
3	5	Vacina-planta, 1 µg	i.m.	Alume
4	5	Vacina-planta, 5 µg	i.m.	-
5	5	Vacina-planta, 5 µg	i.m.	Alume
6	5	Vacina-planta, 7.5 µg	i.m.	-
7	5	Vacina-planta, 15 µg	i.m.	-
8	5	Vacina-planta, 15 µg	i.m.	Alume
9	5	Vacina-planta, 30 µg	i.m.	-
10	5	Vacina-controle, 5 µg	i.m.	-

i.m.: intramuscular

Os furões foram avaliados para saúde total e aparência (peso corpóreo, temperatura retal, postura, pele, modelos de movimento, respiração, excremento) regularmente durante o estudo. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular (0,5-1,0 de volume total) em quadríceps no dia 0, 14 e 28; para protocolos incorporando adjuvante, a composição de vacina foi combinada com Alhidrogel imediatamente antes da imunização em uma proporção de volume de 1:1). As amostras de soro foram obtidas no dia 0 antes da imunização, e no dia 21 e 35. Os animais foram sacrificados (anemia/perfuração cardíaca) nos dias 40-45, e, os baços foram coletados e necropsia realizada.

As titulações de anticorpo antigripe podem ser quantificadas em ensaios ELISA usando-se vírus H5N1 homólogos ou heterólogos inativados.

As titulações de anticorpo inibitórias de hemaglutinação de amostras de soro (pré-imune, dia 21 e dia 35) foram avaliadas por HAI de microtitulação conforme descrito (Aymard et al 1973). Brevemente, os soros foram pré-tratados com enzima de destruição de receptor, inativados com calor e misturados com uma suspensão de eritrócitos (células de sangue vermelhas lavadas-RBC). RBC lavado de cavalo (10%) de Lampire são re-

comendados e considerando-se que o ensaio pode variar dependendo da fonte do RBC (cavalo-dependente), RBCs lavados de 10 cavalos foram testados para selecionar a batelada mais sensível. Alternadamente, RBC de peru pode ser usado. A titulação de anticorpo foi expressa como a recíproca da diluição mais alta que inibe completamente hemaglutinação.

Titulações de HAI reativa cruzada: As titulações de HAI de fures imunizados com uma vacina para a A/Indonésia/5/05 (clade 2.1) foram medidas usando-se cepas inativadas de H5N1 da gripe de outra subclade ou clade tal como a clade 1 Vietnã cepas A/Vietnã/1203/2004 e A/Vietnã/1194/2004 ou a A/Anhui/01/2005 (subclade 2.3) ou a A/peru/Turkey/1/05 (subclade 2.2). Todas as análises foram realizadas nas amostras individuais.

Análise de dados: Análise estatística (ANOVA) será realizada em todos os dados para estabelecer se diferenças entre grupos são estatisticamente significantes.

Desenho experimental para desafio letal (camundongos)

Cento e vinte e oito camundongos foram aleatoriamente divididos em dezesseis grupos de oito animais, um grupo sendo não-imunizado então desafiado (controle negativo). Todos os grupos foram imunizados via administração intramuscular em um regime de duas doses, a segunda imunização sendo feita duas semanas em seguida a primeira imunização.

Para administração intramuscular em pernas de cervo, camundongos não-anestesiados foram imunizados com a H5 VLP produzida de planta (1, 5 ou 15 µg), ou 15 µg de antígeno de controle HA ou PBS. Todas as preparações de antígeno foram misturadas com um volume de Alhidrogel 1% antes das imunizações (alume, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US).

Durante o período de imunização, os camundongos foram pesados uma vez em uma semana e observados e monitorados para reações locais no local de injeção.

Vinte e dois dias em seguida a segunda imunização, os camundongos anestesiados foram desafiados intranasalmente (i.n.) em um labora-

tório contendo BL4 (P4-Jean Merieux-INSERM, Lyon, France) com $4,09 \times 10^6$ 50% dose infectiva de cultura de célula (CCID50) de vírus da Gripe A/Turkey/582/06 (gentilmente fornecido por Dr. Bruno Lina, Lyon University, Lyon, France). Em seguida ao desafio, os camundongos foram observados para todos os sintomas clínicos e pesados diariamente, sobre um período de quatorze dias. Os camundongos com sintomas de infecção severos e perda de peso de >25% foram eutanizados após anestesia.

Coleta de sangue, lavagens de pulmão e nasal e coleta de baço

Coleta de sangue de veia safenosa foi realizada quatorze dias após a primeira imunização e quatorze dias após segunda imunização no animal não-anestesiado. O soro foi coletado por centrifugação a 8000 g por 10 min.

Quatro semanas após segunda imunização, os camundongos foram anestesiados com gás CO₂ e imediatamente após terminação, punção cardíaca foi usada para coletar sangue. Após sangria final, um cateter foi inserido na traquéia nos pulmões e um ml de solução de coquetel de inibidor de PBS-protease frio foi posto em uma seringa lcc fixada ao cateter e injetado nos pulmões e, em seguida, removido para análise. Este procedimento de lavagem foi realizado duas vezes. As lavagens do pulmão foram centrifugadas para remover fragmentos celulares. Para lavagens nasais, um cateter foi inserido na área nasal e 0,5 ml da solução de coquetel de inibidor de PBS-protease foi puxado através do cateter nas passagens nasais e, então, coletada. As lavagens nasais foram centrifugadas para remover fragmentos celulares. A coleta de baço foi realizada em camundongos imunizados intramuscularmente com 5 µg de vacina produzida de planta com adjuvante, ou 5 µg de antígeno de H5 recombinante com adjuvante, bem como em camundongos imunizados intranasalmente com 1 µg de cavina produzida de planta com adjuvante, ou 1 µg de antígeno de H5 recombinante com adjuvante. Os baços coletados foram colocados em RPMI suplementado com gentamycin e misturado em um tubo cônico de 50 ml com êmbolo de uma seringa de 10 ml. Os baços misturados foram enxaguados 2 vezes e centrifugados a 2000 rpm por 5 min e ressuspensos em tampão de lisação de

ACK por 5 min à temperatura ambiente. Os esplenócitos foram lavados em PBS-gentamicin, ressuspensos em 5% de RPMI e contados. Os esplenócitos foram usados para ensaio de proliferação.

Titulações de anticorpo

5 As titulações de anticorpo de antigripe de soro foram medidas nos 14 dias após a primeira imunização, bem como 14 e 28 dias após a segunda imunização. A titulação foi determinada por ensaio imunosorvente ligada por enzima (ELISA) usando o vírus inativo A/Indonésia/5/05 como o antígeno de revestimento. As titulações de ponto terminal foram expressas
10 como o valor recíproco da diluição mais alta que alcançou um valor OD de pelo menos 0,1 mais alto do que aquele de amostras de controle negativo.

Para determinação da classe de anticorpo (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM), as titulações foram avaliadas por ELISA conforme anteriormente descrito.

15 Titulações de inibição de hemaglutinação (H1)

As titulações de inibição de hemaglutinação (H1) de soro foram medidas nos 14 e 28 dias após a segunda imunização conforme anteriormente descrito (WHO 2002; Kendal 1982). Preparações de vírus inativadas de cepas A/Indonésia/5/05 ou A/Vietnã/1203/2004 foram usadas para testar
20 amostras de soro de camundongo para atividade de H1. Os soros foram pré-tratados com enzima II de destruição de receptor (RDE II) (Denka Seiken Co., Tokyo, Japão) preparados de *Vibrio cholerae* (Kendal 1982). Os ensaios de H1 foram realizados com 0,5% de células de sangue vermelhas de peru. As titulações de anticorpo de H1 foram definidas como a recíproca da diluição
25 ção mais alta causando inibição completa de aglutinação.

Exemplos

Exemplo 1: Expressão transiente de vírus da gripe A/Indonésia/5/05 (H5N1)hemaglutinina por agroinfiltração em plantas *N. benthamiana*

A capacidade do sistema de expressão transiente para produzir
30 hemaglutinina da Gripe foi determinada através da expressão do subtipo H5 de cepa A/Indonésia/5/05 (H5N1). Conforme apresentado na Figura 11, a sequência de codificação de gene de hemaglutinina (Ace. N° EF541394),

com seu peptídeo de sinal nativo e domínio de transmembrana, foi primeiro montado no cassete de expressão de plastocianina - promotor, 5'UTR, 3'UTR e sequências de terminação de transcrição a partir o gene de alfafa plastocianina - e o cassete montado (660) foi inserido em um plasmídeo binário de pCAMBIA. O plasmídeo foi, em seguida, transfectado em *Agrobacterium* (AGL1), criando a cepa recombinante AGL1/660, que foi usada para expressão transiente.

Plantas de N. benthamiana foram infiltradas com AGL1/660, e as folhas foram coletadas após um período de incubação de seis dias. Para determinar se H5 se acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída de tecido de folha infiltrado e analisada por Western blotting usando anticorpos policlonais anti-H5 (Vietnã). Uma faixa única de aproximadamente 72 kDa foi detectada em extratos (Figura 12), correspondendo ao tamanho para a forma não-clivada de HA0 de hemaglutinina da gripe. O H5 comercial usou como controle positivo (A/Vietnã/1203/2004; Protein Science Corp., Meriden, CT, USA) foi detectado como duas faixas de aproximadamente 48 e 28 kDa, correspondendo ao peso molecular de fragmentos de HA1 e HA2, respectivamente. Isto demonstra que expressão de H5 em folhas infiltradas resulta no acúmulo do produto de translação não-clivado.

A formação de trímero de HA ativos foi demonstrada pela capacidade de extratos de proteína brutos de folhas transformadas por AGLI/660 para aglutinar células de sangue vermelhas de peru (dados não-mostrados).

Exemplo 2: Caracterização de estruturas contendo hemaglutinina em extratos de planta usando cromatografia de exclusão de tamanho

O conjunto de hemaglutinina produzido por planta da gripe em estruturas de alto peso molecular foi avaliado por filtração de gel. Extratos de proteína brutos de plantas infiltradas com AGLI/660 (1,5 ml) foram fracionados por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em colunas de Sephacryl® S-500 HR (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). Frações de eluição foram ensaiadas por seu teor de proteína total e para abundância de HA usando-se imunodeteção com anticorpos anti-HÁ (Figura 13A). Conforme mostrado na Figura 13A, eluição de Blue Dextran (2

MDa) em pico anterior em fração 10 enquanto a massa de proteínas hospedeiras foi retida na coluna e eluída entre frações 14 e 22. Quando proteínas de 200 µL de cada fração de eluição de SEC foram concentradas (5 vezes) por precipitação de acetona e analisadas por Western blotting (Figura 15A, H5), hemaglutinina (H5) foi principalmente encontrada em frações 9 a 14 (Figura 13B). Sem desejar estar ligado pela teoria, isto sugere que a proteína HA tinha, ou montado em uma superestrutura grande, ou que tinha fixado a uma estrutura de peso molecular alto.

Um segundo cassete de expressão foi montado com a sequência de ácido nucleico de H1 de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (SEQ ID NO: 33; Figura 16; GenBank Accession No. AY289929) para produzir construção 540 (Figura 11). Uma construção de gene quimérico foi designada de modo a produzir uma forma trimérica solúvel de H1 em que o peptídeo de sinal originado de um gene de proteína de planta disulfeto isomerase, e o domínio de transmembrana de H1 foi substituído pela variante pll do zipper de leucina GCN4, um peptídeo mostrado para automontar em trímico (Harbury et al., 1993) (cassete 544, figura 11). Embora carecendo de domínio de transmembrana, esta forma trimérica solúvel foi capaz de hemaglutinação (dados não-mostrados).

Extratos de proteína de plantas infiltradas com AGL1/540 ou AGL1/544 foram fracionados por SEC e a presença de frações eluídas de H1 foi examinada por Western blotting com anticorpos A antigripe (Fitzgerald, Concord, MA, USA). Em folhas infiltradas de AGL1/540, H1 se acumulou principalmente como uma estrutura de peso molecular muito alta, com o pico inclinado para as estruturas de tamanho menores (H1; Figura 13C). Em folhas infiltradas de AGL1/544, a forma solúvel de H1 se acumulou como trímico isolados conforme demonstrado pelo modelo de eluição de filtração de gel que fica paralelo ao perfil de eluição de proteína hospedeira (H1 solúvel; Figura 13D). Em comparação, invólucros de H1 (Proteína Science Corp., Meriden, CT, USA), consistindo em micelas de 5-6 trímico de hemaglutinina eluidos em frações 12 a 16 (Figura 13E), mais cedo do que a forma solúvel de H1 (Figura 13D) e mais tarde do que a H1 nativa (Figura 13C).

Para avaliar o impacto de coexpressão de M1 em conjunto de hemaglutinina em estrutura, um cassete de expressão de M1 foi montado usando-se ácido nucleico correspondente a sequência de codificação do A/PR/8/34 (H1N1) M1 (SEQ ID NO: 35; Figura 18; GenBank Accession Nº NC_002016). A construção foi denominada 750 e é apresentada na Figura 11. Para a coexpressão de M1 e H1, suspensões de AGL1/540 e AGL1/750 foram misturadas em volume igual antes da infiltração. A co-infiltração de suspensões múltiplas de *Agrobacterium* permite coexpressão de transgene múltiplo. A análise de Western blot de frações de SEC de eluição mostra que a coexpressão de M1 não modifica o perfil de eluição das estruturas de H1, mas resultou em uma diminuição em acúmulo de H1 nas folhas agroinfiltradas (vide Figura 13F).

Exemplo 3: Isolamento de estruturas de H5 por centrifugação em gradiente de sacarose e observação sob microscopia de elétron

A observação de estrutura de hemaglutinina sob microscopia de elétron (EM) requereu uma concentração e nível de pureza mais alto do que aquele obtido de SEC em extratos de proteína de folha crua. Para permitir observação de EM de estruturas de H5, um extrato de proteína de folha crua foi primeiro concentrado por precipitação de PEG (20% PEG), seguido por ressuspensão em volumes 1/10 de tampão de extração. O extrato de proteína concentrado foi fracionado por filtração de gel de S-500 HR e frações de eluição 9, 10, e 11 (correspondendo ao volume de vazio da coluna) foram reunidas e adicionalmente isoladas de proteínas hospedeiras por ultracentrifugação em um gradiente de densidade de sacarose 20-60%. O gradiente de sacarose foi fracionado começando do topo, e as frações foram dialisadas e concentradas em uma unidade de filtro centrífuga 100 NMWL antes da análise. Conforme mostrado nos Western blots e resultados de hemaglutinação (Figura 14A), H5 se acumulou principalmente em frações 16 a 19 que continham \approx 60% sacarose, pelo que muitas das proteínas hospedeiras de picos em fração 13. As frações 17, 18, e 19 foram reunidas, manchadas negativamente, e observadas sob Exame de EM. da amostra que demonstrou claramente a presença de estruturas esféricas perfuradas variando em tamanho

de 80 a 300 cursos que se equiparam as características morfológicas de VLPs da Gripe (Figura 14B).

Exemplo 4: Purificação de VLPs H5 da Gripe de biomassa de planta

Em adição a um teor abundante de proteínas solúveis, extratos
5 de folha de planta contêm uma mistura complexa de açúcares solúveis, ácidos nucleicos e lipídeos. O extrato bruto foi clareado por uma alteração de pH e tratamento de calor, seguido por filtração em terra diatomácea (vide seção de Material e método para uma descrição detalhada do método de clareamento). A Figura 15A (raias 1-4) apresenta um teor de proteína comparando gel manchado de Coomassie Blue nas várias etapas de clareamento. Uma comparação de teor de proteína no extrato bruto (raia 1) e no extrato clareado (raia 4) revelam a capacidade das etapas de clareamento de reduzir o teor de proteína global e remover muito do contaminante maior visível em 50 kDa em extratos de folha crua. A faixa de 50 kDa corresponde a
10 subunidade grande RuBisCO, representando até 30% de proteínas de folha totais.

As H5 VLPs da gripe foram purificadas destes extratos clareados por cromatografia de afinidade em uma coluna de fetuin. Uma comparação da fração de carga (Figura 15A, raia 5) com o fluxo através (Figura 15A, raia
20 6) e as VLPs eluídas (Figura 15A, raia 7) demonstram a especificidade da coluna de afinidade de fetuin para H5 VLPs de Gripe em extrato de planta clareado.

O procedimento de purificação resultou em mais de 75% de pureza em H5, conforme determinado por densitometria no gel de Coomassie
25 Blue manchado SDS-PAGE (Figura 15A, raia 7). De modo a avaliar a qualidade estrutural do produto purificado, a H5 purificada foi concentrada em uma unidade de filtro centrífuga de 100 NMWL (limite de peso nominal molecular) e examinada sob EM após manchamento negativo. A Figura 15B mostra um setor representativo mostrando a presença de VLPs profusas. Um
30 exame mais próximo confirmou a presença de picos nas VLPs (figura 15C).

Conforme mostrado na Figura 15D, H5 VLPs foram purificadas para aproximadamente 89% de pureza de extrato de folha clareado por cro-

matografia de afinidade em uma coluna de fetuin, baseado na densidade do Coomassie Blue manchado H5 hemaglutinina e na determinação do teor de proteína total pelo método de BCA.

5 A bioatividade de HA VLPs foi confirmada por sua capacidade de aglutinar células de sangue vermelhas de peru (dados não-mostrados).

A Figura 20B também confirma a identidade da VLP purificada visualizada por Western blotting e imunodeteccção com um soro policlonal de anti-H5 (A/Vietnã/1203/2004). Uma faixa única de aproximadamente 72 kDa é detectada e corresponde em tamanho a forma de HA0 não-clivada de he-
10 maglutinina da gripe. A Figura 15c mostra a estrutura de VLP da vacina com os picos de hemaglutinina cobrindo sua estrutura.

As VLPs foram formuladas para imunização de camundongos por filtração através de um filtro de 0,22 μm ; teor de endotoxin foi medido durante um kit de deteccção de endotoxin LAL (Limulus Amebocyte Lysate)
15 (Lonza, Walkersville, MS, USA). A vacina filtrada contenha $105,8 \pm 11,6\%$ EU/ml (unidades de endotoxin/ml).

Exemplo 5: Localização de VLPs de Gripe em plantas

Para localizar as VLPs e confirmar sua origem de membrana de plasma, seções de folhas delgadas de plantas de produção de H5 foram fi-
20 xadas e examinadas sob TEM após manchamento positivo. A observação de células de folha indica a presença de VLPs em cavidades extracelulares formadas pela invaginação da membrana de plasma (Figura 19). A forma e posição das VLPs observadas demonstram que apesar da aposição de suas membranas de plasmas na parede de célula, as células de planta têm a
25 plasticidade requerida para produzir VLPs da Gripe derivadas de sua membrana de plasma e a acumula no espaço apoplástico.

Exemplo 6: Análise de lipídeo de membrana de plasma

Adicionalmente a confirmação da composição e origem das VLPs da Gripe de planta foram obtidas de análise do teor de lipídeo. Os lipí-
30 deos foram extraídos de VLPs purificadas e sua composição foi comparada àquela de membranas de plasma de tabaco altamente purificadas por cromatografia de camada delgada de desempenho (HP-TLC). Os modelos de

migração de lipídeos polares e neutros de VLPs e controle de membranas de plasma foram similares. As VLPs purificadas continham os fosfolipídeos maiores (fosfatidilcolina e fosfatidilethanolamina) e esfingolipídios (glucosilceramida) encontrados na membrana de plasma (Figura 27A), e ambas continham esteróis livres como os lipídeos neutros somente (Figura 27B). Contudo, a imunodeteção de um marcador de proteína de membrana de plasma (ATPase) em extratos de VLP purificados mostrou que a bicamada de lipídeo de VLP não contém uma das maiores proteínas associadas com membranas de plasma de planta, sugerindo que proteínas hospedeiras podem ter sido excluídas das membranas durante o processo de origem das VLPs a partir das células de planta (Figura 27C).

Exemplo 7: Imunogenicidade das H5 VLPs e efeito de rota de administração

Os camundongos foram administrados com H5 VLPs produzidas por planta por injeção intramuscular, ou intranasal (inalação). 0,1 a 12 µg de VLPs foram injetados intramuscularmente nos camundongos, com alume como um adjuvante, de acordo com os métodos descritos. As titulações de anticorpo de pico foram observadas com a quantidade de antígeno mais baixa, em uma grandeza similar àquela de 5 µg de hemaglutinina solúvel recombinante (HA) (Figura 20A).

0,1 a 1 µg de H5 VLPs produzidas de planta foram administrados intranasalmente com um adjuvante chitosan provido para uma resposta de anticorpo maior do que aquela do HA solúvel recombinante com um adjuvante de alume (Figura 20B).

Para ambas as rotas de administração, e sobre uma faixa de quantidades de antígeno, soroconversão foi observada em todos os camundongos testados. O antígeno solúvel de H5 recombinante conferiu baixas (<1/40) ou razoáveis (1<1/10 para o H5 recombinante não-adjuvante) titulações de H1.

Exemplo 8: Titulação de anticorpo de inibição de hemaglutinação (HAI) H5 VLP

As Figura 21 A, B ilustram a resposta de anticorpo de inibição de hemaglutinação (HAI) 14 dias em seguida a um "impulso" com H5 VLP pro-

duzida de planta, ou HA solúvel recombinante. A dose mais baixa de antígeno (0,1 µg) quando administrada intramuscularmente produziu uma resposta de HAI superior para uma administração maior do que 10 vezes (5 µg) de HÁ solúvel recombinante. As doses aumentadas de H5 VLP proporcionaram um aumento modesto em HAI sobre a dose mais baixa.

A resposta de HAI em seguida a administração intranasal foi significativamente aumentada em camundongos administrados com H5 VLPs produzidas de planta (1,0 ou 0,1 µg) comparado aquelas administradas com 1 µg de HA solúvel recombinante, que foi similar ao controle negativo. Todos os camundongos imunizados por injeção intramuscular de H5 VLPs (de 0,1 a 12 µg) tinham titulações de HAI mais altas do que camundongos imunizados com o antígeno de HA de controle (Figura 4a - agora 21 A). Para a mesma dose de 5 µg, VLPs induziram titulações de HAI 20 vezes mais altas do que a dose correspondente do antígeno de controle de HA. As VLPs também induziram titulações de HAI significativamente mais altas do que o antígeno de HA de controle quando distribuído através da rota intranasal (Figura 21b). Para uma dada dose de H5 VLP, os níveis de titulações de HAI foram mais baixos em camundongos imunizados intranasalmente do que para camundongos imunizados intramuscularmente; 1 µg de VLP induziu uma titulação de HAI média de 210 quando administrada i.m. enquanto a mesma dose induziu uma titulação de HAI media de 34 administrada i.n..

Quando administradas intramuscularmente, todas as doses de VLPs induziram alto nível de anticorpos capazes de ligação homóloga aos vírus inativados totais (Figuras 20b e 24). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a vacina de VLP produzida de planta e o antígeno de HA de controle (exceto o grupo de VLP de 12 µg 14 dias após impulso), conforme ambas preparações de antígeno induzem alta ligação de titulações de anticorpo contra a cepa homóloga. Contudo, quando administradas intranasalmente, as VLPs induziram ligação mais alta de titulações de anticorpo do que o antígeno de HA de controle (Figura 20b). Quando misturada com Chitosan, a imunização com um micrograma de VLP induziu uma titulação média recíproca Ab de 5 500, 8,6 vezes mais alta do que o nível encontrado em

camundongos imunizados com 1 µg do antígeno de HA de controle (titulação Ab média recíproca de 920).

A imunogenicidade das VLPs da Gripe derivadas de planta foi então investigada através de um estudo de variação de dose em camundongos. Os grupos de cinco camundongos B ALB/c foram imunizados intramuscularmente duas vezes em intervalos de 3 semanas com 0,1 µg a 12 µg de HA contendo VLPs de Gripe A/Indonésia/5/05 (H5N1) formulada em alume (proporção 1:1). As titulações de inibição de hemaglutinação (H1), usando antígeno de vírus inativados totais (A/Indonésia/5/05 (H5N1)), foram medidas no soro coletado 14 dias após a segunda imunização. A imunização com doses de VLP mais baixa do que 0,1 µg induziu a produção de anticorpos que inibiram vírus e eritrócitos de aglutinação em altas diluições (Figura 21 A). Imunização paralela de camundongos com 5 µg de antígeno de H5 de controle com adjuvante de não-VLP alume (também de A/Indonésia/5/05) induziu uma resposta de H1 que foi 2-3 logs mais baixa do que aquela alcançada com a dose de VLP mais baixa.

Para ambas as rotas de administração, e sobre uma faixa de quantidades de antígeno, a resposta de HAI é superior em camundongos administrados com VLPs.

20 Exemplo 9: Efeito de adjuvante na imunogenicidade de H5 VLPs

As H5 VLPs produzidas de planta têm uma origem de membrana de plasma (Figura 19, Exemplo 5). Sem desejar estar ligado pela teoria, vírus envelopados ou VLPs de vírus envelopados geralmente adquirem seu envelope a partir da membrana eles originam. As membranas de plasma de planta têm um complemento de fitosterol que é raramente, se sempre encontrado em células de animal, e vários destes esteróis foram demonstrados exibirem efeitos imunoestimulatórios.

As H5 VLPs produzidas de planta foram administradas intramuscularmente (Figura 22A) ou intranasalmente (Figura 22B) a camundongos na presença ou ausência de um adjuvante, e a HAI (resposta de anticorpo de inibição de hemaglutinação) determinada. VLPs, na presença ou ausência de um adjuvante adicionado (alume ou chitosan, como nestes exemplos) em

qualquer sistema de administração demonstrou uma inibição de HAI hema-
glutinina significativamente maior do que HA solúvel recombinante. Mesmo
na ausência de um adjuvante adicionado (isto é, alume ou chitosan), as H5
VLPs produzidas de planta demonstram uma HAI significativa, indicativa de
5 uma resposta imune sistêmica a administração do antígeno.

O alume aumentou o nível médio de titulações de HAI por um
fator de 5 para administração intramuscular de VLP (Figura 22a), e por um
fator de 3,7 para o antígeno de HA de controle. Quando administradas i.m., 5
µg de VLPs induziram uma titulação de HAI média 12 vezes mais alta do
10 que a dose de antígeno correspondente de HA de controle. Chitosan não
impulsiona o nível de HAI médio do antígeno de HA de controle (Figura 22b),
enquanto aumenta o nível de HAI médio de camundongos imunizados com 1
µg de VLP administrado i.n. por um fator de 5 vezes.

Exemplo 10: Isotipos de anticorpo

15 Camundongos administrados com H5 VLPs produzidas de plan-
ta ou HA solúvel recombinante na presença ou ausência de alume como um
adjuvante adicionado demonstrou uma variedade de isotipos de imunoglobu-
lina (Figura 23 A).

Na presença de um adjuvante adicionado, os perfis de isotipo de
20 anticorpo de VLPs e da HA são similares, com IgG1 sendo o isotipo dominan-
te. Quando VLPs ou HA são administradas sem um adjuvante adicionado, a
resposta de IgG1 é reduzida, mas permanece a resposta de isotipo dominan-
te para VLPs, com IgM, IgG2a, IgG2B e IgG3 mantendo titulações similares
como na presença de um adjuvante adicionado. Titulações de IgG1, IgG2a, e
25 IgG2b são marcadamente reduzidas quando HA é administrada sem um ad-
juvante adicionado.

Estes dados, portanto, demonstram que as VLPs produzidas de
planta não requerem um adjuvante adicionado para induzir uma resposta de
anticorpo em um hospedeiro.

30 As titulações de anticorpo contra cepas de vírus da gripe inativa-
das totais (A/Indonésia/5/05; A/Vietnã/1203/04)¹ em camundongos adminis-
trados com VLPs produzidas de planta ou HA solúvel recombinante intra-

muscularmente na presença de um antígeno adicionado são ilustradas na Figura 23B. Nenhuma diferença significativa é observada nas titulações de anticorpo para estas cepas da gripe em camundongos administrados com 1 µg ou 5 µg de VLPs ou 5 µg de HA solúvel.

5 Exemplo 11: Reatividade cruzada de anticorpos de soro induzidos pela vacina de H5 VLP

A reatividade cruzada de anticorpos de soro induzidos por H5 VLP foi avaliada contra vírus da gripe inativados totais de cepas diferentes. Todas as doses de VLP (de 0,1 a 12 µg), bem como 5 µg de antígeno de HA
10 de controle induziram alta ligação de titulações de anticorpo contra uma clade de cepa 1 (A/Vietnã/1194/04), a cepa homóloga A/Indonésia/5/05 de clade de 2.1, e uma cepa de clade 2.2 A/peru/Turkey/1/05 (Figura 25A).

Contudo, somente a VLP produzida de planta induziu titulação de HAI contra a cepa de A/peru/Turkey/1/05 (Figura 25b). As titulações de
15 HAI para a A/Indonésia/5/05 foram altas para VLPs.

Exemplo 12: Proteção cruzada conferida por imunização com H5 VLP produzida de planta

Os camundongos que anteriormente tinham sido administrados com um regime de duas doses de VLPs de A/Indonésia/5/05 H5 VLPs conforme descrito, foram subsequentemente desafiados intranasalmente
20 com vírus de infecção da Gripe ATurkey/582/06 (H5N1) ("Turkey H5N1"), e observados. A dose administrada, por animal, foi 10 LD₅₀ (4,09 X 10⁵ CCID₅₀).

Por 7 dias pós-desafio, somente 37,5% dos camundongos administrados com o controle de vacina de PBS tinha sobrevivido exposto a Turkey H5N1 (Figura 26A). 100% dos animais administrados com o antígeno de controle (HA) ou 1, 5 ou 15 µg de VLPs de Indonésia H5 sobreviveram até
25 17 dias pós-desafio, quando o experimento foi terminado.

A massa corpórea dos camundongos foi também monitorada durante o experimento, e a massa média dos camundongos sobreviventes plotadas (Figura 26B). Os camundongos administrados com 1, 5 ou 15 µg das VLPs da Indonésia H5 antes do desafio não perderam qualquer massa
30

apreciável durante o curso do experimento, e, em particular, camundongos administrados com 5 µg das VLPs pareceram terem ganhado massa significativa. Os camundongos de controle negativo (nenhum desafio de Turkey H5N1) não ganharam ou perderam apreciavelmente massa corpóreas. Os camundongos de controle positivo (não administrados com VLPs, mas desafiados com Turkey H5N1) exibiram perda significativa de massa corpórea durante o curso do experimento, e três destes camundongos morreram. Como massa corpórea é uma média de todos os camundongos no grupo, remoção dos camundongos 'mais doentes' (os 3 que morreram) pode conduzir a um aumento total aparente na massa, contudo nota-se que a massa corpórea média do grupo de controle positivo está ainda significativamente abaixo daquela dos grupos negativos ou tratados com VLP.

Estes dados, portanto, demonstram que VLPs da Gripe produzidas de planta compreendendo a proteína viral H5 hemaglutinina induzem uma resposta imune específica para cepas da gripe patogênicas, e que partículas similares à vírus podem se originar de uma membrana de plasma de planta.

Estes dados, portanto, demonstram que as plantas são capazes de produzirem partículas similares a vírus da gripe, e também pela primeira vez, que partículas similares à vírus podem se originar de uma membrana de plasma de planta.

Adicionalmente, usando-se a tecnologia de expressão transiente atual, um primeiro lote de antígeno foi produzido somente 16 dias após a sequência da HÁ-alvo ser obtida. Sob os rendimentos atuais para H5 VLPs, e em uma dose exemplar de 5 µg por indivíduo, cada kg de folha infiltrada pode produzir ~20.000 doses de vacina. Esta combinação única de simplicidade de plataforma aumenta a capacidade e proporciona imunogenicidade ponderosa para, entre outras concretizações, uma nova resposta de método no contexto de uma pandemia.

Exemplo 13: Caracterização de estruturas contendo hemaglutinina em extratos de planta usando cromatografia de exclusão de tamanho

O conjunto de hemaglutinina da gripe produzida por planta de

subtipos diferentes em estruturas de alto peso molecular foi avaliado por filtração de gel. Extratos brutos ou concentrados de proteína de plantas infiltradas de AGL1/660-, AGL1/540-, AGL1/783-, AGL1/780- e AGLI/785 (1,5 ml) foram fracionados por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em 5 colunas de Sephacryl® S-500 HR (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). Conforme mostrado na Figura 46, Blue Dextran (2 MDa) com eluição de pico anterior na fração 10. Quando as proteínas de 200 µL de cada fração de eluição de SEC foram concentradas (5 vezes) por precipitação de acetona e analisadas por Western blotting (Figura 46), as hemaglutininas foram principalmente encontradas em frações 7 a 14, e são indicativas da incorporação de HA em VLPs. Sem desejar estar ligado pela teoria, isto sugere que a proteína de HA tinha ou montado em uma superestrutura grande ou que ela tinha fixado a uma estrutura de alto peso molecular, indiferente do subtipo produzido.

15 Exemplo 14: Expressão transiente de hemaglutinina do vírus da gripe sazonal por agroinfiltração em plantas *N. benthamiana*

A capacidade do sistema de expressão transiente produzir hemaglutinina da gripe sazonal foi determinada através da expressão do subtipo H1 de cepas de A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (plasmídeo N° 774), A/Nova Caledônia/20/1999 (H1N1) (plasmídeo N° 540) e A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (plasmídeo N° 775). As sequências de codificação de gene hemaglutinina foram primeiro montadas no cassete de expressão de plastocianina - promotor, 5'UTR, 3'UTR e sequências de terminação de transcrição a partir do gene de alfafa plastocianina - e os cassetes montados foram inseridos em um plasmídeo binário de pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados em *Agrobacterium* (AGLI), produzindo cepas de *Agrobacterium* 25 AGLI/774, AGLI/540 e AGL1/775, respectivamente.

Plantas de *N. benthamiana* foram infiltradas com AGL1/774, AGL1/540 e AGL1/775, e as folhas foram coletadas após um período de seis dias. Para determinar se H1 se acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída de tecido de folha infiltrado e analisada por Western blotting usando anticorpos anti-H1. Uma faixa única de aproximadamente 72

kDa foi detectada em extratos (Figura 47), correspondendo em tamanho a forma de HA0 não-clivada de hemaglutinina da gripe. Isto demonstra que expressão de cepas epidêmicas anuais diferentes de hemaglutinina em folhas infiltradas resulta no acúmulo do produto de translação não-clivado.

5 Exemplo 15: Expressão transiente de hemaglutinina de vírus da gripe pandêmico potencial por agroinfiltração em plantas de *N. benthamiana*

A capacidade do sistema de expressão transiente para produzir hemaglutinina da gripe potencial foi determinada através da expressão do subtipo H5 de cepas de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (plasmídeo N° 781),
 10 A/Indonésia/5/2005 (H5N1) (plasmídeo N° 660) e A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (plasmídeo #782). As sequências de codificação de gene de hemaglutinina foram primeiro montadas no cassete de expressão de plastocianina - promotor, 5'UTR, 3'UTR e sequências de terminação de transcrição a partir do gene de alfafa plastocianina - e os cassetes montados foram inseridos
 15 em um plasmídeo binário de pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados em *Agrobacterium* (AGL1).

Plantas de *N. benthamiana* foram infiltradas com AGL1/781, AGL1/660 e AGL1/782, e as folhas foram coletadas após um período de seis dias. Para determinar se H5 se acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída de tecido de folha infiltrado e analisado por Western blotting usando anticorpos anti-H5. Uma faixa única de aproximadamente 72 kDa foi detectada nos extratos (Figura 48), correspondendo em tamanho a forma de HA0 não-clivada de hemaglutinina da gripe. Isto demonstra que expressão de cepas pandêmicas potenciais diferentes de hemaglutinina em
 20 folhas infiltradas resulta no acúmulo do produto de translação não-clivado.

25 Exemplo 16: Expressão transiente de H5 por agroinfiltração em plantas de *N. tabacum*

A capacidade do sistema de expressão transiente para produzir hemaglutinina da Gripe em folhas de *Nicotiana tabacum* foi analisada através da expressão do subtipo H5 de cepa de A/Indonésia/5/2005 (H5N1) (plasmídeo N° 660). As sequências de gene de hemaglutinina foram primeiro montadas no cassete de expressão de plastocianina - promotor, 5'UTR,
 30

3'UTR e sequências de terminação de transcrição a partir do gene de alfafa plastocianina gene - e os cassetes montados foram inseridos em plasmídeo binário de pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados em *Agrobacterium* (AGL1).

- 5 Plantas de *N. tabacum* foram infiltradas com AGL1/660 e as folhas foram coletadas após um período de seis dias. Para determinar se H5 se acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída de tecido de folha infiltrado e analisado por Western blotting usando anticorpos anti-H5. Uma faixa única de aproximadamente 72 kDa foi detectada nos ex-
- 10 tratos (Figura 49), correspondendo em tamanho a forma de HA0 não-clivada de hemaglutinina da gripe. Isto demonstra que expressão de hemaglutinina em folhas de *N. tabacum* infiltradas resulta no acúmulo do produto de trans-
- lação não-clivado.

15 Exemplo 17: Imunogenicidade de vacina de H5N1 VLP produzida por planta de A/Indonésia/5/05 (H5N1) em furões

- Um estudo de escala de dose em furões foi realizado para avaliar a imunogenicidade de VLPs derivadas de planta. Reatividade cruzada in vitro de anticorpo de soro que induz a vacina de H5 VLP em 3 doses (1,5 e 15 µg) foi avaliada por inibição de hemaglutinação de três outras cepas de
- 20 H5N1 - A/peru/Peru/1/05 (clade 2.2), A/Vietnã/1194/04 (clade 1) e A/Anhui/5/05 (todos os vírus totais inativados), usando soro tomado 14 dias após a primeira dose de vacina (Figura 50A), e 14 dias após a segunda dose (Figura 50 B). Para todas as 3 concentrações de dose, reatividade cruzada é observada.

25 Exemplo 17: Análise dos resultados da imunogenicidade de acordo com o critério de CHMP.

- O Comitê EMEA's para Produtos Medicinais para Uso Humano (CHMP)
- (<http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/CHMP/CHMP.html>) ajusta
- 30 três critérios (aplicados em seguida a segunda dose) para eficácia de vacina: 1 –Número de soroconversão ou aumento significativo nas titulações de H1 (4 vezes) >40%; 2 – Aumento geométrico médio de pelo menos 2,5; 3 –

proporção de indivíduos que alcançam uma titulação de H1 de 1/40 deve ser pelo menos 70%. A análise destes critérios no modelo de furão é mostrada nas Tabelas 8-11. (*) é indicativo de encontrar ou exceder os critérios de CHMP. Um resumo de análise de imunogenicidade cruzada em relação aos critérios de CHMP para licenciamento é mostrado na Tabela 12.

Os animais foram avaliados diariamente para peso corpóreo, temperatura e condição total. Nenhum sinal de doença ou desconforto foi registrado durante o estudo. O peso corpóreo e temperatura estavam dentro de faixas normais durante o estudo. A vacina foi segura e tolerada pelos animais do estudo.

Tabela 8: Dados para cepa homóloga (A/Indonésia/5/05)

Dia	Critério	Grupo de estudo										
		1 µg	1µg com adjuvante	5µg	5µg com adjuvante	7.5 µg	15 µg	15 Ug com adjuvante	30 µg	5µg ITC		
14 (pós Istinj.)	% 4-vezes aumento na titulação de H1	0%	100%	0%	100%*	20%	20%	80%*	0%	0%	0%	0%
	% aumento de média geométrica % de H1	0%	7,6	0%	15,6 *	1,3	1,2	11,2*	0%	0%	0%	0%
	% de H1 titulação de 1/40	0%	60%	0%	100%*	20%	0%	80%*	0%	0%	0%	0%
35(14 Dias pós impulso)	Titulação média de H1		38		78			56				
	% 4-vezes aumento na titulação de H1	0%	100%*	0%	60%*	0%	0%	40%*	0%	0%	0%	0%
	% aumento de média geométrica % de titulação de H1	0%	10,8*	0%	5,9*	0,7	0%	4*	0%	0%	0%	0%
	Titulação média de H1	0%	100%*	0%	100%*	0%	0%	100%*	0%	0%	0%	0%
	Titulação média de H1		411		465			217				

Tabela 9: Dados para cepa heteróloga (A/Vietnã/1194/04)

Dia	Critério	Grupo de estudo								
		1µg	1µg com adjuvante	5µg	5µg com adjuvante	7,5 µg	15 µg	15 µg com adjuvante	30 µg	5µg ITC
14 (pós 1st inj.)	% 4-4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de métrica % de titulação de H1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3
		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
35 (pós impulso)	% 4-4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de métrica % de titulação H1 de 1/40	60%	60%	80%*	80%*	80%*	60%	60%	60%	60%
		2,3	2,3	5,1*	5,1*	5,1*	1,78	1,78	1,78	1,78
		0%	0%	80%*	80%*	80%*	20%	20%	20%	20%

Tabela 10: Dados para cepa heteróloga (A/peru/Turkey/1/05)

Dia	Critério	Grupo de estudo									
		1µg	1µg com adjuvante	5µg	5µg com adjuvante	7.5 µg	15 µg	15 µg com adjuvante	30 µg	5µg ITC	
14 (pós 1st inj.)	% 4-4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de métrica geométrica % de titulação de H1 de 1/40		40%		20%			60%			
			1.9		1.7			2.8			
35 (pós impulso)	% 4-4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de métrica geométrica % de titulação de H1 de 1/40		80%*		100%*			80%*			
			10.6*		20.8*			7.7*			
			100%*		100%*			100%*			

Tabela 11: Dados para cepa heteróloga (A/Anhui/5/05)

Dia	Critério	Grupo de estudo									
		1µg	1µg com adjuvante	5µg	5µg com adjuvante	7.5 µg	15 µg	15 µg com adjuvante	30 µg	5µg ITC	
14 (pós 1st inj.)	% 4-4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de métrica geométrica % de titulação de H1 de 1/40		40%		20%			80%*			
			1,8		1,3			6,4*			
35 (pós impulso)	% 4-4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de métrica geométrica % de titulação de H1 de 1/40		100%*		100%*			60%*			
			11,8*		14,4*			3*			
			100%*		80%*			80%*			

Tabela 12: Resumo de análise de imunogenicidade cruzada em relação a critério de CHMP para licenciamento.

Cepa	Critério	Grupo de estudo		
		Com adjuvante	5µg com adjuvante	15 µg com adjuvante
A/peru/Turkey/1/05 (clade 2.2)	% 4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de média geométrica % de titulação de H1 de 1/40	80%* 10.6* 100% *	100% * 20.8* 100% *	80%* 7.7* 100% *
A/Anhui/1/05 (clade 2.3)	% 4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de média geométrica % de titulação de H1 de 1/40	100% * 11.8* 100% *	100% * 14.4 * 80% *	60% * 3* 80%*
A/Vietnã/1194/04 (clade 1)	% 4-vezes aumento na titulação de H1 aumento de média geométrica % de titulação de H1 de 1/40	60% 2.3 0%	80%* 7.1* 80% *	60% 1.78 20%

Exemplo 18: Seleção de sequências de nucleotídeo de hamaglutinins

As sequências de nucleotídeo da HA foram recuperadas de uma base de dados de sequência de Gripe (vide URL: flu.lanl.gov), ou a fonte NCBI de vírus da gripe (vide URL: ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html). Para várias das sequências de ácido nucleico de HA, entradas múltiplas são listadas nas bases de dados (Tabela 13). Alguma variação é associada principalmente com o sistema de cultura (Origem - MDCK, ovo, desconhecida, viral RNA/isolado clínico); por exemplo, o local de glicosilação na posição 194 (numeração de proteína madura) da HA está ausente quando vírus da gripe tipo B é expresso em fluido alantóico de ovos (vide também Chen et al., 2008). Para algumas sequências, domínios podem estar carecendo (por exemplo, clones incompletos, artefatos de sequenciamento, etc.). A sequência de hemaglutinina pode ser dividida em 5 domínios: peptídeo de sinal (SP), HA1, HA2, transmembrana (DTm) e cauda citoplásmica. Os domínios de uma primeira sequência podem ser combinados com um domínio de uma segunda sequência existente, por exemplo, o peptídeo de sinal de uma primeira sequência de cepa pode ser combinado com o restante da sequência

de codificação de hemaglutinina de uma segunda cepa para proporcionar uma sequência de codificação completa.

Tabela 13: Variação de subtipos de Gripe para sequências de codificação de HA selecionadas

	Cepa	Sequência de base de dados de referência	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
H1	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	ISDN231 558 (Vacina rec.)	MDCK	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	ISDN238 190	Ovo	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	EU10072 4	7	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	ISDN220 951	MDCK	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	ISDN220 953	Ovo	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	EU12413 7	Ovo	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)

	Cepa	Sequência de base de dados de referência	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	EU12413 5	MDCK	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Sa-lomão/3/2 006	EU12417 7	MDCK	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
H1	A/Brisbane /59/2007	ISDN282 676	MDCK	Y	Y	Y		203: D/I/N D est le plus abondant chez les H1
	A/Brisban e/59/2007	ISDN285 101	Ovo	Y	Y	N	N	203: D/I/N D est le plus abondant chez les H1
	A/Brisban e/59/2007	ISDN285 111	Ovo	Y	Y	Y	Y	203: D/I/N D est le plus abondant chez les H1
	A/Brisban e/59/2007	ISDN282 677	Ovo	Y	Y	Y	Y	203: D/I/N D est le plus abondant chez les H1
H3	A/Brisbane /10/2007	ISDN274 893	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: del Ala, 242: S/I

Cepa	Sequência de base de dados de referência No.	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
A/Brisban e/10/2007	ISDN257 648	MDCK	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:IVP, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	ISDN256 751	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:IVP, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	ISDN273 757	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	ISDN273 759	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:IVP, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	EU19924 8	Ovo	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	EU19936 6	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:IVP, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	ISDN257 043	Ovo	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:UP, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	EU 19925 0	MDCK	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: del Ala, 242: S/I
A/Brisban e/10/2007	ISDN275 357	Ovo	N	Y	N	N	202: V/G, 210:IVP, 215: del Ala, 242: S/I

	Cepa	Sequência de base de dados de referência No.	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
	A/Brisbane/10/2007	ISDN260 430	Ovo	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210: I/P, 215: del Ala, 242: S/I
H3	A/Wisconsin/67/2005	ISDN131 464 (vacina rec.)	?	N	Y	Y	N	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	DQ86594 7	?	N	Y	partiel	N	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	EF473424	?	N	Y	Y	N	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	ISDN138 723	Ovo	N	Y	Y	Y	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	EF473455	Ovo	N	Y	Y	Y	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	ISDN138 724	?	N	Y	Y	Y	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y

	Cepan	Sequência de base de dados de referência	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
B	B/Malásia / 2506/2004	ISDN126 672 (vacina rec.)	Ovo	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia a/2506/2004	EF566433	Ovo	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia a/2506/2004	ISDN231 265	Ovo	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia a/2506/2004	ISDN231 557	MDCK	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia a/2506/2004	EF566394	MDCK	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia a/2506/2004	EU12427 4	Ovo	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A

	Cepan	Sequência de base de dados de referência	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
	B/Malásia a/2506/2004	EU12427 5	MDCK	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia a/2506/2004	ISDN 124 776	MDCK	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
B	B/Flórida/4/2006	ISDN261 649	Ovo	Y	Y	Y	N	Carecendo de local de glicosilação na posição 211; 10 aminoácidos de DTm/cauda plásmica
	B/Flórida/4/2006	EU 10060 4	MDCK	N	Y	N	N	
	B/Flórida/4/2006	ISDN218 061	MDCK	N	Y	N	N	
	B/Flórida/4/2006	ISDN285 778	Ovo	Y	Y	Y	Y	Inclui cauda citoplásmica
B	B/Brisbane /3/2007	ISDN256 628	Ovo	N	Y	N	N	Carecendo de local de glicosilação na posição 211
	B/Brisban e/3/2007	ISDN263 782	Ovo	Y	Y	Y	Y	Carecendo de local de glicosilação na posição 211

	Cepan	Sequência de base de dados de referência	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
	B/Brisban e/3/2007	ISDN263 783	MDCK	Y	Y	Y	Y	
H5	AViet Nam/1194/2004	ISDN386 86 (Vacina rec.)	?	Y	Y	Y	Y	

	Cepa	Sequência de base de dados de referência No.	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
	A/Vietnã/1194/2004	AY651333	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Vietnã/1194/2004	EF541402	?	Y	Y	Y	Y	
H5	A/Anhui/1/2005	DQ37928 (vacina rec.)	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Anhui/1/2005	ISDN131465	Ovo	Y	Y	Y	Y	
H7	A/Galinha/Itália/13474/1999	AJ91720	ARN Gen	Y	Y	Y	Y	
H7	A/Equino/Pague/56	AB298277 (Lab reassortant)	?	Y	Y	Y	Y	152 (R/G) 169 (171) 208 (N/D) (local de glicosilação abolido)
	A/Equino/Praga/56	X62552	?	Y	Y	Y	Y	

	Cepa	Sequência de base de dados de referência No.	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
H9	A/Hong Kong/1073 /1999	AJ404626	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Hong Kong/1073 /1999	AB08022 6	?	N	N	N	N	
H2	A/Singapura /1/1957	AB29607 4	9	Y	Y	Y	Y	
	A/Singapura /1/1957	L20410	RNA	Y	Y	Y	Y	
	A/Singapura /1/1957	LI 1142	?	Y	Y	Y	Y	
H2	A/Japão/30 5/1957	L20406	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/3 05/1957	L20407	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/3 05/1957	CY01497 6	?	Y	Y	Y	Y	

Cepa	Sequência de base de dados de referência No.	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
A/Japão/3 05/1957	AY20995 3	?	Y	Y	N	N	
A/Japão/3 05/1957	J02127	9	Y	Y	Y	Y	

Cepa	Sequência de base de dados de referência No.	Origem	SP	HA 1	HA2	DTm	Divergência
A/Japão/3 05/1957	DQ50884 1	?	Y	Y	Y	Y	
A/Japão/3 05/1957	AY64308 6	?	Y	Y	Y	N	
A/Japão/3 05/1957	AB28933 7	?	Y	Y	Y	Y	
A/Japão/3 05/1957	AY64308 5	?	Y	Y	Y	Y	
A/Japão/3 05/1957	AY64308 7	Resisten- te a dro- ga	Y	Y	Y	N	

Y, N - Sim, Não, respectivamente

SP - presença e sequência de peptídeo de sinal Y/N

HA1 – domínio de HA1 completo Y/N

HA2 – domínio de HA2 completo Y/N

- 5 DTm - domínio de transmembrana completo Y/N

Cepa: H1 de A/Ilhas Salomão/3/2006

Oito sequências de aminoácido foram comparadas, e variações identificadas. (Tabela 14). Posição 171 exibiu uma variação de glicina (G) ou arginina (R) em algumas sequências.

- 10 Tabela 14: A/Ilhas Salomão/3/2006 variação de aminoácido

Aminoácido #*	MDCK	Ovo
212	K	T
241	Q	R
542	L	R

Numeração a partir do começo M

Cepa: H1 de A/Brisbane/59/2007

Posição 203 exibiu uma variação de ácido aspártico (D), isoleucina (I) ou asparagina (N).

- 15 Cepa: H3from AJBrisbane/10/2007

Variações de sequência foram observadas nas 5 posições (Tabela 15). Na posição 215, uma anulação é observada em duas sequências amostradas.

Tabela 15: H3 de A/Brisbane/10/2007 variação de aminoácido

	Origem	202, 210, 215, 235 242*
ISDN274893	Ovo	VL - YI
ISDN273759	Ovo	GPASI
EU199248	Ovo	GPASI
EU199366	Ovo	GPASI
ISDN273757	Ovo	VL - SS
ISDN257043	Ovo	GPASI
EU199250	MDCK	GLASI
ISDN375357	Ovo	GPASI
ISDN260430	Ovo	GPASI

	Origem	202, 210, 215, 235 242*
ISDN256751	Ovo	G P A S I
ISDN257648	MDCK	G L A S I

* Numeração a partir do começo M

Cepa: H3 para A/Wisconsin/67/2005

Variações de sequência nesta cepa foram observadas nas 4 posições (Tabela 16).

5 Tabela 16: H3 de A/Wisconsin/67/2005 variação de aminoácido

	Origem	138, 156, 186, 196
ISDN138724	Desconhecida	A H G H
DQ865947	Desconhecida	S H V Y
EF473424	Desconhecida	A H G H
ISDN138723	Ovo	S Q V Y
ISDN131464	Desconhecida	A H G H
EF473455	Ovo	A H G H

* Numeração a partir da proteína madura

Cepa: de B/Malásia/2506/2004

Variação em duas posições é observada (Tabela 17). Posição 120 não é um local de glicosilação; posição 210 é envolvida na glicosilação; esta glicosilação é abolida em seguida a cultura em ovos.

10

Tabela 17: Hemaglutinina de B/Malásia/2506/2004 variação de aminoácido

Aminoácido #	MDCK	Egg
120	K	N
210	T	A

* Numeração a partir da parte intermediária de SP

Cepa: hemaglutinina de B/Flórida/4/2006; ISDN261649

Variações observadas incluem variação de sequência de aminoácido na posição 211, dependendo do sistema de cultura. Asparatina (N) é encontrada em sequências isoladas de células de MDCK, enquanto ácido glutâmico (D) é encontrado em sequência isolada de ovos. A posição 211 é um local de glicosilação, e é abolida em seguida a cultura em ovos.

15

Cepa: H2 de A/Singapura/1/1957

20

Variações de sequência foram observadas nas 6 posições (Ta-

bela 18).

Tabela 18: H2 de variação de aminoácido de A/Singapura/1/1957

	Origem	Aminoácido No. 166 168 199\236 238 358
L20410	Viral RNA	K E T L S V
LI 1142	Desconhecida	E G K L S I
AB296074	Desconhecida	K G T Q G V
Consenso A/Japan/305/1957		K G T Q/L G V

¹ Numeração a partir da proteína madura

Cepas: H5 de A/Vietnã/1194/2004 e H5from A/Anhui/1/2005

- 5 Não existem variações observadas na sequência de aminoácido sob alinhamento das sequências primárias de qualquer destas cepas H5.

Cepa: H6 de A/Cerceta/Hong Kong/W312/1997

Somente uma entrada foi disponível para cepa (AF250179).

Cepa: H7 para A/Equino/Praga/56

- 10 Um total de 2 entradas de sequências foram encontradas nas bases de dados. A entrada AB298877 foi excluída, visto que ela é um "reassortant" laboratorial.

Cepa: H9 de A/Hong Kong/1073/1999; AJ404626

- 15 Um total de 2 entradas de sequências foram encontradas nas bases de dados. Somente uma foi completa.

Todas as citações são, desse modo, incorporadas por referência.

- 20 A presente invenção foi descrita com relação a uma ou mais concretizações. Contudo, será aparente aos técnicos no assunto que um número de variações e modificações pode ser feita sem fugir do escopo da invenção as definida nas reivindicações.

Listagem de Referências:

- 25 Aymard, H. M, M. T. Coleman, W. R. Dowdle, W. G. Laver, G. C. Schild, and R. G. Webster. 1973. Influenza virus neuraminidase-inhibition test procedures. Bull. W.H.O. 48: 199-202

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein, S.J. (1996) *Protein*

methods (2nd edition). Wiley-Liss, Nova York, USA.

Bligh, FOR EXAMPLE, & Dyer, W.J. *Can. J. Med. Sci.* 37, 911-917 (1959).

5 Chen, B.J., Leser, G.P., Morita, E., and Lamb R.A. (2007) Influenza Virus hemagglutina e neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly e budding of plasmid derived virus like particles. *J. Virol.* 81,7111-7123.

10 Chen Z, Aspelund A, Jin H. 2008 Stabilizing the glycosylation pattern of Influenza B hemagglutina following adaptation to growth in eggs. *Vaccine* vol 26 p 361-371

Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., and Perdue, M. L. (1999). Baculovirus-derived hemagglutina vaccine protect against lethal Influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17,2265-2274.

15 Darveau, A., Pelletier, A. & Perreault, J. PCR-mediated synthesis of chimeric molecules. *Métodos Neurosc.* 26, 77-85 (1995).

Grgacic EVL, Anderson DA. Partucles similar to Influenza: passport to immune recognition. *Métodos* 2006; 40: 60-65.

20 Gillim-Ross, L., and Subbarao, K. (2006) Emerging respiratory viruses: chanllenges and vaccine strategies. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 614-636.

25 Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E. and Portela, A. (1999) Efficient formation of Influenza virus-like particles: dependence on the expressão level of viral proteins. *J. Gen. Virol.* 80,1635-1645.

Gomez-Puertas, P., Albo, C, Perez-Pastrana, E., Vivo, A., and Portela, A. (2000) Influenza Virus protein is the major driving force in virus budding. *J Virol.* 74, 11538-11547.

30 Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671 -4679 (2002).

Höfgen, R. & Willmitzer, L. Storage of competent cells for Agro-

bacterium transformation. *Acid nucleico Res.* 16, 9877 (1988).

Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T. (1993) A switch between two-, three-, e four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*; 262: 1401-1407)

5 Horimoto T., Kawaoka Y. Strategies for developing vaccinas against h5NI Influenza a viruses. *Trends in Mol. Med.* 2006; 12(11):506-514.

Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine.* 2005 Mar 7;23(15):1851-8.

10 Johansson, B. E. (1999). Immunization with Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine* 17, 2073-2080.

Latham, T., and Galarza, J. M. (2001). Formation of wild-type and chimeric Influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins *J. Virol.* 75,6154- 6165.

Lefebvre, B. *et al. Plant Physiol.* 144, 402-418 (2007).

Leutwiler LS et al 1986. *Nucleic Acid Sresearch* 14910):4051-64

20 Liu, L & Lomonossoff, G.P. Agroinfection as a rapid method for propagating Cowpea mosaic virus-based constructs. *J. Virol. Métodos* 105, 343-348 (2002).

Macala, L.J., Yo, R.K. & Ando, S. *JLipideoRes.* 24, 1243-1250 (1983)

25 Mattanovich, D., Ruker, F., da Camara Machado, A., Laimer, M, Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G., and Katinger, H. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By electroporation. *Nucl. Ac. Res.* 17, 6747.

30 Mena, I., Vivo, A., Perez, E., and Portela, A. (1996) Rescue of synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into Influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.* 70, 5016-5024.

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA et al.. Lipide rafts in higher plant cells. *The Journal of Biological*

Chemistry 2004; 279(35): 36277-36286.

Neumann, G., Watanabe, T., and Kawaoka, Y. (2000) Plasmid-driven formation of virus-like particles. *J. Virol.* 74, 547-551.

5 Nayak DP, Reichl U. (2004) Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived Influenza virus. *J Virol Métodos* 122(1):9-15.

Olsen, C. W., McGregor, M. W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B. R., Nelson, K. M., Lunn, D., Macklin, M. D., and Swain, W. F. (1997). Immunogenicity and efficacy of baculovirus- expressed and DNA-based equine
10 influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccina* 15, 1149-1156.

Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of Influenza virus. *Journal of Virology* 2007; 81(7): 3514-3524.

Rowe, T. et al. 1999. Detection of antibody to avian Influenza A (h5NI) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin Microbiol* 37(4):937-43 Saint-Jore-Dupas C et al. 2007. From plant to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in Biotechnology* 25(7) :317-23
15

Sambrook J, and Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
20 2001.

Stockhaus J et al 1987. Analysis of cis-active sequences involved in the leaf-specific expression of a potato gene in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.S.* 84(22):7943-7947.
25

Stockhaus J et al 1989. Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1. *Planta Cell.* 1(8):805-13.

Suzuki, Y. (2005) Sialobiology of Influenza. Molecular mechanism of host range variation of Influenza virus. *Biol. Pharm. Bull* 28, 399-408.

30 Tsuji M., *Cell. Mol. Life Sci.*, 63 (2006); 1889-1898

Wakefield L., G.G. Brownlee *Nuc Acid Res.* 17 (1989); 8569-8580.

Kendal, AP, Pereira MS, Skehel J. Concepts and procedures for laboratory-based Influenza surveillance. Atlanta: CDC; 1982. p.B17-B35.

WHO. Manual on animal Influenza diagnosis and surveillance. Department of communicable disease surveillance e response. World Health

5 Organisation Global Influenza Program. 2002.

Skehel JJ and Wildy DC Ann Rev Biochem 2000 69:531-69

Vaccaro L et al 2005. Biophysical J. 88:25-36.

Gamblin, S.J., Haire, L.F., Russell, R.J., Stevens, D.J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D.A., Daniels, R.S., Elliot, A., Wiley, D.C.,

10 Skehel, J.J. (2004) The structure and receptor binding properties of the 1918 hemagglutinin Influenza. Science 303: 1838-1842

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma hemaglutinina da gripe (HA) operativamente ligada a uma região regulatória ativa em uma planta.

5 2. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, no qual a hemaglutinina da gripe é selecionada a partir do grupo consistindo em H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, e H16.

3. Método de produção de partículas similares a vírus da gripe (VLPs) em uma planta compreendendo:

10 a) introdução do ácido nucleico como definida na reivindicação 1 na planta, ou porção desta, e

b) incubação da planta sob condições que permitem a expressão do ácido nucleico, produzindo, desse modo, as VLPs.

15 4. Método de acordo com a reivindicação 3, no qual na etapa de introdução (etapa a), o ácido nucleico é transientemente expresso na planta.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, no qual na etapa de introdução (etapa a), o ácido nucleico é estavelmente expresso na planta.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, compreendendo adicionalmente a etapa de

20 c) coleta do hospedeiro e purificação das VLPs.

7. Partícula similar a vírus (VLP) compreendendo uma proteína HA de vírus da gripe e uma ou mais do que um lipídeo derivado de uma planta.

25 8. Partícula similar a vírus (VLP) de acordo com a reivindicação 7, no qual a proteína HA da gripe é H5 Indonésia.

9. Composição compreendendo uma dose efetiva da VLP como definido na reivindicação 7, e um transportador farmacologicamente aceitável.

30 10. Método de indução de imunidade a uma infecção de vírus da gripe em um indivíduo, compreendendo administrar a partícula similar a vírus como definido na reivindicação 7.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, no qual a partícula similar a vírus é administrada a um indivíduo oralmente, intradermalmente,

intranasalmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, ou subcutaneamente.

5 12. Partícula similar a vírus (VLP) compreendendo um vírus da gripe HA suportando N-glicans específicas de planta, ou N-glicans modificadas.

13. Composição compreendendo uma dose efetiva da VLP de acordo com a reivindicação 12, e um transportador farmacologicamente aceitável.

10 14. Método de indução de imunidade a uma infecção de vírus da gripe em um indivíduo, compreendendo administrar a composição de acordo com a reivindicação 13.

15 15. Método de acordo com a reivindicação 11, no qual a composição é administrada a um indivíduo oralmente, intradermalmente, intranasalmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, ou subcutaneamente.

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATA
 AAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTAC
 TACTGTTATAAATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAAC
 AAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTGTTGCAACATTTGAGAAAAATTTGTT
 GTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAG
 AATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAA
 ATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTT
 AATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAAT
 TTTTGGCAAGTCATTA AAAAGAAAGAATAAATTTTAAAAATTA AAAAGTTGAG
 TCATTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAG
 TTGTATTAGTAATTAGAAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTT
 ATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATTTTCATAGATCAAATAA
 GAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA AAAAAACGGTATATTTACTAAA
 AAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCA
 ATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATC
 TGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACA
 CAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAG
 TCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAGAGACTAATTAATTAAT
 TAATCATCTTGAGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTT
TCTCTTCTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCT

GAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTG
 TTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATT
 TGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATC
 AGAATGTTTCCTCCATAACTA ACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTC
 TTATATTTGAACA ACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACA ACTTTATAAGTGGTTA
 ATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTA
 TCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTA ACTACTAATTTTATATCATCCC
 CTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 1A

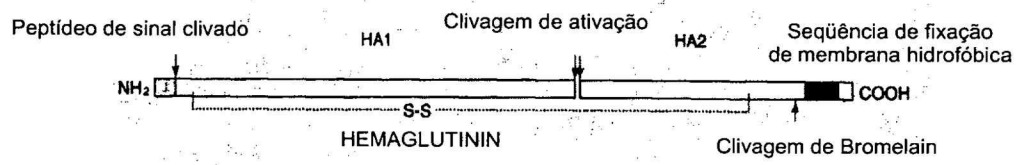


Fig. 1B

Fig. 2A

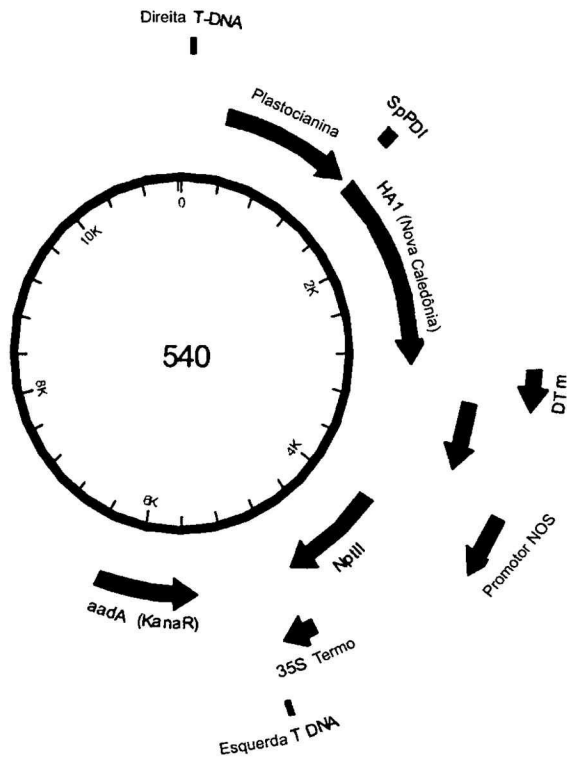


Fig. 2B

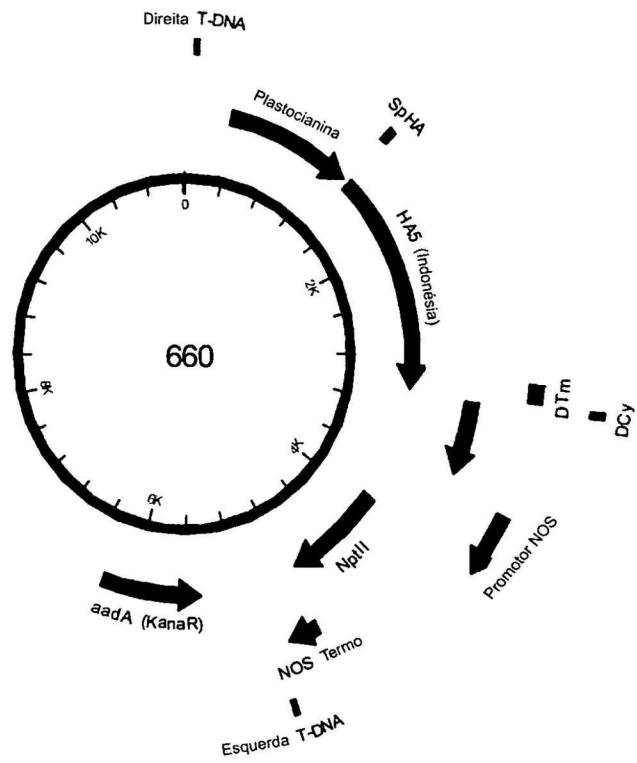


Fig. 3A

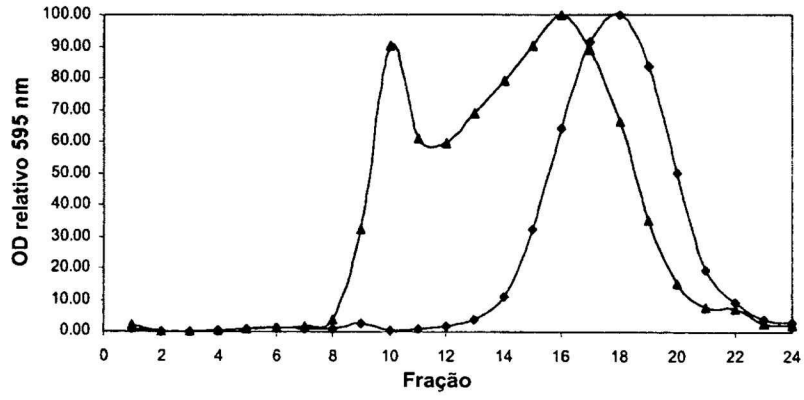


Fig. 3B

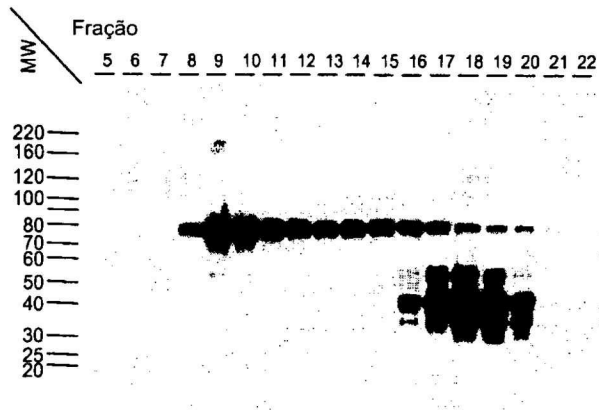


Fig. 4A

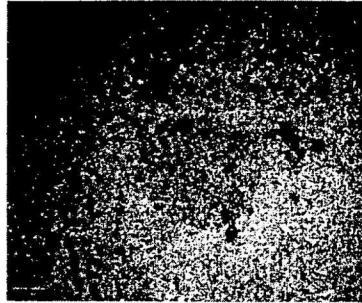


Fig. 4B

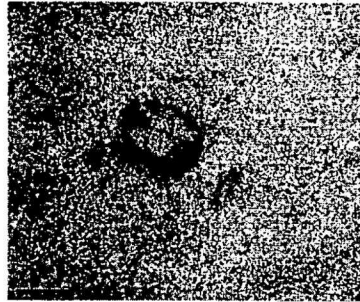


Fig. 4C

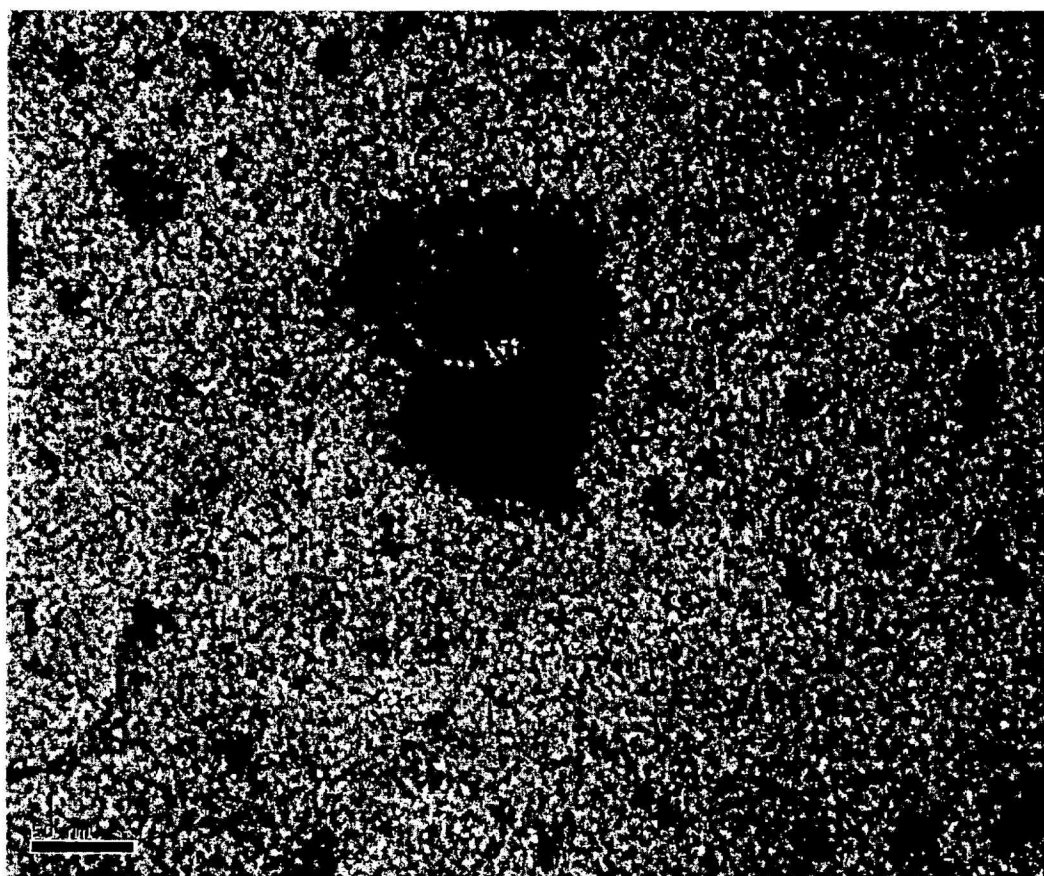


Fig. 5A

SEQ ID NO.1

AGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACTGTTGACACAGTAC
 TTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATGGAAAACCTATGTCT
 ACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGA
 ATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAATCATGGTCTACATTGTAGAAACACCAAATCCTGAGAATGGAAACA
 TGTTACCCAGGGTATTTCCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAG
 AGATTGAAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGC
 TCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTTGACCCA
 AACCTGAGCAAGTCCTATGTAACAAACAAAGAGAAAGATCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCG
 CCTAACATAGGGAAACCAAAGGGCACTCTATCATAACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATT
 ATAGCAGAAGATTACCCCCAGAAAATAGCCAAAAGACCCAAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACT
 ACTACTGGACTCTGCTGGAACCTGGGGATAACAATAATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCAT
 GGTATGCTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACCAATGGATGAAT
 GTGATGCCAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCTTTCCAGAATGTACACCCAG
 TCACAATAGGAGAGTGTCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACA
 TCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAA
 TGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAA
 GTACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATT
 CACAGCTGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATGGAAAGAAGGATGGAAAACCTTAAATAAAAAAAGTTGATGAT
 GGGTTTCTAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATT
 TCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAAGTAAAAAGCCAATTAAGAATAATGCCAAAGAAAT
 AGGAAACGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGTAC
CTATGACTATCCAAAATATCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATGATGGAGTGAATTTGGAA
TCAATGGGAGTATACTAAGAGCTCAGGCCT

Fig. 5B

SEQ ID NO. 2

GGTACCTATGACTATCCAAAATATTTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATGATGGAGTGAAT
 TGGAATCAATGGGAGTATACAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCCAGTTCCCTGGTTCTTTGGT
 CTCCCTGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAAATGGGTCTTTCAGTGTAGAATATGCATCTAAGA
GCTCAGGCCT

Fig. 5C

HA0 from H1 (SEQ ID NO:28)

AGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACA
CAGTACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATG
GAAAACCTATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCACTACAATGGGTAATTGCAGGTTGCCGGAT
GGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAG
AAACACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGTATTTGCGCCGACTATGAGGAACTGA
GGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTGCAAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCAT
GGCCCAACCCACCCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTT
ACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGGAAGAATGGTTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATG
TAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTAACATAGGGA
ACCAAAGGGCACTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTACATTATAGCAG
AAGATTCACCCAGAAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTA
CTACTGGACTCTGCTGGAACCTGGGGATACAATAATTTGAGGCAAATGGAAAATCTAATAGC
GCCATGGTATGCTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACC
AATGGATGAATGTGATGCGAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTT
CCAGAAATGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAATTAAG
GATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGGTTGGACCCATTGC
CGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGA
ATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAACGGGATTA
CAAACAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAAGAGT
TCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACCTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACAT
TTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGAC
TCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAGAATAATGCCAAAGAAATAG
GAAACGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATG
GTACCTATGACTATCCAAAATATTCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTTGATGGAG
TGAAATTGGAATCAATGGGAGTATACCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCC
TGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGCTTTGCAGT
GTAGAATATGCATCTAAGAGCTCAGGCCT

Fig. 6

SEQ ID NO. 3

AAGCTTATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGG
TTACCATGCAAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCC
CAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTA
AGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAA
TGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTAT
GAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTCTTG
GTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCTTTTTTAGA
AATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCA
AGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCA
AAACCAACCACTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACT
AGATCCAAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAA
TCAACTTCGAGAGTAATGAAAATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTC
AGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGCGGATA
AACTCTAGTATGCCATTCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAA
ACAGATTAGTCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAGAGAGGAC
TATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACC
ACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGA
GTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTA
ATAACTTAGAAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTA
TAATGCCGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAATCTAGACTTTTCTAGACTCAAATGTTAAGAAC
CTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTC
TATCACAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTACCGCAGTATTAG
AAGAAGCAAGATTAAGAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATGGAAATCAATAGGAACTTACCAATACT
GTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATG
TGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTC

Fig. 7A

SEQ ID NO. 4
5'-GTATTAGTAATTAGAAATTTGGTGTC-3'

Fig. 7B

SEQ ID NO. 5
5'-GCAAGAAGAAGCACTATTTTCTCCATTTTCTCTCAAGATGATTA-3'

Fig. 7C

SEQ ID NO. 6
5'-TTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC-3'

Fig. 7D

SEQ ID NO. 7
5'-ACTTTGAGCTCTTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGA-3'

Fig. 8A

Seqüência de peptídeo HA1 (SEQ ID NO:9)

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCCLKGIAPLQ
LGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPK
ESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKVLVLWGVHHPPI
GNQRALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWY
AFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNI
PSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMN
TQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQK
NNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVA
SSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

Fig. 8B

Seqüência de peptídeo HA5 (SEQ ID No: 10)

MEKIVLLLAIVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILR
DCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSS
WSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNWVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQ
TRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKI
VKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLATGLRNSPQR
ESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKIDGVTKVNSIIDK
MNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERLDFHDSNVKNLYDKVRL
QLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYST
VASSLALAIMMAGLSLWMCNGLQCRICI*

Fig. 9

SUBTIPO H7 (SEQ ID NO:11)

>BHB940420 | gbj: AF071776 | Símbolo: HA | Nome: Precursor de hemaglutinin

Organismo: Gripe A Vírus A/galinha/Nova York/1995[promossomo:4]/Subtipo: H7/hospedeiro: Ave

GACAAAATATGTCTTGGGCACCATGCTGTGGCAAATGGAACAAAAGTGAACACATTAACAGAGAGGGGGA
 TTGAAGTAGTGAACGCCACAGAGACGGTGGAAACTGCGAATATCAAGAAAATATGTATTCAGGGAAAAG
 GCCAACAGATCTGGGACAATGTGGACTTCTAGGAACCTAATAGGACCTCCCCAATGTGATCAATTCCTG
 GAGTTTACTCTGATTTGATAATTGAGCGAAGAGAAGGAACCGATGTGTGCTATCCCGGTAAATTCACAA
 ATGAAGAATCACTGAGGCAGATCCTTCGAGGGTCAGGAGGAATTGATAAGGAGTCAATGGGTTTCACCTA
 TAGTGGAAATAAGAACCAATGGAGCGACAAGTGCCTGCAAAAGATCAGGTTCTTCTTTCTATGCAGAGATG
 AAGTGGTTGCTGTCGAATTCAGACAATGCGGCATTCCCTCAAATGACAAAAGTCGTATAGAAATCCCGAAA
 ACAAACAGCTCTGATAATTTGGGGAGTTCATCACTCTGGATCGGTTAGCGAGCAGACCAAATCTATGG
 AAGTGGAAACAAGTTGATAACAGTAGGAAGCTCAAAATACCAGCAATCATTACCCCCAAGTCCGGGAGCA
 CGGCCACAAGTGAATGGACAATCAGGGAGAATCGATTTTCACTGGCTACTCCTTGATCCCAATGACACAG
 TGACCTTCACTTTCAATGGGGCATTTCATAGCCCCTGACAGGGCAAGTTTCTTTAGAGGAGAATCACTAGG
 AGTCCAGAGTGATGTTCTCTGGATTCTAGTTGTGGAGGGGATTGCTTTCACAGTGGGGGTACGATAGTC
 AGTTCCCTGCCATTCCAAAACATCAACCCTAGAACTGTGGGGAGATGCCCTCGGTATGTCAAACAGACAA
 GCCTCCTTTTGGCTACAGGAATGAGAAATGTTCCAGAGAATCCAAAGCCCAGAGGCCTTTTGGAGCAAT
 TGCTGGATTCATAGAGAATGGATGGGAGGGTCTCATCGATGGATGGTATGGTTTCAGACATCAAATGCA
 CAAGGGGAAGGAACTGCAGCTGACTACAAAAGCACCCAATCTGCAATAGATCAGATCACAGGCAAATGGA
 ATCGTCTGATGACAAAACAATCAGCAGTTTGGAGCTGATAGACAATGAGTTCATAGATAGAACACA
 AATAGGAAATGTCATTAATTGGACACGAGACGCAATGACTGAGGTATGGTCTGATAATGCTGAGCTGTTG
 GTGGCAATGGAAAATCAGCATACAATAGATCTGCGGACTCAGAAATGAACAACTTTATGAGCGTGTC
 GAAAACAAT*AGGGAGAATGCTGAAGAAGATGGAAGTGGATGTTTTGAGATATCCATAAGTGTGATGA
 TCAGTGCATGGAGAGCATAAGGAACAACACTTATGACCATACTCAATACAGAACAGAGTCATTGCAGAAT
 AGAATACAGATAGACCCAGTGAATTTGAGTAGTGGATACAAAGACATAATCTTATGGTTTAGCTTCGGGG
 CATCATGTTTTCTTCTAGCCGTTGTAATGGGATTGGTTTTTCATTTGCATAAAGAAATGGAAACATGCG
 GTGCACCATTTGTATATAA

Fig. 10A

Subtipo H2 (SEQ ID NO:12)

>gi|408516|gb|L11132.1|FLADE88HA Vírus da Gripe A (A/pato silvestre do arenque/DE/677/88 (H2N8))
Gene hemaglutinin HA, CDs completo

```

AGCAAAAAGCAGGGGTTATACCATAGACAACCAAAGGCAAGACAATGGCCATCATTTTCTAATTTCTCTG
TTCACAGCAGTGAGAGGGGACCAAATATGCATTGGATACCATTCCAACAATTCACAGAAAAGGTTGACA
CAATCCTAGAGAGAAATGTCACCTGTGACTCAGCTGAGGACATTCTTGAGAAGACTCACAATGGGAAGTT
ATGCCAACTAAATGGAATCCCTCCACTTGAATTAAGGGATGCAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGGAAT
CCAGAATGTGATATACTTCTAACTGTGCCAGAATGGTCATACATAATAGAAAAAGAAAATCCAAGGAACG
GCTTGTGCTACCCAGGCAGTTCAATGATTAAGAATGAAGCATCTTATCAGCAGCGTGACACATTT
TGAGAAAGTAAAGATCTGCCAGAAATGAATGGACACAGCATACAACAAC TGGAGGTTACACAGGCTGC
GCAGACTATGGTGGTCCGTCATTCTCCGGAACATGGTCTGGTTGACAAAAGAAAGGGTCGAATTATCCAA
TTGCCAAAAGATCTTACAACAATACAAGTGGGGAACAAATGCTGATCATTGGGGGATACATCACCCCAA
TGATGAAAGTGAACAAAGAGCATTGTATCAGAATGTGGGGACCTATGTGTCAGTAGGAACATCAACTG
AACAAAAGATCATCCCAGAAATAGCAACAAGACCTAAAGTGAATGGACAAGGAGGCAGAATGGAATCT
CGTGGACTATCTTAGATATATGGGACACAATAAATTTTGAGAGTACTGGCAATCTAATGCACCAGAATA
TGGTTTCAAAATATCCAACGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAGAAGGAAAAC TTGAAAAC TGGCAG
ACCAAGTGCCAAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTACCCTTTCACAATATCCACCCACTGACCA
TTGGTGAGTGCCCAAATATGTAAAAATCGGAAAGATTAGTCTTAGCAACAGGACTAAGAAACGTCCTCA
GATTGAGTCAAGGGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAGGGTGGATGGCAAGGAATGGTTGAT
GGTTGGTATGGGTATCATCACAGCAATGACCAGGGATCTGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAA
AGGCAATTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATTTCTGTGATCGAAAAGATGAACACCCAATTCGGAGCTGT
TGAAAAGAATTCAGTAACTTGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAATAAAAAGATGGAGGACGGATTCTTA
GATGTGGACATACAATGCCGAGCTCCTAGTTCTAATGGAAAATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATT
CTAATGTCAAGAATCTATATGATAAAGTCAGAATGCAACTGAGAGACAATGCAAAAAGAACTAGGGAATGG
ATGTTTGAATTTTATCACAAATGTGATGATGAATGCATGAACAGTGTGAAGAATGGGACATATGATTAT
TCCAAGTATGAAGAGGAGTCTAAACTAAACAGGACTGAAATCAAAGGGGTTAAATTGAGCAATATGGGGG
TTTATCAAATCCTTGCCATCTATGCTACAGTAGCAGGTTCCCTGTCACTGGCAATCATGATAGCTGGGAT
TTCTATATGGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAATGCAGAATCTGCATATGATCATCAGTCATTTTGTA
TAAAAACACCCCTTGTTTCTACT

```

Fig. 10B

SUBTIPO H3 (SEQ ID NO:13)

>BHB2107299|gb:EF473574| Símbolo: HA |Nome: hemaglutinin
Organismo: Gripe A Virus A/Texas/Segmento:4/Subtipo: H3/hospedeiro: Humano

CAAAAACCTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAA
CGATAGTGAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTACAGAGTTCCTC
AACAGGTGGAATATGCGACAGTCCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACGCACACTAATAGATGCTCTA
TTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCT
ACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCAC
ACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCTTCGATTGGACTGGAGTCACTCAGAATGGAACAAGCTCTGCTTGCAAA
AGGAGATCTAATAAAAAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATACAAATACCCAGCAT
TGAACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTACCACCCGGGTAC
GGACAGTGACCAAATCAGCCTATATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAGAAGCCAA
CAAACGTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGGGTAAGGGATGTCTCCAGCCGAATAAGCATCTATT
GGACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATGCTCCTCGGGGTTA
CTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCCGAA
TGCATCACTCCAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCAAAATGTAAACAGGATCACATATGGGG
CCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACA
AACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGACGGTTGG
TACGGTTTCAGGCATCAAATTCAGGGGCACAGGA

Fig. 10C

SUBTIPO H4 (SEQ ID NO:14)

>BHB1050162|gb:DQ021859| Símbolo: HA Nome: hemaglutinin |

Organismo: Gripe A Virus A/pato silvestre do hemisfério norte/Segmento:4/Subtipo: H4/hospedeiro: Ave

ATGCTATCAATCACGATTCTGTTTCTGCTCATAGCAGAGGGTTCCTCTCAGAATTACACAGGGAATCCCG
TGATATGCCTGGGACATCATGCCGTATCCAATGGGACAATGGTGAAAACCCCTGACTGATGACCAAGTAGA
AGTTGTCACTGCCAAGAATTAGTGAATCGCAACATCTACCGGAGTTGTGTCTAGCCCTTTAAGATTA
GTAGATGGACAACTTGTGACATCGTCAATGGTGCCTTGGGGAGTCCAGGCTGTGATCACTTGAATGGTG
CAGAAATGGGATGTCTTCATAGAACGACCCACTGCTGTGGACACTTGTATCCATTTGATGTGCCGGATTA
CCAGAGCCTACGGAGTATCCTAGCAAACAATGGGAAATTTGAGTTCATTGCTGAGGAATCCAATGGAAC
ACAGTCAAACAAAATGGGAAATCCGGAGCATGCAAAGAGCAAATGTGAATGACTTTTTCAACAGATTGA
ACTGGCTGACCAAATCTGATGGGAATGCATACCCACTTCAAACCTGACAAAGGTTAACAACGGGGACTA
TGCAAGACTTTACATATGGGGAGTTCATCATCCTTCAACTGACACAGAACAACCAACTTGTATAAGAAC
AACCCTGGGAGAGTAACTGTTTCCACCAAACCAAGTCAAACAAGTGTGGTACCAAACATTGGCAGTAGAC
CATGGGTAAGAGGCCAAAGCGGCAGGATTAGCTTCTATTGGACAATTGTGGAGCCAGGAGACCTCATAGT
CTTCAACACCATAGGGAAATTTAATTGCTCCGAGAGGTCATTACAAGCTTAACAGTCAAAGAAGAGCACA
ATTCTGAATACTGCAATTCCCATAGGATCTTGTGTAGTAAATGTCACACAGATAGGGGTTCAATCTCTA
CAACCAAACCTTTCAGAACATCTCAAGAATATCAATTGGGGACTGTCCCAAGTATGTCAAACAGGGATC
CTTGAAACTAGCTACAGGAATGAGGAATATCCCTGAGAAAGCAACCAGAGGCTGTTTGGTGAATTG

Fig. 10D

SUBTIPO H5 (SEQ ID NO:15)

>BHB950029 | gb : AF501235 | Símbolo: HA | Nome: hemaglutinin |
 Organismo: Gripe A Virus A/Shangai/Segmento:4/Subtipo: H5/hospedeiro: Ave

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCTTGTAAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACC
 ATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGA
 CATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAACTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGAT
 TGTAGTGTAGTGGATGGCTCCTCGGAAACCCTATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTT
 ACATAGTGGAGAAGGCCAGTCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAACGACTATGAAGAACT
 GAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCACTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAAT
 CATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCGCAGCATGTCCATACCATGGGAAGCCCTCCTTTTTCAGAAATGTGG
 TATGGCTTATCAAAAAGAACAGTGCATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA
 TCTTTTGGTACTGTGGGGATTACCATCCTAATGATGGCGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCA
 ACCACCTATATTTCCGTTGGAACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTCCCAAAATAGCTACTAGATCCA
 AAGTAAACGGGCAAAGTGAAGAATGGAGTTCTTCTGGACAATTTAAAGCCGAATGATGCCATAAATTT
 CGAGAGTAATGGAATTTCAATGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATT
 ATGAAAAGTGAATGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAATCCAATGGGGCGATAAACTCTA
 GTATGCCATTTCCACAACATACCCCTCTCACAATCGGGGAATGCCCAATATGTGAAATCAAACAGATT
 AGTCTTTGCGACTGGACTCAGAAAATACCCCTCAAAGAGATAGAAGAAGAAAAAGAGAGGACTATTGGA
 GCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAAGGAATGGTAGATGGTGGTATGGGTACCACCATAGCA
 ATGAGCAGGGGAGTGGATACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAA
 GGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAA
 AGGAGGATAGAAAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGATTCTTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAAC
 TTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGATTCAAATGTCAAGAACCTTTACAACAA
 GGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAATGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGT
 GATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAAAACGGGACGTATGACTACCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAGAC
 TAAACAGAGAGGAATAAGTGGAGTAAAATGGAAATCAATGGGAACCTACCAAACTACTGTCAATTTATTC
 AACAGTGGCGAGTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGG
 TCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

Fig. 10E

SUBTIPO H6 (SEQ ID NO:16)

>BHB1049778 | gb:DQ021667 | Símbolo: HA | Nome: hemaglutinin |

Organismo: Gripe A Virus A/rabijunco do norte/segmento:4/Subtipo: H6/hospedeiro: Ave

ATGATTGCAATCATTGTAATAGCGATACTGGCAGCAGCCGAAAGTCAGACAAGATCTGCATTGGGTATC
ATGCCAACAAATCAACAACACAGGTGGATACGATACTTGAGAAGAATGTAACCGTCACACACTCAGTTGA
ATTGCTGGAGAATCAGAAGGAAGAAAGATTCTGCAAGATCTTGAACAAGGCCCTCTCGACCTAAAGGGA
TGCACCATAGAGGGTTGGATCTTGGGGAATCCCAATGCGATCTGTTGCTTGGTGACCAAAGCTGGTCAT
ATATAGTGGAAAGACCTACTGCCAAAATGGGATATGCTACCCAGGAGCTTTGAATGAGGTAGAAGAACT
GAAAGCATTATCGGATCAGGAGAAAGGGTAGAGAGATTTGAGATGTTCCCAAAGCACATGGGCAGGG
GTAGACACCAGCAGTGGGTAACAAAAGCTTGTCTTATAATAGTGGTTCATCTTCTACAGAAACCTCC
TATGGATAATAAAGACCAAGTCAGCAGCGTATCCAGTAATTAAGGGAACCTACAGCAACACTGGAAACCA
GCCAATCCTCTATTTCTGGGGTGTGCACCATCCTCCTGACACCAATGAGCAAAATACTCTGTATGGCTCT
GGCGATCGGTATGTTAGGATGGGAACTGAGAGCATGAATTTTGCCAAGAGCCCAGAAATGCGGCAAGAC
CCGCTGTGAATGGCCAAAGAGGTGCAATTGATTATTACTGGTCTGTTTTAAAACCAGGAGAAACCTTGAA
TGTGGAATCTAATGGAATCTAATCGCTCCTTGGTATGCATACAAATTTGTCAACACAAATAATAAGGGA
GCCGCTTCAAGTCAAATTTACCAATCGAGAATTGCGATGCCACATGCCAGACTATTGCAGGAGTCTAA
GGACCAATAAAACATTTCAGAAATGTGAGCCCTCTGTGGATAGGAGAATGCCCAAGTATGTGAAAAGTGA
AAGTCTAAGGCTTGCTACTGGACTAAGAAATGTTCCACAGATTGAAACCAGAGGGCTTTTCGGAGCTATC

Fig. 10F

SUBTIPO H8 (SEQ ID NO:17)

>gi|221317|dbj|D90304.1|FLAHAH8N4 Virus da Gripe A
(A/Turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)) Gene para precursor de hemaglutinin, cds completo

ATGGAAAAATTCATCGCAATAGCAACCTTGGCGAGCACAAATGCATACGATAGGATATGCATTGGGTACC
AATCAAACAACCTCCACAGACACAGTGAACACTCTCATAGAACAGAATGTACCAGTCACCCAAACAATGGA
GCTCGTGGAAACAGAGAAACATCCCGCTTATTGTAACACTGATTTAGGTGCCCCATTGGAACATGCGAGAC
TGCAAGATTGAGGCAGTAATCTATGGGAACCCCAAGTGTGACATCCATCTGAAGGATCAAGGTTGGTCAT
ACATAGTGGAGAGGCCAGCGCACAGAGGGATGTGTTACCCTGGATCTGTGAAAATCTAGAAGAACT
GAGGTTTGTCTTCTCCAGTCTGCATCTTACAAGAGAATAAGACTATTTGACTATTCAGGTGGAATGTG
ACTAGATCTGGAACGAGTAAAGCATGCAATGCATCAACAGGTGGCCAATCCTTCTATAGGAGCATCAATT
GGTTGACCAAAAAGGAACAGACTTATGACTTCAATGAAGGAGCTTATGTTAATAATGAAGATGGAGA
CATCATTTTCTTATGGGGATCCATCATCCCGCGGACACAAAAGAGCAGACAACACTATATAAAAAATGCA
AACACTTTGAGTAGTGTACTACTAACACTATAAACAGAAGCTTCAACCAAATATTGGTCCAGACCAT
TAGTAAGAGGACAGCAAGGGAGGATGGATTACTATTGGGGCATTCTGAAAAGAGGGGAGACTCTGAAGAT
CAGGACCAACGGAAATTTAATCGCACCTGAATTTGGCTATCTGCTCAAAGGTGAAAGCTACGGCAGAATA
ATTCAAAATGAGGATATACCCATCGGGAACGTAAACACAAAATGTCAAACATATGCGGGAGCAATCAATA
GCAGCAAACCCCTTCAGAATGCAAGTAGGCATTACATGGGAGAATGTCCCAAATATGTGAAGAAGGCAAG
CTTGCAGCTTGCAAGTTGGGCTTAGGAATACGCCCTCTGTTGAACCCAGAGGACTGTTTGGAGCCATTGCT
GGTTTCATTGAAGGAGGATGGCTGGAATGATTGATGGGTGGTATGGATTTTCATCACAGCAATTCAGAGG
GAACAGGAATGGCAGCTGACCAGAAATCAACACAAGAAGCCATCGATAAGATCACCAATAAAGTCAACAA
TATAGTTGACAAGATGAACAGGGAGTTTGAAGTTGTGAATCATGAGTTCTCTGAAGTTGAAAAAGAATA
AACATGATAAACGATAAAAATAGATGACCAAATGAAGATCTTTGGGCTTACAATGCAGAGCTCCTTGTGC
TCTTAGAGAACCAGAAAACGCTAGACGAACATGATTCCAATGTCAAAAACCTTTTTGATGAAGTGAAGG
GAGACTGTCAGCCAATGCAATAGATGCTGGGAACGGTTGCTTTGACATACTTCACAAATGCGACAATGAG
TGATATGGAAACTATAAAGAACGGAACCTACGATCATAAGGAATATGAAGAGGAGGCTAAACTAGAAAGGA
GCAAGATAAATGGAGTAAACTAGAAGAGAACCCACTTACAAAATCTTAGCATTTACAGTACAGTGGC
GGCCAGTCTTTGCTTGGCAATCCTGATTGCTGGAGGTTAATCCTGGGCATGCAAAATGGATCTTGTAGA
TGCATGTTCTGTATTTGA

Fig. 10G

SUBTIPO H9 (SEQ ID NO:18)

>BHB954830 | gb: AM087218 | Simbolo: HA | Nome: hemaglutinin |
Organismo: Gripe A Vírus A/shoveler/Segmento:4/Subtipo: H9/hospedeiro: Ave

ATGGAAACAGTATCACTAATGACTATACTACTAGTAGCAACAGCAAGCAATGCAGACAAAACTGCATCG
GCCACCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGTTCCCTGTGACACATGC
CAAAGAATTGCTCCACACAGAGCACAATGGAATGCTGTGTGCAACAAATCTGGGACATCCCCAATCTTA
GACACGTGCACTATTGAAGGACTGATCTATGGTAACCCCTTCTTGTGACTTGCTGTTGGGAGGAAGAGAAT
GGTCCCTACATCGTCGAAAGGTCATCAGCTGTAATGGAACGTTACCCTGGGAATGTAGAGAACCTAGA
GGAACCTCAGGACACTTTTTAGTTCCGCTAGTTCCTACCGAAGAATCCAAATCTCCAGACACAATCTGG
AATGTGACTTACACTGGAACAAGCAAAGCATGTTTCAGATTCATCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTC
AAAAAAGCGGGTCTTACCCTGTTCAAGACGCTCAATACACAATAATATGGGAAAGAGCATTCTTTTCGT
GTGGGGCATACATCACCCACCCACTGAAGCTGCACAGACAAATTTGTACACAAGAACCACACAACA
AGCGTGACAACAGAAGACTTAAATAGGATCTTCAAACCGATGGTAGGGCAAGGCCCTTGTCAATGGTC
TGCAGGGAAGAATTAATTATTATTTGGTCGGTACTAAAACCAGGCCAGACTGCGAGTAAGATCCAATGG
GAATCTAATGCTCCATGGTATGGACACATCTTTTCGGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGAT
TTAAAAAGTAGTAATTGCGTAGTGCAATGTCAGACTGAAAAAGCGGCTTAAACAGTACATTGCCGTTC
ACAATATCAGTAAATATGCATTTGGAACTGTCCCAAATATGTTAGAGTTAAAAAGTCTCAAACCTGGCAGT
AGGGTTGAGGAACCTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTCGGAGCCATAGCTGGATTTCATAGAAGGA
GGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGTTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATTGCGG
CAGATAGGGATTCAAACCAAAGGCAATTGATAGAATAACAACCAAGGTGAATAATATAGTCGACAAAAT
GAACAAACAATATGAAATAATTGATCATGAATTCAGTGAGGTTGAAACTAGGCTCAACATGATCAATAAT
AAGATTGATGACCAAATACAAGACATATGGGCATATAATGCAGAGTTGCTAGTACTACTTGAACCCAGA
AAACACTCGATGAGCATGACGCAAATGTGAAGA

Fig. 10H

Subtipo H10 (SEQ ID NO:19)

>gi|324365|gb|M21647.1|FLAMS84HA Vírus da gripe A
 (galinha/Alemanha/ N/1949 (H10N7))
 precursor de hemaglutinin, gene, cds completo

AGCAAAAGCAGGGGTACAATGTACAAAGTAGTAGTAATAATTGCGCTCCTTGGAGCAGTGAAAGGTCTT
 GACAGAATCTGCCTAGGACACCATGCGGTTGCCAATGGAACCATTTGTGAAGACCCCTTACAAATGAACAAG
 AGGAAGTGACCAATGCTACTGAGACGGTAGAGAGCACAATTTGAATAAATTTGTATGAAAGGAAGAAG
 CTACAAGGACTTGGGCAATTGTCACCCGGTAGGAATTTGATAGGAACACCTGTTTGTGATCCGCACTTG
 ACCGGGACCTGGGACACTCTCATTGAGCGAGAGAATGCCATTTGCCACTGTTATCCAGGGGCAACCATAA
 ATGAAGAAGCATTGAGGCAGAAAATAATGGAAGTGGAGGAATCAGCAAGATGAGCACTGGCTTCACTTA
 TGGGTCCTCCATCACCTCAGCTGGGACCACTAAGGCATGCATGAGAAATGGAGGAGATAGTTTCTATGCA
 GAGCTCAAATGGCTAGTGTCAAAGACAAGGGACAAAATTTCCCTCAGACAACAACACCTATCGGAATA
 CGGACACAGCAGAACATCTCATAATATGGGGAATTCATCACCCCTCCAGCACACAGGAAAAGAATGACTT
 ATACGGAACCTCAGTCACTATCTATATCAGTTGAGAGTTCTACATATCAGAACAACCTTTGTTCCAGTTGTT
 GGGGCAAGACCTCAGGTCAATGGACAAAGTGGGCGAATTGACTTTCACTGGACACTAGTACAGCCGGGTG
 ACAACATAACCTTCTCAGACAATGGAGGTCTAATAGCACCAAGTCGAGTTAGCAAATTAACCTGGAAGGGA
 TTTGGGAATCCAATCAGAAGCGTTGATAGACAACAGTTGTGAATCCAATGCFTTTGGAGAGGGGGTTCT
 ATAATACAAAGCTCCCTTTTCAAATCTGTCAACCAGAACAGTAGGTCAATGCCCAAATACGTAATC
 AGAGGAGTTTACTGCTTGCAACAGGGATGAGGAATGTGCCAGAAGTGGTGCAGGGAAGGGGCTGTTTGG
 TGCAATAGCAGGGTTCATAGAAAACGGATGGGAAGGAATGGTAGACGGCTGGTATGGTTTCAGACACCAA
 AATGCCCAGGGCACAGGCCAAGCTGCTGATTACAAGAGTACTCAAGCAGCTATGACCAAATCACAGGGA
 AACTGAACAGGTTGATTGAGAAGACCAACACTGAGTTTGAGTCAATAGAATCTGAATTCAGTGAGACTGA
 GCATCAAATTTGTTAACGTCATTAATTGGACCAAGATTCAATAACCGACATTTGGACTTACAACGCAGAG
 CTATTAGTGGCAATGGAGAATCAGCACACAATTGACATGGCTGATTAGAGATGCTAAATCTGTATGAAA
 GGGTAAGAAAGCAACTCAGACAGAATGCAGAAGAAGACGGAAAGGGATGTTTTGAGATATATCATACTTG
 TGATGATTCGTGCATGGAGAGTATAAGGAACAATACTTATGACCATTCAATAACAGAGAGGGGCTCTT
 CTGAATAGACTGAACATCAACCCAGTAACTTTCTTCGGGGTACAAAGACATCATACTTTGGTTTAGCT
 TCGGGGAATCATGCTTTGTTCTTCTAGCCGTTGTTATGGGTCTTGTCTTCTTCTGCTGAAAAATGGAAA
 CATGCGATGCACAATCTGTATTTAGTTAAAAACACCTTGTCTTACT

Fig. 10I

Subtipo H11 (SEQ ID NO:20)

>gi|221307|dbj|D90306.1|FLAHAH11N Virus da gripe A(A/pato/England/56(H11N6))
Gene para precursor de hemaglutinin, cds completo

ATGGAGAAAACACTGCTATTTGCAGCTATTTTCCTTTGTGTGAAAGCAGATGAGATCTGTATCGGGTATT
TAAGCAACAACCTCGACAGACAAAGTTGACACAATAATTGAGAACAATGTCACGGTCACTAGCTCAGTGGA
ACTGGTTGAGACAGAACACACTGGATCATTCTGTTCAATCAATGGAAAACAACCAATAAGCCTTGGAGAT
TGTTCAATTTGCTGGATGGATATTAGGAAACCTATGTGTGATGAACATAATTGAAAGACTTCATGGTCTT
ACATGTGGAAAAACCAATCCAACAAATGGAATCTGTTACCCAGGAACTTTAGAGAGTGAAGAAGAACT
AAGACTGAAATTCAGTGGAGTTTTAGAATTTAACAATTCGAAGTATTCACATCAAATGGATGGGGTGCT
GTAATTCAGGAGTAGGAGTAACCGCTGCATGCAATTCGGGGTTCTAATTCCTTTCTTTCGAAACATGG
TATGGCTGATACCCAATCAGGAACATATCCTGTAATAAAGAGAACCTTTAACAACACCAAGGGAGAGA
TGTAATGATTTGGGGAATTCATCATCCGCTACACTGACAGAACATCAAGATCTGTATAAAAAGGAC
AGCTCCTATGTAGCAGTGGGTTCCAGAGACCTACAACAGAAGATTCCTCCAGAAATCAACACTAGGCCCA
GAGTCAATGGACAGGCCGGACGGATGACATTCCTACTGGAAGATAGTCAAACCAGGAGAATCAATAACATT
CGAATCTAATGGGGCTTCCCTAGCTCCTAGATATGCTTTTGAGATTGTCTCTGTTGGAAATGGGAACTG
TTCAGGAGCGAACTGAACATTGAATCATGCTCTACCAATGTCAAACAGAATAGGAGGAATTAATACGA
ACAAAAGCTTCCACAATGTTACAGAAACACTATCGGGGATGCCCCAAGTATGTGAATGTCAAATCCTT
AAAGCTTGCAACAGGACCTAGAAATGTCCCAGCAATAGCATCGAGAGGCTTGTGGAGCAATAGCTGGA
TTCATAGAAGGGGGATGGCCTGGACTGATCAATGGATGGTATGGGTCCAACACAGGGACGAAGAAGGAA
CAGGCATTGCAGCAGACAAGGAGTCAACTCAAAGGCAATAGACCAGATAACATCCAAGGTAATAACAT
CGTTGACAGGATGAATACAACTTTGAGTCTGTGCAACACGAATTCAGTGAATAGAGGAAAGAAATAAT
CAATATCAAACACGTAGATGATTCTGTGGTTGACATCTGGTCATATAATGCACAGCTTCTCGTTTTAC
TTGAAAATGAGAAGCACTGGACCTCCATGACTCAAATGTCAGGAACCTCCATGAGAAAGTCAAGAAGAA
GCTAAAGGACAATGCCAAAGATGAGGGGAACGGATGCTTCACCTTTTACCATAAGTGTGACAATAAATGC
ATTGAACGAGTTAGAAACGGAACATATGATCATAAAGAATTCGAGGAGGAATCAAAAATCAATCGCCAGG
AGATTGAAGGGGTGAACTAGATTCTAGTGGGAATGTGTATAAAATACTGTCAATTTACAGCTGCATTGC
AAGCAGTCTTGTATTGGCAGCACTCATCATGGGTTTATGTTTGGGCATGCAGTAATGGATCATGTAGA
TGTACCATTTGCATTTAG

Fig. 10J

Subtipo H12 (SEQ ID NO:21)

>gi|221309|dbj|D90307.1|FLAHAH12N Virus da gripe A (A/pato/Alberta/60/76(H12N5))

Gene para precursor de hemaglutinin, cds completo

ATGGAAAAATTCATCATTTTTGAGTACTGTCTTGGCAGCAAGCTTTGCATATGACAAAATTTGCATTGGAT
ACCAACAAACAACCTCGACTGAAACGGTAAACACACTAAGTGAACAAAACGTTCCGGTGACGCAGGTGGA
AGAACTTGACATCGTGGGATTGATCCGATCCTGTGTGGAACGGAACCTAGGATCACCACCTAGTGCTTGAT
GACTGTTCAATFAGAGGGTCTAATCCTAGGCAATCCCAAATGTGATCTTTATTTGAATGGCAGGGAATGGT
CATACATAGTAGAGAGGCCCAAAGAGATGGAAGGAGTTTGCTATCCAGGGTCAATTGAAAACCAGGAAGA
GCTAAGATCCTGTTTTCTCCATCAAAAAATATGAAAGAGTGAAGATGTTTGATTTACCAAATGGAAAT
GTCACATACACTGGGACCAGCAAGGCTGCAATAATACATCAAACCAAGGCTCATTCTATAGGAGCATGA
GATGGTTGACCTTAAAAATCAGGACAATTTCCAGTCCAACAGATGAGTACAAGAACCAGAGATTGAGA
CATTGTATTCACCTGGGCCATTCACCACCCACCAACATCTGATGAACAAGTAAAATTATACAAAAATCCT
GATACTCTCTCTTCAGTCACCACCGTAGAAATCAATAGGAGCTTCAAGCCTAATATAGGGCCAAGACCAC
TCGTGAGAGGACAACAAGGGAGAATGGATTACTACTGGGCTGTTCTTAAACCTGGACAAACAGTCAAAAT
ACAAACCAATGGTAATCTTATTGCACCTGAATATGGTCACCTAATCACAGGGAAATCACATGGCAGGATA
CTCAAGAATAATTTGCCCATGGGACAGTGTGTGACTGAATGTCAATTGAACGAGGGTGAATGAACACAA
GCAAACCTTTCCAGAACACTAGTAAGCACTATATTGGGAAATGCCCAAATACATACCATCAGGGAGTTT
AAAATTGGCAATAGGGCTCAGGAATGTCCCAAGTTCAGATCGGGGGCTCTTTGGAGCAATTGCAGGT
TTCATAGAAGGCGGATGGCCAGGGCTAGTGGCTGGTGGTACGGATTTACAGCATCAAAATGCGGAGGGGA
CAGGCATAGCTGCAGACAGAGACAGCACCCAAAGGCAATAGACAATATGCAAACAAACTCAACAATGT
CATCGACAAAATGAATAAACAATTTGAAGTGGTGAATCATGAGTTTTCAGAAGTGGAAAGCAGAATAAAC
ATGATTAATTCAAAATTGATGATCAGATAACTGACATATGGGCATACAATGCTGAATTGCTTGCTCTAT
TGGAAAATCAGAAGCATTAGATGAGCATGACGCTAATGTAAGGAATCTACATGATCGGGTCAGAAGAGT
CCTGAGGGAAAATGCAATTGACACAGGAGACGGCTGCTTTGAGATTTACATAAATGTGACAACAATTGT
ATGGACACGATTAGAAACGGGACATACAATCACAAGAGTATGAGGAAGAAAGCAAAATCGAACGACAGA
AAGTCAATGGTGTGAACTTGAGGAGAATTCTACATATAAAAATCTGAGCATCTACAGCAGTGTGCTC
AAGCTTAGTTCTACTGCTCATGATTATTGGGGTTTCATTTTCGGGTGTCAAATGGAAATGTTCTGTTGT
ACTTCTGTATTAA

Fig. 10K

Subtipo H13 (SEQ ID NO:22)

>gi|221311|dbj|D90308.1|FLAHAH13N Virus da gripe A
 (A/*swainson/Maryland/704/77* (H13N6)) Gene de precursor de hemaglutinin, cds completo

ATGGCTCTAAATGTCATTGCAACTTTGACACTTATAAGTGTATGTGTACATGCAGACAGAATATGCGTGG
 GGTATCTGAGCACCAATTCATCAGAAAGGGTCGACACGCTCCTTGAAAATGGGGTCCCAGTCACCAGCTC
 CATTGATCTGATTGAGACAAACCACACAGGAACATACTGTTCTCTAAATGGAGTCAGTCCAGTGCATTTG
 GGAGATTGCAGCTTTGAAGGATGGATTGTAGGAAACCCAGCCTGCACCAGCAACTTTGGGATCAGAGAGT
 GGTACATACCTGATTGAGGACCCCGCGGCCCTCATGGGCTTTGCTACCCTGGAGAATTAACAACAATGG
 TGAACCTCAGACACTTGTTCAGTGAATCAGGTCATTCAGTAGAACGGAATTGATCCCACCTACCTCCTGG
 GGGGAAGTACTTGACGGTACAACATCTGCTTGACAGAGATAACACGGGAACCAACAGCTTCTATCGAAATT
 TAGTTTGGTTTATAAAGAAGAATACTAGATATCCAGTTATCAGTAAGACCTACAACAATACAACGGGAAG
 GGATGTTTTAGTTTTATGGGGAATACATCACCCAGTGTCTGTGGATGAGACAAAGACTCTGTATGTCAAT
 AGTGATCCATACACACTGGTTTCCACCAAGTCTTGGAGCGAGAAATATAAACTAGAAAACGGGAGTCCGCAC
 CTGGCTATAATGGACAGAGGAGCTGGATGAAAATTTATTGGTCTTTGATACATCCAGGGGAGATGATTAC
 TTTTCGAGAGTAATGGTGGATTTTAGCCCCAAGATATGGGTACATAATTGAAGAATATGGAAAAGGAAGG
 ATTTTCCAGAGTCGCATCAGAATGTCTAGGTGCAACACCAAGTGCCAGACTTCGGTTGGAGGGATAAACA
 CAAACAGAACGTTCCAAAACATCGATAAGAATGCTCTTGGTGACTGTCCCAAATACATAAAGTCTGGCCA
 ACTCAAGCTAGCCACTGGACTCAGAAATGTGCCAGCTATATCGAATAGAGGATTGTTCCGGAGCAATTGCA
 GGGTTCATAGAAGGAGGCTGGCCAGGTTTAATCAATGGTGGTACGGTTTTTCAGCATCAAATGAACAGG
 GAACAGGAATAGCTGCAGACAAAGAATCAACACAGAAAGCTATAGACCAGATAACAACCAAATAAATAA
 CATTATTGATAAAATGAATGGGAATGATTCAATTAGGGGTGAATTCAAATCAAGTTGAGAAGCGTATA
 AACATGCTTGACAGACAGAATAGATGATGCCGTGACGGACATTTGGTCATACAATGCCAAACTTCTTGTAT
 TGCTGGAAAATGATAAACTTTAGATATGCATGATGCTAATGTAAAGAATTTACATGAGCAAGTACGAAG
 AGAATTGAAGGACAATGCAATTGACGAAGGAAATGGCTGTTTTGAACTCCTTCATAAATGCAATGACTCC
 TGCATGGAAAATATAAGAAATGGAACGTATGACCACACTGAGTATGCAGAGGAGTCAAAGTTAAAGAGGC
 AAGAAATCGATGGGATCAAACCTCAAATCAGAAGACAACGTTTACAAGCATTATCAATATACAGTTGCAT
 TGCAAGTAGTGTGTACTAGTAGGACTCATACTCTCTTTCATCATGTGGGCCTGTAGTAGTGGGAATTGC
 CGATTCAATGTTTGTATATAA

Fig. 10L

Subtipo H14 (SEQ ID NO:23)

>gi|324045|gb|M35997.1|FLAH1424 Gripe A pato silvestre do hemisfério norte
hemaglutinin, subtipo H14, gene

AGCAAAAGCAGGGGAAAATGATTGCACTCATATTGGTTGCACTGGCTCTGAGCCACACTGCTTATTCTCA
GATCACAATGGGACAACAGGAAACCCATTATATGCTTGGGGCATCATGCAGTGAAAAACGGCACATCT
GTTAAAACACTAACAGACAATCACGTAGAAGTTGTGTGCTAGCTAAAGAATTAGTTGAGACGAACCACACTG
ATGAACTGTGCCAAGCCCTTGAAGCTGTGCGACGGGCAAGACTGCCACCTCATCAATGGTGCATTGGG
GAGTCCAGGCTGTGACCGTTTGCAGGACACCCTTGGGATGTCTTCATTGAAAGGCCACTGCAGTAGAC
ACATGTTATCCATTCGACGTCCCAGATTACCAGAGTCTCAGAAGCATCCTAGCAAGCAGTGGGAGTTTGG
AGTTCATCGCCGAACAATTCACCTGGAATGGTGTCAAAGTTGACGGATCAAGCAGTGTCTGTTTGGGGG
CGGTCGCAACAGCTTCTTCTCCGACTAAACTGGCTAACCAAAGCAACAATGGAACTATGGACCTATT
AACGTCACTAAAGAAAATACGGGCTCTTATGTGAGGCTCTATCTCTGGGGAGTGCATCACCCATCAAGCG
ATAATGAGCAAACGGATCTCTACAAGGTGGCAACAGGGAGAGTAACAGTATCTACCCGCTCGGACCAAAT
CAGTATTGTTCCCAATATAGGAAGTAGACCGAGGGTAAGGAATCAGAGCGGCAGGATAAGCATCTACTGG
ACCCTAGTAAACCCAGGGGACTCCATCATTTTCAACAGTATTGGGAATTTGATTGCACCAAGAGGCCACT
ACAAAATAAGCAAATCTACTAAGAGCACAGTGCCTAAAAGTGACAAAAGGATTGGGTGCATGCACAAGCCC
TTGCTTAACTGATAAAGGTTTCGATCCAAAGTGACAAACCTTTTCAGAATGTATCAAGGATTGCTATAGGA
AACTGCCCGAAATATGTAAAGCAAGGGTCCCTGATGTTAGCAACTGGAATGCGCAACATCCCTGGCAAAC
AGGCAAAGGGCTTATTTGGGGCAATGCTGGATTTCATTGAAAATGGTTGGCAAGGCCTGATTGATGGGTG
GTATGGATTCAGGCACCAAATGCTGAAGGAACAGGAACTGCTGCAGACCTGAAGTCAACTCAGGCAGCC
ATTGATCAGATAAATGGCAAGCTGAACAGATTGATAGAGAAGACAAATGAAAAATATACCCAAATAGAAA
AGGAATTCGAACAGGTGGAAGGAAGAATACAAGACCTTGAGAAGTACGTTGAGGACACTAAGATTGATTT
GTGGTCATACAATGCTGAATTGCTAGTAGCACTAGAGAATCAGCACACAATAGATGTACAGACTCCGAA
ATGAACAAGCTTTTGAAGAGTAAGAAGGCAATTAAGAGAGAATGCAGAAGTCAAGGCAACGGTTGTT
TCGAGATATTCCATCAGTGTGACAACAATTGTATAGAAAGCATAGAAACGGAACCTTATGACCACAACAT
CTACAGGGATGAAGCCATCAACAATCGAATCAAATAAATCCTGTCACCTTGACGATGGGGTACAAGGAC
ATAATCCTGTGGATTTCTTCTCCATGTCATGCTTTGTCTTCGTGGCACTGATTCTGGGATTTGTTCTAT
GGCTTGTCAAAACGGGAATATCCGATGCCAAATCTGTATATAAAGAAAAAACACCCCTTGTCTTCTACTC

Fig. 10M

Subtipo H15 (SEQ ID NO:24)

>gj1226068|gb|L43916.1|FLAHEMAC Virus da gripe A/ pato /Australia/341/83 (H15N8)

Hemagglutinin mRNA, cds completo

AGCAAAGCAGGGGATACAAAATGAACACTCAAATCATCGTCATTCTAGTCCTCGGACTGTCGATGGTGA
 GATCTGACAAGATTGTCTCGGGCACCATGCCGTAGCAAATGGGACAAAAGTCAACACACTAACTGAGAA
 AGGAGTGGAAAGTGGTCAATGCCACGGAGACAGTGGAGATTACAGGAATAAATAAAGTGTGCACAAAAGGG
 AAGAAAGCGGTGGACTTGGGATCTTGTGGAACTCTGGGAACCTATCATTGGGCCTCCACAATGTGACTCTC
 ATCTTAAATTCAAAGCTGATCTGATAATAGAAAGAAGAAATTCAAGTGACATCTGTTACCCAGGAAATT
 CACTAATGAGGAAGCACTGAGACAAATAATCAGAGAATCTGGTGAATTGACAAAGAGCCAATGGGATTT
 AGATATTCAGGAATAAAAACAGACGGGGCAACCAGTGCCTGTAAGAGAACAGTGTCTCTTTCTACTCAG
 AAATGAAATGGCTTTTATCCAGCAAGGCTAACCCAGGTGTTCCCACTGAATCAGACATACAGGAACAA
 CAGAAAAGAACCCAGCCCTAATGTTTGGGGAGTACATCATTCAAGTTCCTTGGATGAGCAAAAATAAGCTA
 TATGGAGCTGGGAACAAGCTGATAACAGTAGGAAGCTCAAAATACCAACAATCGTTTTCCACCAAGTCCAG
 GGGACAGGCCCAAAGTGAATGGTCAGGCCGGGAGGATCGACTTTCATTGGATGCTATTGGACCCAGGGGA
 TACAGTCACTTTTACCTTCAATGGTGCATTATAGCCCCAGATAGAGCCACCTTTCTCCGCTCTAATGCC
 CCATCGGGAGTTGAGTACAATGGGAAGTCACTGGGAATACAGAGTGTGACAAAATTGATGAATCATGTG
 AAGGGGAATGCTTCTACAGTGGAGGGACAATAAACAGCCCTTTGCCATTTCAAAAATCGATAGTTGGGC
 TGTCCGAAGGTGCCCCAGATATGTAAAGCAATCAAGCCTGCCGCTGGCCTTAGGAATGAAAAATGTACCA
 GAGAAAATACATACTAGGGGACTGTTCCGGTCAATTCAGGATTCATCGAGAAATGGATGGGAAGGACTCA
 TTGATGGATGGTATGGATTTAGGCATCAAAATGCAAGGGGCAGGGAACAGCTGCTGACTACAAGAGTAC
 TCAGGGTGCAATTGACCAGATAACAGGGAACTTAATAGATTAATTGAAAAAACCAACACACAGTTTGAA
 CTCATAGACAATGAGTTCCTGAAAGTGGAGCAGCAGATAGGCAATGTAATAAAGTGGACAAGGGACTCCT
 TGACTGAGATCTGGTCATACAATGCTGAACTTCTAGTAGCAATGGAAAATCAGCATACAATTGACCTTGC
 AGATTCGAAATGAACAACTCTATGAGAGAGTGAGAAGACAGCTAAGGGAGAATGCCGAGGAGGATGGA
 ACTGGATGTTTTGAGATTTTCCACCGATGTGACGATCAATGTATGGAGAGCATAAGAAATAATACTTACA
 ATCACACTGAATATCGACAGGAAGCCTTACAGAATAGGATAATGATCAATCCGGTAAAGCTTAGTGGTGG
 GTACAAAGATGTGATACTATGGTTAGCTTCGGGGCATCATGTGTAATGCTTCTAGCCATTGCTATGGGT
 CTTATTTTCATGTGTGTGAAAAACGGGAATCTGCGGTGCACTATCTGTATATAATTATTTGAAAAACACC
 CTTGTTTCTACT

Fig. 10N

Subtipo H16 (SEQ ID NO:25)

>gi|56425020|gb|AY684891.1| Virus da gripe A (A/palo silvestre da cabeça preta/Sweden/5/99(H16N3))
Hemaglutinin (HA), gene, cds completo

AGCAAAGCAGGGGATATGTCAAAACAACAGAATGGTGATCAAAGTGCTCTACTTTCTCATCGTATTGT
TAAGTAGGTATTCGAAAGCAGACAAAATATGCATAGGATATCTAAGCAACAACGCCACAGACACAGTAGA
CACACTGACAGAGAACGGAGTTCAGTGACCAGCTCAGTTGATCTCGTTGAAACAAACCACAGGAACA
TACTGCTCACTGAATGGAATCAGCCCAATTCATCTTGGTGACTGCAGCTTTGAGGGATGGATCGTAGGAA
ACCCTTCCTGTGCCACCAACATCAACATCAGAGAGTGGTCGTATCTAATTGAGGACCCCAATGCCCCAA
CAAACCTCGCTTCCCAGGAGAGTTAGATAATAATGGAGAATTACGACATCTCTCAGCGGAGTGAACCT
TTTAGCAGAACAGAATTAATAAGTCCCAACAAATGGGGAGACATTCGGATGGAGTCACCGCTTCTTGCC
GCGATAATGGGGCAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGGTCTGGATAGTGAAGAATAAAAAATGGAAAAATCCC
TGTCATAAAGGGGGATTACAATAACACAACAGGCAGAGATGTTCTAGTACTCTGGGGCATTACCATCCG
GATACAGAAACAACAGCCATAAACTTGTACGCAAGCAAAAACCCCTACACATTAGTATCAACAAAGGAAT
GGAGCAAAAGATATGAACTAGAAATTTGGCACCAGAATAGGTGATGGACAGAGAAGTTGGATGAAACTATA
TTGGCACCTCATGCGCCCTGGAGAGAGGATAATGTTTGAAAGCAACGGGGCCCTTATAGCGCCAGATAC
GGATACATCATTGAGAAGTACGGTACAGGACGAATTTCCAAAGTGGAGTGAAGTGGCCAAATGCAACA
CAAAGTGTCAAACATCATTAGGTGGGATAAACACCAACAAAACCTTTCCAAAACATAGAGAGAAATGCTCT
TGGAGATTGCCCAAAGTACATAAAGTCTGGACAGCTGAAGCTTGCAACTGGGCTGAGAAATGTCCCATCC
GTTGGTGAAAGAGGTTTGTGGTGCATTCAGGCTTCATAGAAGGAGGGTGGCCTGGGCTAATTAATG
GATGGTATGGTTCCAGCATCAGAATGAACAGGGGACTGGCATTGCTGCAGACAAAGCCTCCACTCAGAA
AGCGATAGATGAAATAACAACAAAAATTAACAATATAATAGAGAAGATGAACGGAAACTATGATTCATA
AGAGGGGAATCAATCAAGTAGAAAAGAGGATCAACATGCTCGCTGATCGAGTTGATGATGCAGTAACTG
ACATATGGTCTGACAACTGCTAACTTCTTGTACTGCTTGAAAATGGGAGAACATTGGACTTACACGACGC
AAATGTCAGGAACCTTACACGATCAGGTCAAGAGAATATTGAAAAGTAATGCTATTGATGAAGGAGATGGT
TGCTTCAATCTTTCACAAATGTAATGACTCATGCATGGAACCTATTAGAAATGGGACCTACAATCATG
AAGATTACAGGGAAGAATCACAACCTGAAAAGGCAGGAAATTGAGGGAATAAAATGAAGTCTGAAGACAA
TGTGTATAAAGTACTGTCGATTTATAGCTGCATTGCAAGCAGTATTGTGCTGGTAGGTCTCATACTTGCG
TTCATAATGTGGGCATGCAGCAATGGAATTTGCCGGTTTAAATGTTTGTATATAGTCGGAAAAAATACCCT
TGTTTCTACT

Fig. 100

Gripe B (SEQ ID NO:26)

>gi|325175|gb|K00423.1|FLBHAZO Gripe B /Lee/40, Hemagglutinin(seg 4), segmento completo

AGCAGAAGCGTTGCATTTTCTAATATCCACAAAAATGAAGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACAT
 CCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACCTCACCTCATGTGGTTAAAACTGCCACTCA
 AGGGGAAGTCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAAACACCTACCAAATCTCATTGCAAATCTC
 AAAGGAACACAGACCAGAGGAAAACCTATGCCCAAACCTGTTTAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCCTAG
 GCAGACCAAATGCATGGGAACACACCCCTCCGAAAAGTCTCAATACTCCATGAAGTCAAACCTGCTAC
 ATCTGGATGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGACAACCTAACTTCTCAGAGGATAT
 GAAAACATCAGGTTATCAACCAGTAATGTTATCAATACAGAGACGGCACCAGGAGGACCCTACAAGGTGG
 GGACCTCAGGATCTTGCCCTAACGTTGCTAATGGGAACGGCTTCTCAACACAATGGCTTGGGTTATCCC
 AAAAGACAACAACAAGACAGCAATAAATCCAGTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTTTCAGAAGGGGAA
 GACCAAATTAAGTGTGGGGTTCACCTCTGATGACAAAACCCAAATGGAAAGACTCTATGGAGACTCAA
 ATCTCAAAAAGTTCACCTCATCTGCCAATGGAGTAACCACACATATGTTTCTCAGATTGGTGGCTTCCC
 AAATCAAACAGAAGACGAAGGGCTAAAACAAGCGGCAGAATTGTTGTTGATTACATGGTACAAAAACCT
 GGAAAAACAGGAACAATTGTTTATCAAAGAGGCATTTTATGCTCAAAAAGTGTGGTGCACAAGTGGCA
 GGAGCAAGGTAATAAAAAGGCTCCTGCTTTAATGGTGAAGCAGATTGCTCCACGAAAAGTACGGTGG
 ATTAATAAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAGCATGCAAAGGCCATAGGAAATGCCCCAATATGGGTG
 AAAACACCTTGAAGCTGGCCAAATGGAACCAAATATAGACCGCTGCAAAAATTAAGGAAAGAGGTT
 TCTTCGGAGCTATGCTGGTTTCTTGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACAC
 ATCTCATGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAACAGATA
 ACAAAAAATCTCAACTATTTAAGTGAGCTAGAAGTAAAAACCTTCAAAGACTAAGCGGAGCAATGAATG
 AGCTTACGACGAAATACTCGAGCTAGACGAAAAGTGGATGATCTAAGAGCTGATACAATAAGCTCACA
 AATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTCCAACGAAGGATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTCTGGCACTT
 GAAAGAAAACCTGAAGAAAATGCTTGGCCCTCTGCTGTAGAAAATAGGGAATGGGTGCTTGAACCAAAC
 ACAATGCAACCAGACTTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAAATGCAGGAGATTTTCTTCTCC
 CACTTTTGATTCATTAACATTACTGCTGCATCTTAAATGATGATGGCTTGGATAATCATACTATACTG
 CTCTACTACTCAACTGCTGCTTAGCTTGGCTGTAACATTAATGATAGCTATCTTCATTGCTACATGG
 TCTCCAGAGACAATGTTTCTTGTCCATCTGCTGTGAGGGAGATTAAGCCCTGTGTTTTCCTTTACTGT
 AGTGCTCATTGCTGTCCACATTACAAGAAACGTTATGAAAAATGCTCTTGTACTACT

Fig. 10P

Gripe C (SEQ ID NO:27)

>gi|325317|gb|M17868.1|FLCHAJO Gripe C /Johannesburg/66
Hemagglutinin esterase RNA, cds completo

AGCAGAAGCAGGGGTTAATAATGTTTTTCTCATTACTCTTGGTGTGGGCCTCACAGAGGCTGAAAAA
TAAAGATATGCCTTCAAAGCAAGTGAACAGTAGCTTCAGCCTACACAATGGCTTCGGAGGAAATTTGTA
TGCCACAGAAGAAAAAGAATGTTGAGCTTGTAAAGCCAAAGCTGGAGCCTCTGTCTGAAATCAAAGT
ACATGGATTGGCTTTGGAGATTCAAGGACTGACAAAAGCAATTCAGCTTTTCCTAGGTCTGTGATGTTT
CAGCAAAAACCTGCTGATAAGTTTCGTTTTTTGCTGGTGGATCCTTAATGTTGAGTATGTTTGGCCACC
TGGGAAGGTAGACTACCTTTACCAAGGATGTGAAAACATAAAGTTTTTATGAAGGAGTTAACTGGAGT
CCACATGCTGCTATAAATTGTTACAGAAAAAATGGACTGATATCAAAGTAAATTTCCAGAAAAACATTT
ATGAATTGGCTTCAAAATCACATTGCATGAGCTTGGTGAATGCCTTGGACAAAACATTTCTTTTACAAGT
GACTGCTGGGACTGCAGGAAATGCAACAACAGCTTCTTAAAAAATCCAGCATGTACACACAAGAAGTC
AAGCCTTCAGAAAACAAATGTGGGAAAGAAAACTTGGCTTCTTCCACTTCCAACCAATTTGGAACCT
ATGAGTGCAAACGCACTTGTGGCTTCTTGCTATTTTATCTATGATAGTAAAGAAGTGTACAATAAAAG
AGGATGTGACAACACTTTCAAGTGATCTATGATTCATTTGGAAAAGTCGTTGGAGGACTAGATAACAGG
GTATCACCTTACACAGGGAATTCCTGGAGACACCCCAACAATGCAATGTGACATGCTCCAGCTGAAACCTG
GAAGATATTCAGTAAGAAGCTCTCAAGATTCCTTTTAAATGCCTGAAAGAAGTATTGCTTTGACATGAA
AGAAAAAGGACCAGTCACTGCTGCTCAATCCATTTGGGAAAAAGGCAGAGAATCTGACTATGCAGTGGAT
CAAGCTTGCTTGAGCACTCCAGGGTGCATGTTGATCCAAAAGCAAAGCCATACATTGGAGAAGCTGATG
ATCACCATGGAGATCAAGAAATGAGGGAGTTGCTGTCAGGACTGGACTATGAAGCTAGATGCATATCACA
ATCAGGGTGGGTGAATGAAACCAAGTCTTTTACGGAGAAATACCTCCTTCCCTCCAAATTTGGAAGATGC
CCTTTGGCTGCAAAGGAAGAAATCCATTCAAAAATCCCAGATGGCCTTCTAATTTCCACCAAGTGGAAACCG
ATACCACTGTAACCAAACCTAAGAGCAGAATTTTGGAAATCGATGACCTCATTATTGGTGTGCTCTTTGT
TGCAATCGTTGAAACAGGAATGGAGGCTATCTGCTTGGAAAGTAGAAAAGAATCAGGAGGAGGTGTGACA
AAAGAATCAGCTGAAAAAGGGTTTGGAAAATGGAAATGACATACAAATTTTAAAATCTTCTATAAATA
TCGCAATAGAAAAACTAAATGACAGAATTTCTCATGATGAGCAAGCCATCAGAGATCTAACTTTAGAAAT
TGAAAATGCAAGATCTGAAGCTTTATTTGGGAGAATTTGGGAATAATAAGAGCCTTATTGGTAGGAAATATA
AGCATAGGATTACAGGAATCTTTATGGGAACCTAGCTTCAGAAATAACAAATAGAGCAGGAGATCTAGCAG
TTGAAGTCTCCCAAGGTGCTGGATAATTGACAATAACATTTGTGATCAAAGCTGTCAAATTTTATTTT
CAAGTTCAACGAAACTGCACCTGTTCCAACCATTTCCCTCTTGACACAAAAATTTGATCTGCAATCAGAT
CCTTTTTACTGGGGAAGCAGCTTGGGCTTAGCAATAACTGCTACTATTTTATTGGCAGCTTTGGTGTATCT
CTGGGATCGCCATCTGCAGAACTAAATGATTGAGACAATTTGAAAAATGGATAATGTTGGTCAATAT
TTGTACAGTTTTATAAAAAACAAAAATCCCTTGTACTGCT

Fig. 10Q

SEQ ID NO: 29

5'-AGTTCCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTC-3'

Fig. 10 R

SEQ ID NO: 30

5'-AATAGGAGCTCCATTTTCTCTCAAGATGATTAATTAATTAATTAGTC-3

Fig. 10S

SEQ ID NO: 31

5'-AATAGGAGCTCGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGG-3'

Fig. 10T

SEQ ID NO: 32

5'-
TTACGAATTCTCCTTCCTAATTGGTGTACTATCATTTATCAAAGGGGA-3'

Fig. 11

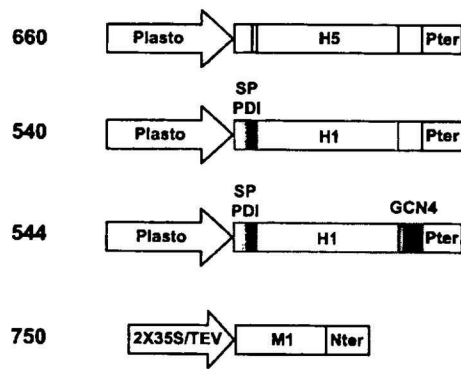
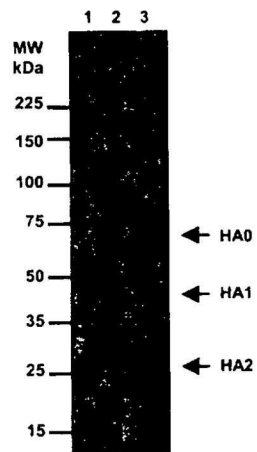


Fig. 12



- 1- H5 comercial (750 ng)
- 2- Extrato de proteína de folha de imitação (37.5 µg)
- 3- Extrato de proteína de folha de planta infiltrada R-660 (37.5 µg)

Fig. 13A

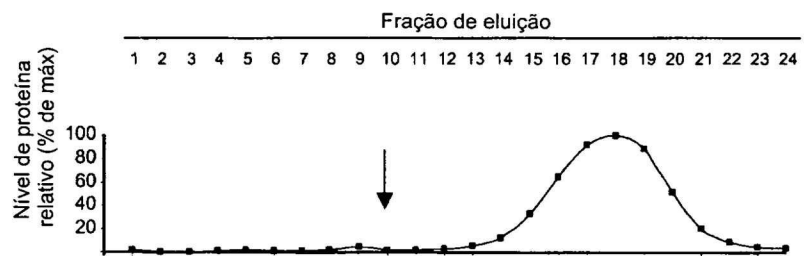


Fig. 13B

H5



Fig. 13C

H1

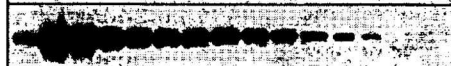


Fig. 13D

H1 solúvel



Fig. 13E

Invólucro H1

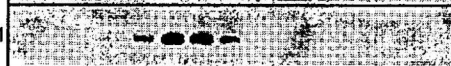


Fig. 13F

H1+M1

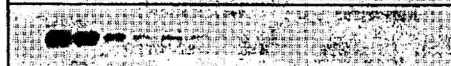


Fig.14A

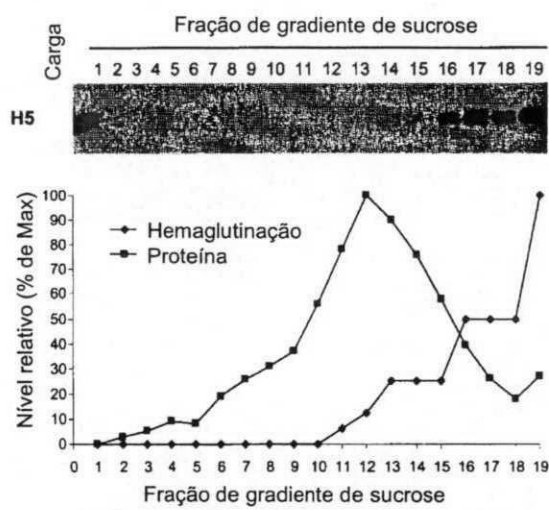


Fig. 14B



Fig. 15A

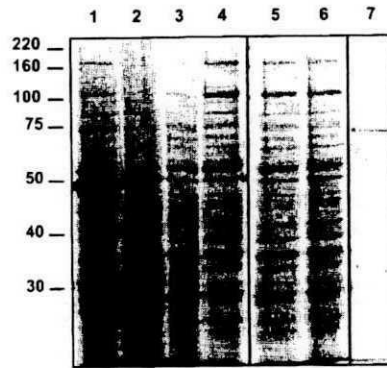


Fig. 15B



Fig. 15C

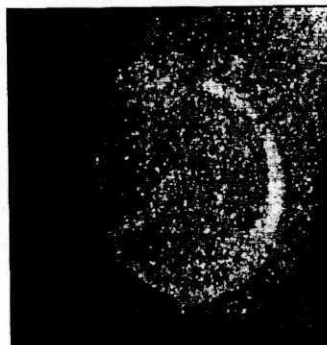


Fig. 15D

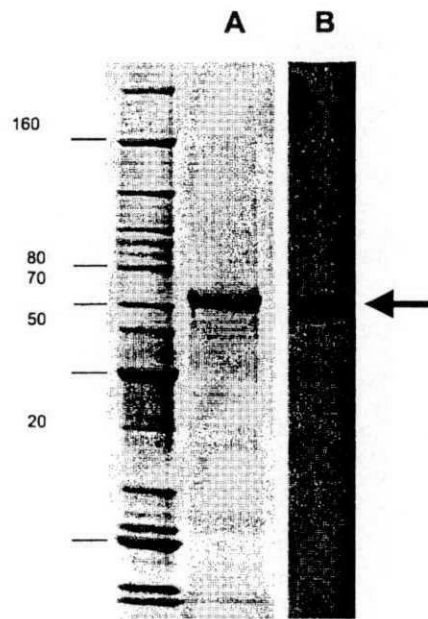


Fig. 16

SEQ ID NO: 33

ATGAAAGCAAACTACTGGTCCTGTTATGTACATTTACAGCTACATATGCAGAC
CACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAG
TACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGT
CACAATGGAAAATATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAA
TTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTT
CCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAATCCTGAGAATGGAACA
TGTTACCCAGGGTATTTGCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTC
AGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCCA
ACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCAATAATGGGAAAAGCAGT
TTTACAGAAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTGTACCCAAACCT
GAGCAAGTCCTATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTG
TTCATCACCCGCTAACATAGGGAACCAAAGGGCCCTCTATCATACAGAAAAT
GCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTACATTATAGCAGAAGATTCACCCAGAAAAT
AGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTACTGGA
CTCTGCTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGC AAAATGGAATCTAATA
GCGCCATGGTATGCTTTTGCCTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAC
CTCAAATGCACCAATGGATGAATGTGATGCGAAGTGTC AAACACCTCAGGGAG
CTATAAACAGCAGTCTTCCCTTTCCAGAATGTACACCCAGTCACAATAGGAGAG
TGCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAATAAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAA
CATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGGTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTG
AAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAAT
GAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAA
CGGGATTACAAACAAGGTGAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCA
CAGCTGTGGGCAAAGAATTCAACAAATGGAAAAGAAGGATGGAAAATTAAT
AAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTT
GGTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGA
ATCTGTATGAGAAAGTAAAAGCCAATTAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGA
AACGGGTGTTTTGAATTCTATCACAAGTGAACAATGAATGCATGGAGAGTGT
GAAAAATGGAACCTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACA
GGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTG
GCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCTGGTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGC
AATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCT
GAGACCAGAATTTCA

Fig. 17

SEQ ID NO: 34

CCAAATCCTTAACATTCTTTCAACACCAACAATGGCGAAAAACGTTGCGATT
TTCGGTTTATTGTTTTCTTCTTCTTCTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTG
AGGAATCATCAACTGACGCTAAGGAATTTGTTCTTACATTGGATAAACAATA
TTCCATGACACTGTTAAGAAGCAGATTTTCATCGTTCGTTGAATTCTACGCA
CCTTGGTGTGGACACTGTAAGAAGCTAGCCCCAGAGTATGAGAAGGCTGCTT
CTATCTTGAGCACTCACGAGCCACCAGTTGTTTTGGCTAAAAGTTGATGCCAA
TGAGGAGCACAACAAAGACCTCGCATCGGAAAATGATGTTAAGGGATTCCCA
ACCATTAAGATTTTTAGGAATGGTGGAAAGAACATTCAAGAATACAAAGGTC
CCCGTGAAGCTGAAGGTATTGTTGAGTATTGAAAAACAAGTGGCCCTGC
ATCCACAGAAATTAATCTGCTGATGATGCGACCGCTTTTGTGGTGACAAC
AAAGTTGTTATTGTCGGAGTTTTCCCTAAATTTCTGGTGAGGAGTACGATA
ACTTCATTGCATTAGCAGAGAAGTTGCGTTCGACTATGACTTTGCTCACAC
TTTGAATGCCAAACACCTTCCAAAGGGAGACTCATCAGTGTCTGGGCCTGTG
GTTAGGTTATTTAAGCCATTTGACGAGCTCTTTGTTGACTCAAAGGATTTCA
ATGTAGAAGCTCTAGAGAAATTCATTGAAGAATCCAGTACCCCAATTGTGAC
TGTCTTCAACAATGAGCCTAGCAATCACCCTTTTGTTGTCAAATTCTTTAAC
TCTCCCAACGCAAAGGCTATGTTGTTCACTTACTACCGAAGGTGCTG
AATCTTTCAAACAATAACCATGAAGTGGCTGAGCAATACAAACAACAGGG
AGTTAGCTTTCTTGTGGAGATGTTGAGTCTAGTCAAGGTGCCTTCCAGTAT
TTTGGACTGAAGGAAGAACAAGTACCTTAATTATTATTAGCATAATGATG
GCAAGAAGTTTTTCAAACCCAATTTGGAAGTGAATCAACTCCCAACTTGGTT
GAAGGCATACAAGGATGGCAAGGTTGAACCATTTGTCAAGTCTGAACCTATT
CCTGAAACTAACAACGAGCCTGTTAAAGTGGTGGTTGGGCAAACCTTGGAG
ACGTTGTTTTCAAGTCTGGGAAGAATGTTTGATAGAGTTTTATGCTCCTTG
GTGTGGTCACTGCAAGCAGTTGGCTCCAATCTTGGATGAAGTTGCTGTCTCA
TTCCAAAGCGATGCTGATGTTGTTATTGCAAACTGGATGCAACTGCCAACG
ATATCCCAACCGACACCTTTGATGTCCAAGGCTATCCAACCTTGACTTCAG
GTCAGCAAGTGGAAAACATCACAAATACGACGGTGGTAGGACAAAGGAAGAC
ATCATAGAATTCATTGAAAAGAACAAGGATAAAAAGTGGTGCTGCTCATCAAG
AAGTAGAACAACAAAAGCTGCTGCTCAGCCAGAAGCAGAACAACAAAAGA
TGAGCTTTGAAAAGTTCGCTTGGAGGATATCGGCACACAGTCATCTGCGGG
CTTTACAACCTTTTTGTATCTCAGAATCAGAAGTTAGGAAATCTTAGTGCCA
ATCTATCTATTTTTGCGTTTTCAATTTATCTTTTGGTTTACTCTAATGTATT
ACTGAATAATGTGAGTTTTGGCGGAGTTTAGTACTGGAACCTTTGTTTCTGT
AAAAAAAAAAAAA

Fig. 18

Fig. 18

SEQ ID NO: 35

AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTAC
GTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTG
AAGATGTCTTTGCAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAA
GACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACAG
CTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCC
TTAATGGGAACGGGGATCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAACTGTATAGGAA
GCTCAAGAGGGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCT
GCTGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGCTGTGA
CCACTGAAGTGGCATTGTCCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTC
CCAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAACCCACTAATCAGACAT
GAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTG
GATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAAT
GGTGCAAGCGATGAGAACCATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAA
AATGATCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGC
AACGGTTCAAGTGATCCTCTCGCTATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACT
TGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTTACCGTCGCTTTAA
ATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTATGAGGGAA
GAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTGTCA
GCATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTTTCTACT

Fig. 19

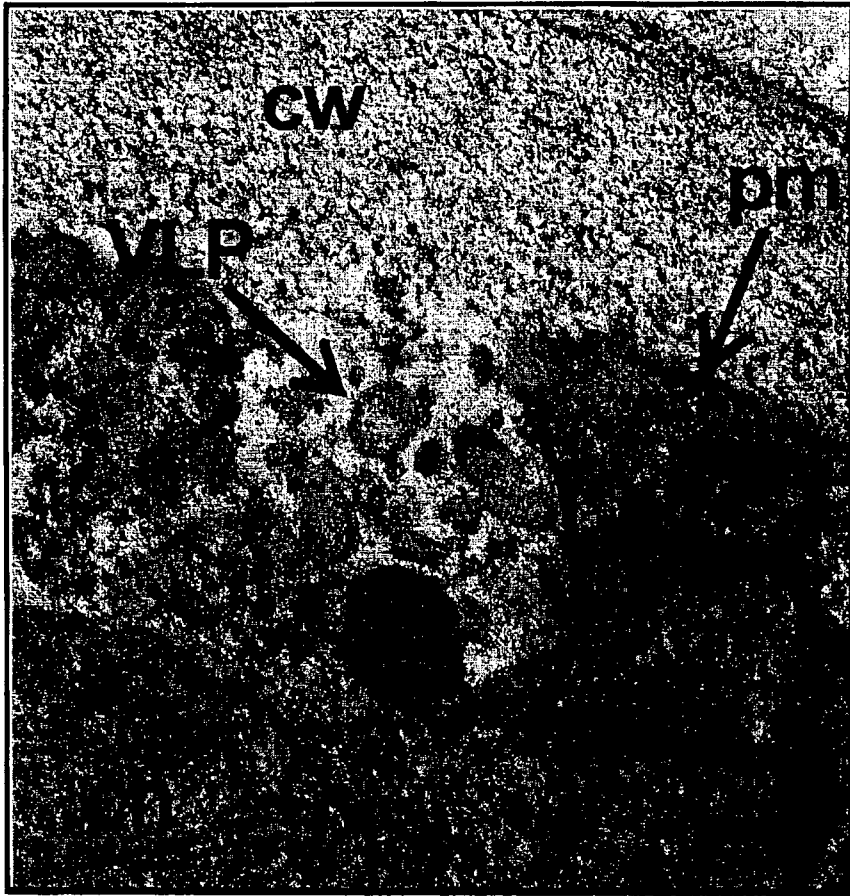


Fig. 20A

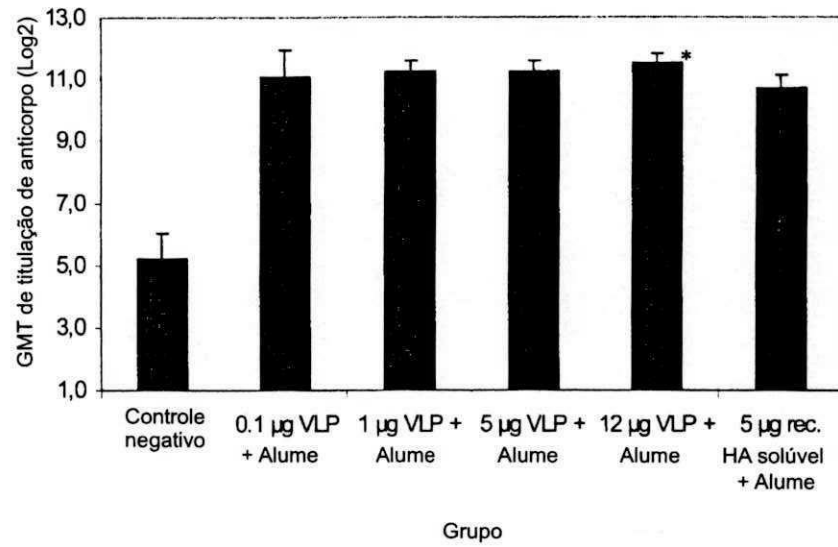


Fig. 20B

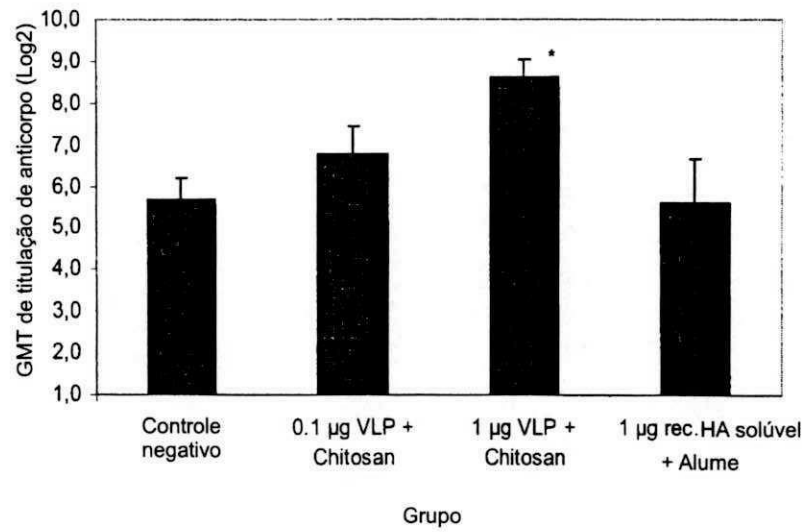


Fig. 21A

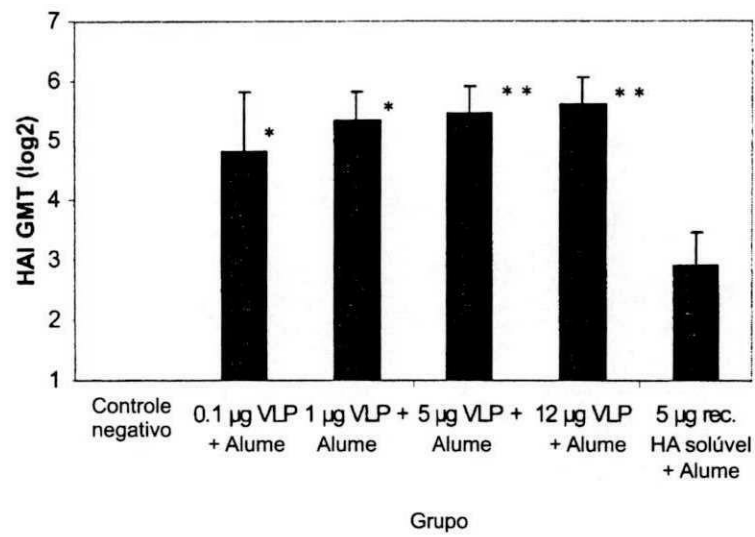


Fig. 21B

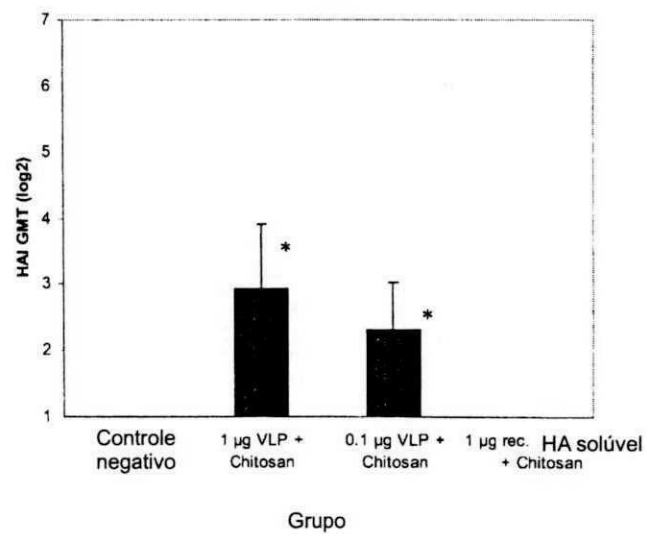


Fig. 22A

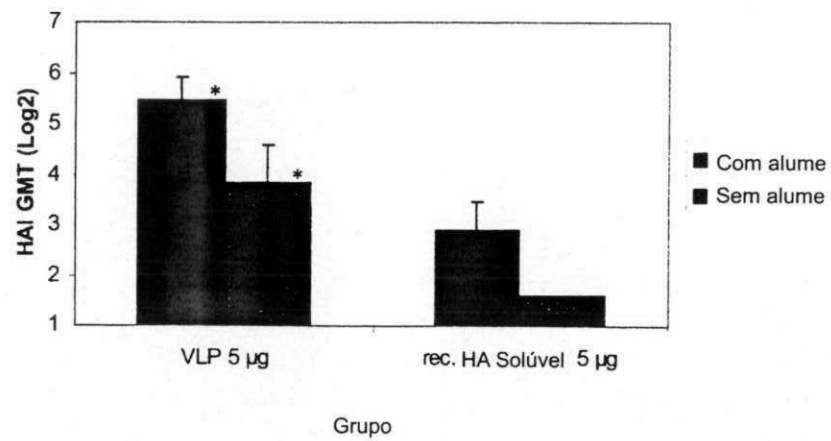


Fig. 22B

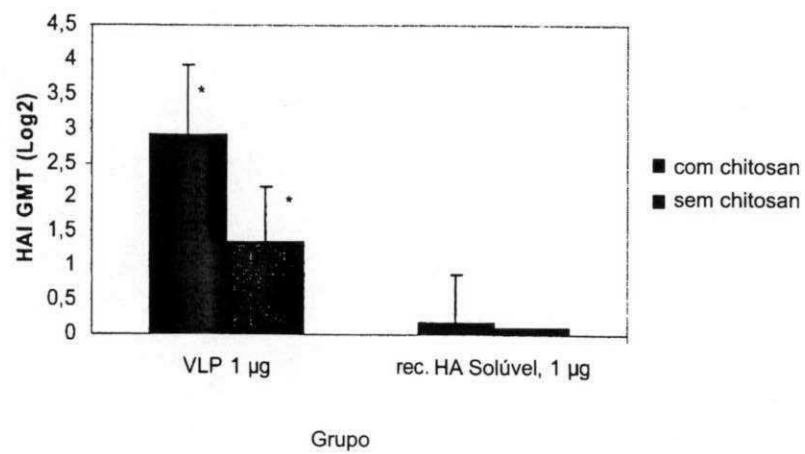


Fig. 23A

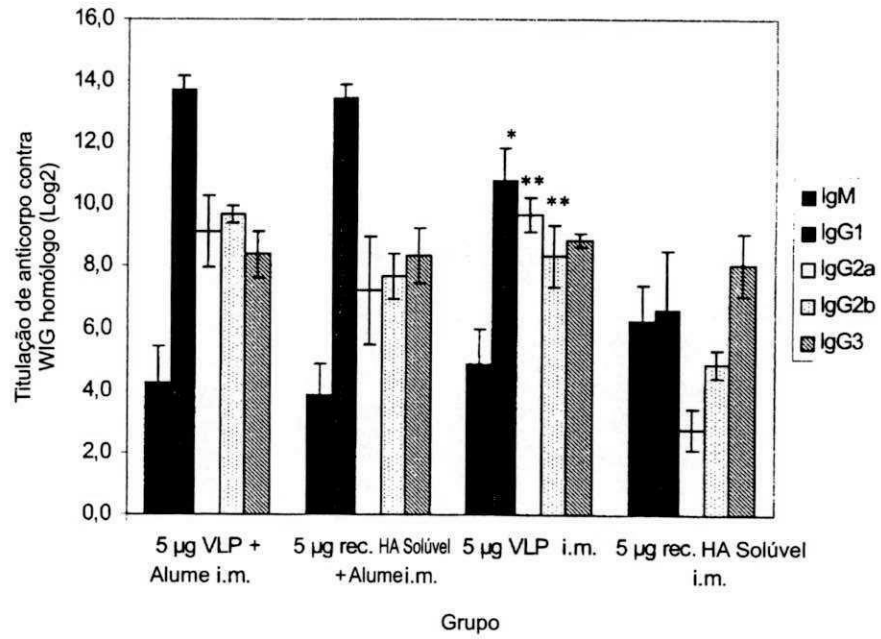


Fig. 23B

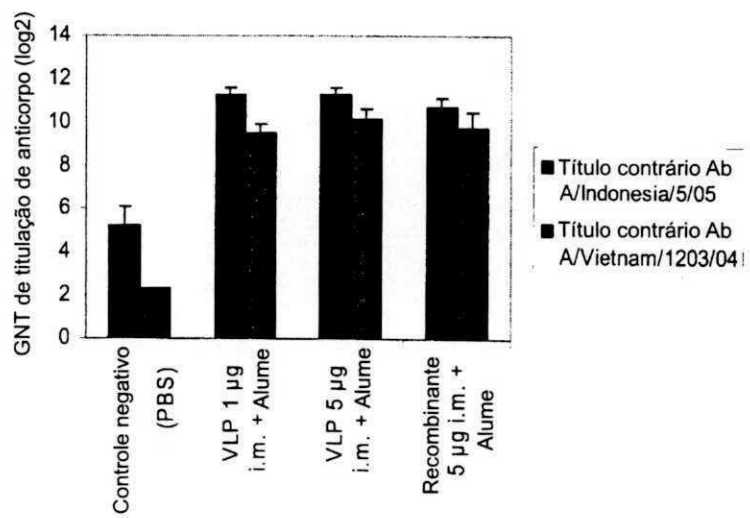


Fig. 24

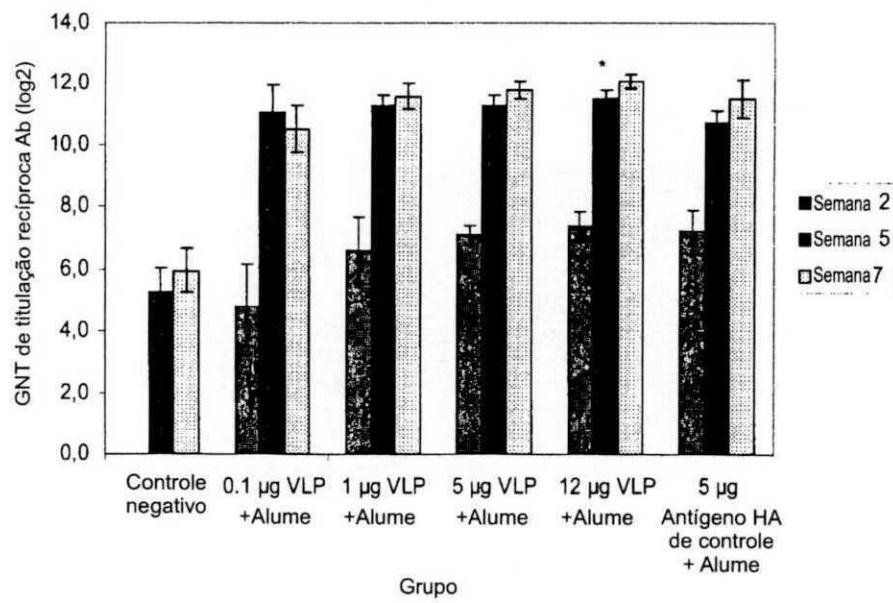


Fig. 25A

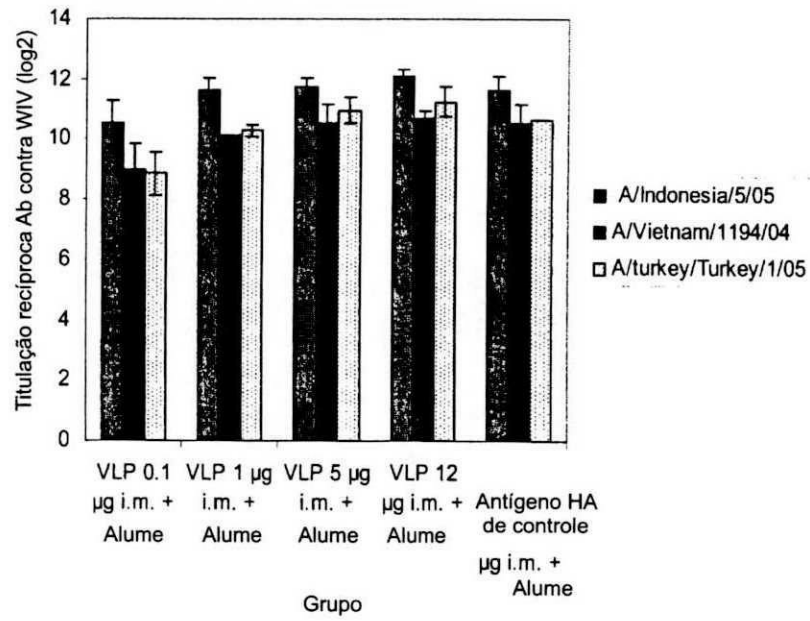
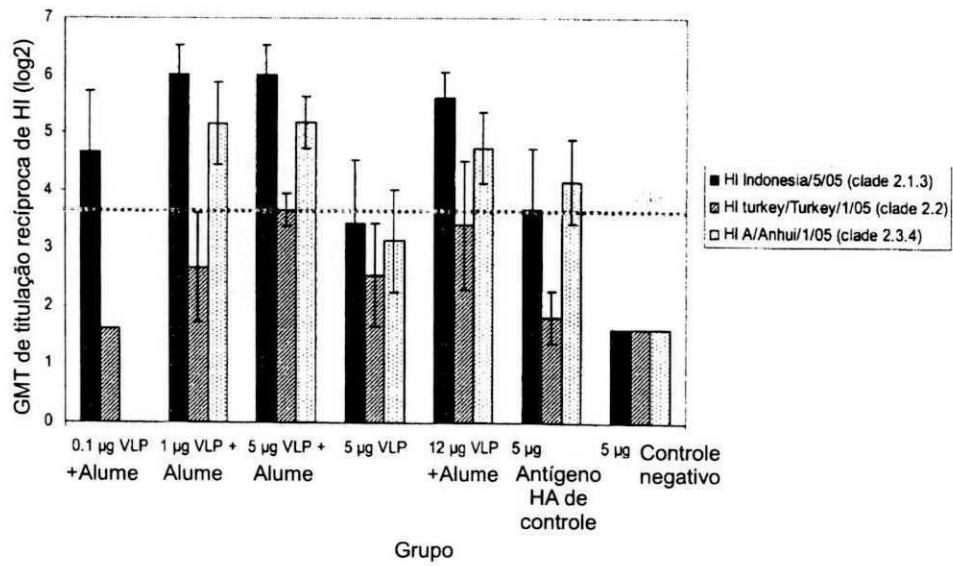


Fig. 25B



A todos os valores < 10 foram dados um valor arbitrário de 5 (1,6 em log2) e são considerados negativos

Fig. 26A

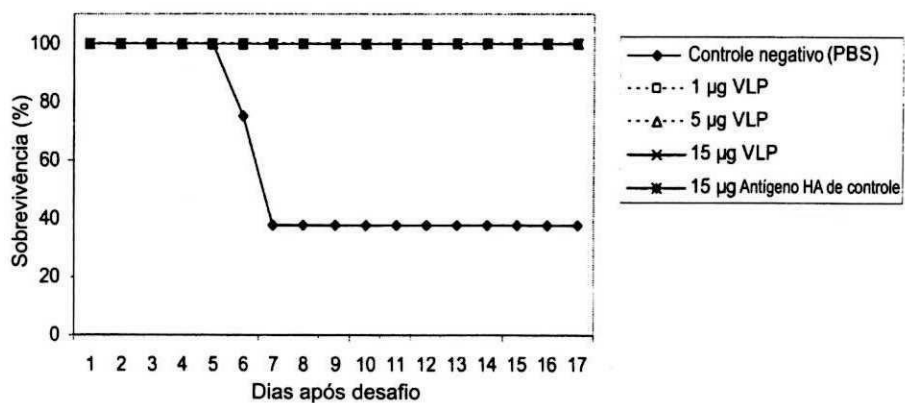


Fig. 26B

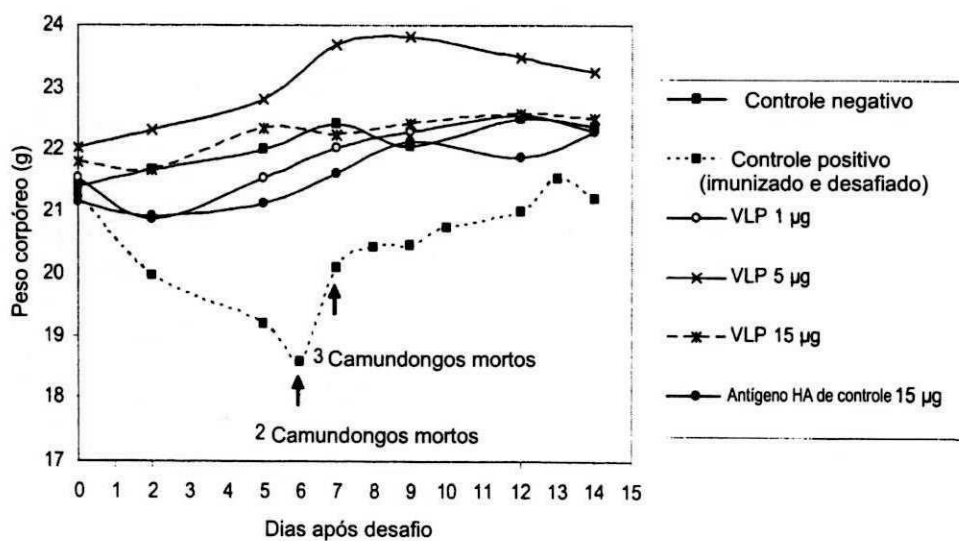


Fig. 27A

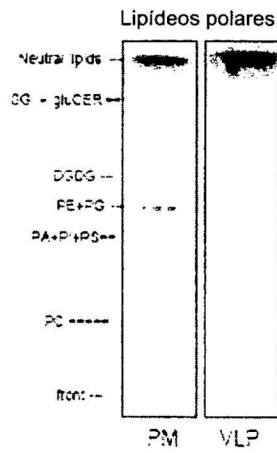


Fig. 27B

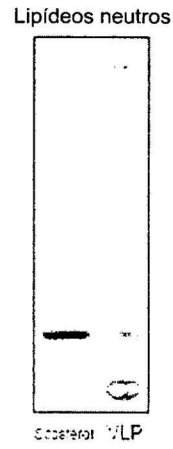


Fig. 27C

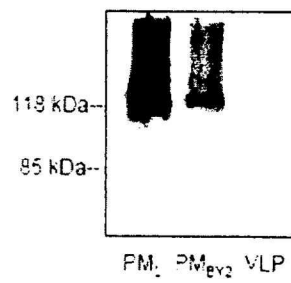


Fig. 29

SEQ ID NO: 37

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAAGTAAAACACTACTGGTCCTGTTA
TGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACCA
ACTCAACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACT
CTGTCAACCTGCTTGAGGACAGTCACAATGGAAAATTATGTCTATTAAGGAAT
AGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCC
AGAATGCCAATTACTGATTTCCAGGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAAACCA
AATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCCGACTATGAGGAACTG
AGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTGAAATATCCCCAAAG
AAAGCTCATGGCCCAACCACACCACAACCCGGAGTATCAGCATCATGCTCCATA
ATGGGGAAAGCAGTTTTTACAAAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTT
GTACCCAAACCTGAGCAAGTCTATGCAACAACAAGAGAAAGAAGTCCCTTGTA
CTATGGGGTGTTTCATCACCCGCCTAACATAGGTGACCAAAGGGCTCTCTATCAT
AAAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTACATTATAGCAGAAAATTCACCCC
AGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCAACTACTAC
TGGACTCTACTTGAACCCGGGGATAACAATAATTTGAGGCAAATGGAAATCTAA
TAGCGCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCA
ACTCAAATGCACCAATGGATGAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAG
CTATAAACAGCAGTCTTCTTCCAGAATGTACACCCTGTCACAATAGGAGAGTG
TCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACAT
CCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGGTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGG
GGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCA
AGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATT
ACAAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGG
GCAAAGAGTTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACCTAAATAAAAAGTTGA
TGATGGGTTTATAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAA
AATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAG
TAAAAGCCAATTAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTT
CTATCATAAGTGTAAACGATGAATGCATGGAGAGTGTA AAAAATGGAACCTTATGAC
TATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGA
AATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAG
TTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAAT
GGGTCTTGCAGTGTAGAATATGCATCTGAGAGCTC

Fig. 30

SEQ ID NO: 38

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGA
CTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGACTATCATTGCTTTGAG
CTACATTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACCTCCCGGAAATGACAACAGCA
CGGCAACGCTGTGCCTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGA
AAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTGAG
AGTTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAG
AAAACGCACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTT
CCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACT
GTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCA
TCCGGCACACTGGAGTTTAAACAATGAAAGTTTCAATTGGACTGGAGTCACTCA
AAACGGAACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAACAGTTTCTTTAGTA
GATTGAATTGGTTGACCCACTTAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACT
ATGCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCCACCACC
GGGTACGGACAATGACCAAATCTTCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATC
ACAGTCTTACCAAAGAAGCCAACAAACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAG
ACCCAGAGTAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAA
AACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAG
GGGTTACTTCAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCA
CCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAACGGAAGCATTCCCAA
TGACAAACCATTCAAATGTAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCCAGA
TATGTTAAGCAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAG
AGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGG
TTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAATTTCTGAG
GGAATAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAA
TCAATGGGAAGCTGAATAGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATCCATCA
GATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAA
TATGTTGAGGACACCAAATAGATCTCTGGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGT
TGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAAAC
TGTTTGAAAAACAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAA
TGTTGTTTCAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCA
GAAATGGAACCTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCG
GTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGAAGTCAGGATACAAAGATTGGATACTA
TGGATTTCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTC
ATCATGTGGGCCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGAG
AGCTC

Fig. 31

SEQ ID NO: 39

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGACTATCATTGCTTTG
AGCTACATTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACCTCCCGGAAATGACAACA
GCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATA
GTGAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTG
GTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGGAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTT
GATGGAGAAAACCTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGT
GATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCC
TACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCA
CTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTAACGATGAAAAGTTTCAATTGG
ACTGGAGTCACTCAAAATGGAACAAGCTCTGCTTGCAAAGGAGATCTAAT
AACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATCAAATACC
CAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACAT
TTGGGGGGTTCACCACCCGGGTACGGACAATGACCAAATCTTCTGCATG
CTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAGAAGCCAACAACTG
TAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCAGCAGAA
TAAGCATCTATTGGACAATAGTAAACCAGGAGACATACTTTTGATTAACAG
CACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAATACGAAGTGGGAA
AAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATG
CATCACTCCAATGGAAGCATTCCAATGACAAACCATTTCAAATGTAAAC
AGGATCACATATGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAACACTCTGAAA
TTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAACTAGAGGCATATTT
GGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGG
TTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATCTGAGGGAATAGGACAAGCAGCAGA
TCTCAAAGCACTCAAGCAGCAATCAATCAATCAATGGGAAGCTGAATAG
GTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATCCATCAGATTGAAAAGAGTTCTC
AGAAGTAGAAGGGAGAATCCAGGACCTCGAGAAATATGTTGAGGACACTAA
AATAGATCTCTGGTCATACACGCGGAGCTTCTTGTGGCCCTGGAGAACCA
ACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAACTGTTTGAAAGAACA
AAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGTTGTTTCAA
ATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCT
ATGACCATGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGTTCCAGATCA
AAGGCGTTGAGCTGAAGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCT
TTGCCATATCATGTTTTTGTCTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTG
GGCCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGAGAGCTC

Fig. 32

SEQ ID NO: 40

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGGCAATAATTGTAC
TACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACAT
CGTCAAACCTCACCACATGTTGTCAAACCTGCTACTCAAGGGGAGGTCAAT
GTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCA
AATCTCAAAGGAACAGAAACCAGAGGGAAACTATGCCCAAATGCCTCAA
CTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAATGCACGGGGAAC
ATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCT
GGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAATAATTAGACAGCTGCCTAAA
CTTCTCAGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACTCATAACGTTATCAAT
GCAGAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTG
CCCTAACGTTACCAATGGAAACGGATTTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCG
TCCCAAAAAACGACAACAACAACAGCAACAATTATTAAACAATAGAAG
TACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGTTTC
CACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCC
CCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCAC
AGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGC
GGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAAAC
AATTACCTATCAAAGAGGTATTTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGGTGCAGCAAG
TGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATTGGAGAAGCAG
ATTGCCTCCACGAAAATACGGTGGATTAACAAAAGCAAGCCTTACTACA
CAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACA
CCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTA
AAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATG
GGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACAT
GGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACA
AGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTC
AAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTA
GACGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGA
ACTCGCAGTCCTGCTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGC
ATCTCTTGGCGCTTGAAGAAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCT
GTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGAC
CTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAAATTTCTCT
CCCCACTTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGG
ATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTT
GGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGA
CAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAGAGCTC

Fig. 33

SEQ ID NO: 41

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAA
GAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGGCAATAATT
GTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGAA
TAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGA
GGTCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCT
TATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGGAAACTATGCCCA
GACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATG
TGTGTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTC
AAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAA
TCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATC
AACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTACA
GACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGAT
TTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAATG
CAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGG
AAGACCAAATCACTGTTTGGGGGTTCCATTAGATAACAAAACCCAAAT
GAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCT
AATGGAGTAACCACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCAGATC
AAACAGAAGACGGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATT
ACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTACCAAAGAG
GTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGC GCGAGTGGCAGGAGCAAA
GTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATG
AAAAATACGGTGGATTAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACA
TGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAA
GCTCGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAGGAA
AGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTAGAAGGAGGATGGGAA
GGAATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGG
AGTGGCAGTGGCGGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAA
GATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTT
CAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAG
CTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCAA
ATAGAACTTGCAGTCTTGCTTTC AACGAAGGAATAATAACAGTGAAG
ATGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACCTAAAGAAAATGCTGGGTC
CCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAGT
GCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAG
GAGAATTTTCTCTCCCACTTTTGATTCACTGAACATTACTGCTGCATCT
TTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAAC
TGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGCTAGCTATTTTTATTGTTT
ATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAAGAGCT
C

Fig. 34

SEQ ID NO: 42

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAA
GAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGCCATCATTTA
TCTAATTCTCCTGTTACAGCAGTGAGAGGGGACCAAATATGCATTGG
ATACCATGCCAATAATTCCACAGAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCG
GAACGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGACCCATAA
CGGAAAGTTATGCAAATAAACGGAATCCCTCCACTTGAAGTGGGGA
CTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGAAATCCAGAATGTGATAGGCT
TCTAAGTGTGCCAGAATGGTCCTATATAATGGAGAAAGAAAACCCGAG
AGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAA
CATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTGAGAAAGTAAAGATTCTGCCC
AAAGATAGATGGACACAGCATACAACAAGTGGAGGTTACGGGCTG
CGCGGTGTCTGGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGAC
AAAGAAAGAATCAAATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATAC
AAGCGGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGCACCATCCAATGA
TGAGACAGAACAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTC
CGTAGGCATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCAGACATAGCAAC
AAGGCCTAAAGTGAATGGACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGAC
CCTATTGGATATGTGGGACACCATAAATTTTGAGAGTACTGGTAATCTA
ATTGCACCAGAGTATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTTCAGGG
ATCATGAAAACAGAAGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAA
ACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTGCCTTTTCACAATGTCCACC
CACTGACAATAGGTGAGTGCCCCAAATATGTAATCGGAGAAGTTGG
TCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCAGATTGAATCAAGAGGAT
TGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATG
GTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGG
GTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCATTTGATGGAATCAC
CAACAAGGTAAATTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAATTTGAAGCT
GTTGGGAAAGAGTTCAGTAACTTAGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAAC
AAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAG
CTTCTAGTTCTGATGGAAAATGAGAGGACACTTGACTTTTCATGATTCTA
ATGTCAAGAATCTGTATGATAAAGTCAGAATGCAGCTGAGAGACAACG
TCAAAGAAGTAAAGTGGATGTTTTGAATTTTATCACAAATGTGATGA
TGAATGCATGAATAGTGTGAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTA
TGAAGAAGAGTCTAACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAAAATTG
AGCAGCATGGGGTTTATCAAATCCTTGCCATTTATGCTACAGTAGCA
GGTTCTCTGCACTGGCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATG
TGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGAGAGCTC

Fig. 35

SEQ ID NO: 43

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAG
AGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCT
TCTTCTTGCAATAGTCAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTA
CCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAAC
GTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGA
AGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTGATTTTAAGAGATTGTAGT
GTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATG
TGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAACCCAGCCAATGACCT
CTGTTACCCAGGGAATTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGA
GCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGG
TCCGATCATGAAGCCTCATCAGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGG
GAACGCCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAAT
ACATACCCAACAATAAAGAGAAGCTACAATAATACCAACCAGGAAGATCT
TTTGATACTGTGGGGGATTTCATCATTCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAA
AGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTA
AACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGGCA
AAGTGGAAAGGATGGATTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAA
TCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTATTGCTCCAGAATATGCATACAAA
ATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTGTTAAAAGTGAAGTGAATATGG
TAACTGCAATACAAAGTGTCAAACCTCAATAGGGGCGATAAACTCTAGTA
TGCCATTCCACAACATACACCCTCTACCATCGGGGAATGCCCAAATAT
GTGAAATCAAACAATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCT
AAGAGAAAAGAAGAAGAAAAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGGTTT
ATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCAC
CATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTC
AAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAA
ATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAG
GAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAAATGGAAGACGGATTCTAGATGTCT
GGACTTATAATGCTGAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTA
GACTTCCATGATTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACA
GCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTAT
CACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAAGAAACGGAACGTATGA
CTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTAAGAAAGAGAGGAAATAAGT
GGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAACCTTACCAAACTGTCAATTTATTCA
ACAGTTGCGAGTTCTCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCTGTATCTTT
GTGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGC
TC

Fig. 36

SEQ ID NO: 44

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTC
TTTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCA
TGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTA
CTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAATGGGAAGCTC
TGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGGAGAGATTGTAGTGTAGCT
GGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCCGGA
ATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACC
CAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAA
ACCATTTTGGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATG
AAGCCTCATTGGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAAGTCCTCC
TTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACA
ATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGG
GGGATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAAGCTCTATCAAAA
CCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCTACACTAAACCAGAGATTGGT
ACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGG
AGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTA
ATGGAAATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGG
ACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAATACCAAGT
GTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATATAC
ACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTA
GTCCTTGGGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAA
AAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGC
AGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGG
GAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAG
TCACCAATAAGGTCAACTCGATTATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGG
CCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACA
AGAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTT
CTAGTTCTCATGGAAAACGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTC
AGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGA
GCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTAT
GGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAG
CAAGACTAAAAAGAGAGGAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGA
ATTTACCAAATATTGTCAATTTATTCTACAGTGGCCAGCTCCCTAGCACTG
GCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTT
ACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTC

Fig. 37

SEQ ID NO: 45

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGATTGCAATCATTGTAA
TAGCAATACTGGCAGCAGCCGGAAAAGTCAGACAAGATCTGCATTGGGTAT
CATGCCAACAAATCAACAACACAGGTAGATACGATACTTGAGAAGAATGT
GACTGTCACACACTCAATTGAATTGCTGGAAAATCAGAAGGAAGAAAGAT
TCTGCAAGATATTGAACAAGGCCCTCTCGACTTAAGGGAATGTACCATA
GAGGGTTGGATCTTGGGGAATCCCAATGCGACCTATTGCTTGGTGATCA
AAGCTGGTCATACATTGTGAAAGACCTACTGCTCAAAACGGGATCTGCT
ACCCAGGAACCTTAAATGAGGTAGAAGAAGTACTGAGGGCACTTATTGGATCA
GGAGAAAGGGTAGAGAGATTTGAGATGTTTCCCAAAGCACCTGGCAAG
GAGTTGACACCAACAGTGAACAACAAGATCCTGCCCTTATTCTACTGGT
GCGTCTTTCTACAGAAACCTCCTATGGATAATAAAAACCAAGACAGCAGA
ATATCCAGTAATTAAGGGAATTTACAACAACACTGGAACCCAGCCAATCCT
CTATTTCTGGGGTGTGCATCATCCTCCTAACACCGACGAGCAAGATACTC
TGTATGGCTCTGGTGATCGATACGTTAGAATGGGAACTGAAAGCATGAAT
TTTGCCAAGAGTCCGGAAATTGCGGCAAGGCCTGCTGTGAATGGACAAA
GAGGCAGAATTGATTATTATTGGTCGGTTTTAAACCAGGGGAAACCTTG
AATGTGGAATCTAATGAAATCTAATCGCCCTTGGTATGCATACAAATTT
GTCAACACAAATAGTAAAGGAGCCGTCTTCAGGTGAGATTTACCAATCGA
GAACTGCGATGCCACATGCCAGACTATTGCAGGGGTTCTAAGGACCAATA
AAACATTTGAGAATGTGAGTCCCCTGTGGATAGGAGAATGTCCCAAATAC
GTGAAAAGTGAAAGTCTGAGGCTTGCAACTGGACTAAGAAATGTTCCACA
GATTGAACTAGAGGACTCTTCGGAGCTATTGCAGGGTTTATTGAAGGAG
GATGGACTGGGATGATAGATGGGTGGTATGGCTATCACCATGAAAATTCT
CAAGGGTCAGGATATGCAGCAGACAGAGAAAGCACTCAAAGGCTGTAA
ACAGAATTACAAATAAGGTCAATTCATCATCAACAAAATGAACACACAAT
TTGAAGCTGTCGATCACGAATTTCAAATCTGGAGAGGAGAATTGACAAT
CTGAACAAAAGAATGCAAGATGGATTTCTGGATGTTTGGACATACAATGC
TGAAGTGTGGTTCTTCTTGAAAACGAAAGAACACTAGACATGCATGACG
CAAATGTGAAGAACCTACATGAAAAGGTCAAATCACAACCTAAGGGACAAT
GCTACGATCTTAGGGAATGGTTGCTTTGAATTTTGGCATAAGTGTGACAAT
GAATGCATAGAGTCTGTCAAAAATGGTACATATGACTATCCCAAATACAG
ACTGAAAGCAAATTAACAGGCTAAAAATAGAATCAGTAAAGCTAGAGAAC
CTTGGTGTGTATCAAATTTGCCATTTATAGTACGGTATCGAGCAGCCTA
GTGTTGGTAGGGCTGATCATGGCAATGGGTCTTTGGATGTGTTCAAATGG
TTCAATGCAGTGCAGGATATGTATATAAGAGCTC

Fig. 38

SEQ ID NO: 46

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAACACTCAAATTCTAA
TATTAGCCACTTCGGCATTCTTCTATGTACGTGCAGATAAAATCTGCCTAG
GACATCATGCTGTGTCTAATGGAACCAAAGTAGACACCCTTACTGAAAAA
GGAATAGAAGTTGTCAATGCAACAGAAACAGTTGAACAAACAAACATCCC
TAAGATCTGCTCAAAGGAAAACAGACTGTTGACCTTGGTCAATGTGGAT
TACTAGGGACCGTTATTGGTCCTCCCAATGTGACCAATTTCTTGAGTTCT
CTGCTAATTTAATAGTTGAAAGAAGGGAAGGTAATGACATTTGTTATCCAG
GCAAATTTGACAATGAAGAAACATTGAGAAAAATACTCAGAAAAATCCGGA
GGAATTA AAAAGGAGAATATGGGATTCACATATACCGGAGTGAGAACCAA
TGAGAGACTAGCGCATGTAGAAGGTCAAGATCTTCCTTTTATGCAGAGA
TGAAATGGCTTCTATCCAGCACAGACAATGGGACATTTCCACAAATGACA
AAGTCCTACAAGAACTAAGAAGGTACCAGCTCTGATAATCTGGGGAAT
CCACCACTCAGGATCACTACTGAACAGACTAGATTATATGGAAGTGGGA
ATAAATTGATAACAGTTTGGAGTTCCAAATACCAACAATCTTTTGTCCCAA
ATCCTGGACCAAGACCGCAAATGAATGGTCAATCAGGAAGAATTGACTTT
CACTGGCTGATGCTAGATCCCAATGATACTGTCACTTTCAGTTTTAATGGG
GCCTTTATAGCACCTGACCGCGCCAGTTTTCTAAGAGGTAATCTCTAGG
AATCCAAAGTGATGCACAACCTTGACAATAATTGTGAAGGTGAATGCTATCA
TATTGGAGGTACTATAATTAGCAACTTGCCCTTTCAAACATTAATAGTAG
GGCAATCGGAAAATGCCCCAGATACGTGAAGCAGAAGAGCTTAATGCTA
GCAACAGGAATGAAAAATGTTCTGAAGCTCCTGCACATAAACAACTAAC
TCATCACATGCGCAAAAAAAGAGGTTTATTTGGTGCAATAGCAGGATTCAT
TGAAAATGGGTGGGAAGGATTAATAGACGGATGGTATGGATATAAGCATC
AGAATGCACAAGGAGAAGGGACTGCTGCAGACTACAAAAGTACACAATCT
GCTATCAACCAAATAACCGGAAAATTGAACAGACTAATAGAAAAACCAAC
CAGCAATTCGAACTAATAGATAATGAGTTCAATGAAATAGAAAAACAAATT
GGCAATGTTATTA ACTGGACTAGAGATTCTATCATCGAAGTATGGTCATAT
AATGCAGAGTTCCTCGTAGCAGTGGAGAATCAACACACTATTGATTTAACT
GACTCAGAAATGAACAACTATATGAAAAGGTAAGAAGACA ACTGAGAGA
AAATGCTGAGGAAGATGGTAATGGCTGTTTTGAAATATTCCACCAATGTG
ACAATGATTGCATGGCCAGCATTAGAAACAACACATATGACCATAAAAAAT
ACAGAAAAGAGGCAATACAAAACAGAATCCAGATTGACGCAGTAAAGTTG
AGCAGTGGTTACAAAGATATAATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATG
TTTCTTATTTCTTGCCATTGCAATGGGTCTTGTTTTCATATGTATAAAAAAT
GAAACATGCGGTGCACTATTTGTATATAAGAGCTC

Fig. 39

SEQ ID NO: 47

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAAACAATATCACTAA
TAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAATCTGCATCG
GCCACCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACC
AATGTTCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGA
ATGCTGTGTGCAACAAGCCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCAC
TATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCCTTCTTGACCTGCTGTTGGGAG
GAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTGTAATGGAACG
TGTTACCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGT
TCCGCTAGTTCTACCAAAGAATCCAAATCTTCCCAGACACAACCTGGAAT
GTGACTTACACTGGAACAAGCAGAGCATGTTGAGTTTATTCTACAGGAG
TATGAGATGGCTGACTCAAAGAGCGGTTTTACCCTGTTCAAGACGCC
AATACACAAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTTCGTGTGGGGCATA
CACCACCCACCTATACCGAGCAAACAATTTGTACATAAGAAACGACACA
ACAACAAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAGTGATA
GGCCAAGGCCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTG
GTCGGTACTAAAACCAGGCCAAACATTGCGAGTACGATCCAATGGGAATC
TAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTTCAGGAGGGAGCCATGGAAGA
ATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAATGTCAGACT
GAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATAT
GCATTTGGAACCTGCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCA
GTCGGTCTGAGGAACGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGC
CATAGCTGGATTCATAGAAGGAGGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGG
TATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGCAGATAG
GGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATAT
AGTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTTAGTGA
GGTTGAAACTAGACTCAATATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACA
AGACGTATGGGCATATAATGCAGAATTGCTAGTACTTAAAAATCAAAA
AACACTCGATGAGCATGATGCGAACGTGAACAATCTATATAACAAGGTGA
AGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTTTCGA
GCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGCATGGAAACAATTCGGAACGGGA
CCTATAATAGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAA
ATAGAGGGGGTTAAGCTGGAATCTGAGGGAACCTACAAAATCCTCACCAT
TTATTCGACTGTCGCCTCATCTTGTGCTTGCAATGGGGTTTGCTGCCTT
CCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGACAGATGCAACATTTGTATATA
AGAGCTC

Fig. 40A

SEQ ID NO: 48

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSH
NGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCY
PGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASC SHNGESSF
YRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQKALYHTEN
AYVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAP
RYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCDKACQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGCEP
KYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNE
QGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNK
KVDDGFIDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNG
CFEFYHKCNDECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAI
YSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

Fig. 40B

SEQ ID NO: 49

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLSDH
NGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISRESWSYIVEKPNPENGTCY
PGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTTTGVSASC SHNGESSFY
KNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHKENA
YVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPR
YAFALSRGFGSGIINSNAPMDECDKACQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGCEPK
YVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQ
GSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKK
VDDGFIDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGC
FEFYHKCNDECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIY
STVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

Fig. 41A

SEQ ID NO: 50

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTN
ATELVQSSSTGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVE
RSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWTGVTQNGTSSA
CIRRSNNSFFSRLNWLTHLKFKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTD
NDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRVRNIPSRISYWTIVKPGDI
LLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQ
NVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG
MVDGWYGFRRHQNSEGIGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIE
KEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
EKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNN
RFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Fig. 41B

SEQ ID NO: 51

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTN
ATELVQSSSTGGICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVE
RSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNDESNWTGVTQNGTSSA
CKRRSNNSFFSRLNWLTHLKFKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTD
NDQIFLHAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRIRNIPSRISYWTIVKPGDI
LLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQ
NVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG
MVDGWYGFRRHQNSEGIGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIE
KEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
ERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNN
RFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Fig. 42A

SEQ ID NO: 52

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKS
HFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGNIPSARVSILHEVRPVT
SGCFPIMHDRTKIRQLPKLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCP
NVTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHS
DNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRI
VVDYMQKSGKTGTITYQRGILLPQKVVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHE
KYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLANGTKYRPPAKLLKERGFF
GAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNS
LSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELAVLLSNEGII
SEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGE
FSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRD
NVSCSICL

Fig. 42B

SEQ ID NO: 53

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKS
YFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTDLVALGRPMC VGTTPSAKASILHEVKPVT
SGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGTSGSC
PNATSKSGFFATMAWAVPKNDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHS
DNKTQMKNL YGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGSFDPQTEDGGLPQSGRI
VVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLH
EKYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLANGTKYRPPAKLLKERGF
FGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLN
SLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELAVLLSNEGII
NSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAG
EFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFIVVMVSRD
NVSCSICL

Fig. 43A

SEQ ID NO: 54

MAIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDILERNVTVTHAKDILEKTHNGKLC
KLNIGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSF
NDYEELKHLSSVKHFEEKILPKDRWTQHTTTGGSRACAVSGNPSFFRNMV
WLTKKESNYPVAKGSYNNTSGEQMLIHWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTYSV
GTSTLNKRSTPDIATRPKVNGLGSRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGF
KISKRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTPLGAINTTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSE
KLVLATGLRNVQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYGA
ADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKMEDGFL
DVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEY
HKCDDCEMNSVKNGTYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQILAIYATVAG
SLSLAIMMAGISFWMCNSGLQCRICI

Fig. 43B

SEQ ID NO: 55

MEKIVLLLAIVSLVKSQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGK
LCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPG
NFNDYEELKHLSSRINHFEKIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGTPSFFRNVV
WLIKKNNTYPTIKRSYNNTNQEDLLILWGIHHSNDAAEQTKLYQNPTTYISVGT
TLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMDFFWTILKPNDAINFESNGNFAPEYAYKIVK
KGDSAIVKSEVEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVL
ATGLRNSPLRERRRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYGA
ADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFL
DVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNKELGNGCFEYH
KCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSL
ALAIMVAGLSLWMCSNSGLQCRICI

Fig. 44A

SEQ ID NO: 56

MEKIVLLFAIVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKL
CDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDF
NDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLI
KKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLN
QRLVPRIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGD
STIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVATG
LRNSPQRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGGSGYAAD
KESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDV
WTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKC
DNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAI
MVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

Fig. 44B

SEQ ID NO: 57

MIAIIVIALAAAGKSDKICIGYHANNSTTQVDTILEKNVTVTHSIELLENQKEERFCK
ILNKAPLDLRECTIEGWILGNPQCDLLLGDQSWSYIVERPTAQNGICYPGTLNEV
EELRALIGSGERVERFEMFPQSTWQGVDTNSGTTRSCPYSTGASFYRNLLWIIK
TKTAEYPVIKGIYNNTGTQPILYFWGVHHPNTDEQDTLYGSGDRYVRMGTESM
NFAKSPEI AARPAVNGQRGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKFVNT
NSKGAVFRSDLPINCDATCQTIAGVLRNKTQFNVSPLWIGECPKYVKSESLRL
ATGLRNVPQIETRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHENSQGGSGYAADRES
TQKAVNRITNKVNSIINKMNTQFEAVDHEFSNLERRIDNLNKRMDGFLDVWY
NAELLVLENERTLDMHDANVKNLHEKVKSQLRDNATILGNGCFEFWHKCDNEC
IESVKNGTYPKYQTESKLNRLKIESVKLENLGVYQILAIYSTVSSSLVLVGLIMA
MGLWMCSNGSMQCRICI

Fig. 45A

SEQ ID NO: 58

MNTQILILATSAFFYVRADKICLGHHAVSNGTKVDTLTEKGIEVVNATETVEQT
NIPKICSKGKQTVDLGQCGLLGTVIGPPQCDQFLEFSANLIVERREGNDICYPG
KFDNEETLRKILRKSGGIKKENMGFTYTGVRTNGETSACRRSRSSFYAEMKW
LLSTDNGTFPQMTKSYKNTKKVPALIIWGIHHSGSTTEQTRLYGSGNKLITV
WSSKYQQSFVPNPGPRPQMNGQSGRIDFHWLMLDPNDTVTFSFNGAFIAPD
RASFLRGKSLGIQSDAQLDNNCEGECYHIGGTIISNLPFQININSRAIGKCPRYV
KQKSLMLATGMKNVPEAPAHKQLTHHMRKKRGLFGAIAGFIENGWEGLIDG
WYGYKHQNAQGEETAADYKSTQSAINQITGKLNRLIEKTNQQFELIDNEFNEI
EKQIGNVINWTRDSIIEVWSYNAEFLVAVENQHTIDLTDSEMKNLYEKVRRQL
RENAEEDGNGCFEIFHQCDNDCMASIRNNTYDHKKYRKEAIQNRIQIDAVKLS
SGYKDIIWFSFGASCFLFLAIAMGLVFICIKNGNMRCTICI

Fig. 45B

SEQ ID NO: 59

METISLITILLWTASNADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHN
GMLCATSLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCDLLLGGREWSYIVERSSAVNGTCY
PGNVENLEELRTLFSASSYQRIQIFPDTTWNVTYTGTSRACSGSFYRSMRW
LTQKSGFYPVQDAQYTNNRGKSILFVWGIHHPPTYTEQTNLIRNDTTTSVTT
EDLNRTFKPVIGPRPLVNLQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYGH
VLSGGSHGRILKTDLKGNCVVCQTEKGLNSTLPPHNISKYAFGTCPKYV
RVNSLKLAVGLRNVPARSSRGLFGAIAGFIEGGWPGLVAGWYGFQHSNDQG
VGMAARDSTQKAIDKITSKVNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKID
DQIQDVWAYNAELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAMEDGKG
CFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIEGVKLESEGTYKILTI
YSTVASSLVLAMGFAAFLFWAMSNNGSCRCNICI

Fig. 46

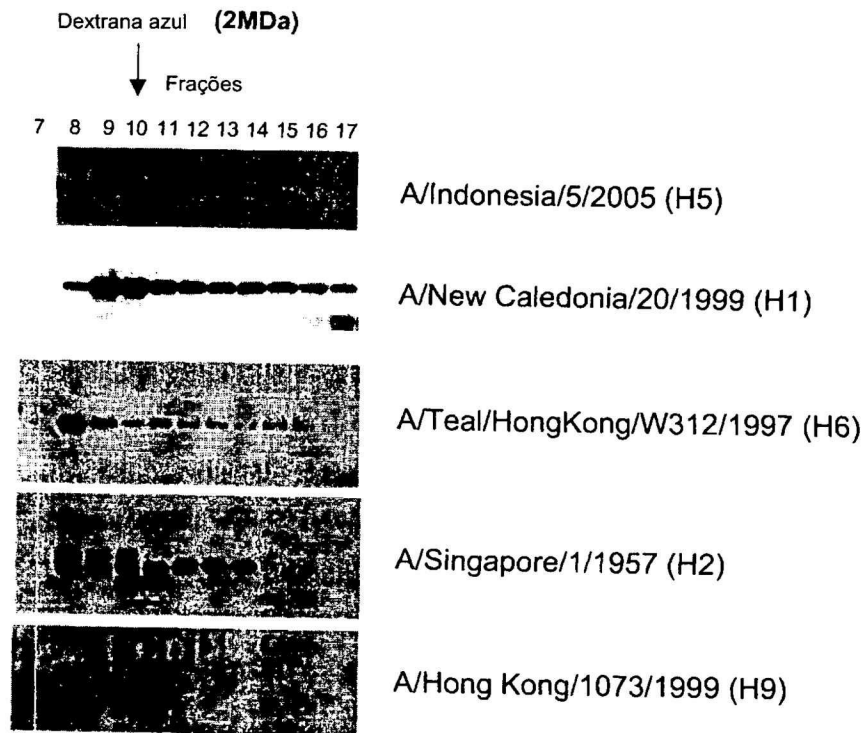


Fig. 47

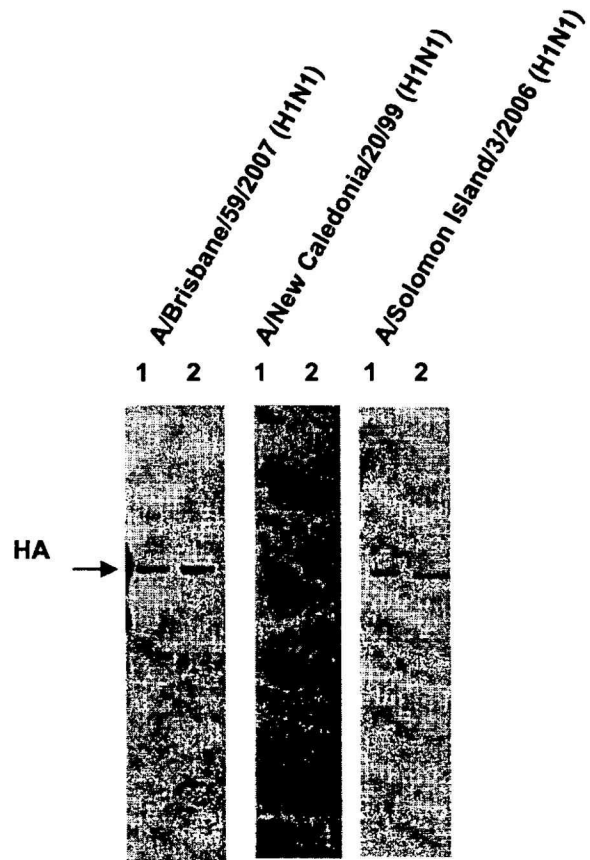


Fig. 48

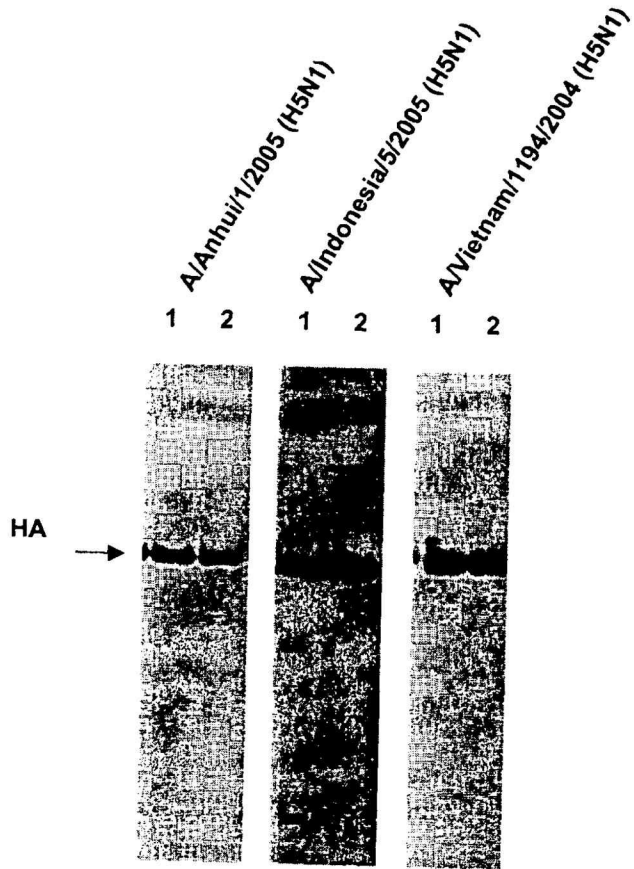


Fig. 49

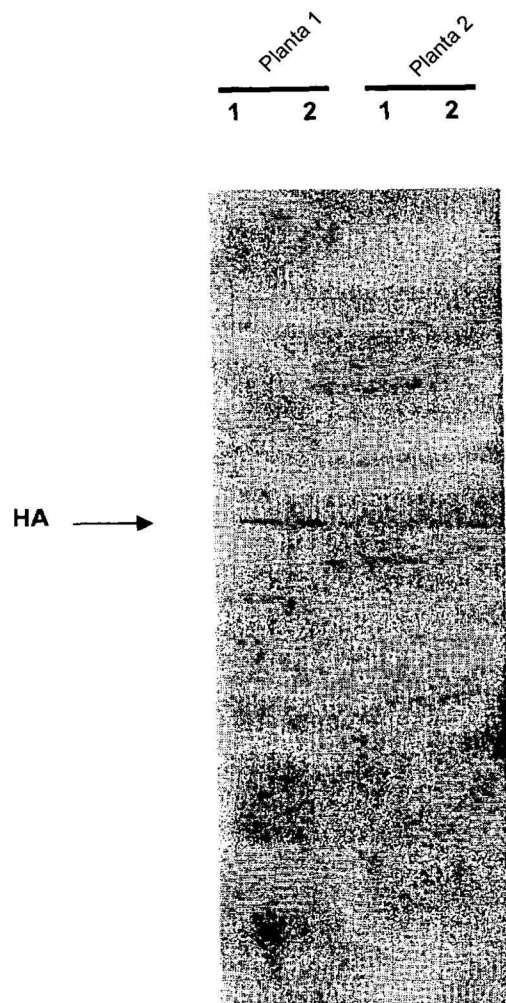


Fig. 50A

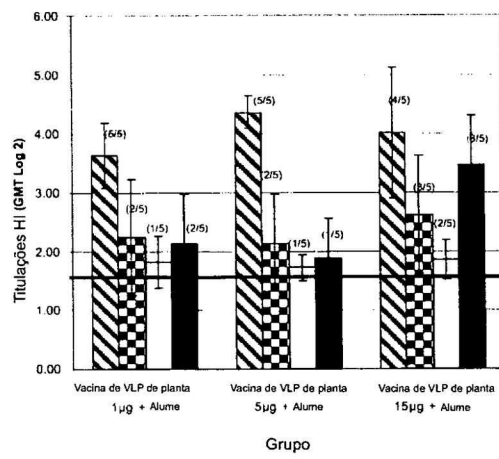


Fig. 50B

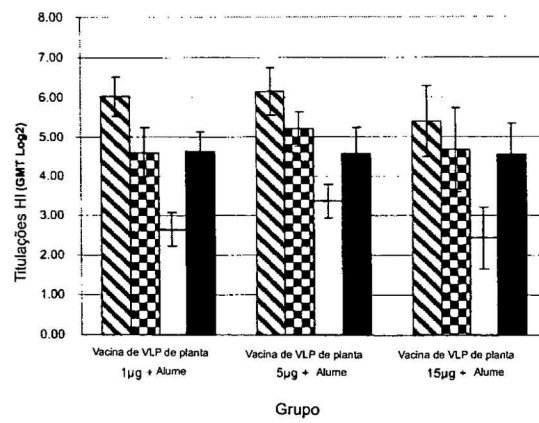


Fig. 51

SEQ ID NO: 60

H5 from A/Indonesia/5/2005 (Construct # 660)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAAGTT
AGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAAATTTACACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAC
ATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCA
ACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAA
GAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACAAAATAG
TTGTACAAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTGCTGTAATAAA
TAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAA
AAATTTTTTAAAATTAAGGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAA
GAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTT
CCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTAACTCATTTTTATATTTTATAGATCAAATAAGAGAAATAA
CGGTATATTAATCCCTCAAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAG
GATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATA
ACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTCCACACAT
CTGAGCCACACAAAACCAATCCACATCTTTATCACCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGT
CTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACCAAGAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGA
GAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCTTGTAAAGTGATCAGATTTTGC
ATTGGTTACCATGCAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGT
TACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTG
AACCTCTAATTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCAATGTGTGACGA
ATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTT
ACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAAGTGAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAATTTTGGAG
AAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGC
ATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTA
CATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGA
ATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCAACCACCTATATTTT
CATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACG
GGCAAAGTGAAGGATGGAGTTCTTCTGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAG
AGTAATGGAAATTTTATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGCAAGAAAGGGGACTCAGCAATT
ATGAAAAGTGAATTTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAA
CTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAAT
CAAACAGATTAGTCTTGAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAA
GAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGT
TGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTC
AAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTT
GAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGA
AGACGGGTTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACCTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAA
CTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCGACTACAGCTTAGGGAT
AATGCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAATGTGATAATGAATGTATGGA
AAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGAGTATTGAGAAGAAGCAAGATTAAGAAAGAGAGG
AAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACCTACCAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGG
CGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCG
TTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGCTCCTATTTATAATAT
GGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATCTAT
TTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCC
TCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTTGCTTATATTTGAACAACATAAATTG
AACATCTTTTCCACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATT
AATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTAATTTTAT
ATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 52

SEQ ID NO: 61

H1 from A/New Caledonia/20/1999 (Construct # 540)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAAGTT
 AGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATTTACCTACTACTGTTATAAATCATTATTA AAC
 ATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATTTTTGACAACAATTTTGTGCA
 ACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAA
 GAGGGAGAATAAAAAATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACAAAATAG
 TTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAA
 TAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTA AAAAGAAAAGAA
 TAAATTATTTTTAAAATTA AAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAA
 AGAGTTGGATTAAGTTGTATTAGTAATTAGAAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTT
 TCCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATA
 ACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATTAAGCCACGTAGGA
 GGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAAACAATCCTGATGAGA
 TAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTCCACAC
 ATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGA
 GTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTT
 GAGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTTGTGTTGGTTCCCT
 CTCAGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGAC
 ACAGTACTTGAGAAGATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATG
 GAAAACATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATG
 GATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTA CTGATTTCCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAA
 CACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGTATTTCCGCGACTATGAGGAACTGAGGGA
 GCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCA
 ACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAAAT
 TTGCTATGGCTGACCGGGAAGAAATGGTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCATGTAACAACA
 AAGAGAAAAGTCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTAACATAGGGAACCAAAGGGC
 ACTCTATCATAAGAAAATGCTTATGTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAGATTCACCCC
 AGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTACTGGACTCTG
 CTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAATCTAATAGCGCCATGGTATGCTTT
 TGCAGTGTGCAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCCTTTCCAGAATGTACACCCAG
 TCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTGAGGAGTGCAAAAATAAGGATGGTTACAGGACTAAG
 GAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGG
 TGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATG
 CTGCAGATCAAAAAGTACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAAACAAGGTCAATTTCTGTAATT
 GAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATGGAAAGAAGGATGG
 AAACTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTTGTTGG
 TTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAA
 GTAAAAGCCAAATTAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGAAACGGGTGTTTGTAGTTCTATCAAA
 GTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGTACCCTATGACTATCCAAAATATCCGGAAG
 AATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAAATGATGGAGTGAATTTGAATCAATGGGAGTATACCAGATT
 CTGGCGATCTACTCAACTGTGCCAGTTCCCTGGTTCTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCT
 TCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTAAGAGCTCTAAGTTAAAATG
 CTTCTTCGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATT
 AATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAG
 TGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCCTCCATACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTG
 TCTTATATTTGAACAATAAAAATGAACATCTTTGCCACAACTTATAAGTGGTTAATATAGCTCA
 AATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAAC
 TTAACGTTATTA ACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 53

SEQ ID NO: 62

H1 from A/Brisbane/59/2007 (construct #774)

CTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACAT
TTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAAT
ATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAAATTT
GTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACA
TAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGA
GGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGA
GAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAAATAAATTATTTTTAAAATTA
AAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGT
ATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATA
GAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCC
AAAAAATAAAGCGGTATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTGA
GGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACG
CATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACC
AATCCACATCTTTATCACCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCTC
AAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAAGTAAAACT
ACTGGTCTGTATGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCTAA
CAACTCGACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAAGAAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACC
TGCTTGAGAACAGTCACAATGGAAAACACTATGTCTATTAAGAAAGAAATAGCCCACTACAATGGGT
AATTGCAGCGTTGCCGGTGGATCTTAGGAAACCCAGAATGCCAATTAAGTATTTCCAAGGAGT
ATGGTCTACATTGTAGAAAAACCAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCTG
ACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTGGAATATTTCCCC
AAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTGTGAGCATCATGCTCCATAATGGGG
AAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTGTACCCAAACCTGAGC
AAGTCTATGCAAACAACAAAGAAAAAGAAGTCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAAA
CATAGGTGACCCAAAGGCCCTCTATCATAAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTA
TAGCAGAAAATTCACCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGAAGGAAGAATCA
ATTACTACTGGACTCTGCTTGAACCCGGGATACAATAATTTGAGGCAAATGGAATCTAATAG
CGCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCACCA
ATGGATAAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAACAGCAGTCTTCTTTCCA
GAACGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATG
GTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTGGAGCCATTGCCGGTTT
CATTGAAGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAA
GGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACAAGGT
CAATTCGTGAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCAGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATGG
AAAGAAGGATGGAAACTTGAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAGACATTTGGACATATAATG
CAGAACTGTTGGTTCTACTGGAATAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAAT
CTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAGTTAAAGAATAATGCTAAAGAAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAG
TTCTATCACAAGTGTAAACGATGAATGCATGGAGAGTGTAAAGAAATGGAACCTATGACTATCCAAA
TATTCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATGATGGAGTGAATTTGGAATCAATGGGAGT
CTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTGGTCTCCCTGGGGG
CAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTACAGTGTAGAATATGCATCTAAGAGCTCTAA
GTTAAAATGCTTCTCGTCTCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTGTAGAAGA
GCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATT
TACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTAGACATGAAGACCTGCCGCG
TACAATGTCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAAT
ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTA
CAATCAACTTAACGTTATTACTACTAATTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 54

SEQ ID NO: 63

H1 from A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) (Construct # 775)

AGAGGTACCCCGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTA
 AGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATTTACCTACTACTGTTATAAATCAT
 TATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATTTTTGACAAC
 AATTTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAG
 AGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTAC
 AAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATA
 AGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTT
 TTGGCAAGTCATTA AAAAGAAAGAATAAATTTATTTTTAAAATTA AAAAGTTGAGTCATTTGATTA
 AACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTA AAAAGTTGATTAGTAATTAGAAT
 TTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAA
 CTCATTTTTATATTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAA
 AAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGG
 AGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAAACATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCAC
 GCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATCTTCCACACATCTGAGCCACACAA
 AAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTG
 ATCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAA
 TGAAAGTAAACTACTGGTCCCTGTTATGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGT
 ATAGGCTACCATGCCAACAACCAACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGAATTGGA
 CAGTGACACACTCTGTCAACCTGCTTGAGGACAGTCACAATGGAAAATTATGTCTATTA AAA
 GGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCA
 GAATGCGAATTACTGATTTCCAGGGAATCATGGTCTACATTGTAGAAAAACCAATCCTGA
 GAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAG
 TTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCA
 CCACAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAAATGGGGAAAGCAGTTTTTACAAAAATTT
 GCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCTATGCAAACAA
 CAAAGAGAAAGAAAGTCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCTAACATAGGTGACCAA
 AGGGCTCTCTATCATAAAGAAAATGCTTATGTCTGTAGTGTCTTACATTATAGCAGAAA
 ATTCACCCAGAAAATAGCCAAAAGACCCAAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCAACTAC
 TACTGGACTCTACTTGAACCCGGGGATACAATAATTTTGGGCAAAATGGAAATCTAATAGC
 GCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCA
 CCAATGGATGAATGTGATGCCAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTC
 CTTCCAGAATGTACACCCTGTACAATAGGAGAGTGCCAAAGTATGTGAGGAGTGCAAAA
 ATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGTTTGTGTTGGA
 GCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTTAT
 CATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAGCACACAAAATGCCA
 TTAATGGGATTACAACAAGGTCAATCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCT
 GTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTGAAAGAAGGATGGAAAATTAATAAAAAAGTTGATG
 ATGGGTTTATAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGG
 ACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAAGTAAAAAGCCAATTA
 GAATAATGCCAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTATCATAAGTGTACGATGAAT
 GCATGGAGAGTGTAAAAATGGAACCTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTA
 AACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAATTTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTTGGCGA
 TCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTG
 GATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTGAGAGCTCTAAGTTAAAATGC
 TTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTGTAGAAGAGCTTAA
 TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTA
 CATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCCTCCATAACTAAGACATGAAGACCTGCCG
 CGTACAATTGCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTTCCACAACCTTTATAAGTG
 GTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGA
 AATTCATTAACAATCAACTAACGTTATTAACACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATG
 ATAGTACA

Fig. 55

SEQ ID NO: 64

H2 from A/Singapore/1/57 (H2N2) (construct # 780)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAA
 GTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATTTACCTACTACTGTTATAAATCATTAT
 TAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTT
 TGTGCAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAG
 AAAAAAGGAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGACAAAAGTTG
 TACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAAT
 TGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTC
 ATTA AAAAGAAAGAATAAATTTTAAAAATTAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATT
 ATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGATTAAGTTGATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAAT
 TTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATT
 TCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA AAAAAACGGTATATTT
 ACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATC
 CAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCT
 ACATTATCTAAATCACACATTCCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTA
 TCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACA
 AAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGCCATCATTTATCTAATTC
 TCCTGTTACAGCAGTGTGAGAGGGGACCAATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACA
 GAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCGGAACGTCCTGTGACTCATGCCAAGGACATTCCTTGA
 GAAGACCCATAACGGAAGTTATGCAAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAAGTGGGGACT
 GTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAA
 TGGTCTTATAATGGAGAAAAGAAAACCCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAA
 TGATTATGAAGAATTGAAACATCTCCTCAGCAGCGTGAACATTTGAGAAAAGTAAAGATTCT
 GCCCAAAGATAGATGGACACAGCATACAACAACCTGGAGGTTACGGGCTCGCGGTGTCT
 GGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAAGAAAAGAAATCAAATTTCCGGTT
 GCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGTGCACCA
 TCCCAATGATGAGACAGAACAAGAACATTTGACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAG
 GCACATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCAGACATAGCAACAAGGCCTAAAGTGAATGGA
 CTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCTATTGGATATGTGGGACACCAATAAATTTGAG
 AGTACTGGTAATCTAATTCACCAGAGTATGGATTCAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGG
 ATCATGAAAACAGAAGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAAAATGCCAACTCCTTTGGGAGC
 AATAAATACAACATTGCCTTTTACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCCCAAATA
 TGTA AAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCAAGATTGAATCAA
 GAGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGT
 TGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCAC
 TCAAAGGCATTTGATGGAAATCACCACAAGGTAATTTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCA
 ATTTGAAGCTGTTGGGAAAGAGTTCACTAAGTACTAGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAACAAAA
 GATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAAA
 ATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAAGTCAGAATGC
 AGCTGAGAGACAACGTCAAAGAAGTGGAAATGGATGTTTTGAATTTATCACAAATGTGATG
 ATGAATGCATGAATAGTGTGAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTA
 AACTAAATAGAAAATGAAATCAAAGGGTAAAATTTGAGCAGCATGGGGTTTATCAAATCCTTG
 CCATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCT
 GGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGAGAGCTCTAAGTAAAATG
 CTCTTCGCTCCTATTTATAATATGGTTTTGTTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAA
 TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACA
 TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCCTCCATAAATACTAAGACATGAAGACCTGCCGCGTA
 CAATTTGCTTATTTGAACAACATAAATTTGAACATCTTTTGCACAACCTTATAAGTGGTTAAT
 ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCAT
 TAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 56

SEQ ID NO: 65

H5 from A/Anhui/1/2005 (H5N1) (Construct# 781)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAAAG
TTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATT
AAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTT
GTTGCAACATTTGAGAAAAATTTTGTGTTCTCTTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGA
AAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGT
ACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATT
GCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCA
TTAAAAAGAAAAGAATAAATTTTTTAAAAATAAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTAT
TTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTA
ATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCA
AGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAACAACGGTATATTTACTA
AAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAAC
CAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACAT
TATCTAAATCACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGA
GAAGAGACTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC
AATAGTCAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAAACAACCTCGACAGA
GCAGGTTGACACAATAATGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAA
GACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTGATTTTAAGAGATTGTA
GTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCCGGAAATGG
TCTTACATAGTGGAGAAGGCCAACCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAATTTCAACGA
CTATGAAGAAGTGAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCC
AAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGG
AACGCCCTCCTTTTTAGAAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCCAACAATA
AAGAGAAGCTACAATAATACCAACCAGGAAGATCTTTTGATACTGTGGGGGATTCATCATTCT
AATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCTATATTTCCGTTGGGACA
TCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGT
GGAAGGATGGATTTCTTCTGGACAATTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAT
GGAATTTCAATGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTGTT
AAAAGTGAAGTGAATATGGTAACTGCAATACAAAGTGTCAAACCTCAATAGGGGCGATAAAC
TCTAGTATGCCATTCACAACATACACCCTCTACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAA
TCAAACAAATTAGTCCTTGGGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCTAAGAGAAAAGAAGAAAA
AGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGGTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGG
TTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCA
CTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTC
AGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAAATTAATAACTTAGAAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGA
AATGGAAGACGGATTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAA
ATGAGAGAAGTCTAGACTTCCATGATTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTAC
AGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAATGTGATA
ATGAATGTATGGAAAGTGAAGAAAACGGAACGTATGACTACCCGAGTATTGAGAAGAAGCAA
GATTA AAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACTGT
CAATTTATTCAACAGTTGCGAGTTCTCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCTGGTCTATCTTTGT
GGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGC
TTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAAGAGCTTAATT
AATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACATA
AGTGGAGTCAGAATCAGAAATGTTTCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCTACA
ATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATTTGAACATCTTTTGCCACAACTTATAAGTGGTTAATAT
AGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTA
CAATCAACTAACGTTATTAACCTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 57

SEQ ID NO: 66

H5 from A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) (Construct # 782)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAG
 TTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATT
 AAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATTTTTGACAACAATTTT
 GTTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGA
 AAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGACAAAAGTTGT
 ACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATT
 GCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCA
 TAAAAAGAAAAGAATAAATATTTTTAAAAATAAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTAT
 TTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTA
 ATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCAT
 AGATCAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCAAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTA
 AAAAACTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAAC
 CAATCACAAACATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACAT
 TATCTAAATCACACATTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGA
 GAAGAGACTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTGC
 AATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGA
 GCAGGTTGACACAATAATGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGAAAAA
 GACACACAATGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTTAATTTTGAGAGATTGTAG
 TGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCCGGAATGGT
 CTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACT
 ATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAA
 AAGTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTGGGGTTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAA
 AGTCCCTCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAA
 GAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAA
 TGATGCGGCAGAGCAGACAAAAGCTCTATCAAAAACCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATC
 TACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGG
 AAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGG
 AAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAA
 AGTGAATTTGGAATATGGTAACTGCAATACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAATCT
 AGCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCA
 AACAGATTAGTCTTGGGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAA
 GAGAGGATATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATG
 GTTGGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAGAATC
 CACTAAAAGGCAATAGATGGAGTCAACCAATAAGGTCAACTCGATTATTGACAAAATGAACAC
 TCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAA
 GAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACCTCTAGTTCTCATGGA
 AAACGAGAGAATCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACT
 ACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAAATGTGA
 TAATGAATGTATGGAAGTGTAAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCGATTCAGAAGAAGC
 AAGACTAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAATTTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATTTG
 TCAATTTATTTACAGTGGCCAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTA
 TGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATG
 CTTCTTCGTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAA
 TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACA
 TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTA
 CAATTTGCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAAT
 ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGAAAATATCAGTTATCGAAATTCATT
 ACAAATCAACTAACGTTATTAACCTACTAATTTTATATCATCCCCTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 58

SEQ ID NO: 67

H6 from A/Teal/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (Construct # 783)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTA
 AGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCAT
 TATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATTTTTGACAACA
 ATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGA
 GAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAAATAAAAAATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACA
 AAAGTTGTACAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAA
 GGGTTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGACCATTAGAGAATTTT
 TGGCAAGTCATTAAGAAAGAAATAAATTTATTTTAAAATTAAGTTGAGTCATTTGATTA
 ACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATT
 TGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAAC
 TCATTTTTATATTTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
 AAACGGTATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAG
 GATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGC
 ATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAA
 ACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGAT
 TCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATG
 ATTGCAATCATTGTAATAGCAACTACTGGCAGCAGCCGAAAAGTCAGACAAGATCTGCATTG
 GGTATCATGCCAACAAATCAACAACACAGGTAGATACGATACTTGAGAAGAATGTGACTGT
 CACACACTCAATTGAATTGCTGGAAAATCAGAAGGAAGAAAGATTCTGCAAGATATTGAACA
 AGGCCCTCTCGACTTAAGGGAATGTACCATAGAGGGTTGGATCTTGGGGAATCCCCAAT
 GCGACCTATTGCTTGGTGATCAAAGCTGGTCATACATTGTGAAAGACCTACTGCTCAAAA
 CGGGCTCTGCTACCCAGGAACCTTAAATGAGGTAGAAGAACTGAGGGCACTTATTGGATCA
 GGAGAAAGGGTAGAGAGATTTGAGATGTTTCCCAAAGCACCTGGCAAGGAGTTGACACC
 AACAGTGGAAACAACAAGATCCTGCCCTTATTCTACTGGTGCCTTTCTACAGAACTCCT
 ATGGATAATAAAAACCAAGACAGCAGAATATCCAGTAATTAAGGGAATTTACAACAACACTG
 GAACCCAGCCAATCCTCTATTCTGGGGTGTGCATCATCCTCCTAACCCGACGAGCAAGA
 TACTCTGTATGGCTCTGGTATCGATACGTTAGAATGGAACTGAAAGCATGAATTTTGCCA
 AGAGTCCGGAATTTGCGGCAAGGCCTGCTGTGAATGGACAAAGAGGCAGAATTGATTATTA
 TTGGTCCGTTTTAAACCAGGGGAAACCTTGAATGTGGAATCTAATGGAAATCTAATCGCC
 CCTTGGTATGCATACAAATTTGTCAACACAAATAGTAAAGGAGCCGTCTTCAGGTCAGATTT
 ACCAATCGAGAACTGCGATGCCACATGCCAGACTATTGCAGGGGTTCTAAGGACCAATAAAA
 ACATTTCAGAATGTGAGTCCCCTGTGGATAGGAGAATGTCCCAAATACGTGAAAAGTGAAA
 GTCTGAGGCTTGCAACTGGACTAAGAAATGTTCCACAGATTGAACTAGAGGACTCTTCGG
 AGCTATTGCAGGGTTTATTGAAGGAGGATGGACTGGGATGATAGATGGGTGGTATGGCTAT
 CACCATGAAAATTC AAGGTCAGGATATGCAGCAGACAGAGAAAGCACTCAAAGGCTG
 TAAACAGAATTACAATAAGGTCAATTCATCATCAACAAAATGAACACACAATTTGAAGCTG
 TCGATCAGGAATTTCAAATCTGGAGAGGAGAATTGACAATCTGAACAAAAGAAATGCAAGAT
 GGATTTCTGGATGTTTGGACATACAATGCTGAACTGTTGGTCTTCTTGAACGAAAGAAC
 ACTAGACATGCATGACGCAATGTGAAGAACCACATGAAAAGGTCAAATCACAACAAAGG
 GACAAATGCTACGATCTTAGGGAATGGTTGCTTTGAATTTTGGCATAAGTGTGACAAATG
 CATAGAGTCTGTCAAAAATGGTACATATGACTATCCCAAATACCAGACTGAAAGCAAATTA
 ACAGGCTAAAAATAGAATCAGTAAAGCTAGAGAACCCTGGTGTGTATCAAATCTTGCCATT
 TATAGTACGGTATCGAGCAGCCTAGTGTGGTAGGGCTGATCATGGCAATGGGTCTTTGGA
 TGTGTTCAAATGGTTCAATGCAGTGCAGGATATGATATAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTT
 CTTCGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATT
 AATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACA
 TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCCTCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCCGG
 TACAATTGCTTATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTT
 AATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAAT
 TCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATA
 GTACA

Fig. 59

SEQ ID NO: 68

H9 from A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Construct # 785)

AGAGGTACCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAA
 GTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATT
 TTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAAT
 TTTGTTGCAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAG
 AGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAG
 TTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGT
 TAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCA
 AGTCATTA AAAAGAAAGATAAATATTTTTAAAATAAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATG
 TGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGATTAGTAATTAGAATTTGGTGT
 CAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTT
 TATATTTTATAGATCAAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA AAAAAACGG
 TATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACA
 TCCAATCCAACCAATCACAAACATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTG
 GCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCC
 ACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTCAA
 ACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACAATA
 TCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAATCTGCATCGGCCA
 CCAGTCAACAAAACCTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAAACCAATGTTCCCTGTGACAC
 ATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACAAGCCTGGGACA
 TCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCCTTCTTGTGACC
 TGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCAAAGATCATCAGCTGTAATGGAAC
 GTGTTACCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGTTCCGCTAGTT
 CCTACCAAAGAATCCAAATCTTCCAGACACAACCTGGAATGTGACTTTACTGGAACAAGC
 AGAGCATGTTCAAGGTTCACTTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAGAGCGGTTTTTA
 CCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTTCGTGTGGGGC
 ATACATCACCCACCCACCTATACCGAGCAAACAAATTTGACATAAGAAACGACACAACAAC
 AAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAAGTGATAGGGCCAAGGCCCTT
 GTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTGTTGGTCCGTAATAAACAGGCCAAACATT
 GCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTGAGGAGG
 AGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTTGTGTAGTGCAATGTGAGAC
 TGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATCCACAATATCAGTAAATATGCATTTGGAAC
 CTGCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCAGTCGGTCTGAGGAACGTGCCT
 GCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTATAGAAGGAGGTTGGCCAG
 GACTAGTGCCTGGCTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGC
 AGATAGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATATAGTCGA
 CAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTTAGTGAGGTTGAAACTAGACTCAA
 TATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAAATACAAGACGTATGGGCATATAATGCAGAATTGCT
 AGTACTACTTGAAAAATCAAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAACGTGAACAATCTATATAA
 CAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTTTCGAGCTA
 TACCATAAATGTGATGATCAGTGATGGAACAATTCGGAACGGGACCTATAATAGGAGAAA
 GTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGAATCTGAG
 GGAACCTACAAAAATCCTCACCATTTATTCGACTGTGCGCTCATCTTTGTGCTTGCAATGGG
 GTTTGCTGCCTTCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATGCAACATTTGTATAT
 AAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTT
 TGTTCTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAAC
 GGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTA
 AGACATGAAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTT
 GCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATGATTAATAAT
 GGAATATCAGTTATCGAAATTCATAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATAT
 CATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 60

SEQ ID NO: 69

H3 from A/Brisbane/10/2007 (H3N2)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGT
 TAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTA
 ACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTT
 GCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAA
 GGAAGAGGGAGAAATAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAA
 AATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTA
 AATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAATAAAG
 AAAGAATAAATTTATTTTAAAAATTAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTTATTAATGAAT
 TGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATT
 TGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATA
 AGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAACAACCGGTATTTACTAAAAATCTAAG
 CCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAA
 TCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACA
 CATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAA
 ATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTA
 TTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCTACATTCTATGTCTGGTT
 TTCACTCAAAAACCTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCA
 GTACCAAACGGAACGATAGTGAACAACATCAGGAATGACCAAATGAAGTTACTAATGCTACTG
 AGCTGGTTTCAGAGTTCCCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCCTCATCAGATCCTTGATGGAG
 AAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAA
 ATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGAT
 TATGCCTCCCTTAGGTCAGTGTGCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACAATGAAAGTTTCA
 ATGGACTGGAGTCACTCAAACCGGAACAAGCTCTGCTTGCCATAAGGAGATCTAATAACAGTTT
 CTTTAGTAGATTGAATGGTTGACCCACTTAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGC
 CAAACAATGAAAAATTTGACAAATTTGACATTTGGGGGTTTACCACCCGGGTACGGACAATGA
 CCAAATCTTCCGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAGAAGCCAACAA
 ACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCAGCAGAATAAGCATCT
 ATGGACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCC
 TAGGGTTACTTCAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGG
 CAAATGCAATTCGAATGCATCACTCAAACCGGAAGCATTCCAATGACAAACCAATCCAAAAT
 GTAAACAGGATCACATACGGGGCTGTCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTTGGCA
 ACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTC
 ATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAATTTCTGAG
 GGAATAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAG
 CTGAATAGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAG
 TCGAAGGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACCAAAATAGATCTCTGGTCAT
 ACAACGCGGAGCTTCTTGTGGCCCTGGAGAACCACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAAT
 GAACAACTGTTTAAAAAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGG
 TTGTTTCAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATG
 ACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGA
 AGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCTTTGCCATATCATGTTTTTGTCTTTGTGTT
 GCTTTGTTGGGGTTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTT
 GAGAGCTCTAAGTTAAATGCTTCTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTG
 TTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGT
 GTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACACA
 TGAAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAATAAAATTTGAACATCTTTTCCACAA
 CTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCA
 GTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTACTAATTTTATATCATCCCCTTGA
 TAAATGATAGTACA

Fig. 61

SEQ ID NO: 70

H3 from A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAA
GTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAATCATT
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAAT
TTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAG
AGAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAG
TTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGT
TAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCA
AGTCATTAAGAAAGAAATAAATATTTTTAAAAATTAAGGTTGAGTCATTTGATTAACATGT
GATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGT
AAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCATATATTTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTA
TATTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAACAACGGTAT
ATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCC
AATCCAACCAATCAACAACATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCA
CATCTACATTATCTAAATCACACATTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACA
TCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCTTCAAACA
CATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGACTATCATT
GCTTTGAGCTACATTTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACCTCCCGGAAATGACAACAGCAC
GGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAACAACATCAGC
AATGACCAAATGAAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGGAAT
ATGCGACAGTCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACGACACTAATAGATGCTCTATTGG
GAGACCCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAA
GCCTACAGCAACTGTTACCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGC
CTCATCCGGCACACTGGAGTTAACGATGAAAGTTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAATG
GAACAAGCTCTGCTTGCAAAAGGAGATCTAATAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGA
CCCCTTAAAATCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACA
AATTGTACATTTGGGGGTTCCACCACCCGGGTACGGACAATGACCAAATCTTCTGCATGCT
CAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTTACCAAAGAAGCCAACAACACTGTAATCCCGAAT
CGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAA
AACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTC
AAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTC
TGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCAAATGTAAACAGGAT
CACATATGGGGCCTGTCCAGATATGTTAAGCAAACACTCTGAAATTTGGCAACAGGGATGC
GAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAAT
GGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATCTGAGGGAATAG
GACAAGCAGCAGATCTCAAAGCACTCAAGCAGCAATCAATCAATCAATGGGAAGCTGAAT
AGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAAGTAGA
AGGGAGAATCCAGGACCTCGAGAAATATGTTGAGGACACTAAAATAGATCTCTGGTCATACA
ACGCGGAGCTTCTTGTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATG
AACAACTGTTTGAAGAACAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGG
TTGTTTCAAATATACCACAAATGTGACAATGCCATGATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTTA
TGACCATGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAAGGCGTTGAGC
TGAAGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCTTTGCCATATCATGTTTTTGTCTT
GTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATT
TGCATTTGAGAGCTTAAGTTAAATGCTTCTCGTCTCCTATTATAATATGGTTTGTATTG
TTAATTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAG
ATGAATGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAAATGTTTCCCTCCATA
ACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATTTGAAC
ATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATT
AATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTAACGTTATTACTACTAATTT
TATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 62

SEQ ID NO: 71

H7 from A/Equine/Prague/56 (H7N7)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTAAAG
 TTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATT
 AACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTT
 GTTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGA
 AAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGACAAAAGTTGT
 ACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATT
 GCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCA
 TTAATAAGAAAGAAATAAATTTATTTTAAAATTTAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTAT
 ATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTATATTTTCA
 TAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACT
 AAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAA
 CCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACA
 TTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACAAAAACCAATCCACATCTTTATCA
 CCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAG
 AGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAACACTCAAATTTCTAATATTAG
 CCATTCCGGCATTCTTCTATGTACGTGCAGATAAAATCTGCCTAGGACATCATGCTGTGTCTA
 ATGGAACCAAAGTAGACACCCCTTACTGAAAAAGGAATAGAAGTTGTCAATGCAACAGAAACAG
 TTGAACAAAACAAACATCCCTAAGATCTGCTCAAAGGAAAACAGACTGTTGACCTTGGTCAAT
 GTGGATTACTAGGGACCGTTATTGGTCTCCCAATGTGACCAATTTCTTGAGTTCTCTGCTA
 ATTTAATAGTTGAAAGAAGGGAAGGTAATGACATTTGTTATCCAGGCAATTTGACAATGAAGA
 AACATTGAGAAAAATACTCAGAAAATCCGGAGGAATTAAGGAGGAGAATATGGGATTCACATA
 TACCGGAGTGAGAACCAATGGAGAGACTAGCGCATGTAGAAGTCAAGATCTTCTTTTATG
 CAGAGATGAAATGGCTTCTATCCAGCACAGACAATGGGACATTTCCACAAAATGACAAAGTCTT
 ACAAGAACACTAAGAAGGTACCAGCTCTGATAATCTGGGGAATCCACCCTCAGGATCAACT
 ACTGAACAGACTAGATTATATGGAAGTGGGAATAAATTTGATAACAGTTTGGAGTTCCAAATAC
 CAACAATCTTTTGTCCAAATCCTGGACCAAGACCGCAAATGAATGGTCAATCAGGAAGAATT
 GACTTTCACTGGCTGATGCTAGATCCCAATGATACTGTCACTTTCCAGTTTTAATGGGGCCTT
 ATAGCACCTGACCGCGCCAGTTTTCTAAGAGGTAAATCTCTAGGAATCCAAAGTATGCACAA
 CTTGACAATAATTGTGAAGGTGAATGCTATCATATTGGAGGTACTATAATTAGCAACTTGCCTT
 TTCAAACATTAATAGTAGGGCAATCGGAAAATGCCCCAGATACGTGAAGCAGAAGAGCTTAA
 TGCTAGCAACAGGAATGAAAAATGTTCTGAAGCTCCTGCACATAAACAACACTAATCATCACA
 TGCGCAAAAAAGAGGTTTATTTGGTGAATAGCAGGATTCATTGAAAATGGGTGGGAAGGAT
 TAATAGACGGATGGTATGGATATAAGCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGGACTGCTGCAGAC
 TACAAAAGTACACAATCTGCTATCAACCAAATAACCGGAAAATTTGAACAGACTAATAGAAAAA
 CCAACCAGCAATTCGAACTAATAGATAATGAGTTCAATGAAATAGAAAAACAAATTTGCCAATGT
 TATTAACTGGACTAGAGATTCTATCATCGAAGTATGGTCATATAATGCAGAGTTTCTCGTAGC
 AGTGGAGAATCAACACACTATTGATTTAACTGACTCAGAAAATGAACAAACTATATGAAAAGGTA
 AGAAGACAACACTGAGAGAAAATGCTGAGGAAGATGGTAATGGCTGTTTTGAAATATTTCCACCAA
 TGTGACAATGATTGCATGGCCAGCATTAGAAAACAACACATATGACCATAAAAAATACAGAAAA
 GAGGCAATACAAAACAGAAATCCAGATTGACGCAGTAAAGTTGAGCAGTGGTTACAAAGATATA
 ATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGTTTCTTATTTCTTCCATTGCAATGGGTCTTGTTT
 TCATATGTATAAAAAATGAAAACATGCGGTGCACTATTTGTATATAAGAGCTCTAAGTTAAAT
 GCTTCTTCTGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTA
 ATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTAC
 ATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCGT
 ACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAATTTGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGTTAA
 TATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCAT
 TAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 63

SEQ ID NO: 72

HA from B/Malaysia/2506/2004

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAAG
 TTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTA
 AACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGT
 TGCAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAA
 AGGAAGAGGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACC
 AAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTG
 TAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTA
 AAGAAAGAATAAATTTTAAAATTTAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAAT
 GAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTG
 ACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTATATTTTATAGATC
 AAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAACAACGGTATATTTACTAAAAAAT
 CTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCAC
 AACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAA
 TCACACATTTCCACACATCTGAGCCACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTAT
 AAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
 AATTAATTAATTAATCATCTTTGAGAGAAAAATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAA
 TCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACCTACCCACATGTTGTCAAACCTG
 CTAACAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACACCCCAACCAATCTC
 ATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACAGAGGGAAACTATGCCAAAAATGCCTCAACTGCA
 CAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAACATACCCTCGGCAAGAGTT
 TCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCATAATGCACGACAGAAACAA
 AAATTAGACGCTGCCTAACTTCTCAGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACTCATAACGT
 TATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGGCCCTAA
 CGTTACCAATGGAACGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCAAAAAACGACAACAA
 CAAAAAGCAACAAATTCATTAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAA
 ATTACCGTTTGGGGTTCCTACTCTGATAACGAAACCAAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCA
 AAGCCCCAGAAGTTACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTACAGATTGGT
 GGCTTCCCAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGTAGAAATTGTTGATTAC
 ATGGTGCAAAAATCTGGGAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGAGGTATTTTATGCTCAA
 AAGTGTGGTGCCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCCTTAATTGGAGAAG
 CAGATTGCCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAAC
 ATGCAAAGGCCATAGGAAATGGCCAAATATGGGTGAAAAACACCCCTGAAGCTGGCCAAATGGAA
 CCAAATATAGACCTCCTGCAAAACTATTAAGGAAAGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTT
 CTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCAC
 ATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAAACAAGATAACAAAA
 ATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATG
 AACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGACGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATA
 GCTCACAAATAGAACTCGCAGTCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGC
 ATCTCTTGGCGCTTGAAGAAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGA
 ATGGATGCTTTGAACCAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTA
 CCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCCTCCACTTTTATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTA
 AATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGG
 CTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTGCTCC
 ATCTGTCTATAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATT
 GTTAATTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAACTATTTGATGAGA
 TGAAGTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACT
 AACTAGACATGAAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTT
 TTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAAT
 GGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCA
 TCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 64

SEQ ID NO: 73

HA from B/Florida/4/2006

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTAAGT
TAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTA
ACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGT
GCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAA
GGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCA
AATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTA
AATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAG
AAAGAATAAATATTTTTAAAAATTAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAAT
TGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATA
AGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAACAACGGTATATTTACTAAAAATCTAAG
CCCGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAAACA
TCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCAGATCTACATTATCTAAATCACA
CATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAA
ATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTA
TTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAAGGCAATAATTGACTACTCATGGTAGTAACATCCAAT
GCAGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTC
AAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGC
AAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGAAACTATGCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCT
GGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATAC
TCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAG
GCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATAGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCTCGAT
GCGGAAAAGGCACCAGGAGGCCCTACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCTAACGCTAC
CAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAATGC
AACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAATCACTGTT
TGGGGGTTCCATTAGATAACAAAACCAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAA
AGTTACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCAGA
TCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAA
ACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTACAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAGGTGTGGTG
CGCGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCTTGCCTTAAATGGTGAAGCAGATTGCCT
TCTGAAAATACGGTGGATTAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCC
ATAGGAAATTGCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCAATGGAACCAAAATATAGAC
CTCCTGCAAAACTATTAAGGAAAGGGTTTTCTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTAGAAGGAG
GATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCA
GTGGCGGGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAACAAGATAACAAAAATCTCAATTCTT
TGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACTTCAAAGACTAAGTGGTCCATGGATGAATCCACAACG
AAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCAAATAG
AACTTGCAGTCTTGCTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGGCACT
TGAGAGAAAATAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGA
AACCAAAACACAAGTGAACAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAAATGCAGG
AGAATTTTCTCCTCCCACTTTTATTCACTGAACATTACTGCTGCATCTTAAATGATGATGGAT
TGGATAACCATACTATACTGCTCTAATCACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATG
CTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAAGA
GCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCTCCTATTTATAATATGGTTTTGTTATTGTTAATTTTGTCT
TGTAAGAGCTTAAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAA
TGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAA
GACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAACAAAATGAACATCTTTTGCACAACCTTT
ATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTA
TCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAA
TGATAGTACA

Fig. 65

Consenso de SEQ ID NO: 49, 48, 33 and 9

SEQ ID NO: 74

MK(X₁)KLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
E(X₂)SHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLIS(X₃)ESWSYIVE(X₄)P
NPENGTCYPG(X₅)FADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHT(X₆)TGVSA
SCSHNG(X₇)SSFY(X₈)NLLWLTGKNGLYPNLSKSY(X₉)NNKEKEVLVLWGVHHPPN
IG(X₁₀)Q (X₁₁)ALYH(X₁₂)ENAYVSVSSHYSR(X₁₃)FTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLL
EPGDTIIFEANGNLIAP(X₁₄)YAFALSRGFGSGII(X₁₅)SNAPMD(X₁₆)CDAKCQTPQG
AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSKLRMVTGLRNIPSISRGLFGAIA
GFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIE
KMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGF(X₁₇)DIWTYNAELLVLENERT
LDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCN(X₁₈)ECMESVKNGTY
DYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAIS
FWMCSNGSLQCRICI

Fig. 66

SEQ ID NO: 75

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCLLKGIA
PLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCPYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIF
PKESSWPNHTVTGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPNI
GNQRALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALS
RFGSGIITSNAPMDECDACCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRG
LFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK
EFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEF
YHKCNNECMESVKNGTYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVSLGAISFWMC
SNGSLQCRICI

Fig. 67

SEQ ID NO: 76

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPS
ERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEISLSYSAGALASCMGLIYNRMGAV
TTEVAFGLVCATCEQIADSQRSHRQMVTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVAS
QARQMVQAMRTIGTHPSSSAGLKNLLENLQAYQKRMGVQMQRFK

RESUMO

Patente de Invenção: **"PARTÍCULAS SIMILARES A VÍRUS DA GRIPE (VLPs) COMPREENDENDO HEMAGLUTININA PRODUZIDA NO INTERIOR DE UMA PLANTA"**.

5 A presente invenção refere-se a um método para sintetização de partículas similares a vírus da gripe (VLPs) no interior de uma planta, ou uma porção desta é proporcionado. O método envolve expressão de HA da gripe em plantas, e a purificação por cromatografia de exclusão de tamanho. A invenção é também direcionada a uma VLP compreendendo proteína de

10 HA da gripe e lipídeos de planta. A invenção é também direcionada a um ácido nucleico que codifica HA da gripe, bem como vetores. As VLPs podem ser usadas para formularem vacinas da gripe, ou podem ser usadas para enriquecerem vacinas existentes.