

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 259**

51 Int. Cl.:

C07K 14/11 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/CA2012/050681**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13044390**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12836545 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2023 EP 2760882**

54 Título: **Aumento del rendimiento de las partículas similares a virus en las plantas**

30 Prioridad:

30.09.2011 US 201161541780 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2023

73 Titular/es:

**MEDICAGO INC. (100.0%)
1020 route de l'Eglise Suite 600
Québec, Québec G1V 3V9, CA**

72 Inventor/es:

**D'AOUST, MARC-ANDRE;
COUTURE, MANON y
VEZINA, LOUIS-PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 951 259 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aumento del rendimiento de las partículas similares a virus en las plantas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la producción de proteínas virales en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la producción y aumento de la producción de partículas similares a virus en plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

La gripe es causada por un virus de ARN de la familia ortomixoviridae. Existen tres tipos de estos virus y causan tres tipos diferentes de gripe: tipo A, B y C. Los virus del virus de la gripe tipo A infectan mamíferos (seres humanos, cerdos, hurones, caballos) y aves. Esto es muy importante para la humanidad, ya que es el tipo de virus que ha causado pandemias en todo el mundo. El virus de la gripe de tipo B (también conocido simplemente como gripe B) sólo infecta a los seres humanos. Ocasionalmente provoca brotes locales de gripe. Los virus de la gripe C también infectan solo a seres humanos. Infectan a la mayoría de las personas cuando son jóvenes y rara vez causan enfermedades graves.

La vacunación proporciona protección contra la enfermedad causada por un agente similar al inducir a un sujeto a montar una defensa antes de la infección. Convencionalmente, esto se ha logrado mediante el uso de formas vivas atenuadas o enteras inactivadas de los agentes infecciosos como inmunógenos. Para evitar el peligro de utilizar el virus entero (como los virus muertos o atenuados) como vacuna, se ha optado por utilizar proteínas víricas recombinantes, por ejemplo, subunidades, como vacunas. Tanto las vacunas peptídicas como las de subunidades están sujetas a una serie de limitaciones potenciales. Las vacunas de subunidades pueden presentar una inmunogenicidad deficiente, debido a un plegamiento incorrecto o a una presentación deficiente del antígeno. Un problema importante es la dificultad de asegurar que la conformación de las proteínas manipuladas imita la de los antígenos en su entorno natural. Los adyuvantes adecuados y, en el caso de péptidos, proteínas portadoras, deben usarse para reforzar la respuesta inmunitaria. Además, estas vacunas provocan principalmente respuestas humorales y, por tanto, pueden no evocar una inmunidad eficaz. Las vacunas de subunidades a menudo son ineficaces para enfermedades en las que se puede demostrar que el virus completo inactivado proporciona protección.

Las partículas similares a virus (VLP) son candidatos potenciales para su inclusión en composiciones inmunogénicas. Las VLP se parecen mucho a los viriones maduros, pero no contienen material genómico viral. Por tanto, las VLP son de naturaleza no replicativa, lo que las hacen seguras para la administración como una vacuna. Además, las VLP pueden modificarse por ingeniería genética para expresar glicoproteínas virales en la superficie de la VLP, que es su configuración fisiológica más nativa. Además, dado que las VLP se parecen a viriones intactos y son estructuras en forma de partículas multivalentes, las VLP pueden ser más eficaces para inducir anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína que los antígenos proteicos de la envoltura soluble.

Las VLP se han producido en plantas (documento WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/003235; WO 2011/03522; WO 2010/148511), y en sistemas de insectos y mamíferos (Noad, R. y Roy, P., 2003, Trends Microbiol 11: 438-44; Neumann y col., 2000, J. Virol., 74, 547-551). Latam y Galarza (2001, J. Virol., 75, 6154-6165) informaron la formación de VLP de la gripe en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que coexpresan genes hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), M1 y M2. Este estudio demostró que las proteínas del virión de la gripe se autoensamblan al coexpresarse en células eucariotas y que la proteína matriz M1 era necesaria para la producción de VLP. Sin embargo, Gomez-Puertas y col., (1999, J. Gen. Virol, 80, 1635-1645) también mostró que la sobreexpresión de M2 bloqueó completamente la transmisión de ARN de CAT a cultivos de MDCK.

M2 funciona como una proteína de canal iónico y se ha demostrado que, cuando esta proteína se sobreexpresa, se inhibe el transporte intracelular de HA coexpresada y la acumulación de heamaglutinina (HA) en la membrana plasmática se reduce en un 75 - 80 % (Sakaguchi y col., 1996; Henkel&Weisz, 1998). Además, al sobreexpresar M2, la acumulación de proteínas de membrana de virus en la membrana plasmática se reduce y, por lo tanto, hay una reducción drástica en el número de VLP funcionales producidas.

La proteína M2 se expresa abundantemente en la superficie celular de las células infectadas con la gripe A (Lamb y col. (1985) Cell, 40, 627 a 633). La proteína también se encuentra en la membrana de la propia partícula de virus, pero en cantidades mucho más pequeñas, de 14 a 68 moléculas de M2 por virión (Zebedee y Lamb (1988) J. Virol. 62, 2762 a 72). La proteína M2 se modifica postraduccionalmente mediante la adición de un ácido palmítico sobre la cisteína en la posición 50 (Sugrue y col. (1990) Virology 179, 51 a 56).

La proteína M2 es un homotetrámero compuesto por dos dímeros unidos por disulfuro, que se mantienen unidos por interacciones no covalentes (Sugrue y Hay (1991) Virology 180, 617 a 624). Mediante mutagénesis dirigida al sitio, Holsinger y Lamb, (1991) Virology 183, 32 a 43, demostraron que los residuos de cisteína en las posiciones 17 y 19 están implicados en la formación del puente disulfuro. Solo la cisteína en la posición 17 está presente en todos los virus analizados. En las cepas de virus en las que la cisteína 19 también está presente, no se sabe si se forma un segundo puente disulfuro en el mismo dímero (ya unido por Cys 17-Cys 17) o con el otro dímero.

Smith y col. (solicitud de patente estadounidense 2010/0143393) y Song y col. (Plos ONE 2011 6(1):e14538) describen vacunas y VLP que comprenden la proteína M2 de la gripe. Las VLP comprenden al menos una proteína central viral tal como M1. Esta proteína central impulsa la gemación y la liberación de las partículas de las células huésped de insectos.

Szecsí y col. (Virology Journal, 2006, 3:70) VLP ensamblaron VLP en partículas centrales con replicación defectuosa derivadas del virus de la leucemia murina (MLV). Las VLP de la gripe modificadas por ingeniería genética se obtienen mediante la coexpresión transitoria de componentes de la superficie celular (HA, NA, M2) y componentes virales internos (Gag, genoma marcador GFP) y albergan en su superficie HA, HA y NA o M2, o las tres proteínas derivadas del virus H7N1 o H5N1. Según Szecsí y col. la expresión de M2 durante la producción de Flu-VLP no influyó en la incorporación de HA o NA en las partículas virales (página 2, columna derecha, segundo párrafo en Szecsí y col.).

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a la producción de proteínas virales en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la producción y aumento de la producción de partículas similares a virus en plantas.

Es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para aumentar la producción de partículas similares a virus en plantas. La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se describe un método (A) para producir una partícula similar a virus (VLP) en una planta que comprende,

a) introducir un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de virus estructural en la planta, o parte de la planta,

b) introducir un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de canal

c) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de los ácidos nucleicos, produciendo de este modo la VLP.

La primera región reguladora activa en la planta, y la segunda región reguladora activa en la planta puede ser igual o diferente.

La proteína de canal del método (A) descrito anteriormente puede ser una proteína de canal de protones. La proteína de canal de protones puede seleccionarse de M2 o BM2. Además, la proteína de canal de protones puede comprender la secuencia HXXXW de firma de canal de protones. La proteína M2 puede ser una proteína M2 obtenida de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (Id. de sec. n.º 14) o de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (Id. de sec. n.º 11).

También se describe el método (A), en donde la proteína de virus estructural comprende un dominio de trimerización. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural comprende una secuencia de nucleótidos química que codifica, en serie, para una proteína viral antigénica o un fragmento de la misma, un dominio transmembrana de la gripe y una cola citoplasmática. La proteína de virus estructural puede comprender una proteína HA de la gripe. Además, puede delecionarse uno o más bucle proteolítico de la proteína HA de la gripe.

También se describe el método (A) en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede seleccionarse del grupo que consiste en B HA, C, HA, H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede ser HA tipo B o H3. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede ser, por ejemplo, HA de la gripe B/Brisbane/60/2008, B/Malasia/2506/2004 o B/Wisconsin/1/2010, o H3 de la gripe A/Perth/16/2009 o A/Victoria/361/2011. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de virus estructural tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con Id. de sec. n.º: 23, 28, 43, 46, 51, 57 o 61. La secuencia de la proteína de virus estructural también puede comprender la secuencia de Id. de sec. n.º: 25, 30, 41, 48, 54, 58 o 64.

También se describe el método (A), en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la primera región reguladora unida operativamente con uno o más de un potenciador de comovirus, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural, y uno o más de un elemento de amplificación de geminivirus, y se introduce en la planta o porción de la planta un tercer ácido nucleico que codifica una replicasa de geminivirus. El uno o más de un potenciador de comovirus puede ser una UTR de comovirus, por ejemplo, una UTR hipertraducible del virus del mosaico del caupí (CPMV-HT) como la 5' y/o 3'UTR del CPMV-HT. El uno o más de un elemento de amplificación de geminivirus puede seleccionarse entre una región intergénica larga del virus del enanismo amarillo de la judía (BeYDV LIR) y una región intergénica corta del BeYDV (BeYDV SIR). Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede ser HA o H3 de tipo B, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína viral estructural puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con Id. de sec. n.º: 23, 28, 43, 46, 51, 57 o 61. La secuencia de la proteína de virus estructural también puede comprender la secuencia de Id. de sec. n.º: 25, 30, 41, 48, 54, 58 o 64.

El método descrito anteriormente (método A) también puede incluir la introducción de otra secuencia de ácido nucleico que codifique un supresor del silenciamiento, por ejemplo, HcPro o p19.

- 5 También se describe el método (A), en el que en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa transitoriamente en la planta. Alternativamente, en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa de forma estable en la planta.

El método (A) tal como se describió anteriormente puede comprender además una etapa de:

- 10 d) cosechar la planta y purificar las VLP.

También se describe el método (A), en donde la VLP no contiene una matriz vírica o una proteína central.

- 15 Se describe una VLP producida mediante el método (A) tal como se describió anteriormente. La VLP puede comprender además uno o más de un lípido derivado de una planta. La VLP también puede caracterizarse por no contener la proteína de canal. Además, la proteína de virus estructural de la VLP puede ser una proteína HA0. La una o más proteínas de virus comprenden la VLP puede comprender N-glucanos específicos de la planta o N-glucanos modificados. Se describe un anticuerpo policlonal preparado usando la VLP.

- 20 Se describe una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP como se acaba de describir para inducir una respuesta inmunitaria, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 25 Se describe un método para inducir inmunidad frente a una infección por el virus de la gripe en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de la VLP que se acaba de describir. La VLP puede administrarse a un sujeto por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea.

- 30 Se describe la materia vegetal que comprende una VLP producida mediante el método (A) descrito anteriormente. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por el virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también puede mezclarse como un suplemento alimenticio.

Se describe un método (B) para producir una partícula similar a virus (VLP) que comprende,

- 35 a) proporcionar una planta o parte de la planta que comprende un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína viral estructural en la planta, o parte de la planta, y un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de canal

- 40 b) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de los ácidos nucleicos, produciendo de este modo la VLP.

La primera región reguladora activa en la planta, y la segunda región reguladora activa en la planta puede ser igual o diferente.

- 45 La proteína de canal del método (B) descrito anteriormente puede ser una proteína de canal de protones. La proteína de canal de protones puede seleccionarse de M2 o BM2. Además, la proteína de canal de protones puede comprender la secuencia HXXXW de firma de canal de protones.

- 50 También se describe el método (B), en donde la proteína de virus estructural comprende un dominio de trimerización. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural comprende una secuencia de nucleótidos quimérica que codifica, en serie, para una proteína viral antigénica o un fragmento de la misma, un dominio transmembrana de la gripe y una cola citoplasmática. La proteína de virus estructural puede comprender una proteína HA de la gripe. Además, puede delecionarse uno o más bucle proteolítico de la proteína HA de la gripe.

- 55 También se describe el método (B) en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede seleccionarse del grupo que consiste en B HA, C, HA, H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede ser HA tipo B o H3. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural puede ser, por ejemplo, HA de la gripe B/Brisbane/60/2008, B/Malasia/2506/2004 o B/Wisconsin/1/2010, o H3 de la gripe A/Perth/16/2009 o A/Victoria/361/2011.

- 60 También se describe el método (B), en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la primera región reguladora unida operativamente con uno o más de un potenciador de comovirus, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de virus estructural, y uno o más de un elemento de amplificación de geminivirus, y se introduce en la planta o porción de la planta un tercer ácido nucleico que codifica una replicasa de geminivirus. El uno o más de un potenciador de comovirus puede ser una UTR de comovirus, por ejemplo, una UTR hipertraducible del virus del mosaico del caupí (CPMV-HT) como la 5' y/o 3'UTR del CPMV-HT. Además, el uno o más de un elemento de

amplificación de geminivirus puede seleccionarse entre una región intergénica larga del virus del enanismo amarillo de la judía (BeYDV LIR) y una región intergénica corta del BeYDV (BeYDV SIR).

5 El método descrito anteriormente (método B) también puede incluir la introducción de otra secuencia de ácido nucleico que codifique un supresor del silenciamiento, por ejemplo, HcPro o p19.

También se describe el método (B), en el que en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa transitoriamente en la planta. Alternativamente, en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa de forma estable en la planta.

10 El método (B) tal como se describió anteriormente puede comprender además una etapa de: d) cosechar la planta y purificar las VLP.

También se describe el método (A), en donde la VLP no contiene una matriz vírica o una proteína central.

15 Se describe una VLP producida mediante el método (B) tal como se describió anteriormente. La VLP puede comprender además uno o más de un lípido derivado de una planta. La VLP también puede caracterizarse por no contener la proteína de canal. Además, la proteína de virus estructural de la VLP puede ser una proteína HA0. La una o más proteínas de virus comprenden la VLP puede comprender N-glucanos específicos de la planta o N-glucanos modificados. Se describe un anticuerpo policlonal preparado usando la VLP.

20 Se describe una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP elaborada mediante el método (B) tal como se acaba de describir para inducir una respuesta inmunitaria, y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Se describe un método para inducir inmunidad frente a una infección por el virus de la gripe en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de la VLP que se acaba de describir. La VLP puede administrarse a un sujeto por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea.

30 Se describe la materia vegetal que comprende una VLP producida mediante el método (B) descrito anteriormente. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por el virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también puede mezclarse como un suplemento alimenticio.

35 Se describe un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º:41 (PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico suprimido), y una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de Id. de sec. n.º:41. La secuencia de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de Id. de sec. n.º:43. Se describe una VLP que comprende el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º:41. La VLP puede comprender además uno o más de un lípido derivado de una planta. La VLP también puede caracterizarse por no contener la proteína de canal. La VLP puede comprender N-glucanos específicos de la planta o N-glucanos modificados. Se describe una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP que comprende la

40 secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º:41, para inducir una respuesta inmunitaria, y un portador farmacéuticamente aceptable. Se describe un método para inducir inmunidad frente a una infección por el virus de la gripe en un sujeto, que comprende la administración de la VLP que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º:41, al sujeto. La VLP puede administrarse a un sujeto por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea. Se describe materia vegetal que comprende una VLP que comprende la

45 secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º:41. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por el virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también puede mezclarse como un suplemento alimenticio.

50 Al coexpresar una proteína de virus estructural junto con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, se observa un mayor rendimiento de la proteína de virus estructural y VLP. Se sabe que las HA cambian de conformación en función del pH. Sin querer atarnos a la teoría, el pH dentro del aparato de Golgi de las células productoras de HA durante la maduración y la migración puede influir en el plegamiento de la HA, afectar a la estabilidad y aumentar la degradación, o una combinación de ambas, de la HA. Mediante la coexpresión de una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitado a una proteína de canal de protones, junto con

55 una HA, el pH dentro del aparato de Golgi puede aumentar, y dar lugar a un aumento de la estabilidad, la reducción de la degradación, o una combinación de los mismos, y aumentar el rendimiento de HA.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

60 Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos en donde:

65 **Figura 1A** muestra el cebador IF-H5A-I-05.s1+3c (Id. de sec. n.º: 2). **Figura 1B** muestra el cebador IF-H5dTm.r (Id. de sec. n.º: 3). **Figura 1C** muestra una representación esquemática del constructo 1191. **Figura 1D** muestra el

constructo 1191 (Id. de sec. n.º 4). **Figura 1E** muestra el casete de expresión número 489 (Id. de sec. n.º 5). **Figura 1F** muestra la secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) (Id. de sec. n.º: 6). **Figura 1G** muestra una secuencia de nucleótidos que codifica H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) (Id. de sec. n.º: 42).

Figura 2A muestra el cebador IF-S1-M1+M2ANC.c (Id. de sec. n.º:7). **Figura 2B** muestra el cebador IF-S1-4-M2ANC.r (Id. de sec. n.º: 8). **Figura 2C** muestra la secuencia de nucleótidos para el gen M2 sintetizado (correspondiente a nt 1-26 unido a 715-982 del número de registro Genbank DQ508860) (Id. de sec. n.º: 9). **Figura 2D** muestra el casete de expresión número 1261 del promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1) está subrayado. (Id. de sec. n.º: 10). **Figura 2E** muestra la secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1) (Id. de sec. n.º: 11).

Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos del gen M2 sintetizado (correspondiente a nt 26-51 unido a nt 740-1007 del número de registro Genbank EF467824) (Id. de sec. n.º: 12). **Figura 3B** muestra el casete de expresión número 859 del promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) está subrayado. (Id. de sec. n.º: 13). **Figura 3C** muestra la secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (Id. de sec. n.º:14).

Figura 4A muestra el cebador IF-H1A-C-09.s2+4c (Id. de sec. n.º: 15). **Figura 4B** muestra el cebador IF-H1A-C-09.s1-4r (Id. de sec. n.º: 16). **Figura 4C** muestra la secuencia de nucleótidos del gen H1 sintetizado (número de registro Genbank FJ966974) (Id. de sec. n.º: 17). **Figura 4D** muestra una representación esquemática del constructo 1192. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación. **Figura 4E** muestra el constructo 1192 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º: 18). **Figura 4F** muestra el casete de expresión número 484 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/H1 de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) está subrayado. (Id. de sec. n.º: 19). **Figura 4G** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP-H1 de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) (Id. de sec. n.º: 20).

Figura 5A muestra el cebador IF-S2+S4-H3 Per.c (Id. de sec. n.º: 21). **Figura 5B** muestra el cebador IF-S1a4-H3 Per.r (Id. de sec. n.º: 22). **Figura 5C** muestra la secuencia de nucleótidos del gen H3 sintetizado (correspondiente al nt 26-1726 del número de registro GQ293081 de Genbank) (Id. de sec. n.º: 23). **Figura 5D** muestra el casete de expresión número 1019 del promotor 2 x 35 S al terminador NOS. PDISP/H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) está subrayado. (Id. de sec. n.º: 24). **Figura 5E** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) (Id. de sec. n.º: 25).

Figura 6A muestra el cebador IF-S2+S4-B Bris.c (Id. de sec. n.º: 26). **Figura 6B** muestra el cebador IF-S1a4-B Bris.r (Id. de sec. n.º: 27). **Figura 6C** muestra la secuencia de nucleótidos del gen HA Brisbane sintetizado (correspondiente a nt 34-1791 del número de registro Genbank FJ766840) (Id. de sec. n.º: 28). **Figura 6D** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1029 del promotor 2 x 35 S al terminador NOS. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (Id. de sec. n.º: 29). **Figura 6E** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 (Id. de sec. n.º: 30). **Figura 6F** muestra una representación esquemática de la construcción 1194. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación. **Figura 6G** muestra el constructo 1194 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º: 31). **Figura 6H** muestra un casete de expresión número 1008 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (Id. de sec. n.º: 32).

Figura 7A muestra el cebador dTmH5I-B Bris.r (Id. de sec. n.º: 33). **Figura 7B** muestra el cebador Bris-dTmH5I.c (Id. de sec. n.º: 34). **Figura 7C** muestra el cebador IFS1aS4-dTmH5I.r (Id. de sec. n.º: 35). **Figura 7D** muestra un casete de expresión número 1009 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA B Brisbane/H5Indo TMCT está subrayado. (Id. de sec. n.º:36). **Figura 7E** muestra una secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane/H5Indo TMCT (Id. de sec. n.º: 37).

Figura 8A muestra el cebador 1039+1059.r (Id. de sec. n.º: 38). **Figura 8B** muestra el cebador 1039+1059.c (Id. de sec. n.º: 39). **Figura 8C** muestra un casete de expresión número 1059 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado está subrayado. (Id. de sec. n.º: 40). **Figura 8D** muestra una secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado (Id. de sec. n.º: 41) **Figura 8E** muestra una secuencia de nucleótidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado (Id. de sec. n.º: 43).

Figura 9 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 1008. El número de constructo 1008 dirige la expresión de HA de tipo natural de la cepa de la gripe BBris/60/2008. Este constructo comprende elementos derivados del BeYDV para la amplificación del ADN.

Figura 10 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 1009. El número de constructo 1009 dirige la expresión de una HA quimérica de la cepa de la gripe B/Brisbane/60/2008 en la que el dominio transmembrana y la cola citosólica se reemplazan por las de H5 de la gripe A/Indonesia/05/2005. Este constructo comprende elementos derivados del BeYDV para la amplificación del ADN.

Figura 11 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 1029. El número de constructo 1029 dirige la expresión de HA de tipo natural de la cepa de la gripe BBrisb/60/2008.

Figura 12 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 1059. El número de constructo 1059 dirige la expresión de una HA mutante de la cepa de gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico suprimido. Este constructo comprende elementos derivados del BeYDV para la amplificación del ADN.

Figura 13 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 1019. El número de constructo 1019 dirige la expresión de H3 de tipo salvaje de la cepa de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2).

Figura 14 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 484. El número de constructo 484 dirige la expresión de H1 de tipo salvaje de la cepa A/California/07/2009 (H1N1) de tipo natural.

Figura 15 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 489. El número de constructo 489 dirige la expresión de H5 de tipo natural de la cepa A/Indonesia/05/2005 (H5N1) de tipo natural.

Figura 16 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 1261. El número de constructo 1261 dirige la expresión de M2 de tipo salvaje de la cepa de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1).

Figura 17 muestra el mapa plasmídico del número de constructo 859. El número de constructo 859 dirige la expresión de M2 de tipo natural de la cepa de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Figura 18 muestra el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. HA de B/Brisbane/60/2008 se coexpresa con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. “C+”: control positivo, virus B/Brisbane/60/2008 semipurificado de la Therapeutic Goods Administration, Australia; “C-”: control negativo, plantas infiltradas simuladas; “1008”: expresión de HA de tipo natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1008+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2; “1009+1261”: coexpresión de HA quimérica de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2; “1029”: expresión de HA de tipo natural de B/Brisbane/60/2008 en ausencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1029+1261”: coexpresión de HA de tipo natural de B/Brisbane/60/2008 en ausencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. Las razones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión.

Figura 19 muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. Carril “C+”: Control positivo, virus A/Wisconsin/15/2009 (H3N2) semipurificado de la Therapeutic Goods Administration, Australia; “C-”: control negativo, plantas infiltradas simuladas; “1019”: expresión de HA de tipo natural de A/Perth/16/2009 (H3N2); “1019+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de A/Perth/16/2009 (H3N2) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. La razón indica la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión.

Figura 20 muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. Carril “C+”: Control positivo, A/California/7/2009 (H1N1) NYMC X-179A semipurificado de virus NIBSC (código NIBSC 09/146); “C-”: control negativo, plantas infiltradas simuladas; “484”: expresión de HA de tipo salvaje de A/California/7/2009 (H1N1); “484+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de A/California/7/2009 (H1N1) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. La razón indica la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión.

Figura 21 muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. Carril “C+”: Control positivo, H5 recombinante purificado de A/Indonesia/05/2005, Immune Technology Corporation (n.º de producto IT-003-052p); “C-”: control negativo, plantas infiltradas simuladas; “489”: expresión de HA de tipo salvaje de A/Indonesia/5/05 (H5N1); “489+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de A/Indonesia/5/05 (H5N1) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99.

Figura 22A muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. “1008”: expresión de HA de tipo natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1008+1261”: coexpresión de HA de tipo natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99; “1059”: expresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1059+1261”: coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. Se analizaron plantas de tres infiltraciones distintas (A, B y C). Las razones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión. **Figura 22B** muestra una comparación de la capacidad de hemaglutinación de extractos de proteínas en bruto de plantas productoras de HA.

Figura 23 muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. **Figura 23A**: “1059”: expresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1059+1261”: coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en

presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. “1059+859”: coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/Puerto Rico/8/34. Se analizaron plantas de tres infiltraciones distintas (A, B y C). Las razones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión. **Figura 23B**: “1019”: expresión de HA de tipo natural de A/Perth/16/2009 (H3N2); “1019+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de A/Perth/16/2009 (H3N2) con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99; “1019+859”: coexpresión de HA de tipo salvaje de A/Perth/16/2009 (H3N2) con M2 de A/Puerto Rico/8/34. Las razones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión.

Figura 24 muestra la alineación de secuencia de HA de varias cepas de gripe. El sitio de escisión del precursor HA0 se indica mediante una flecha.

Figura 25A muestra el cebador IF-H3V36111.52+4c (Id. de sec. n.º: 44). **Figura 25B** muestra el cebador IF-H3V36111.s1-4r (Id. de sec. n.º: 45). **Figura 25C** muestra la secuencia de nucleótidos del gen H3 sintetizado (correspondiente a nt 25 a 1725 del número de aislado Gisd EPI_ISL_101506 HA) (Id. de sec. n.º: 46). **Figura 25D** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1391 del promotor 2 x 35 S al terminador NOS. PDISP/H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 (H3N2) está subrayado. (Id. de sec. n.º: 47). **Figura 25E** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 (H3N2) (Id. de sec. n.º: 48). **Figura 25F** muestra una representación esquemática de la construcción 1391.

Figura 26A muestra el cebador IF-HAB110.S1+3c (Id. de sec. n.º: 49). **Figura 26B** muestra el cebador IF-HAB110.s1-4r (Id. de sec. n.º: 50). **Figura 26C** muestra la secuencia de nucleótidos de la HA B Wisconsin sintetizada (número de registro Genbank JN993010) (Id. de sec. n.º: 51). **Figura 26D** muestra una representación esquemática de la construcción 193. **Figura 26E** muestra el constructo 193 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º: 52). **Figura 26F** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1462 del promotor 2 x 35 S al terminador NOS. HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 está subrayado (Id. de sec. n.º: 53). **Figura 26G** muestra la secuencia de aminoácidos de la HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 (Id. de sec. n.º: 54). **Figura 26H** muestra una representación esquemática del constructo 1462.

Figura 27A muestra el cebador HAB110(PrL-).r (Id. de sec. n.º: 55). **Figura 27B** muestra el cebador HAB110(PrL-).c (Id. de sec. n.º: 56). **Figura 27C** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1467 del promotor 2 x 35 S al terminador NOS. HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico delecionado está subrayado (Id. de sec. n.º: 57). **Figura 27D** muestra la secuencia de aminoácidos de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con el bucle proteolítico delecionado (Id. de sec. n.º: 58). **Figura 27E** muestra una representación esquemática del constructo 1467.

Figura 28A muestra el cebador IF-HB-M-04.s2+4c (Id. de sec. n.º: 59). **Figura 28B** muestra el cebador IF-HB-M-04.s1-4r (Id. de sec. n.º: 60). **Figura 28C** muestra la secuencia de nucleótidos de la HA B Malasia sintetizada (correspondiente al nt 31-1743 del número de registro Genbank EU124275) con las mutaciones T759C y C888G subrayadas. (Id. de sec. n.º: 61). **Figura 28D** muestra una representación esquemática del constructo 194, con los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI utilizados para la linealización del plásmido anotados en la representación. **Figura 28E** muestra el constructo 194 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º: 62). **Figura 28F** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1631 del promotor 2 x 35 S al terminador NOS. PDISP-HA de la gripe B/Malasia/2506/2004 está subrayado. (Id. de sec. n.º: 63). **Figura 28G** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP-HA de la gripe B/Malasia/2506/2004 (Id. de sec. n.º: 64). **Figura 28H** muestra una representación esquemática del constructo 1631.

Figura 29 muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. HA de B/Malasia/2506/2004 se coexpresa con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. Se cargaron veinte microgramos de extracto de proteína por carril. “C+”: control positivo, virus B/Malasia/2506/2004 semipurificado del National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido; “1631”: expresión de HA de tipo natural de B/Malasia/2506/2004 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1631+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de B/Malasia/2506/2004 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2. Las razones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* usados en experimentos de coexpresión.

Figura 30A muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. HA de B/Wisconsin/1/2010 se coexpresa con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. Se cargaron diez microgramos de extracto de proteína por carril. “C+”: control positivo, virus B/Wisconsin/1/2010 semipurificado del National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido; “1462”: expresión de HA de tipo natural de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1467”: expresión de HA mutante de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); “1462+1261”: coexpresión de HA de tipo salvaje de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2; “1467+1261”: coexpresión de HA mutante de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2. Las razones indican la densidad óptica de cada cultivo de *Agrobacterium* usado en los experimentos de expresión y coexpresión. **Figura 30B**

muestra una comparación de la capacidad de hemaglutinación de extractos de proteínas en bruto de plantas transformadas con AGL1/1462, AGL1/1467, AGL1/1462+AGL1/1261 y AGL1/1467+AGL1/1261.

Figura 31 muestra un análisis de inmunotransferencia de tipo a Western de la expresión de la proteína HA en hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. HA de H3/Victoria/361/2011 se coexpresa con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99. Se cargaron veinte microgramos de extracto de proteína por carril. "C+": control positivo, virus H3/Wisconsin/15/2009 semipurificado de la Therapeutic Goods Administration, Australia; "1391": expresión de HA de tipo natural de H3/Victoria/361/2011; "1391+1261": coexpresión de HA de tipo natural de H3/Victoria/361/2011 con M2. Las razones indican la densidad óptica de cada cultivo de *Agrobacterium* usado en los experimentos de expresión y coexpresión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La siguiente descripción es de una realización preferida.

La presente invención se refiere a partículas similares a virus (VLP) y a métodos para producir y aumentar el rendimiento y producción de VLP en plantas.

Se describe un método para producir una partícula similar a virus (VLP) en una planta o parte de la planta. El método implica introducir un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico en la planta. El primer ácido nucleico comprende una primera región reguladora activa en la planta o parte de la planta, y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína viral estructural. El segundo ácido nucleico comprende una segunda región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones. La primera región reguladora y la segunda región reguladora pueden ser iguales o diferentes. La planta o parte de la planta se incuban en condiciones que permiten la expresión de los ácidos nucleicos, produciendo de este modo la VLP. Si se desea, la planta o parte de la planta puede cosecharse y la VLP se purifica. Preferentemente, la VLP no contiene M1, una matriz viral o una proteína central. Se describe una VLP producida mediante este método. La VLP puede comprender uno o más de un lípido derivado de una planta. La VLP puede usarse para preparar una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria y un portador farmacéuticamente aceptable.

Se describe materia vegetal que comprende la VLP producida mediante la expresión del primer y segundo ácidos nucleicos descritos anteriormente. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por el virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también puede mezclarse como un suplemento alimenticio.

La VLP también puede producirse proporcionando una planta o porción de planta que comprenda un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico como se ha definido anteriormente, e incubando la planta o porción de planta en condiciones que permitan la expresión del primer y segundo ácidos nucleicos, produciendo de este modo la VLP. La VLP puede comprender uno o más de un lípido derivado de una planta. La VLP puede usarse para preparar una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria y un portador farmacéuticamente aceptable. Se describe la materia vegetal que comprende la VLP producida mediante la expresión del primer y segundo ácido nucleico. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por el virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también puede mezclarse como un suplemento alimenticio.

Las VLP pueden comprender una o más proteínas virales. Por ejemplo, que no debe considerarse limitativo, la una o más proteínas víricas pueden ser una proteína vírica estructural, como la hemaglutinina (HA) de la gripe, o una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, como por ejemplo, M2. La HA puede ser cualquier HA, por ejemplo, una H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 o HA de tipo B como se describe en el documento WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/003235; WO 2011/03522).

Como se describe con más detalle a continuación, las VLP pueden producirse en una planta mediante la coexpresión de un primer ácido nucleico que codifica una proteína vírica con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal protónico. Los ácidos nucleicos primero y segundo pueden introducirse en la planta en el mismo paso, o pueden introducirse en la planta secuencialmente. El primer y segundo ácidos nucleicos pueden introducirse en la planta de forma transitoria o de forma estable. Además, una planta que expresa un primer ácido nucleico que codifica una proteína viral puede transformarse con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, (segundo ácido nucleico) de modo que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresen en la planta. Alternativamente, una planta que expresa una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitada a una proteína de canal de protones, (segundo ácido nucleico) puede transformarse con un primer ácido nucleico que codifica una proteína viral de modo que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresen en la planta. Además, una primera planta que exprese el primer ácido nucleico que codifica una proteína viral, puede cruzarse con una segunda planta que exprese el segundo ácido nucleico que codifica la proteína de canal -por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones- para producir una planta progenie que coexpresen los ácidos nucleicos primero y segundo que codifican la proteína viral y la proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, respectivamente.

También se describe un método para aumentar la expresión y el rendimiento de una proteína vírica en planta mediante la coexpresión de un primer ácido nucleico que codifica una proteína vírica con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitado a una proteína de canal de protones. Los ácidos nucleicos primero y segundo pueden introducirse en la planta en el mismo paso, o pueden introducirse en la planta secuencialmente. El primer y segundo ácidos nucleicos pueden introducirse en la planta de forma transitoria o de forma estable. Además, una planta que expresa un primer ácido nucleico que codifica una proteína viral puede transformarse con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, (segundo ácido nucleico) de modo que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresen en la planta. Alternativamente, una planta que expresa una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitada a una proteína de canal de protones, (segundo ácido nucleico) puede transformarse con un primer ácido nucleico que codifica una proteína viral de modo que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresen en la planta. Además, una primera planta que exprese el primer ácido nucleico que codifica una proteína viral, puede cruzarse con una segunda planta que exprese el segundo ácido nucleico que codifica la proteína de canal -por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones- para producir una planta progenie que coexprese los ácidos nucleicos primero y segundo que codifican la proteína viral y la proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, respectivamente.

Proteína de canal

Por “proteína de canal” se entiende una proteína capaz de formar un canal a través de una membrana fosfolipídica que permite el paso de iones y/o pequeñas moléculas a través de la membrana. Las proteínas de canal pueden ser selectivas por tamaño y/o carga de los iones y/o moléculas pequeñas. Ejemplos no limitantes de proteínas de canal son la proteína de canal no específica que altera la permeabilidad de las membranas a compuestos de bajo peso molecular y la proteína de canal iónico, como por ejemplo, el canal de cloruro, el canal de potasio, el canal de sodio, el canal de calcio y el canal de protones.

Por “proteína canal de protones” se entiende una proteína capaz de formar un canal selectivo de protones a través de una bicapa de fosfolípidos. La proteína del canal de protones puede ser una proteína de membrana de un solo paso con un dominio transmembrana (TM) flanqueado por dominios hidrofóbicos. El dominio TM del canal de protones puede comprender la secuencia HXXXW (Id. de sec. n.º. 1).

Tras la escisión de HA0, la HA se vuelve sensible al pH, experimentando un cambio conformacional irreversible al pH del endosoma (<pH 6,0). La conformación del precursor HA0 es estable a pH bajo, pero la forma escindida HA1-HA2 es metaestable (Bullough PA y col., 1994, Nature. vol 371: 37-43). Los estudios sobre el umbral de pH que induce cambios conformacionales en las diferentes HA, muestran que este umbral es de aproximadamente pH 5,8-5,9 para las cepas B, mientras que es más ácido (pH 5,1 a 5,3) para las HA de tipo A (Beyer WEP y col., 1986, Archives Virol, vol 90.): 173). Durante la extracción de la biomasa vegetal (entre pH 5-6), también puede producirse un cambio conformacional de HA1-HA2 con HA de tipo B.

Sin desear limitarse a la teoría, el pH de un compartimento celular que comprende HA, que incluye el aparato de Golgi, puede por lo tanto ser importante para el plegamiento, la estabilidad y/o la proteólisis de HA. Las proteínas canalizadoras de protones, como por ejemplo, la proteína M2 y BM2 de la gripe, pueden regular el pH de los compartimentos celulares. Por ejemplo, M2 regula la potenciación de la fusión de membranas amortiguando los compartimentos intracelulares tanto en las fases tardías como en las tempranas de la replicación viral de la gripe. Al principio de la infección de nuevas células tras la captación endocítica de partículas víricas, la activación de la actividad del canal de protones M2 conduce a la acidificación del interior del virión durante el proceso de desvestimiento. En una fase tardía de la infección, durante la producción del virus, M2 actúa para elevar el pH durante el tránsito a través de la red trans-Golgi y evita la inactivación inducida por un pH bajo de las proteínas cotransportadas, como la HA en el caso de la gripe. Al coexpresar una proteína de virus estructural junto con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, se observa un mayor rendimiento de la proteína de virus estructural y VLP. Se sabe que las HA cambian de conformación en función del pH. Sin querer atarnos a la teoría, el pH dentro del aparato de Golgi de las células productoras de HA durante la maduración y la migración puede influir en el plegamiento de la HA, afectar a la estabilidad y aumentar la degradación, o una combinación de ambas, de la HA. Al coexpresar una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, junto con una HA, el pH dentro del aparato de Golgi puede aumentar y dar como resultado un aumento de la estabilidad, reducción de la degradación, o una combinación de los mismos, y aumentar los niveles de expresión y el rendimiento de HA y/o VLP.

Al coexpresar una proteína vírica estructural junto con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, en una planta, se observa un mayor rendimiento de la proteína vírica estructural y/o de las VLP, en comparación con una planta que expresa la proteína vírica estructural sin la coexpresión de la proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones.

Además, al coexpresar una proteína viral estructural como la HA con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, en una planta, la proteína HA puede exhibir una mayor actividad, como lo demuestra una mayor capacidad de hemaglutinación, en comparación con una proteína HA que no se coexpresa con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones. Por aumento de la

actividad se entiende un aumento de la capacidad de hemaglutinación de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 100 %, o cualquier cantidad intermedia determinada mediante técnicas habituales en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 % o cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente el 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 %, cuando se compara con la actividad de la misma proteína HA producida en ausencia de una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitada a una proteína de canal de protones.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “M2”, “proteína M2”, “secuencia M2” y “dominio M2” se refieren a la totalidad o a una parte de una secuencia de proteína M2 aislada de, basada en o presente en cualquier cepa o aislado de virus de la gripe natural o producido artificialmente. Así, el término M2 y similares incluye variantes de secuencias M2 naturales producidas por mutación durante el ciclo de vida del virus o producidas en respuesta a una presión selectiva (por ejemplo, terapia farmacológica, expansión del tropismo o infectividad de la célula huésped, etc.), así como secuencias M2 producidas recombinante o sintéticamente. Los ejemplos de proteínas de canal que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de canal de protones, por ejemplo, las enumeradas en la tabla 1. Ejemplos no limitativos de secuencias que pueden utilizarse incluyen M2 de A/Puerto Rico/8/1934 y M2 de A/Nueva Caledonia/20/1999. Una proteína M2 ejemplar consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en Id. de sec. n.º: 11 o 14.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “BM2”, “proteína BM2”, “secuencia BM2” y “dominio BM2” se refieren a la totalidad o a una parte de una secuencia de la proteína BM2 aislada de, basada en o presente en cualquier cepa o aislado del virus de la gripe natural o producido artificialmente. Así, el término BM2 y similares incluye variantes de secuencias BM2 naturales producidas por mutación durante el ciclo de vida del virus o producidas en respuesta a una presión selectiva (por ejemplo, terapia farmacológica, expansión del tropismo o infectividad de la célula huésped, etc.), así como secuencias BM2 producidas recombinante o sintéticamente. Los ejemplos de proteínas de canal que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de canal de protones, las enumeradas en la tabla 2.

Otros ejemplos de secuencias de proteínas de canales de protones son las secuencias depositadas en los números de registro GenBank que se muestran en la tabla 1 y la tabla 2.

Tabla 1: Números de registro de las secuencias de aminoácidos Proteínas de los canales de protones M2

Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank
ABA42438.1	ABB54697.1	ABI36079.1	ADM95491.1	ADM29632.1
ABBA42436.1	AAA43253.1	ABI36077.1	ADM95489.1	ADM29566.1
ABA42434.1	BAB19809.1	ABI36075.1	ADM95487.1	ADM29555.1
AAD51268.1	ABD59884.1	ABI36073.1	ADM95485.1	ADM29544.1
AAD51264.1	ABD59882.1	ABI36071.1	ADM95483.1	ADM29533.1
AAC60735.1	ABD59880.1	AB136069.1	ADM95481.1	ADM29445.1
BAI77393.1	BAD89348.1	ABI36067.1	ADM95479.1	ADM29434.1
BAI7745.1	BAD89338.1	ABI36065.1	ADM95477.1	ADM29423.1
CAP58009.1	BAD89328.1	ABI36063.1	ADM95475.1	ADM29412.1
CAP58007.1	BAE47133.1	ABI36061.1	ADM95473.1	ADM29401.1
CAP58005.1	ABD59890.1	ABI36059.1	ADM95471.1	ADM29379.1
BAH84754.1	ABD59888.1	ABI36037.1	BAF37390.1	ADM29368.1
BAH86619.1	ABD59886.1	ABI36027.1	ADG59188.1	ADM29357.1
BAH86616.1	ABD59900.1	ABI36016.1	ADG59186.1	ADM29313.1
BAH84985.1	ABD59898.1	ABI36005.1	ADG59184.1	ADM29302.1
YP 308853.1	ABD59896.1	AAY87447.1	ADG59182.1	ADM29291.1
AAD49092.1	ABD59894.1	AAY87431.1	ADG59180.1	ADM29280.1
AAD49090.1	ABD59892.1	AAV32647.1	ADG59178.1	ADM29269.1
AAD49088.1	AAC79578.1	AAV32639.1	ADG59176.1	ADM29258.1
ABQ12378.1	ABB51968.1	AAU00829.1	ADG59174.1	ADM29698.1
AAO33518.1	ABY75105.1	AAU00827.1	ADG59172.1	ADM29687.1
AAO33516.1	ABY75039.1	AAA91324.1	ADG59170.1	ADM29676.1
AAO33514.1	ABY75037.1	ABG75620.1	ADG59168.1	ADM29665.1
AAO33512.1	AAL60446.1	ACR09361.1	ADG59166.1	ADM29654.1
AAO33510.1	ABB00351.1	ACR09359.1	ADG59164.1	ADM29621.1
ADM29621.1	AAA43312.1	ACR09355.1	ADG59162.1	ADM29610.1
AAO33506.1	ABB00339.1	ACR09353.1	ADG59160.1	ADM29599.1
AAO33504.1	AAO33504.1	ACQ99604.1	ADG59158.1	ADM29522.1
AAO33502.1	AAM09299.1	ACQ99602.1	ADG59156.1	ADM29511.1
ABS52607.1	AAM09297.1	ACQ99600.1	ADG59154.1	ADM29500.1
ABS52597.1	ABS00915.1	ACQ99592.1	ADG59152.1	ADM29489.1

ES 2 951 259 T3

	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank
	ABS52587.1	ABS00914.1	ABS00914.1	ADG59150.1	ADM29478.1
	ABM21873.1	ABS00913.1	ACQ99588.1	ADG59148.1	ADM29467.1
5	ABM21871.1	ABS00912.1	ACQ99586.1	ADG59146.1	ADM29456.1
	ABM21869.1	ABS00911.1	ACP41965.1	ADG59144.1	ADM29390.1
	ABM21867.1	ABS00910.1	ACP41955.1	ADG59142.1	ADM29346.1
	ABM21865.1	ABS00909.1	ACP41951.1	ADG59140.1	ADM29335.1
10	ABM21863.1	ABS00908.1	ACP41946.1	ADG59138.1	ADM29324.1
	ABM21861.1	ABS00907.1	ACR49258.1	ADG59136.1	ADM29247.1
	ADM29247.1	ABS00906.1	ACR49256.1	ADG59134.1	AEE73588.1
	AAD49094.1	ABS00905.1	ACR49254.1	ADG59132.1	AEB89880.1
	AAD49086.1	ABS00904.1	ACR49252.1	ADG59130.1	AEB89869.1
15	AAD49084.1	ABS00903.1	ACR49250.1	ACR49250.1	AEB89858.1
	AAD49082.1	ABS00902.1	ACR49248.1	ADG59126.1	ADG59126.1
	AAD49080.1	ABB51974.1	ACR49246.1	ADG59124.1	AEA74013.1
	AAD49078.1	ABB51972.1	ACR49244.1	ADG59122.1	ADF42731.1
	AAD49076.1	ABB51970.1	ACR38840.1	ADG59120.1	ADF42721.1
20	AAD49074.1	AAD00150.1	ACR38838.1	ADG59118.1	ADF28007.1
	AAD49072.1	AAD00148.1	ACR38836.1	ADG59116.1	ADF27997.1
	AAD49070.1	AAD00146.1	ACR38834.1	ADG59114.1	ADF27987.1
	AAD49068.1	AAD00144.1	ACR38832.1	ADG59112.1	ADF27977.1
25	ACA25333.1	AAD00142.1	ACR18965.1	ADG59110.1	ADF27967.1
	ACA25323.1	AAD00140.1	ACR18963.1	ADG59108.1	ADF27957.1
	ACA25313.1	AAD00138.1	ACR18958.1	ADG59106.1	ADF27947.1
	CAJ12148.1	AAD00136.1	ACR18957.1	ADG59104.1	ADF27937.1
	CAJ12154.1	AAD00134.1	ACR18953.1	ADG59102.1	ADF27927.1
30	CAJ12152.1	AAD00132.1	ACR18949.1	ADG59100.1	ADF27917.1
	CAJ12150.1	AAD00130.1	ACR18946.1	ADG59098.1	ADF27907.1
	ACP41109.1	AAC80168.1	ACR18945.1	ADG59096.1	ADF27897.1
	ADG59536.1	AAC80166.1	ACR18943.1	ADG59094.1	ADF27887.1
35	AAK14988.1	AAC80164.1	ACR08560.1	ABO21713.1	ACS87931.1
	AAK14984.1	AAC80162.1	ACR08556.1	ADG59717.1	ACU44926.1
	ACR67209.1	AAC80160.1	NP_040979.2	ADG59706.1	ACU44922.1
	ACP41929.2	AAC80158.1	ABZ91697.1	AAF74335.1	ACU44920.1
	ACR18961.1	AAC80156.1	ABZ91685.1	AAF74333.1	ACU44918.1
40	ACR18955.1	ABY75159.1	ACB54711.1	ADF56637.1	ACU44916.1
	ACR18941.1	ABY75157.1	ABM90504.1	ADF56636.1	ACU44914.1
	ACRO8564.1	ABY75155.1	ABM90493.1	ADF56635.1	ACU44912.1
	ACR08562.1	ABY75153.1	ABM90482.1	ADF29921.1	ACU44910.1
	ACR08558.1	ABY75151.1	ABM90471.1	ADE75385.1	ACU44908.1
45	ACQ99594.1	ABY75149.1	ABM90460.1	ADE75374.1	ACU44906.1
	ACQ83308.1	ABY75147.1	ABM90449.1	ADE75365.1	ACU44904.1
	ACQ76400.1	ABY75145.1	ABM90438.1	ADE75354.1	ACU44902.1
	ACQ76382.1	ABY75143.1	ABI49411.1	ADE75344.1	ACU44900.1
50	ACQ76375.1	ABY75141.1	ABI49400.1	ADE75327.1	ACU44898.1
	ACQ76369.1	ABY75139.1	ABO31433.1	ADE75298.1	ACU44896.1
	ACQ76361.1	ABY75137.1	ABM90548.1	ADE75287.1	ACU44894.1
	ACQ76355.1	ABY75135.1	ABM90537.1	ADE75276.1	ACU44892.1
	ACQ76346.1	ABY75133.1	ABM90526.1	ADE75265.1	ACU44890.1
55	ACQ76332.1	ABY75131.1	ABM90515.1	ADE75254.1	ACU44888.1
	ACQ76325.1	ABY75129.1	ABL31784.1	ADE75244.1	ACU44886.1
	ACQ76313.1	ABY75127.1	ABL31770.1	ADE75235.1	ACU44883.1
	ACQ76303.1	ABY75125.1	ABL31759.1	ADE75228.1	ACU44881.1
	ACQ76293.1	ABY75123.1	ABL31748.1	ADE75218.1	ACU44879.1
60	ACQ63288.1	ABY75121.1	AB149419.1	ADE75207.1	ACU44877.1
	ACQ63259.1	ABY75119.1	ABL07034.1	ADE75196.1	ACU44875.1
	ACQ63250.1	ABY75117.1	ABL07023.1	ADE75187.1	ACU44873.1
	ACQ63217.1	ABY75115.1	ABL07012.1	ADE75178.1	ACU44871.1
65	ACQ63211.1	ABY75113.1	ACC55276.2	ADE75170.1	ACU44869.1
	ACQ55364.1	ABY75111.1	ABV53559.1	ADE75152.1	ACU44867.1

	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank
	ACQ55353.1	ABY75109.1	AEB71385.1	ADE75143.1	ACU44865.1
	ACP44171.1	ABY75107.1	AEB66897.1	ADE75134.1	ACU44863.1
5	ACP44160.1	ABY75103.1	AEB40208.1	ADE75124.1	ACU44861.1
	ACP44153.1	ABY75101.1	ADX36111.1	ADE75115.1	ACU44859.1
	ACP44149.1	ABY75099.1	ADX21100.1	ADE75095.1	ACU44857.1
	ACR18951.2	ABY75097.1	ADX21090.1	ADE75085.1	ACU44855.1
10	AAV87421.1	ABY75095.1	ADX21080.1	ADE75075.1	ACU44853.1
	AAV87413.1	ABY75093.1	ADW93762.1	ADE75057.1	ACU44851.1
	ACQ63284.1	ABY75091.1	ADW82270.1	ADE75046.1	ACU44849.1
	ACQ63275.1	ABY75089.1	ADW82260.1	ADE75030.1	ACU44847.1
	ACQ63266.1	ABY75087.1	ADW82250.1	ACL11961.1	ACU44845.1
15	ACQ63225.1	ABY75085.1	ADW82240.1	ABY40439.1	ACU44843.1
	ACP44185.1	ABY75083.1	ADW82230.1	ABY40432.1	ACU44841.1
	ACP44178.1	ABY75081.1	ADW82220.1	AAD25212.1	ACU44839.1
	ACA28776.1	ABY75079.1	ADW82210.1	AAD25206.1	ACU44837.1
	ACA28772.1	ABY75077.1	ADW82200.1	AAD25172.1	ACU44835.1
20	ACU44835.1	ABY75075.1	ADW82190.1	BAF36962.1	ACU44833.1
	ACR49240.1	ABY75073.1	ADW82179.1	AB194583.1	ACU44831.1
	ACQ84453.1	ABY75071.1	ADW82168.1	ACT21522.1	ACU44829.1
	ACU00946.2	ABY75069.1	ADW82157.1	ABY81638.1	ACU44827.1
25	ACR46665.1	ABY75067.1	ADW82148.1	ACF40971.1	ACU44825.1
	ACZ81655.1	ABY75065.1	ADW82137.1	ADW82137.1	ACU44823.1
	ACZ81651.1	ABY75063.1	ADW82126.1	ACD88507.1	ACU44821.1
	ACR46675.1	ABY75061.1	ADV19021.1	ABW97453.1	ACU44819.1
	ACU00956.1	ABY75059.1	ADL41167.1	ACZ81646.1	ACU44817.1
30	ACU00936.1	ABY75057.1	AAF74337.1	YP 308670.1	ACU44815.1
	ACT21587.1	ABY75055.1	ACS92616.1	AAA56808.1	ACU44813.1
	ACT21581.1	ABY75053.1	ACC94117.1	AAA56806.1	ACU44811.1
	ACT21576.1	ABY75051.1	ACC94089.1	ABS00311.1	ACU44809.1
35	ACR19302.2	ABY75049.1	ACC94087.1	ABS00320.1	ACU44807.1
	ACR19300.2	ABY75047.1	ACC94085.1	ACR08491.1	ACU44805.1
	ACR19298.2	ABY75045.1	ACC94071.1	ACR01010.1	ACU44803.1
	ACR19296.2	ABY75043.1	ACC94067.1	ACR01006.1	ACU44801.1
	ABX10529.1	ABY75041.1	ACC94065.1	ACG80612.1	ACU44799.1
40	ABJ90284.2	ABY75035.1	ACC94059.1	ABG78553.1	ACU44797.1
	ABJ90273.2	ABY75033.1	ACC94057.1	ABG78550.1	ACU44795.1
	ABJ90230.1	ABY75031.1	ACC94051.1	ACD37773.1	ACU44793.1
	ADD21567.1	ABY75029.1	ACC94041.1	ACD37763.1	ACU44791.1
	ACU44924.1	ABY75027.1	ACC94033.1	ACA64013.1	ACU44789.1
45	ACU44779.1	ABY75025.1	ABW97496.1	ABX10519.1	ACU44787.1
	ACU44773.1	ABY75023.1	ACA28780.1	ABW95953.1	ACU44785.1
	ADE48138.1	ABY75021.1	ACA28778.1	ABW95942.1	ACU44783.1
	ACG80349.1	ABY75019.1	ACA28774.1	ABJ90263.1	ACU44781.1
50	ADN34731.1	ABY75017.1	ACA28770.1	ABJ90251.1	ACU44777.1
	ADN34711.1	ABY75015.1	ACA28766.1	ABJ90241.1	ACU44775.1
	ADG59534.1	ABY75013.1	ACZ81636.1	BAF38386.1	ACU44771.1
	ADG59532.1	ABY75011.1	ACU27045.1	BAF37824.1	ACU44769.1
	ADG59530.1	ABY75009.1	ACR54040.1	BAF33431.1	ACU44767.1
55	ACX43975.1	ABY75007.1	ACH68522.1	BAF33417.1	ACU44765.1
	ACX43973.1	ABY75005.1	ACF04730.1	BAF33412.1	ACU44763.1
	ABG91471.1	ABY75003.1	ACF04728.1	BAF33401.1	ACU44761.1
	ABG91467.1	ABY75001.1	ACF04726.1	ACN22341.1	ACU44759.1
	ABF21313.1	ABY74999.1	ACF04724.1	ACV49525.1	ACU44757.1
60	ABF21301.1	ABY74997.1	ACF04722.1	ACV49503.1	ACU44755.1
	ABF21299.1	ABY74995.1	ACC69091.1	ACU79906.1	AEA92622.1
	ABF21297.1	ABY74993.1	ABV53579.1	ACU79895.1	AEA35548.1
	ABQ57382.1	ABY74991.1	ABV53569.1	ACU79884.1	ADM29588.1
	ACR09357.1	ABY74989.1	ABV53549.1	ACU79873.1	ADM29577.1
65	ACQ99606.1	ABY74987.1	ABV53539.1	ACI25792.1	BAK08628.1

	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank
	ACQ99598.1	ABY74985.1	ABV53529.1	ACI25781.1	BAK08626.1
5	ACQ99596.1	ABY74983.1	ABV53519.1	ACI25770.1	ADZ75331.1
	ACU43624.2	ABV45404.1	ABV53509.1	ACI25759.1	ADZ75320.1
	ACR67240.1	AAC63486.1	ABV53499.1	ACI25748.1	ADP07242.1
	ACR67238.1	AAC63484.1	ABV53489.1	ACF54468.1	ACZ54004.1
	ACR67235.1	AAC63482.1	ABV53479.1	ACF54457.1	ACX93288.1
10	ACR67234.1	AAC63480.1	ABV53470.1	ACF54446.1	ACX93222.1
	ACR67232.1	ABB00355.1	ADP37370.1	ACF54435.1	ACD65198.1
	ACR67230.1	ABB00353.1	ADG21464.1	ACF54424.1	ACD65196.1
	ACR67228.1	ABB00349.1	ADG21457.1	ACF54413.1	ACD65194.1
	ACR67226.1	ABB00347.1	ACF17953.1	ACF54402.1	ACD65191.1
15	ACR67224.1	ABB00345.1	ACF17943.1	ACF41825.1	ACD65189.1
	ACR67222.1	ABB00343.1	ADM95569.1	ACF41814.1	ACX93277.1
	ACR67220.1	ABB00341.1	ADM95567.1	ACF41803.1	ACX93269.1
	ACR67218.1	ABB00337.1	ADM95565.1	ACF41792.1	ABD79034.1
20	ACR67216.1	ABB00335.1	ADM95563.1	ACF41781.1	ABJ16853.1
	ACR67214.1	ABB00333.1	ADM95561.1	ACF41770.1	ABJ16842.1
	ACR67212.1	CAA30889.1	ADM95559.1	ACF41759.1	AD199547.1
	ACR67208.1	CAA30887.1	ADM95557.1	ACF41748.1	ADI99536.1
	ACR67206.1	CAA30885.1	ADM95555.1	ACF41737.1	ADI34045.1
25	ACR54054.1	CAA30893.1	ADM95553.1	ACF22399.1	ADD21471.1
	ACR09363.1	CAA30891.1	ADM95551.1	ACF22388.1	ADD21461.1
	ACP41961.1	AAA43091.1	ADM95549.1	ACF22377.1	ADD21451.1
	ACP41938.1	AAA43577.1	ADM95547.1	ACF22366.1	ACZ48112.1
	ABI36484.1	BAB19808.1	ADM95545.1	ACF22355.1	ACF25678.1
30	ABI36475.1	CAA30883.1	ADM95543.1	ACF22344.1	ACF25666.1
	ABI36464.1	AAD51929.1	ADM95541.1	ACF22333.1	ACF25466.1
	ABI36456.1	BAA99398.1	ADM95539.1	ACF22322.1	ACF25065.1
	ABI36445.1	AAF99673.1	ADM95537.1	ACF22311.1	ACF25057.1
35	ABI36434.1	AAF99671.1	ADM95535.1	ACF22300.1	ACF24971.1
	ABI36425.1	ABH04389.1	ADM95533.1	ACF22278.1	ACV74288.1
	ABI36412.1	ABB90274.1	ADM95531.1	ACF22256.1	ACV74286.1
	ABI36401.1	AAD51270.1	ADM95529.1	ACF22245.1	ABV56243.1
	ABI36390.1	AAM70004.1	ADM95527.1	ACF22234.1	ACI25712.1
40	ABI36379.1	AAB19772.1	ADM95525.1	ACF22223.1	ACI25710.1
	ABI36368.1	AAD51266.1	ADM95523.1	ACF22212.1	ADA81213.1
	ABI36357.1	ABD59885.1	ADM95521.1	ACF22201.1	ACZ56084.1
	ABI36346.1	AAM70001.1	ADM95519.1	ACF22190.1	ACZ45024.1
	ABI36335.1	AAM69992.1	ADM95517.1	ACF22172.1	ACV91683.1
45	ABI36324.1	AAM69982.1	ADM95515.1	ADL41185.1	ACV91679.1
	ABI36313.1	AAM69972.1	ADM95513.1	ADM07115.1	ACV91675.1
	ABI36297.1	AAM69961.1	ADM95511.1	ADM07104.1	ACV72405.1
	ABI36277.1	AAZ38741.1	ADM95509.1	ADM07093.1	ACV72403.1
50	ABI36202.1	AAZ38739.1	ADM95507.1	ADM07082.1	ACV72401.1
	ABI36191.1	AAZ38737.1	ADM95505.1	ADM07071.1	ACV72399.1
	ABI36181.1	AAZ38735.1	ADM95503.1	ADM07060.1	ACV72397.1
	ABI36170.1	AAZ38733.1	ADM95501.1	ADE62289.1	ACV72395.1
	ABI36159.1	AAZ38731.1	ADM95499.1	AEG65177.1	ACV72393.1
55	ABI36148.1	AAZ38729.1	ADM95497.1	AEC46386.1	ACV72391.1
	ABI36083.1	ABA42442.1	ADM95495.1	ADR78653.1	ACV72389.1
	ABI36081.1	ABA42440.1	ADM95493.1	ADM29643.1	ACV72349.1

Tabla 2: Números de registro de las secuencias de aminoácidos Proteínas de los canales de protones BM2

	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank
60	AAU01002.1	ACR15701.1	ACA96576.1	ABN50549.1
	BAC54010.1	ACR15690.1	ACA96565.1	ABN50538.1
65	BAC53999.1	ACR15679.1	ACA96554.1	ABN50527.1
	P0C0X4.1	ACR15668.1	ACA65099.1	ABN50516.1

	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank	Número de registro GenBank
	P03493.2	ACR15657.1	ACA65088.1	ABN50505.1
	P08383.2	ACR15646.1	ACA65077.1	ABN50494.1
5	P13882.2	ACR15635.1	ACA65066.1	ABN50483.1
	P13881.2	ACR15624.1	ACA65055.1	ABN50472.1
	Q80DN6.1	ACO94663.1	ACA65044.1	ABN50450.1
	ABF21319.1	ACO06025.1	ACA65033.1	ABN50439.1
10	ABN50461.1	ACO06014.1	ACA65022.1	ABN50428.1
	YP_419283.1	ACO06003.1	ACA65011.1	ABN50417.1
	ACN32784.1	AC005992.1	ACA65000.1	ABN50406.1
	ACN32773.1	AC005981.1	ACA64989.1	ABN50395.1
	ACN32719.1	AC005970.1	ACA64978.1	ABN50384.1
15	ACN32613.1	ACO05959.1	ACA64967.1	ABL77389.1
	ACN32602.1	AC005937.1	ACA64956.1	ABL77378.1
	ACN32591.1	AC005926.1	ACA64945.1	ABL77367.1
	ACN32580.1	ACF54369.1	ACA64934.1	ABL77356.1
	ACN32569.1	ACF54358.1	ACA64923.1	ABL77345.1
20	ACN32558.1	ACF54347.1	ACA64912.1	ABL77334.1
	ABL77103.1	ACF54336.1	ACA64901.1	ABL77323.1
	ABN50725.1	ACF54325.1	ABR16019.1	ABL77312.1
	ABX71689.1	ACF54314.1	ABR16008.1	ABL77301.1
25	ABF21321.1	ACF54303.1	ABR15997.1	ABL77290.1
	AAD29209.1	ACF54292.1	ABR15986.1	ABL77279.1
	AAD29207.1	ACF54281.1	ABR15975.1	ABL77268.1
	AAD29205.1	ACF54270.1	AB072379.1	ABL77257.1
	AAD29203.1	ACF54259.1	ABN50637.1	ABL77246.1
30	AAD29201.1	ACF54248.1	ABN59447.1	ABL77235.1
	AAD29199.1	ACF54226.1	ABN58663.1	ABL77224.1
	AAD29197.1	ACF54215.1	ABN51197.1	ABL77213.1
	AAD29195.1	ACF54204.1	ABN51186.1	ABL77202.1
35	AAD29193.1	ACF54182.1	ABN50747.1	ABL77191.1
	AAD29191.1	ACF54160.1	ABN50736.1	ABL77180.1
	AAD29189.1	ACF54149.1	ABN50714.1	ABL77169.1
	AAD29185.1	ACF54138.1	ABN50703.1	ABL77158.1
	AAD29183.1	ACF41660.1	ABN50692.1	ABL77147.1
40	AAD29181.1	ACD56579.1	ABN50681.1	ABL77136.1
	AAD29179.1	ACD56568.1	ABN50670.1	ABL77125.1
	AAD29177.1	ACB06477.1	ABN50659.1	ABL77114.1
	AAD29175.1	ACA96664.1	ABN50648.1	ABL77092.1
	AAD29173.1	ACA96653.1	ABN50626.1	ABL77081.1
45	AAT69452.1	ACA96642.1	ABN50615.1	ABL77070.1
	AAT69441.1	ACA96631.1	ABN50604.1	ABL77059.1
	AAT69430.1	ACA96620.1	ABN50593.1	ABL77048.1
	ACR39338.1	ACA96609.1	ABN50582.1	ABL77037.1
50	ACR15734.1	ACA96598.1	ABN50571.1	ABL77026.1
	ACR15723.1	ACA96587.1	ABN50560.1	ABL77015.1
	ACR15712.1	ACA96576.1	ABN50549.1	ABL77004.1

Proteína de virus estructural

La proteína de virus estructural (también denominada proteína viral estructural) puede ser una proteína antigénica viral o fragmento de la misma, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de envoltura del virus o glicoproteína viral. La proteína de virus estructural puede ser una proteína del virus quimérico. La proteína viral puede existir como un monómero, un dímero, un trímero o una combinación de los mismos. Un trímero es un complejo macromolecular formado por tres, normalmente proteínas unidas no covalentemente. Sin desear limitarse a la teoría, el dominio de trimerización de una proteína puede ser importante para la formación de dichos trímeros. Por lo tanto, la proteína viral estructural o su fragmento puede comprender un dominio de trimerización. Un ejemplo no limitante de una proteína de virus estructural es la hemaglutinina (HA) de la gripe, o un fragmento de HA. Los ejemplos no limitantes de HA, o fragmentos de HA que pueden usarse incluyen los descritos en los documentos WO 2009/009876, WO 2009/076778; WO 2010/003225, WO 2010/003235, WO 2011/035222, WO 2010/006452, WO 2010/148511, WO 2011/035422.

Además, la proteína de virus estructural puede ser la proteína precursora no procesada de HA. La proteína HA se sintetiza como una proteína precursora (HA0) de aproximadamente 75 kDa, que se ensambla en la superficie en una proteína trimérica alargada. La proteína precursora se escinde en un sitio de escisión conservado de la activación en 2 cadenas polipeptídicas, HA1 y HA2 (que comprende la región transmembrana), unida por un enlace disulfuro.

Modificación de bucle proteolítico (sitio de escisión)

La proteína de virus estructural puede ser una hemaglutinina de la gripe B o una proteína hemaglutinina de la gripe A con una delección o modificación del bucle proteolítico (sitio de escisión) dentro de la proteína hemaglutinina. La eliminación o modificación del bucle proteolítico asegura que la molécula de HA se mantiene principalmente como precursor HA0.

HA se sintetiza como una proteína precursora HA0, que se somete a procesamiento proteolítico en dos subunidades (HA1 y HA2) unidas entre sí por un puente disulfuro. Las cepas del virus de la gripe aviar apatogénica y de mamífero causan infecciones localizadas anatómicamente como resultado del intervalo restringido de células que secretan una proteasa que puede escindir el precursor HA0 extracelularmente (Chen J, y col 1998, Cell. vol. 95: 409-417). Las proteasas responsables de la escisión de HA0 en infecciones por gripe de seres humanos, son secretadas por las células del tracto respiratorio, o por coinfección de bacterias o micoplasma, o pueden producirse en respuestas inflamatorias a infecciones. Un candidato de proteasa principal es la tripsina Clara, que es producida por células Clara del epitelio bronquial, y tiene una distribución de tejido limitada (tracto respiratorio superior). La proteasa es específica para la secuencia monobásica Q/E-X-R encontrada en el sitio de escisión de H1, H2, H3 y H6. Las HA de las cepas H9 y B muestran un sitio de escisión monobásico ligeramente diferente con una secuencia SSR y KER respectivamente (véase la Figura 24). No se ha identificado proteasa para la mayoría de los virus de la gripe que causan infección entérica y respiratoria observada en aves acuáticas. En el laboratorio, la mayoría de las líneas celulares no admiten la replicación multiciclo a menos que se añada proteasa exógena (generalmente tripsina).

Sin embargo, las cepas de aves altamente patógenas son escindidas por una familia de proteasas intracelulares más extendidas, lo que da como resultado infecciones sistémicas. Esta diferencia en patogenicidad se correlaciona con diferencias estructurales en el sitio de escisión de HA0. Las cepas patógenas tienen insertos de aminoácidos polibásicos dentro de, o junto al, sitio monobásico. La escisión en este caso ocurre intracelularmente y las proteasas involucradas han sido identificadas como furina y otras enzimas de tipo subtilisina, encontradas en el Golgi e involucradas en el procesamiento postraduccion de precursores de hormonas y factores de crecimiento. La secuencia de reconocimiento de furina R-X-R/K-R es un aminoácido de inserción frecuente en los sitios de escisión de HA0 de H5 y H7 (véase la figura 24). La amplia distribución tisular de la enzima, y la eficiencia de la escisión intracelular, contribuyen a la infección sistémica amplia y virulenta causada por estos virus.

Hoimoto T, y col. (2006, Vaccine, vol. 24: 3669-3676) describen la abolición del sitio de escisión polibásico de H5 (RERRRKKRJ.G) en H5. Los mutantes seleccionados se sometieron a estudio de inmunogenicidad en ratones, incluyendo un mutante con una delección de los 4 primeros aminoácidos cargados (RERR) y una modificación para inactivar el sitio de escisión polibásico (RKRR con TETR). La ausencia del sitio de escisión no afectó a las propiedades inmunogénicas del mutante H5. También se ha informado de la ausencia del sitio polibásico (GERRRKKRJ.G reemplazado por RETR) para producir el virus de referencia de la gripe NIBSC 05/240 NIBSC mutante NIBG-23. Hoffman y col. (2002, 2002, Vaccine, Vol 20: 3165-3170) reemplazaron el sitio de escisión polibásico de una HA de H5 con el sitio monobásico de H6 para aumentar la expresión en huevos. Los primeros 4 residuos se eliminaron y reemplazaron los cuatro últimos aminoácidos del sitio polibásico mediante ITR (reemplazo de RERRRKKRJ.G con IETR₁G). Este H5 mutante mostró un alto nivel de expresión, proteólisis potencial y cambio conformacional a pH bajo, no se notificaron datos de inmunogenicidad. Estos estudios muestran que la modificación del sitio de escisión puede emplearse para disminuir la virulencia de la partícula viral (en los casos en que los virus verdaderos se replican, permitiendo que el virus se replique sin matar el huevo huésped. Sin tales mutaciones, los virus matan el huevo antes de alcanzar títulos altos.

Durante el plegamiento de HA y secreción a través del Golgi, el sitio de escisión del precursor de hemaglutinina, que se ubica en un bucle en la superficie de HA, es bien accesible para la proteólisis por proteasas. Sin pretender imponer ninguna teoría, si la proteólisis del precursor HA0 se produce en el sitio mono o polibásico durante el plegamiento de la HA en el ER, un cambio conformacional de la proteína puede tener lugar en el aparato de Golgi durante la secreción, porque el entorno de pH dentro del Golgi de la planta y en el apoplasto es ligeramente ácido. Puede producirse una AH de conformación de pH bajo, disminuyendo tanto el nivel de expresión como la estabilidad intrínseca de la partícula. Por lo tanto, la proteína precursora HA0 mayormente no escindida sería la derivación de la membrana plasmática.

Por "bucle proteolítico" o "sitio de escisión" se entiende la secuencia consenso del sitio proteolítico que está implicada en la escisión del precursor HA0. "Consenso" o "secuencia consenso" como se usa en la presente descripción significa una secuencia (secuencia de aminoácidos o nucleótidos) que comprende la variabilidad de secuencia de secuencias relacionadas en base al análisis de alineación de múltiples secuencias, por ejemplo, subtipos de una secuencia particular de HA0 de gripe. La secuencia consenso del sitio de escisión del HA0 de la gripe puede incluir secuencias de aminoácidos de hemaglutinina consenso de la gripe A, que incluyen, por ejemplo, secuencias de aminoácidos de hemaglutinina consenso H1, consenso H3 o gripe B consenso. Los ejemplos no limitantes de secuencias consenso se muestran en la Figura 24.

En la secuencia de aminoácidos de la HA, se ubica el bucle proteolítico, antes del péptido de fusión que consiste en los 20 primeros aminoácidos de la parte de HA2. Se ha determinado la estructura cristalina de HA0 de A/Hong Kong/68 (Chen, J., 1998. Cell 95:40 9-417). Los residuos que se exponen al disolvente generalmente se consideran parte del sitio de escisión que forma un bucle de superficie extendido y altamente expuesto. A partir de esta secuencia peptídica específica, la secuencia consenso puede determinarse en esta región elegida (Bianchi y otros, 2005, Journal of Virology, 79:73 80-7388).

Para anular el bucle proteolítico, se examinó la estructura de un B HA. La delección de solo el sitio de escisión proteolítica de la HA habría abandonado el C-terminal de HA1 y el extremo N de HA2 a la izquierda y se necesitaría diseñar un ligador largo. Sin embargo, la eliminación de parte del péptido de fusión junto con el sitio de partición proteolítico permitió eliminar el bucle proteolítico completo y unir las secuencias restantes HA1 y HA2 por un ligador peptídico mínimo de 2 aminoácidos. En resumen, la variante B contiene una delección de secuencia ALKLLKER en el extremo C-terminal de HA1 además de la delección de los aminoácidos N-terminales GFFGAIAGFLEG de HA2. HA1-HA2 acortadas se unieron entre sí por un enlazador GG.

Como se muestra en la figura 22B, al eliminar el bucle proteolítico de HA0, la proteína HA0 resultante exhibe una mayor actividad como se muestra por una mayor capacidad de hemaglutinación, en comparación con una proteína HA que no tiene su bucle proteolítico eliminado. Por aumento de la actividad se entiende un aumento de la capacidad de hemaglutinación de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 100 %, o cualquier cantidad intermedia determinada mediante técnicas habituales en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 % o cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente el 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 %, cuando se compara con la actividad de la misma proteína HA que no tiene su bucle proteolítico eliminado.

Por “proteína vírica quimérica” o “polipéptido vírico quimérico”, también denominado “proteína quimérica” o “polipéptido quimérico”, se entiende una proteína o polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más fuentes, por ejemplo, pero sin limitarse a ello, dos o más tipos o subtipos de gripe, o gripe de origen diferente, que se fusionan como un único polipéptido. La proteína o polipéptido quimérico puede incluir un péptido señal que sea igual o heterólogo con el resto del polipéptido o proteína. La proteína quimérica o el polipéptido quimérico pueden producirse como un transcrito a partir de una secuencia nucleotídica quimérica, y la proteína quimérica o el polipéptido quimérico pueden escindirse tras la síntesis y, si es necesario, asociarse para formar una proteína multimérica. Por lo tanto, una proteína quimérica o un polipéptido quimérico también incluye una proteína o polipéptido que comprende subunidades que están asociadas a través de puentes disulfuro (es decir, una proteína multimérica). Por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más de dos fuentes puede procesarse en subunidades, y las subunidades asociadas a través de puentes disulfuro para producir una proteína quimérica o polipéptido quimérico. Una proteína del virus quimérico también puede comprender una proteína antigénica o un fragmento de la misma de un primer virus de la gripe, y un complejo de dominio transmembrana (TDC) de una segunda HA del virus HA, que incluye un dominio transmembrana y dominios de la cola citosólica (TM/CT). El polipéptido puede ser hemaglutinina (HA), y cada una de las dos o más de dos secuencias de aminoácidos que componen el polipéptido puede obtenerse de diferentes HA para producir una HA quimérica, o HA quimérica de gripe. Una HA quimérica también puede incluir una secuencia de aminoácidos que comprende péptido señal heterólogo (una preproteína HA quimérica) que se escinde después o durante la síntesis de proteínas. Preferentemente, el polipéptido quimérico o la HA quimérica de la gripe no se produce de forma natural. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico puede describirse como “ácido nucleico quimérico” o “secuencia nucleotídica quimérica”. Una partícula similar a un virus compuesta por HA quiméricas puede describirse como una “VLP quimérica”.

La proteína o polipéptido quimérico puede incluir un péptido señal que sea igual o heterólogo con el resto del polipéptido o proteína. El término “péptido señal” es bien conocido en la técnica y se refiere en general a una secuencia corta (unos 5-30 aminoácidos) de aminoácidos, que se encuentra generalmente en el extremo N-terminal de un polipéptido y que puede dirigir la translocación del polipéptido recién traducido a un orgánulo concreto, o ayudar al posicionamiento de dominios específicos de la cadena polipeptídica en relación con otros. Como ejemplo no limitante, el péptido señal puede dirigirse a la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico y/o ayudar en el posicionamiento del dominio proximal del extremo N en relación con un dominio de anclaje a membrana del polipéptido naciente para ayudar en la escisión y plegamiento de la proteína madura, por ejemplo, que no debe considerarse limitante, una proteína HA madura.

Ejemplos no limitantes de proteínas de virus quiméricos o ácidos nucleicos de virus de quimérico que pueden usarse se describen en los documentos WO 2009/076778, WO 2010/003235 o WO 2010/148511.

Péptido señal

Un péptido señal (SP) puede ser nativo de la proteína antigénica o proteína viral, o un péptido señal puede ser heterólogo con respecto a la secuencia primaria de la proteína antigénica o proteína viral que se expresa. Una proteína antigénica o proteína de virus puede comprender un péptido señal de un primer tipo de gripe, subtipo o cepa con el resto de la HA de uno o más de un tipo de gripe diferente, subtipo o cepa. Por ejemplo, el péptido señal nativo de los subtipos de HA H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 o gripe tipo B puede usarse para expresar la proteína del virus quimérico en un sistema vegetal. El SP puede ser de una gripe tipo B, H1, H3 o H5; o del subtipo H1/Pt, H1/NC, H5/Indo, H3/T- o B/Flo.

Un péptido señal también puede ser no nativo, por ejemplo, de una proteína antigénica, proteína viral o hemaglutinina de un virus distinto de la proteína viral, o de un polipéptido vegetal, animal o bacteriano. Un ejemplo no limitante de un péptido señal que puede usarse es el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa ("PDISP"; los nucleótidos 32-103 del número de registro Z11499; véanse también el documento WO 2009/076778; WO 2010/148511, o WO 2010/003235). Por lo tanto, la presente descripción proporciona una proteína del virus quimérico que comprende un péptido señal nativo o no nativo y ácidos nucleicos que codifican tales proteínas del virus quimérico.

Por lo tanto, la presente descripción también proporciona un método para producir VLP quimérica en una planta, en donde un primer ácido nucleico que codifica una proteína de virus quimérico se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero no se limita a una proteína de canal de protones. El primer y segundo ácido nucleico pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse en la planta secuencialmente.

HA

Con referencia al virus de la gripe, el término "hemaglutinina" o "HA" como se usa en el presente documento se refiere a una glicoproteína que se encuentra en el exterior de las partículas virales de la gripe. HA es una glicoproteína de membrana tipo I homotrimérica, que generalmente comprende un péptido señal, un dominio HA1 y un dominio HA2 que comprende un sitio de anclaje que abarca la membrana en el extremo C-terminal y una cola citoplasmática pequeña. Las secuencias de nucleótidos que codifican HA son bien conocidas y están disponibles, véase, por ejemplo, la base de salud pública BioDecerca (Virus de la gripe; consulte URL: biohealthbase.org) o National Center for Biotechnology Information (consulte URL: ncbi.nlm.nih.gov).

El término "homotrimérico" u "homotrimérico" indica que un oligómero está formado por tres moléculas de proteína HA. Sin querer ceñirnos a la teoría, la proteína HA se sintetiza como proteína precursora monomérica (HA0) de unos 75 kDa en las células animales, que se ensambla en la superficie formando una proteína trimérica alargada. Antes de que se produzca la trimerización, la proteína precursora se escinde en un sitio de escisión conservado de la activación (también denominado péptido de fusión) en 2 cadenas polipeptídicas, HA1 y HA2 (que comprende la región transmembrana), unida por un enlace disulfuro. El segmento HA1 puede tener 328 aminoácidos de longitud, y el segmento HA2 puede tener 221 aminoácidos de longitud. Aunque esta escisión puede ser importante para la infectividad del virus, puede no ser esencial para la trimerización de la proteína. La inserción de HA dentro de la membrana del retículo endoplásmico (RE) de la célula huésped, la escisión del péptido señal y la glicosilación de proteínas son eventos cotraduccionales. El repliegamiento correcto de HA requiere la glicosilación de la proteína y la formación de 6 enlaces disulfuro intracatenarios. El trimero de HA se ensambla dentro del complejo cis y trans-Golgi, el dominio transmembrana desempeña un papel en el proceso de trimerización. Las estructuras cristalinas de las proteínas HA tratadas con bromelina, que carecen del dominio transmembrana, han mostrado una estructura altamente conservada entre las cepas de la gripe. También se HA establecido que la HA experimenta cambios conformacionales importantes durante el proceso de infección, lo que requiere que el precursor HA0 se escinda en las 2 cadenas polipeptídicas HA1 y HA2. La proteína HA puede procesarse (es decir, comprender los dominios HA1 y HA2), o puede no procesarse (es decir, comprender el dominio HA0). La proteína HA puede usarse en la producción o formación de VLP mediante el uso de una planta, o célula vegetal, sistema de expresión.

La HA puede obtenerse de cualquier subtipo. Por ejemplo, la HA puede ser del subtipo H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 o HA de tipo natural B. La HA recombinante también puede comprender una secuencia de aminoácidos basada en la secuencia cualquier hemaglutinina conocida en la técnica, por ejemplo, la base de salud pública BioDecerca (virus de la gripe; consulte URL: biohealthbase.org) o National Center for Biotechnology Information (consulte URL: ncbi.nlm.nih.gov). Además, la HA puede basarse en la secuencia de una hemaglutinina que se aísla de uno o más virus de la gripe emergentes o recién identificados.

Los ejemplos no limitantes de HA, o fragmentos de HA que pueden usarse incluyen los descritos en los documentos WO 2009/009876, WO 2009/076778; WO 2010/003225, WO 2010/003235, WO 2010/006452, WO 2011/035422 o WO 2010/148511.

Como se muestra en la figura 18, la HA de B/Brisbane/60/2008 se expresa escasamente en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas (véanse los carriles "1008" o "1029"). Sin embargo, la coexpresión de HA-tipo B con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99, resulta en un aumento significativo de la expresión de HA (ver carriles "1008+1261"; "1009+1261" y "1029+1261"). Se observó el aumento de la expresión de HA con HA natural de tipo B o HA quimérica tipo B. Se observó una expresión de HA en presencia o ausencia de elementos de amplificación (BeYDV), y a través de diversas diluciones de *Agrobacterium*. Se observó un aumento similar en la expresión de H3 cuando H3 de A/Perth/16/2009 se coexpresó con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99 (figura 19; comparar carril "1019" H3 solo, con "1019+1261" H3 coexpresado con M2).

VLP

El término "partícula similar a virus" (VLP), o "partículas similares a virus" o "VLPs" se refiere a estructuras que se autoensamblan y comprenden proteínas virales, por ejemplo, una proteína viral estructural como la proteína HA de la gripe o una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitado a una proteína de canal de protones, como M2 o una combinación de esas proteínas. Las VLP suelen ser morfológicamente y antigénicamente similares a los viriones producidos

en una infección, pero carecen de información genética suficiente para replicarse y, por tanto, no son infecciosas. En algunos ejemplos, las VLP pueden comprender una única especie proteica, o más de una especie proteica. Para las VLP que comprenden más de una especie proteica, las especies proteicas pueden ser de la misma especie de virus, o pueden comprender una proteína de una especie, género, subfamilia o familia de virus diferente (según la nomenclatura ICTV). En otros ejemplos, una o más de las especies de proteínas que comprenden una VLP pueden modificarse a partir de la secuencia que se produce de manera natural. Las VLP pueden producirse en células huésped adecuadas que incluyen células huésped de plantas e insectos. Tras su extracción de la célula huésped y su aislamiento y posterior purificación en condiciones adecuadas, las VLP pueden purificarse como estructuras intactas.

Además, se pueden producir VLP que comprendan una combinación de subtipos de HA. Por ejemplo, las VLP pueden comprender una o más HA del subtipo H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, HA del subtipo B o una combinación de las mismas. La selección de la combinación de HA puede estar determinada por el uso previsto de la vacuna preparada a partir de la VLP. Por ejemplo, una vacuna para uso en la inoculación de aves puede comprender cualquier combinación de subtipos de HA, mientras que las VLP útiles para inocular humanos pueden comprender subtipos uno o más de uno de los subtipos H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, subtipo B HA. Sin embargo, se pueden preparar otras combinaciones de subtipos de HA dependiendo del uso de la VLP. Para producir VLP que comprenden combinaciones de subtipos de HA, el subtipo de HA deseado puede coexpresarse dentro de la misma célula, por ejemplo, una célula vegetal.

Como se describe con más detalle A continuación, la expresión de una HA de tipo B o H3 de B/Brisbane/60/2008 en la agroinfiltrado *Nicotiana benthamiana* se aumenta cuando se coexpresan M2 de A/New Caledonia/20/99 (véanse las Figuras 18 y 19). No se observa un aumento similar cuando H1 o H5 se coexpresa con M2, ya que se observan altos niveles de expresión H1 o H5 en presencia o ausencia de M2 (figuras 20 y 21 respectivamente). Se sabe que HA se procesa de una manera dependiente del pH (véase Reed M. L. y col. Journal of Virology, febrero de 2010, págs. 1527-1535, vol. 84, No. 3), y hasta el cambio de confirmación dependiente del pH del pH (Skehel J.J. y col. 1982, PNAS79: 968-972). H1 y H5 presentan un cambio conformacional a un pH menor que el observado con HA de H3 y tipo B. Sin querer atarnos a la teoría, el pH dentro del aparato de Golgi durante la maduración y la migración puede no tener efecto sobre el plegamiento de H1 o H5, sin embargo, un pH bajo dentro del aparato de Golgi puede afectar al plegamiento de H3 y HA de tipo B. Al coexpresar una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, con H3 o HA de tipo B, el pH dentro del aparato de Golgi puede aumentar y dar lugar al plegamiento de la HA, lo que conduce a un mayor rendimiento de la HA. Además, H1 y H5 pueden ser más estables a pH más bajos que H3 y HA de tipo B. Por lo tanto, al coexpresar una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, junto con H3 o HA de tipo B, se degrada menos HA dentro del aparato de Golgi.

Las VLP producidas a partir de proteínas derivadas de la gripe no contienen la proteína M1. Se sabe que la proteína M1 se une a ARN (Wakefield y Bronlee, 1989) que es un contaminante de la preparación de VLP. La presencia de ARN no es deseable cuando se obtiene la aprobación regulatoria para el producto de VLP, por lo tanto, una preparación de VLP que carece de ARN puede ser ventajosa.

Las VLP producidas como se describe en el presente documento no suelen contener neuramindasa (NA). Sin embargo, la NA puede coexpresarse con la HA en caso de que se deseen VLP que incluyan HA y NA.

La descripción también incluye, pero no se limita a, las VLP derivadas de virus que obtienen una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula en la que se expresan las proteínas VLP. Por ejemplo, si la VLP se expresa en un sistema basado en plantas, la VLP puede obtener una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula.

En general, el término “lípidos” se refiere a moléculas liposolubles (lipofílicas) que se encuentran en la naturaleza. El término también se usa más específicamente para referirse a los ácidos grasos y sus derivados (incluidos los tri-, di- y monoglicéridos y los fosfolípidos), así como a otros metabolitos liposolubles que contienen esteroides o esteroides. Los fosfolípidos son uno de los principales componentes de todas las membranas biológicas, junto con los glucolípidos, los esteroides y las proteínas. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina, el fosfatidilinositol, la fosfatidilserina y similares. Los ejemplos de esteroides incluyen zoosteroides (por ejemplo, colesterol) y fitoesteroides. Se han identificado más de 200 fitoesteroides en diversas especies vegetales, siendo los más comunes el campesterol, el estigmasterol, el ergosterol, el brasicasterol, el delta-7-estigmasterol, el delta-7-avenasterol, el daunossterol, el sitosterol, el 24-metilcolesterol, el colesterol o el beta-sitosterol. Como entendería un experto en la técnica, la composición lipídica de la membrana plasmática de una célula puede variar con las condiciones de cultivo o crecimiento de la célula u organismo del que se obtiene la célula.

Las membranas celulares generalmente comprenden bicapas lipídicas, así como proteínas para diversas funciones. En la bicapa lipídica pueden encontrarse concentraciones localizadas de determinados lípidos, denominadas “balsas lipídicas”. Sin querer ceñirnos a la teoría, las balsas lipídicas pueden desempeñar funciones importantes en la endo y exocitosis, la entrada o salida de virus u otros agentes infecciosos, la transducción de señales entre células, la interacción con otros componentes estructurales de la célula u organismo, como las matrices intracelulares y extracelulares.

En las plantas, las VLP de la gripe brotan de la membrana plasmática, por lo que la composición lipídica de las VLP refleja su origen. Las VLP producidas según la presente descripción comprenden HA de uno o más de un tipo o subtipo de gripe, complejo con lípidos derivados de plantas. Los lípidos vegetales pueden estimular células

inmunitarias específicas y potenciar la respuesta inmunitaria inducida. Las membranas vegetales están formadas por lípidos, fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), y también contienen glicoesfingolípidos, saponinas y fitosteroles. Además, también se encuentran balsas lipídicas en las membranas plasmáticas de las plantas: estos microdominios están enriquecidos en esfingolípidos y esteroides. En las plantas, se conocen diversos fitosteroides, como el estigmasterol, el sitosterol, el 24-metilcolesterol y el colesterol (Mongrand y col., 2004).

El PC y el PE, así como los glicoesfingolípidos, pueden unirse a las moléculas CD1 expresadas por las células inmunitarias de los mamíferos, como las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas y los macrófagos, y otras células, como los linfocitos B y T del timo y el hígado (Tsuji M., 2006). Las moléculas CD1 son estructuralmente similares a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y su función es presentar antígenos glicolípidos a las células NKT (células T citolíticas naturales). Tras la activación, las células NKT activan las células inmunitarias innatas como las células NK y las células dendríticas y también activan las células inmunitarias adaptativas como las células B y las células T productoras de anticuerpos.

En una membrana plasmática pueden encontrarse diversos fitosteroides; el complemento específico puede variar en función de la especie, las condiciones de crecimiento, los recursos nutritivos o el estado del patógeno, por citar algunos factores. En general, el beta-sitosterol es el fitosterol más abundante.

Los fitoesteroides presentes en una VLP de la gripe complejada con una bicapa lipídica, como una envoltura derivada de la membrana plasmática, pueden proporcionar una composición vacunal ventajosa. Sin querer atarse a la teoría, las VLP fabricadas en plantas y complejas con una bicapa lipídica, como una envoltura derivada de la membrana plasmática, pueden inducir una reacción inmunitaria más fuerte que las VLP fabricadas en otros sistemas de expresión, y puede ser similar a la reacción inmunitaria inducida por vacunas de virus enteros vivos o atenuados.

Por lo tanto, la descripción prevé una VLP complejada con una bicapa lipídica de origen vegetal. En algunas modalidades, la bicapa lipídica derivada de plantas puede comprender la envoltura de la VLP. Los lípidos derivados de plantas pueden comprender componentes lipídicos de la membrana plasmática de la planta en la que se produce la VLP, incluyendo, entre otros, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), glicoesfingolípidos, fitosteroides o una combinación de los mismos. Un lípido de origen vegetal puede denominarse alternativamente "lípido vegetal". Los ejemplos de fitoesteroides son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol y colesterol - véase, por ejemplo, Mongrand et al., 2004.

La estructura y el tamaño de las VLP pueden evaluarse, por ejemplo, mediante un ensayo de hemaglutinación, microscopía electrónica o cromatografía de exclusión molecular.

Para la cromatografía de exclusión molecular, las proteínas solubles totales pueden extraerse del tejido vegetal homogeneizando (Polytron) una muestra de material vegetal congelado y triturado en tampón de extracción, y eliminando el material insoluble mediante centrifugación. Puede usarse la precipitación con PEG. Se cuantifica la proteína soluble y se hace pasar el extracto a través de una matriz de exclusión por tamaño, por ejemplo, pero sin limitarse a Sephacryl™. Tras la cromatografía, las fracciones pueden analizarse mediante inmunotransferencia para determinar el complemento proteico de la fracción.

Sin pretender imponer ninguna teoría, la capacidad de HA para unirse a los RBC de diferentes animales es impulsada por la afinidad de HA por los ácidos siálicos α 2,3 o α 2,6 y la presencia de estos ácidos siálicos en la superficie de los RBC. La HA equina y aviar de los virus de la gripe aglutina eritrocitos de varias especies, como pavos, pollos, patos, cobayas, seres humanos, ovejas, caballos y vacas; mientras que las HA humanas se unen a los eritrocitos de pavos, pollos, patos, conejillos de indias, humanos y ovejas (véase también Ito T. y col., 1997, Virology, vol 227, págs. 493-499); y Medeiros R y col., 2001, Virology, vol 289 págs.74-85).

Plegamiento (chaperona)

El plegamiento correcto de la proteína viral expresada puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación de VLP, la función de la proteína viral y el reconocimiento de la proteína viral por un anticuerpo, entre otras características. El plegamiento y acumulación de una proteína puede estar influenciado por uno o más factores, que incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de la proteína, la abundancia relativa de la proteína, el grado de apiñamiento intracelular, el pH en un compartimento celular, la disponibilidad de cofactores que pueden unirse o asociarse transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada, la presencia de una o más proteínas chaperonas, o similares.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) o las proteínas de estrés son ejemplos de proteínas chaperonas, que pueden participar en diversos procesos celulares que incluyen síntesis de proteínas, tráfico intracelular, prevención del plegamiento incorrecto, prevención de agregación de proteínas, ensamblaje y desensamblaje de complejos de proteínas, plegamiento de proteínas y desagregación de proteínas. Los ejemplos de tales proteínas chaperonas incluyen, pero no se limitan a, Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, ciclofilinas, ClpP, GrpE, ubiquitina, calnexina e isomerasas de disulfuro de proteínas (véase, por ejemplo, Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25:59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27:437-496

(1993); patente estadounidense 5.232.833). Como se describe en el presente documento, las proteínas chaperonas, por ejemplo, pero sin limitarse a Hsp40 y Hsp70, pueden utilizarse para asegurar el plegamiento de una proteína vírica.

Los ejemplos de Hsp70 incluyen Hsp72 y Hsc73 de células de mamíferos, DnaK de bacterias, particularmente micobacterias como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Mycobacterium bovis* (como Bacille-Calmette Guérin: referido en el presente documento como Hsp71). DnaK de *Escherichia coli*, levaduras y otros procariotas, y BiP y Grp78 de eucariotas, como *A. thaliana* (Lin y col. 2001 (Cell Stress and Chaperones 6:201-208). Un ejemplo concreto de Hsp70 es la Hsp70 de *A. thaliana* (codificada por Genbank ref: AY120747.1). Hsp70 es capaz de unirse específicamente a ATP así como a polipéptidos y péptidos desplegados, participando de este modo en el plegamiento y desplegamiento de proteínas, así como en el ensamblaje y desmontaje de complejos de proteínas.

Los ejemplos de Hsp40 incluyen DnaJ de procariotas como *E. coli* y micobacterias y HsJ1, HDJ1 y Hsp40 de eucariotas, como la alfalfa (Frugis y col., 1999. Plant Molecular Biology 40:397-408). Un ejemplo particular de Hsp40 es *M. sativa* MsJ1 (Genbank ref: AJ000995.1). Hsp40 desempeña un papel como chaperona molecular en el plegamiento de proteínas, la termotolerancia y la replicación del ADN, entre otras actividades celulares.

Entre Hsp70, Hsp70 y su cochaperona, Hsp40, están involucradas en la estabilización de polipéptidos de traducción y recién sintetizados antes de que se complete la síntesis. Sin pretender imponer ninguna teoría, Hsp40 se une a los parches hidrófobos de polipéptidos desplegados (nacientes o recién transferidos), lo que facilita la interacción del complejo Hsp70-ATP con el polipéptido. La hidrólisis del ATP conduce a la formación de un complejo estable entre el polipéptido, la Hsp70 y el ADP, y a la liberación de la Hsp40. La asociación del complejo Hsp70-ADP con los parches hidrofóbicos del polipéptido impide su interacción con otros parches hidrofóbicos, evitando el plegamiento incorrecto y la formación de agregados con otras proteínas (revisado en Hartl, FU. 1996. Nature 3 81:57 1-579).

Las proteínas chaperonas nativas pueden facilitar el correcto plegamiento de niveles bajos de proteína recombinante, pero a medida que aumentan los niveles de expresión, la abundancia de chaperonas nativas puede convertirse en un factor limitante. Los altos niveles de expresión de la proteína del virus en las hojas agroinfiltradas pueden conducir a la acumulación de la proteína del virus en el citosol, y la coexpresión de una o más proteínas chaperonas como Hsp70, Hsp40 o ambas Hsp70 y Hsp40 puede reducir el nivel de proteínas mal plegadas o agregadas, y aumentar el número de proteínas que presentan características estructurales terciarias y cuaternarias que permiten la formación de partículas similares a virus.

Por lo tanto, la presente descripción también prevé un método de producción de VLPs de proteína vírica en una planta, en el que un primer ácido nucleico que codifica una proteína vírica se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitado a una proteína de canal de protones, y un tercer ácido nucleico que codifica una chaperona. El primer, segundo y tercer ácido nucleico pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse en la planta secuencialmente.

N-glicanos

La VLP producida dentro de una planta puede inducir una proteína viral que comprende N-glicanos específicos de la planta. Por lo tanto, esta descripción también proporciona una VLP que comprende proteína viral que tiene N-glicanos específicos de la planta.

Además, se conoce la modificación de N-glicano en plantas (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/151440; WO 2010/006452; o U.S. 60/944.344;) y la proteína viral que tiene N-glicanos modificados puede producirse. Puede obtenerse proteína vírica que comprenda un patrón de glicosilación modificado, por ejemplo, con N-glicanos fucosilados, xilosilados, o ambos, fucosilados y xilosilados, o puede obtenerse proteína vírica que tenga un patrón de glicosilación modificado, en el que la proteína carezca de fucosilación, xilosilación, o ambas, y comprenda una galatosilación aumentada. Además, la modulación de las modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la adición de galactosa terminal puede dar lugar a una reducción de la fucosilación y la xilosilación de la proteína vírica expresada en comparación con una planta de tipo natural que exprese la proteína vírica.

Por ejemplo, que no debe considerarse limitante, la síntesis de la proteína del virus que tiene un patrón de glucosilación modificado puede lograrse mediante la coexpresión de la proteína de interés junto con una secuencia de nucleótidos que codifica beta-1,4galactosiltransferasa (GalT), por ejemplo, pero no limitado a GalT de mamífero, o GalT humana sin embargo también puede utilizarse GalT de otras fuentes. El dominio catalítico de GalT también puede fusionarse con un dominio CTS (es decir, la cola citoplasmática, el dominio transmembrana, la región madre) de la N-acetilglucosaminil transferasa (GNT1), para producir una enzima híbrida GNT1-GalT, y la enzima híbrida puede coexpresarse con la proteína vírica. La proteína vírica también puede coexpresarse junto con una secuencia nucleotídica que codifique la N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), por ejemplo, pero sin limitarse a la GnT-III de mamífero o la GnT-III humana, también puede utilizarse GnT-III de otras fuentes. Además, también puede utilizarse una enzima híbrida GNT1-GnT-III, que comprende el CTS de GNT1 fusionado a GnT-III.

Por lo tanto, la presente descripción también incluye las VLP que comprenden una o más proteínas víricas que tienen N-glicanos modificados.

Secuencias

Un ejemplo no limitante de secuencias que pueden usarse incluyen:

- 5 la proteína H2 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Singapur/1/57 (H2N2);
- la proteína H3 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Victoria/361/2011 (H3N2) o A/Perth/16/2009 (H3N2);
- 10 la proteína H6 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1);
- la proteína H7 codificada por la molécula de ácido nucleico también puede ser de la cepa A/Equino/Praga/56 (H7N7);
- la proteína H9 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/HongKong/1073/99 (H9N2);
- 15 la proteína HA del subtipo B codificada por el ácido nucleico puede ser de la cepa B/Florida/4/2006, B/Malasia/2506/2004, B/Wisconsin/1/2010, o B/Brisbane/60/2008.

- Un ejemplo no limitante de secuencias que pueden usarse también incluyen las descritas en el documento WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/148511; WO 2010/003235; WO 2010/006452). Ejemplos de secuencias de moléculas de aminoácidos que codifican dichas proteínas HA de H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 y HA de tipo B, que son conocidas en la técnica. Por ejemplo, los subtipos de H3 o B incluyen las Id. de sec. n.º: 25 o 30. La secuencia que codifica la proteína de virus estructural puede ser, por ejemplo, HA de la gripe B/Brisbane/60/2008, B/Malasia/2506/2004 o B/Wisconsin/1/2010, o H3 de la gripe A/Perth/16/2009 o A/Victoria/361/2011.
- 20 Otros ejemplos incluyen secuencias de moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas HA en las que se ha suprimido el bucle proteolítico de la proteína HA como, por ejemplo, pero sin limitarse a la secuencia definida por Id. de sec. n.º: 41.

- La presente descripción también incluye, pero no se limita a, secuencias de nucleótidos que codifican HA de, por ejemplo, H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 o HA de tipo B. Por ejemplo, Id. de sec. n.º: 28, 43, 23, que codifican una HA de B, B con bucle proteolítico delecionado o H3. Respectivamente, una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de hibridación estrictas con Id. de sec. n.º: 28, 43, 23, o una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de hibridación estrictas con un complemento de Id. de sec. n.º: 28, 43, 23, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una proteína hemaglutinina que cuando se expresa forma una VLP, y que la VLP induce la producción de un anticuerpo. Por ejemplo, la expresión de la secuencia de nucleótidos dentro de una célula vegetal forma una VLP, y la VLP puede utilizarse para producir un anticuerpo capaz de unir HA, incluida la HA madura de B o H3. La VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria. La secuencia de nucleótidos también puede coexpresarse con una segunda secuencia de nucleótidos que codifique una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a, las secuencias de nucleótidos Id. de sec. n.º: 9, 12, una secuencia de nucleótidos que hibride en condiciones de hibridación estrictas con Id. de sec. n.º: 9, 12, o una secuencia de nucleótidos que hibride en condiciones de hibridación estrictas con un complemento de Id. de sec. n.º: 9, 12, en la que la segunda secuencia de nucleótidos codifique una proteína de canal de protones forme una VLP. Preferiblemente, la VLP induce la producción de un anticuerpo y la VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.
- 30
- 35
- 40

- 45 Por ejemplo, la expresión de la secuencia de nucleótidos dentro de una célula vegetal forma una VLP, y la VLP puede utilizarse para producir un anticuerpo capaz de unirse a una proteína vírica, como por ejemplo, HA, incluyendo pero sin limitarse a HA0, la proteína HA0 con su bucle proteolítico delecionado o modificado, HA1 o HA2 de uno o más tipos o subtipos de gripe, como por ejemplo, pero sin limitarse a los subtipos H2, H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, subtipo B HA. La VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.

- 50 La hibridación en condiciones de hibridación estrictas es conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., eds. 1995 y suplementos; Maniatis y col., en MMolecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; Sambrook y Russell, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición 2001). Un ejemplo de estas condiciones de hibridación estrictas puede ser una hibridación de
- 55 unas 16-20 horas en 4 X SSC a 65 °C, seguida de un lavado en 0,1 X SSC a 65 °C durante una hora, o 2 lavados en 0,1 X SSC a 65 °C durante 20 o 30 minutos cada uno. Alternativamente, una condición ejemplar de hibridación estricta podría ser toda la noche (16-20 horas) en formamida al 50 %, 4 X SSC a 42 °C, seguido de lavado en 0,1 X SSC a 65 °C durante una hora, o 2 lavados en 0,1 X SSC a 65 °C cada uno durante 20 o 30 minutos, o toda la noche (16-20 horas), o hibridación en tampón fosfato acuoso Church (7 % SDS; tampón NaPO₄ < 0,5M pH 7,2; EDTA 10 mM) a 65 °C, con 2 lavados ya sea a 50 °C en SSC 0,1 X, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno, o 2 lavados a 65 °C en 2 X SSC, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno.
- 60

- Además, la presente descripción incluye secuencias de nucleótidos que se caracterizan por tener aproximadamente 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % o cualquier cantidad entre ellos, identidad de secuencia, o similitud de secuencia, con la secuencia de nucleótidos que codifica HA de B (Id. de sec. n.º: 28), B con bucle proteolítico suprimido o modificado (Id. de sec. n.º: 43), H3 (Id. de sec. n.º: 23), o una HA codificada por una o más de las Id. de sec.
- 65

n.º: 23, 28, 43, 46, 51, 57 o 61, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una proteína hemaglutinina que cuando se expresa forma una VLP, y que la VLP induce la producción de un anticuerpo. Por ejemplo, la expresión de la secuencia de nucleótidos dentro de una célula vegetal forma una VLP, y la VLP puede utilizarse para producir un anticuerpo que sea capaz de unir HA, incluyendo HA no procesada y/o madura de B o H3, o HA no procesada y/o madura en la que se haya delecionado el bucle proteolítico. La VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.

La presente descripción también incluye secuencias de nucleótidos que se caracterizan por tener aproximadamente 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % o cualquier cantidad entre ellos, identidad de secuencia, o similitud de secuencia, con la secuencia de nucleótidos que codifica M2 (Id. de sec. n.º: 9, 12), en la que la secuencia de nucleótidos codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitada a una proteína de canal de protones, que cuando se coexpresa con una proteína de virus estructural forma una VLP. Preferiblemente, la VLP induce la producción de un anticuerpo y la VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.

La identidad de secuencia o la similitud de secuencia puede determinarse utilizando un programa de comparación de secuencias de nucleótidos, como el proporcionado en DNASIS (por ejemplo, utilizando, entre otros, los siguientes parámetros: penalización GAP 5, n.º de diagonales superiores 5, penalización GAP fija 10, k-tupla 2, gap flotante 10 y tamaño de ventana 5). Sin embargo, otros métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, los 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), y mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y BLAST), o mediante alineación manual e inspección visual. Un ejemplo de alineación de secuencia de HA de diferentes cepas de gripe se puede encontrar en la figura 24.

Una "respuesta inmunitaria" se refiere generalmente a una respuesta del sistema inmunitario adaptativo. El sistema inmunitario adaptativo comprende generalmente una respuesta humoral y una respuesta mediada por células. La respuesta humoral es el aspecto de la inmunidad mediado por anticuerpos secretados, producidos en las células del linaje de linfocitos B (célula B). Los anticuerpos secretados se unen a antígenos en las superficies de microbios invasores (tales como virus o bacterias), que los marca para su destrucción. La inmunidad humoral se utiliza generalmente para referirse a la producción de anticuerpos y a los procesos que la acompañan, así como a las funciones efectoras de los anticuerpos, incluida la activación de las células Th2 y la producción de citocinas, la generación de células de memoria, la promoción de la fagocitosis por opsoninas, la eliminación de patógenos y similares. Los términos "modular" o "modulación" o similares se refieren a un aumento o disminución de una respuesta o parámetro particular, determinado por cualquiera de los diversos ensayos generalmente conocidos o utilizados, algunos de los cuales se ejemplifican en el presente documento.

La respuesta celular es una respuesta inmunitaria en la que no intervienen anticuerpos, sino la activación de macrófagos, células citolíticas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de diversas citocinas en respuesta a un antígeno. La inmunidad mediada por células se utiliza generalmente para referirse a la activación de células Th, la activación de células Tc y las respuestas mediadas por células T. La inmunidad celular reviste especial importancia en la respuesta a las infecciones víricas.

Por ejemplo, la inducción de linfocitos T CD8 positivos específicos de antígeno puede medirse mediante un ensayo ELISPOT; la estimulación de los linfocitos T CD4 positivos puede medirse mediante un ensayo de proliferación. Los títulos de anticuerpos antiprimarios pueden cuantificarse mediante un ensayo ELISA; los isotipos de anticuerpos específicos de antígeno o de reacción cruzada también pueden medirse utilizando anticuerpos antiisotipo (por ejemplo, anti -IgG, IgA, IgE o IgM). Los métodos y técnicas para realizar dichos ensayos son bien conocidos en la técnica.

Los títulos de HAI de reactividad cruzada también pueden utilizarse para demostrar la eficacia de una respuesta inmunitaria frente a otras cepas de virus relacionadas con el subtipo vacunal. Por ejemplo, el suero de un sujeto inmunizado con una composición vacunal de una primera cepa (por ejemplo, VLPs de A/Indonesia 5/05) puede utilizarse en un ensayo de HAI con una segunda cepa de virus entero o partículas de virus (por ejemplo, A/Vietnam/1194/2004), y determinarse el título de HAI.

También se pueden cuantificar la presencia o los niveles de citocinas. Por ejemplo, una respuesta de células T auxiliares (Th1/Th2) se caracterizará por la medición de células secretoras de IFN-γ e IL-4 mediante ELISA (por ejemplo, kits OptEIA de BD Biosciences). Se pueden cultivar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o esplenocitos obtenidos de un sujeto y analizar el sobrenadante. Los linfocitos T también pueden cuantificarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), utilizando etiquetas fluorescentes específicas de marcadores y métodos conocidos en la técnica.

También puede realizarse un ensayo de microneutralización para caracterizar una respuesta inmunitaria en un sujeto; véanse, por ejemplo, los métodos de Rowe y col., 1973. Los títulos de neutralización del virus pueden obtenerse de varias maneras, entre ellas: 1) enumeración de las placas de lisis (ensayo de placas) tras la fijación/coloración de las células con violeta cristal; 2) observación microscópica de la lisis celular en cultivo; 3) ELISA y detección espectrofotométrica de la proteína del virus NP (se correlaciona con la infección por el virus de las células huésped).

Constructos

La presente descripción se dirige además a un constructo génico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero no limitado a una proteína de canal protónico o una proteína viral estructural, como se ha descrito anteriormente, operativamente unida a un elemento regulador que es operativo en una planta. Ejemplos de elementos reguladores operativos en una célula vegetal y que pueden utilizarse de acuerdo con la presente descripción incluyen, entre otros, una región reguladora de plastocianina (US 7,125,978), o una región reguladora de Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO; US 4.962.028), proteína de unión a clorofila a/b (CAB; Leutwiler y col.; 1986), ST-LS1 (asociado con el complejo de oxígeno en evolución del fotosistema II y descrito por Stockhaus y col., 1987, 1989).

Elementos reguladores

El uso de los términos “región reguladora”, “elemento regulador” o “promotor” en la presente solicitud pretende reflejar una porción de ácido nucleico típicamente, pero no siempre, aguas arriba de la región codificante de proteínas de un gen, que puede estar compuesta de ADN o ARN, o de ambos. Cuando una región reguladora está activa, y en asociación operativa, u operativamente vinculada, con un gen de interés, esto puede resultar en la expresión del gen de interés. Un elemento regulador puede ser capaz de mediar en la especificidad de un órgano o de controlar la activación génica temporal o del desarrollo. Una “región reguladora” puede incluir elementos promotores, elementos promotores centrales que muestran una actividad promotora basal, elementos que son inducibles en respuesta a un estímulo externo, elementos que median la actividad promotora como elementos reguladores negativos o potenciadores transcripcionales. “Región reguladora”, tal como se utiliza en el presente documento, también puede incluir elementos que son activos tras la transcripción, por ejemplo, elementos reguladores que modulan la expresión génica, como potenciadores traslacionales y transcripcionales, represores traslacionales y transcripcionales, secuencias activadoras aguas arriba y determinantes de inestabilidad del ARNm. Varios de estos últimos elementos pueden estar situados cerca de la región codificante.

En el contexto de esta divulgación, el término “elemento regulador” o “región reguladora” se refiere típicamente a una secuencia de ADN, normalmente, pero no siempre, aguas arriba (5') de la secuencia codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante proporcionando el reconocimiento para la ARN polimerasa y/u otros factores necesarios para que la transcripción comience en un sitio determinado. Sin embargo, debe entenderse que otras secuencias de nucleótidos, situadas dentro de intrones, o 3' de la secuencia también pueden contribuir a la regulación de la expresión de una región codificante de interés. Un ejemplo de elemento regulador que permite el reconocimiento de la ARN polimerasa u otros factores transcripcionales para asegurar la iniciación en un sitio concreto es un elemento promotor. La mayoría de los elementos promotores eucarióticos, aunque no todos, contienen una caja TATA, una secuencia de ácido nucleico conservada compuesta por pares de bases de nucleótidos de adenosina y timidina que suele estar situada aproximadamente 25 pares de bases aguas arriba de un sitio de inicio transcripcional. Un elemento promotor comprende un elemento promotor basal, responsable del inicio de la transcripción, así como otros elementos reguladores (como los enumerados anteriormente) que modifican la expresión génica.

Existen varios tipos de regiones reguladoras, incluidas las que están reguladas por el desarrollo, las inducibles o las constitutivas. Una región reguladora del desarrollo, o que controla la expresión diferencial de un gen bajo su control, se activa en determinados órganos o tejidos de un órgano en momentos específicos durante el desarrollo de dicho órgano o tejido. Sin embargo, algunas regiones reguladoras que están reguladas por el desarrollo pueden ser preferentemente activas en ciertos órganos o tejidos en etapas específicas del desarrollo, también pueden ser activas de una manera regulada por el desarrollo, o a un nivel basal en otros órganos o tejidos dentro de la planta también. Los ejemplos de regiones reguladoras específicas de un tejido, por ejemplo, una región reguladora específica de ver, incluyen el promotor de la napina y el promotor de la cruciferina (Rask y col., 1998, J. Plant Physiol. 152: 595-599; Bilodeau y col., 1994, Plant Cell 14: 125-130). Un ejemplo de un promotor específico de la hoja incluye el promotor de plastocianina (véase el documento US 7.125.978).

Una región reguladora inducible es aquella capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias de ADN o los genes no se transcribirán. Típicamente, el factor proteico que se une específicamente a una región reguladora inducible para activar la transcripción puede estar presente en una forma inactiva, que luego es convertida directa o indirectamente a la forma activa por el inductor. Sin embargo, el factor proteico también puede estar ausente. El inductor puede ser un agente químico, como una proteína, un metabolito, un regulador del crecimiento, un herbicida o un compuesto fenólico, o un estrés fisiológico impuesto directamente por el calor, el frío, la sal o elementos tóxicos, o indirectamente a través de la acción de un agente patógeno o enfermedad, como un virus. Una célula vegetal que contenga una región reguladora inducible puede ser expuesta a un inductor mediante la aplicación externa del inductor a la célula o planta, como por pulverización, riego, calentamiento o métodos similares. Los elementos reguladores inducibles pueden proceder de genes vegetales o no vegetales (por ejemplo, Gatz, C. y Lenk, L.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358). Algunos ejemplos de posibles promotores inducibles son, entre otros, el promotor inducible por tetraciclina (Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48,89-108), promotor inducible por esteroides (Aoyama, T. y Chua, N.H., 1997, Plant 1. 2, 397-404) y promotor inducible por etanol (Salter, M.G., y col., 1998, Plant 10umal 16, 127-132; Caddick, M.X., y col., 1998, Nature Biotech. 16, 177-180) genes IB6 y CK1 1 inducibles por citocinina (Brandstatter, I. y Kieber, J., 1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274,982-985) y el elemento inducible por auxina, DR5 (Ulmasov, T., y col., 1997, Plant Cell 9, 1963-1971).

Una región reguladora constitutiva dirige la expresión de un gen en las distintas partes de una planta y de forma continua a lo largo de su desarrollo. Los ejemplos de elementos reguladores constitutivos conocidos incluyen promotores asociados con el transcrito 35S de CaMV (Odell y col., 1985, *Nature*, 313: 810-812), la actina 1 de arroz (Zhang y col., 1991, *Plant Cell*, 3: 1155-1165), actina 2 (An y col., 1996, *Plant J.*, 10: 107-121), o tms 2 (documento US 5.428.147) y genes de trifosfato isomerasa 1 Xu y col., 1994, *Plant Physiol.* 106: 459-467), el gen de la ubiquitina 1 del maíz (Cornejo y col., 1993, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), los genes ubiquitina 1 y 6 de *Arabidopsis* (Holtorf y col., 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), y el gen del factor de iniciación traslacional 4A del tabaco (Mandel y col., 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 995-1004).

El término “constitutivo”, tal y como se utiliza aquí, no indica necesariamente que un gen bajo control de la región reguladora constitutiva se exprese al mismo nivel en todos los tipos celulares, sino que el gen se expresa en una amplia gama de tipos celulares, aunque a menudo se observe una variación en su abundancia. Los elementos reguladores constitutivos pueden acoplarse con otras secuencias para potenciar aún más la transcripción y/o traducción de la secuencia de nucleótidos a la que están unidos operativamente. Por ejemplo, el sistema CPMV-HT se deriva de las regiones no traducidas del virus del mosaico del caupí (CPMV) y demuestra una traducción mejorada de la secuencia codificante asociada. Por “nativo” se entiende que el ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos es de origen natural, o “tipo natural”. Por “operativamente unido” se entiende que las secuencias particulares, por ejemplo, un elemento regulador y una región codificante de interés, interactúan directa o indirectamente para llevar a cabo una función prevista, como la mediación o modulación de la expresión génica. La interacción de secuencias operativamente enlazadas puede, por ejemplo, estar mediada por proteínas que interactúan con las secuencias operativamente enlazadas.

La una o más proteínas víricas, como una proteína vírica estructural o una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal protónico, puede expresarse en un sistema de expresión que comprenda un sistema de expresión basado en virus, ADN o ARN, por ejemplo, pero sin limitarse a, un casete de expresión basado en comovirus y un elemento de amplificación basado en geminivirus.

El sistema de expresión aquí descrito puede comprender un casete de expresión basado en un virus bipartito, o un virus con un genoma bipartito. Por ejemplo, los virus bipartitos pueden ser de la familia Comoviridae. Los géneros de la familia Comoviridae incluyen Comovirus, Nepovirus, Fabavirus, Cheravirus y Sadwavirus. Los comovirus incluyen el virus del mosaico del caupí (CPMV), el virus del mosaico severo del caupí (CPSMV), el virus del mosaico de la calabaza (SqMV), el virus del moteado del trébol rojo (RCMV), el virus del moteado de la vaina de la judía (BPMV), el virus de las manchas anulares del nabo (TuRSV), el virus del mosaico verdadero de la judía común (BBtMV), el virus de las manchas de la judía común (BBSV) y el virus del mosaico del rábano (RaMV). Ejemplos de secuencias de ARN-2 comoviruses que comprenden elementos potenciadores que pueden ser útiles incluyen, pero no se limitan a: ARN-2 del CPMV (n.º de registro GenBank NC_003550), ARN-2 del RCMV (n.º de registro GenBank NC_003738), ARN-2 del BPMV (n.º de registro GenBank NC_003495), CPSMV RNA-2 (n.º de registro GenBank NC_003544), SqMV RNA-2 (n.º de registro GenBank NC_003800), TuRSV RNA-2 (n.º de registro GenBank NC_013219.1), ARN-2 de BBtMV (n.º de registro GenBank: GU810904), ARN2 de BBSV (n.º de registro GenBank: FJ028650), RaMV (n.º de registro GenBank: NC_003800).

Los segmentos del genoma bipartito del ARN comoviral se denominan ARN-1 y ARN-2. El ARN-1 codifica las proteínas implicadas en la replicación, mientras que el ARN-2 codifica las proteínas necesarias para el movimiento de célula a célula y las dos proteínas de la cápside. Se puede utilizar cualquier casete adecuado basado en comovirus, incluidos CPMV, CPSMV, SqMV, RCMV o BPMV, por ejemplo, el casete de expresión puede basarse en CPMV.

“Casete de expresión” se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un ácido nucleico de interés bajo el control de, y operativamente (u operativamente) unido a, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción del ácido nucleico de interés en una célula huésped.

Se ha demostrado que la transformación de *Nicotiana benthamiana* con copias de ADNc de longitud completa y replicación competente de ambos ARN genómicos del CPMV puede dar lugar a una infección productiva (Liu y col., 2004, *Virology* 323, 37-48). En el documento WO2007/135480 se describen ejemplos de casetes de expresión basados en CPMV; documento WO 2009/087391; y Sainsbury F. y col., (2008, *Plant Physiology*; 148: 1212-1218; Sainsbury F. y col., (2008, *Plant Biotechnology Journal*; 6: 82-92; Sainsbury F. y col., 2009, *Plant Biotechnology Journal*; 7: 682-693). A modo de ejemplo, que no debe considerarse limitativo, pueden utilizarse las regiones no traducidas (UTR) obtenidas a partir del ARN genómico 2 del virus del mosaico del caupí (CPMV) en las que se han suprimido los dos primeros codones de iniciación de la traducción que se encuentran en la secuencia líder 5', tal como se describe en el documento WO 2009/087391. Cuando se combinaron con el promotor CaMV 35S y el terminador de la nopalina sintasa (NOS), las UTRs CPMV modificadas mejoraron la traducción de la región codificante flanqueante. El sistema de expresión basado en el CPMV se denominó CPMV-HT (hipertraducible). Por lo tanto, los casetes de expresión, las construcciones de expresión y los sistemas de expresión también pueden comprender un sistema de expresión basado en CPMV como, por ejemplo, un sistema de expresión CPMV-HT.

Como se describe en el presente documento, una secuencia potenciadora de la expresión, cuya secuencia se deriva de (o comparte homología con) el segmento del genoma ARN-2 de un virus ARN bipartito, tal como un comovirus, en el que se ha mutado un sitio de iniciación diana, puede utilizarse para expresar una secuencia de ácido nucleico de interés. La presente descripción proporciona además procesos para aumentar la expresión, o la actividad potenciadora de la traducción, de una secuencia derivada de un segmento del genoma ARN-2 de un virus bipartito, cuyos procesos comprenden la mutación de un sitio de iniciación diana en la misma.

Las secuencias “potenciadoras” (o elementos potenciadores), incluyen secuencias derivadas de (o que comparten homología con) el segmento del genoma ARN-2 de un virus ARN bipartito, como un comovirus, en el que se ha mutado un sitio de iniciación diana. Estas secuencias pueden potenciar la expresión posterior de un ORF heterólogo al que estén unidas. Sin limitación, se cree que dichas secuencias, cuando están presentes en el ARN transcrito, pueden potenciar la traducción de un ORF heterólogo al que están unidas.

Los sistemas de expresión también pueden comprender elementos de amplificación de un geminivirus, por ejemplo, un elemento de amplificación del virus del enanismo amarillo de la judía (BeYDV). BeYDV pertenece al género de los Mastrevirus adaptados a las plantas dicotiledóneas. BeYDV es monopartito, tiene un genoma de ADN circular monocatenario y puede replicarse hasta alcanzar un número de copias muy elevado mediante un mecanismo de círculo rodante. Los sistemas de vectores de ADN replicón derivados del BeYDV se han utilizado para la producción rápida de proteínas de alto rendimiento en plantas.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “elementos de amplificación” se refiere a un segmento de ácido nucleico que comprende al menos una porción de una o más regiones intergénicas largas (LIR) de un genoma de geminivirus. Tal como se usa en el presente documento, “región intergénica larga” se refiere a una región de una región intergénica larga que contiene un sitio de unión Rep capaz de mediar la escisión y replicación por una proteína Rep de geminivirus. En algunos aspectos, el segmento de ácido nucleico que comprende uno o más LIRs, puede comprender además una región intergénica corta (SIR) de un genoma de geminivirus. Tal como se usa en el presente documento, “región intergénica corta” se refiere a la cadena complementaria (el IR corto (SIR) de un Mastrevirus). En el presente documento puede usarse cualquier elemento de amplificación derivado de geminivirus adecuado. Véase, por ejemplo, el documento WO 2000/20557; WO 2010/025285; Zhang X. y col. (2005, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 93, 271-279), Huang Z. y col. (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 103, 706-714), Huang Z. y col. (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 106, 9-17)). Si se usa más de un LIR en la construcción, por ejemplo, dos LIR, entonces el promotor, las regiones CMPV-HT y la secuencia de ácido nucleico de interés y el terminador están entre corchetes por cada uno de los dos LIR.

Tal como se describe en el presente documento, la co-distribución de un vector derivado del virus del enanismo amarillo de la judía (BeYDV) y un vector que suministra Rep/RepA, mediante agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* resulta en una amplificación eficiente del replicón y una producción robusta de proteínas.

Un casete de expresión basado en comovirus y un elemento de amplificación derivado de geminivirus pueden estar incluidos en el primer y segundo vectores respectivos, o las partes componentes pueden estar incluidas en un vector. Si se usan dos vectores, el primero y el segundo pueden introducirse en una célula vegetal simultáneamente o por separado.

También puede incluirse una replicasa viral en el sistema de expresión tal como se describe en el presente documento para aumentar la expresión del ácido nucleico de interés. Un ejemplo no limitativo de replicasa es una replicasa BeYDV (pREP110) que codifica BeYDV Rep y RepA (C2/C1; Huang y col., 2009, *Biotechnol. Bioeng.* 103, 706-714).

El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) puede estar involucrado en la limitación de la expresión de transgenes en plantas, Y la coexpresión de un supresor del silenciamiento de la p19 del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV p19) o el virus de patata Y (HcPro) puede usarse para contrarrestar la degradación específica de los ARNm transgénicos (Bgneti y col., 1998).

Los supresores alternativos del silenciamiento son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse como se describe en el presente documento (Chiba y col., 2006, *Virology* 346:7-14), por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, TEV -p1/HC-Pro (Tobacco etch virus-p1/HC-Pro), BYV -p21, proteína de la cápside del virus de la arruga del tomate (TCV -CP), 2b del virus del mosaico del pepino; CMV-2b), p25 del virus X de la patata (PVX-p25), p11 del virus M de la patata (PVM-p11), p11 del virus S de la patata (PVS-p11), p16 del virus de la quemadura del arándano, (BScV -p16), p23 del virus tristexa de los cítricos (CTV-p23), p24 del virus asociado al enrollamiento de la hoja de la vid (GLRaV-2 p24), p10 del virus A de la vid (GVA-p10), p14 del virus B de la vid (GVB-p14), p 10 del virus latente del *Heracleum* (HLV-p10), o p 16 del virus latente común del ajo (GCLV-p16). Por lo tanto, un supresor del silenciamiento, por ejemplo, pero no limitado a, HcPro, TEV -p1/HC-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 o GVA-p10, puede coexpresarse junto con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés para asegurar aún más altos niveles de producción de proteína dentro de una planta.

Por “coexpresión” se entiende que dos, o más de dos, secuencias de nucleótidos se expresan aproximadamente al mismo tiempo en la planta y en el mismo tejido de la planta. Sin embargo, no es necesario que las secuencias de nucleótidos se expresen exactamente al mismo tiempo. Más bien, las dos o más secuencias de nucleótidos se expresan de tal manera que los productos codificados tienen la oportunidad de interactuar. Por ejemplo, la proteína que modifica la glicosilación de la proteína de interés puede expresarse antes o durante el periodo en que se expresa la proteína de interés, de modo que tenga lugar la modificación de la glicosilación de la proteína de interés. Las dos o más de dos secuencias de nucleótidos pueden coexpresarse utilizando un sistema de expresión transitoria, en el que las dos o más secuencias se introducen en la planta aproximadamente al mismo tiempo en condiciones en las que se expresan ambas secuencias. Alternativamente, una planta plataforma que comprende una de las secuencias nucleotídicas, por ejemplo, la secuencia que codifica la proteína que modifica el perfil de glicosilación de la proteína de interés, puede transformarse,

de forma transitoria o estable, con una secuencia adicional que codifica la proteína de interés. En este caso, la secuencia que codifica la proteína que modifica el perfil de glicosilación de la proteína de interés puede expresarse en un tejido deseado, durante una etapa deseada del desarrollo, o su expresión puede inducirse utilizando un promotor inducible, y la secuencia adicional que codifica la proteína de interés puede expresarse en condiciones similares y en el mismo tejido, para garantizar que las secuencias de nucleótidos se coexpresen.

La proteína de uno o más virus puede producirse como un transcrito a partir de una secuencia de nucleótidos, y la proteína escindirse tras la síntesis, y según se requiera, asociarse para formar una proteína multimérica. Por lo tanto, la proteína de uno o más virus también incluye una proteína o polipéptido que comprende subunidades que están asociadas a través de puentes disulfuro (es decir, una proteína multimérica). Por ejemplo, una proteína que comprenda secuencias de aminoácidos de dos o más fuentes puede procesarse en subunidades, y las subunidades asociarse mediante puentes disulfuro para producir una proteína.

La una o más secuencias de ácido nucleico o constructos genéticos pueden expresarse en cualquier huésped vegetal adecuado que sea transformado por la secuencia de nucleótidos, o constructos, o vectores. Los ejemplos de huéspedes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cultivos agrícolas como alfalfa, canola, *Brassica* spp., maíz, *Nicotiana* spp., patata, ginseng, guisante, avena, arroz, soja, trigo, cebada, girasol, algodón y similares.

La una o más construcciones genéticas pueden comprender además una región 3' no traducida. Una región no traducida 3' se refiere a la porción de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualquier otra señal reguladora capaz de efectuar el procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación suele caracterizarse por efectuar la adición de pistas de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor del ARNm. Las señales de poliadenilación suelen reconocerse por la presencia de homología con la forma canónica 5' AATAAA-3', aunque no son infrecuentes las variaciones. Ejemplos no limitantes de regiones 3' adecuadas son las regiones 3' transcritas no traducidas que contienen una señal de poliadenilación de genes de plásmidos inductores de tumores (Ti) de *Agrobacterium*, como el gen de la nopalina sintasa (NOS), genes de plantas como los genes de proteínas de almacenamiento de la soja, la subunidad pequeña del gen de la ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO; US 4.962.028), el promotor usado en la regulación de la expresión de plastocianina, descrito en el documento US 7.125.978.

Uno o más de los constructos genéticos también pueden incluir otros potenciadores, ya sean de traducción o de transcripción, según sea necesario. Los potenciadores pueden situarse a 5' o 3' de la secuencia que se transcribe. Las regiones potenciadoras son bien conocidas por los expertos en la materia, y pueden incluir un codón de iniciación ATG, secuencias adyacentes o similares. El codón de iniciación, si está presente, puede estar en fase con el marco de lectura ("en marco") de la secuencia codificante para proporcionar una traducción correcta de la secuencia transcrita.

Por "transformación" se entiende la transferencia interespecífica de información genética (secuencia de nucleótidos) que se manifiesta genotípica, fenotípicamente o de ambas formas. La transferencia interespecífica de información genética de una construcción a un huésped puede ser transitoria y la transferencia de información genética no es heredable o la transferencia puede ser heredable y la transferencia de información genética considerada estable.

Los constructos pueden introducirse en células vegetales utilizando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación, etc. Para una revisión de estas técnicas, véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, Nueva York VIII, pp. 421-463 (1988); Geier y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed. (1988); y Miki e Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. En *Plant Metabolism*, 2ª Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd., Londres, págs. 561-579 (1997). Londres, págs. 561-579 (1997). Otros métodos son la captación directa de ADN, el uso de liposomas, la electroporación, por ejemplo, utilizando protoplastos, la microinyección, los microproyectiles o bigotes y la infiltración al vacío. Véase, por ejemplo, Bilang, y col. (Gen 100: 247-250 (1991), Scheid y col. (Mol. Gen. Genet. 228: 104-112, 1991), Guerche y col. (Plant Science 52: 111-116, 1987), Neuhaus y col. (Theor. Appl. Genet. 75: 30-36, 1987), Klein y col., Nature 327: 70-73 (1987); Howell y col. (Science 208: 1265, 1980), Horsch y col. (Science 227: 1229-1231, 1985), DeBlock y col., Plant Physiology 91: 694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach y Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu y Lomonosoff (J Virol Meth, 105:343-348, 2002.), patentes US-4.945.050; 5.036.006; y 5.100.792, las solicitudes de patente estadounidense con n.º de serie 08/438.666, presentada el 10 de mayo de 1995 y 07/951.715, presentada el 25 de septiembre de 1992.

Como se describe más adelante, pueden utilizarse métodos de expresión transitoria para expresar las construcciones (véase Liu y Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348). Alternativamente, puede usarse un método de expresión transitoria basado en el vacío, tal como se describe por Kapila y col., 1997). Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, un método de agroinoculación o agroinfiltración, infiltración de jeringa, sin embargo, también pueden usarse otros métodos transitorios como se indicó anteriormente. Con agroinoculación, agroinfiltración o infiltración de sinjeringas, una mezcla de *Agrobacteria* que comprende el ácido nucleico deseado en los espacios intercelulares de un tejido, por ejemplo, las hojas, parte aérea de la planta (incluyendo tallo, hojas y flor), otra parte de la planta (tallo, raíz, flor) o la planta completa. Después de atravesar la epidermis, la *Agrobacteria* infecta y transfiere copias de ADN-t a las células. El ADN-t se transcribe de manera episomal y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en las células infectadas, sin embargo, el paso del ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

Para ayudar en la identificación de células vegetales transformadas, los constructos pueden manipularse adicionalmente para incluir marcadores seleccionables por la planta. Los marcadores seleccionables útiles incluyen enzimas que proporcionan resistencia a sustancias químicas como un antibiótico, por ejemplo, gentamicina, higromicina, kanamicina, o herbicidas como fosfinotricina, glifosato, clorosulfurón y similares. Del mismo modo, pueden utilizarse enzimas que permitan la producción de un compuesto identificable por el cambio de color, como la GUS (beta-glucuronidasa), o la luminiscencia, como la luciferasa o la GFP.

Por “materia vegetal” se entiende cualquier material derivado de una planta. La materia vegetal puede comprender una planta entera, tejidos, células o cualquier fracción de los mismos. Además, la materia vegetal puede comprender componentes vegetales intracelulares, componentes vegetales extracelulares, extractos líquidos o sólidos de plantas, o una combinación de los mismos. Además, la materia vegetal puede comprender plantas, células vegetales, tejidos, un extracto líquido, o una combinación de los mismos, de hojas, tallos, frutos, raíces o una combinación de los mismos. La materia vegetal puede comprender una planta o porción de la misma que no haya sido sometida a ninguna etapa de transformación. Sin embargo, también se contempla que el material vegetal pueda someterse a etapas mínimas de procesamiento, como se define a continuación, o a un procesamiento más riguroso, incluida la purificación parcial o sustancial de proteínas mediante técnicas comúnmente conocidas en la técnica, incluidas, entre otras, la cromatografía, la electroforesis y similares.

Por el término “procesamiento mínimo” se entiende materia vegetal, por ejemplo, una planta o porción de la misma que contenga una proteína de interés que esté parcialmente purificada para producir un extracto vegetal, homogeneizado, fracción de homogeneizado vegetal o similar (es decir, mínimamente procesado). La purificación parcial puede comprender, entre otras cosas, la alteración de las estructuras celulares de la planta, creando así una composición que comprende componentes vegetales solubles y componentes vegetales insolubles que pueden separarse, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración o una combinación de ambas. A este respecto, las proteínas secretadas dentro del espacio extracelular de la hoja u otros tejidos podrían obtenerse fácilmente utilizando la extracción al vacío o centrifuga, o los tejidos podrían extraerse bajo presión mediante el paso a través de rodillos o molienda o similares para exprimir o liberar la proteína libre de dentro del espacio extracelular. El procesamiento mínimo también podría implicar la preparación de extractos crudos de proteínas solubles, ya que estas preparaciones tendrían una contaminación insignificante de productos vegetales secundarios. Además, el procesamiento mínimo puede implicar la extracción acuosa de la proteína soluble de las hojas, seguida de la precipitación con cualquier sal adecuada. Otros métodos pueden incluir la maceración a gran escala y la extracción de zumo para permitir el uso directo del extracto.

La materia vegetal, en forma de material o tejido vegetal, puede administrarse por vía oral a un sujeto. La materia vegetal puede administrarse como parte de un suplemento dietético, junto con otros alimentos, o encapsulada. La materia o tejido vegetal también puede concentrarse para mejorar o aumentar la palatabilidad, o suministrarse junto con otros materiales, ingredientes o excipientes farmacéuticos, según se requiera.

Se contempla que una planta que comprende la proteína de interés, o que expresa la VLP que comprende la proteína de interés, puede administrarse a un sujeto u organismo diana, de diversas maneras dependiendo de la necesidad y la situación. Por ejemplo, la proteína de interés obtenida de la planta puede extraerse antes de su uso en forma cruda, parcialmente purificada o purificada. Si la proteína debe purificarse, puede producirse en plantas comestibles o no comestibles. Además, si la proteína se administra por vía oral, el tejido de la planta puede cosecharse y alimentar directamente al sujeto, o el tejido cosechado puede secarse antes de la alimentación, o puede permitirse que un animal padezca en la planta sin que tenga lugar una cosecha previa. También se considera dentro del ámbito de aplicación que los tejidos vegetales recolectados se suministren como complemento alimenticio dentro de la alimentación animal. Si el tejido vegetal se administra a un sujeto o a un animal con poco o ningún procesamiento posterior, es preferible que el tejido vegetal administrado sea comestible.

Las VLP producidas pueden purificarse, purificarse parcialmente a partir de una planta, porción de una planta o materia vegetal, o pueden administrarse como vacuna oral, utilizando métodos conocidos por un experto en la materia. La purificación puede incluir la producción de una fracción de apoplasto como se describe en el documento WO 2011/035422. Para la cromatografía de exclusión molecular preparativa, se puede obtener una preparación que comprenda VLP y eliminar el material insoluble por centrifugación. También puede usarse la precipitación con PEG. La proteína recuperada puede cuantificarse utilizando métodos convencionales (por ejemplo, ensayo de Bradford, BCA), y el extracto se hace pasar por una columna de exclusión por tamaño, utilizando por ejemplo, SEPHACRYL™, SEPHADEX™, o un medio similar, y se recogen las fracciones. Como patrón de calibración puede utilizarse Dextrano azul 2000 o una proteína adecuada. El extracto también puede pasarse por una columna de intercambio catiónico y recoger las fracciones activas. Tras la cromatografía, las fracciones pueden analizarse mediante electroforesis de proteínas, inmunotransferencia, o ambas, para confirmar la presencia de VLP y el complemento proteico de la fracción.

También se consideran parte de esta descripción las plantas transgénicas, células vegetales, semillas o cualquier fracción de las mismas que contengan las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. También se conocen métodos para regenerar plantas enteras a partir de células vegetales. En general, las células vegetales transformadas se cultivan en un medio apropiado, que puede contener agentes selectivos como antibióticos, en el que se utilizan marcadores seleccionables para facilitar la identificación de las células vegetales transformadas. Una vez formado el callo, puede fomentarse la formación de brotes empleando las hormonas vegetales adecuadas de acuerdo con métodos conocidos y los brotes pueden transferirse a un medio de enraizamiento para la regeneración de las plantas. A continuación, las plantas

pueden utilizarse para establecer generaciones repetitivas, ya sea a partir de semillas o mediante técnicas de propagación vegetativa. Las plantas transgénicas también pueden generarse sin utilizar cultivos de tejidos.

Como se muestra en la figura 18, la HA de B/Brisbane/60/2008 se expresa escasamente en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas (véanse los carriles “1008” o “1029”). Sin embargo, la coexpresión de HA-tipo B con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99, resulta en un aumento significativo de la expresión de HA (ver carriles “1008+1261”; “1009+1261” y “1029+1261”). El aumento de la expresión de HA se observó tanto con HA nativa de tipo B como con una HA quimérica de tipo B. La expresión de HA se observó en presencia o ausencia de elementos de amplificación (BeYDV), y a través de varias diluciones de *Agrobacterium*. Se observó un aumento similar en la expresión de H3 cuando H3 de A/Perth/16/2009 se coexpresó con M2 de A/Nueva Caledonia/20/99 (figura 19; comparar carril “1019” H3 solo, con “1019+1261” H3 coexpresado con M2).

La presente descripción incluye las secuencias de nucleótidos que figuran en la tabla 3:

Tabla 3. Lista de números de identificación de secuencia.

Id. de sec. n.º:	Descripción	Figura:
1	secuencia de firma de canal de protones HXXXW	
2	cebador IF-H5A-I-05.s1+3c	Fig. 1A
3	cebador IF-H5dTm.r	Fig. 1B
4	constructo 1191	Fig. 1D
5	casete de expresión número 489	Fig. 1E
6	secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	Fig. 1F
7	cebador IF-S1-M1+M2ANC.c	Fig. 2A
8	cebador IF-S 1-4-M2ANC.r	Fig. 2B
9	secuencia de nucleótidos del gen M2 sintetizado (DQ508860)	Fig. 2C
10	Casete de expresión número 1261	Fig. 2D
11	secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1)	Fig. 2E
12	secuencia de nucleótidos del gen M2 sintetizado	Fig. 3A
13	casete de expresión número 859	Fig. 3B
14	secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Fig. 3C
15	cebador IF-H1A-C-09.s2+ 4c	Fig. 4A
16	cebador IF-H1A-C-09.s1-4r	Fig. 4B
17	secuencia de nucleótidos del gen H1 sintetizado	Fig. 4C
18	constructo 1192	Fig. 4E
19	casete de expresión número 484	Fig. 4F
20	secuencia de aminoácidos de PDISP-H1 de la gripe A/California/7/2009 (H1N1)	Fig. 4G
21	cebador IF-S2+S4-H3 Per.c	Fig. 5A
22	cebador IF-S1a4-H3 Per.r	Fig. 5B
23	secuencia de nucleótidos del gen H3 sintetizado	Fig. 5C
24	casete de expresión número 1019	Fig. 5D
25	secuencia de aminoácidos de PDISP/ H3 de la gripe A/ Perth/16/2009 (H3N2)	Fig. 5E
26	cebador IF-S2+S4-B Bris.c	Fig. 6A
27	cebador IF-S1a4-B Bris.r	Fig. 6B
28	secuencia de nucleótidos del gen de HA B Brisbane sintetizado	Fig. 6C
29	casete de expresión número 1029	Fig. 6D
30	secuencia de aminoácidos de PDISP/ HA de la gripe B/Brisbane/60/2008	Fig. 6E
31	constructo 1194	Fig. 6G
32	casete de expresión número 1008	Fig. 6H
33	cebador dTmH5I-B Bris.r	Fig. 7A
34	cebador B Bris-dTmH5I.c	Fig. 7B
35	cebador IF-S1aS4-dTmH5I.r	Fig. 7C
36	casete de expresión número 1009	Fig. 7D
37	secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane/H5Indo TMCT	Fig. 7E
38	cebador 1039+1059.r	Fig. 8A
39	cebador 1039+1059.c	Fig. 8B
40	casete de expresión número 1059 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado	Fig. 8C
41	secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado	Fig. 8D
42	secuencia de nucleótidos que codifica H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	Fig. 1G
43	secuencia de nucleótidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado	FIG. 8E

	Id. de sec. n.º:	Descripción	Figura:
	44	cebador IF-H3V36111.S2+4c	Fig. 25A
	45	cebador IF-H3V36111.s1-4r	Fig. 25B
5	46	secuencia de nucleótidos del gen H3 sintetizado	Fig. 25C
	47	casete de expresión número 1391	Fig. 25D
	48	secuencia de aminoácidos de PDISP-H3 de la gripe A/ Victoria/361/2011	Fig. 25E
	49	cebador IF-HAB110.S1+ 3c	Fig. 26A
	50	cebador IF-HAB110.s1-4r	Fig. 26B
10	51	secuencia de nucleótidos del gen de HA B/Wisconsin (JN993010)	Fig. 26C
	52	constructo 193	Fig. 26E
	53	casete de expresión número 1462	Fig. 26F
	54	secuencia de aminoácidos de la HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010	Fig. 26G
	55	cebador HAB110 (PrL-).r	Fig. 27A
15	56	cebador HAB110 (PrL-).c	Fig. 27B
	57	casete de expresión número 1467	Fig. 27C
	58	secuencia de aminoácidos de HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico deletado	Fig. 27D
20	59	cebador IF-HB-M-04.s2+4c	Fig. 28A
	60	cebador IF-HB-M-04.s1-4r	Fig. 28B
	61	secuencia de nucleótidos del gen de HA B/Malasia	Fig. 28C
	62	constructo 194	Fig. 28E
	63	casete de expresión número 1631	Fig. 28F
25	64	secuencia de aminoácidos de la PDISP-HA de la gripe B/Malasia/2506/2004	Fig. 28G

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

30 Material y métodos: Conjunto de casetes de expresión con proteína de la gripe

A-2X35S/CPMV-HT/H5 Indonesia/NOS (número de constructo 489)

Se clonó una secuencia que codifica H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante H5 completa utilizando los cebadores IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, Id. de sec. n.º: 2) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, Id. de sec. n.º: 3) utilizando el constructo número 972 (véase la Figura 94, Id. de sec. n.º: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia del constructo número 972) como plantilla. El producto de la PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1191 (Figura 1D, Id. de sec. n.º: 4) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 1D (Id. de sec. n.º: 4). El constructo resultante recibió el número 489 (figura 1E, Id. de sec. n.º: 5). La secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) se presenta en la figura 1F (Id. de sec. n.º: 6). En la figura 15 se presenta una representación del plásmido 489.

50 B-2X35S/CPMV - HT/M2 Nueva Caledonia/NOS (número de constructo 1261)

Se clonó una secuencia que codifica M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante completa de M2 utilizando los cebadores IF-S1-M1+M2ANC.c (Figura 2A, Id. de sec. n.º: 7) e IF-S1-4-M2ANC.r (Figura 2B, Id. de sec. n.º: 8) utilizando como molde el gen M2 sintetizado (correspondiente al nt 1-26 unido al nt 715-982 del número de registro DQ508860 del GenBank) (Figura 2C, Id. de sec. n.º: 9). El producto de la PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1191 (Figura 1C) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMVHT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 1D (Id. de sec. n.º: 4). El constructo resultante recibió el número 1261 (figura 1E, Id. de sec. n.º: 10). La secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Nueva

Caledonia/20/1999 (H1N1) se presenta en la figura 2E (Id. de sec. n.º: 11). En la figura 16 se presenta una representación del plásmido 1261.

C-2X35S/CPMV-HT/M2 Puerto Rico/NOS (número de constructo 859)

Se clonó una secuencia que codifica M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante completa de M2 utilizando los cebadores IF-S1-M1+M2ANC.c (Figura 2A, Id. de sec. n.º: 7) e IF-S1-4-M2ANC.r (Figura 2B, Id. de sec. n.º: 8) utilizando como molde el gen M2 sintetizado (correspondiente al nt 26-51 unido al nt 740-1007 del número de registro EF467824 del GenBank) (figura 3A, Id. de sec. n.º: 12). El producto de la PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1191 (Figura 1C) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación “In Fusion” de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. El vector es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 1D (Id. de sec. n.º: 4). El constructo resultante recibió el número 859 (figura 3B, Id. de sec. n.º: 13). La secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) se presenta en la figura 3C (Id. de sec. n.º: 14). En la figura 17 se presenta una representación del plásmido 859.

D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H1 California/NOS (número de constructo 484)

Se clonó una secuencia que codifica H1 de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de H1 sin su péptido señal de tipo salvaje utilizando los cebadores IF-H1A-C-09.s2+4c (Figura 4A, Id. de sec. n.º: 15) e IF-H1A-C-09.s1-4r (Figura 4B, Id. de sec. n.º: 16), utilizando como molde el gen H1 sintetizado (número de registro al Genbank FJ966974) (Figura 4C, Id. de sec. n.º: 17). El producto de la PCR se clonó in-frame con el péptido señal de la PDI de alfalfa en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1192 (Figura 4D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1192 es un plásmido aceptor destinado a la clonación “In Fusion” de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 4E (Id. de sec. n.º: 18). El constructo resultante recibió el número 484 (figura 4F, Id. de sec. n.º: 19). La secuencia de aminoácidos de PDISP/H1 de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) se presenta en la figura 4G (Id. de sec. n.º: 20). En la figura 14 se presenta una representación del plásmido 484.

E-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H3 Perth/NOS (número de constructo 1019)

Se clonó una secuencia que codifica H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante H3 sin su péptido señal de tipo silvestre utilizando los cebadores IF-S2+S4-H3 Per.c (Figura 5A, Id. de sec. n.º: 21) e IF-S1a4-H3 Per.r (Figura 5B, Id. de sec. n.º: 22), utilizando como molde el gen H3 sintetizado (correspondiente al nt 26-1726 del número de registro al Genbank GQ293081) (Figura 5C, Id. de sec. n.º: 23). El producto de la PCR se clonó in-frame con el péptido señal de la PDI de alfalfa en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1192 (Figura 4D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1192 es un plásmido aceptor destinado a la clonación “In Fusion” de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 4E (Id. de sec. n.º: 18). El constructo resultante recibió el número 1019 (figura 5D, Id. de sec. n.º: 24). La secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) se presenta en la Figura 5E (Id. de sec. n.º: 25). En la figura 13 se presenta una representación del plásmido 1019.

F-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane/NOS (número de constructo 1029)

La secuencia que codifica la HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el siguiente método basado en la PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA Brisbane sin su péptido señal de tipo salvaje utilizando los cebadores IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 6A, Id. de sec. n.º: 26) e IF-S1a4-B Bris.r (Figura 6B, Id. de sec. n.º: 27), utilizando como plantilla el gen HA Brisbane sintetizado (correspondiente al nt 34-1791 del número de registro FJ766840 del Genbank) (Figura 6C, Id. de sec. n.º: 28). El producto de la PCR se clonó in-frame con el péptido señal de la PDI de alfalfa en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando

el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1192 (Figura 4D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1192 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 4E (Id. de sec. n.º: 18). El constructo resultante recibió el número 1029 (figura 6D, Id. de sec. n.º: 29). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 se presenta en la figura 6E (Id. de sec. n.º: 30). Una representación del plásmido 1029 se presenta en la figura 11.

G-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA Brisbane/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa (número de constructo 1008)

Se clonó una secuencia que codifica la HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en la PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA Brisbane sin su péptido señal de tipo salvaje utilizando los cebadores IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 6A, Id. de sec. n.º: 26) e IF-S1a4-B Bris.r (Figura 6B, Id. de sec. n.º: 27), utilizando como plantilla el gen HA Brisbane sintetizado (correspondiente al nt 34-1791 del número de registro FJ766840 del Genbank) (Figura 6C, Id. de sec. n.º: 28). El producto de la PCR se clonó in-frame con el péptido señal PDI de alfalfa en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1194 (véanse las figuras 6F y 6G) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1194 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 6G (Id. de sec. n.º: 31). El constructo resultante recibió el número 1008 (figura 6H Id. de sec. n.º: 32). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de BBrisbane/60/08 se presenta en la figura 6E (Id. de sec. n.º: 30). Una representación del plásmido 1008 se presenta en la figura 9.

Dominio transmembrana H-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA Brisbane/H5 Indonesia y cola citoplasmática (H5Indo TMCT)/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa (número de constructo 1009)

Una secuencia que codifica la HA del ectodominio de la gripe B/Brisbane/60/2008 fusionada a los dominios transmembrana y citosólico de la H5 de A/Indonesia/5/2005 (H5N1) se clonó en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter como se indica a continuación, utilizando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau y col. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante del ectodominio HA Brisbane sin el péptido señal nativo ni los dominios transmembrana y citoplasmático, utilizando los cebadores IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 6A, Id. de sec. n.º: 26) y dTmH5I-B Bris.r (Figura 7A, Id. de sec. n.º: 33), utilizando como molde el gen HA Brisbane sintetizado (correspondiente al nt 34-1791 del número de registro al Genbank FJ766840) (Figura 6C, Id. de sec. n.º: 28). Se amplificó un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 Indonesia utilizando los cebadores B Bris-dTmH5I.c (Figura 7B, Id. de sec. n.º: 34) e IF-S1aS4-dTmH5I.r (Figura 7C, Id. de sec. n.º: 35), utilizando el constructo número 489 (véase la Figura 1E, Id. de sec. n.º: 5) como molde. A continuación, se mezclaron los productos de PCR de ambas amplificaciones y se utilizaron como molde para una segunda ronda de amplificación utilizando IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 6A, Id. de sec. n.º: 26) e IF-H5dTm.r (Figura 7C, Id. de sec. n.º: 34) como cebadores. El fragmento resultante de la PCR se clonó in-frame con el péptido señal PDI de alfalfa en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1194 (figuras 6F y 6G) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1194 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMVHT en el sistema de amplificación BeYDV. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 6G (Id. de sec. n.º: 31). El constructo resultante recibió el número 1009 (figura 7D, Id. de sec. n.º: 36). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA Brisbane/H5Indo TMCT se presenta en la Figura 7E (Id. de sec. n.º: 37). Una representación del plásmido 1009 se presenta en la figura 10.

I-2X35S/CPMV-HT/PDISP-HA Brisbane con bucle proteolítico delecionado en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa (número de constructo 1059)

Se clonó una secuencia que codifica la HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método de ligamiento basado en la PCR de Darveau y col. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA Brisbane desde el nt 46 hasta el nt 1065 utilizando los cebadores IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 6A, Id. de sec. n.º: 26) y 1039+1059.r (Figura 8A, Id. de sec. n.º: 38), utilizando como molde el gen HA Brisbane sintetizado (correspondiente al nt 34-1791 del número registro Genbank FJ766840) (Figura 6C, Id. de sec. n.º: 28). Se amplificó un segundo fragmento, que contenía la secuencia codificante de HA Brisbane desde el nt 1123 hasta el nt 1758, utilizando los cebadores 1039+1059.c (Figura 8B, Id. de sec. n.º: 39) e IF-S1a4-B Bris.r (Figura 6B, Id. de sec. n.º: 27), utilizando como molde el gen HA Brisbane sintetizado (correspondiente al nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) (Figura 6C, Id. de sec. n.º: 28). A continuación, se mezclaron los productos de PCR de ambas amplificaciones y se utilizaron como molde para una segunda ronda de amplificación utilizando IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 6A, Id. de sec. n.º: 26) e IF-H5dTm.r IF-S1a4-B Bris.r (Figura 6B, Id. de sec. n.º: 27) como cebadores. El fragmento resultante (que codifica HA B/Brisbane/60/2008 Δa.a. 356-374 con un ligador GG entre fragmentos) se clonó dentro del marco con el péptido señal PDI de alfalfa en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1194 (figuras 6F y 6G) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1194 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 6G (Id. de sec. n.º: 31). El constructo resultante recibió el número 1059 (figura 8C, Id. de sec. n.º: 40). La secuencia de aminoácidos de PDISP-HA B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado se presenta en la Figura 8D (Id. de sec. n.º: 41). Una representación del plásmido 1059 se presenta en la Figura 12.

A-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H3 Victoria/NOS (número de constructo 1391)

Se clonó una secuencia que codifica H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 (H3N2) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante H3 sin su péptido señal de tipo salvaje utilizando los cebadores IF-H3V36111.S2+4c (Figura 25A, Id. de sec. n.º: 44) e IF-H3V36111.s1-4r (Figura 25B, Id. de sec. n.º: 45), utilizando como plantilla el gen H3 sintetizado (correspondiente a los nt 25 a 1725 de la secuencia HA del aislado GISAID EPI_ISL_101506) (Figura 25C, Id. de sec. n.º: 46). El producto de la PCR se clonó en marco con el péptido señal de la PDI de alfalfa en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 1192 (Figura 4D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 1192 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 4E (Id. de sec. n.º: 18). El constructo resultante recibió el número 1391 (figura 25D, Id. de sec. n.º: 47). La secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 (H3N2) se presenta en la Figura 25E (Id. de sec. n.º: 48). Una representación del plásmido 1391 se presenta en la Figura 25F.

B-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa (número de constructo 1462)

Se clonó una secuencia que codifica la HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en la PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante completa de HA B Wisconsin utilizando los cebadores IF-HAB110.S1+3c (Figura 26A, Id. de sec. n.º: 49) e IF-HAB110.s1-4r (Figura 26B, Id. de sec. n.º: 50), utilizando como molde el gen HA B Wisconsin sintetizado (número de registro Genbank JN993010) (Figura 26C, Id. de sec. n.º: 51). El producto de la PCR se clonó en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m) utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 193 (Figura 26D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV(m). También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 26E (Id. de sec. n.º: 52). El constructo resultante recibió el número 1462

(figura 26F, Id. de sec. n.º: 53). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 se presenta en la figura 26G (Id. de sec. n.º: 54). Una representación del plásmido 1462 se presenta en la Figura 26H.

C-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin con bucle proteolítico delecionado en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa (número de constructo 1467)

Se clonó una secuencia que codifica la HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico delecionado en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método de ligamiento basado en la PCR de Darveau y col. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA B Wisconsin desde el nt 1 hasta el nt 1062 utilizando los cebadores IF-HAB110.S1+3c (Figura 26A, Id. de sec. n.º: 49) y HAB110(PrL-).r (Figura 27A, Id. de sec. n.º: 55), utilizando como molde el gen HA B Wisconsin sintetizado (número de registro Genbank JN993010) (Figura 26C, Id. de sec. n.º: 51). Se amplificó un segundo fragmento, que contenía la secuencia codificante de HA B Wisconsin desde el nt 1120 hasta el nt 1755, utilizando los cebadores HAB110(PrL-).c (Figura 27B, Id. de sec. n.º: 56) e IF-HAB110.s1-4r (Figura 26B, Id. de sec. n.º: 50), utilizando como molde el gen HA B Wisconsin sintetizado (número de registro Genbank JN993010) (Figura 26C, Id. de sec. n.º: 51). A continuación, se mezclaron los productos de PCR de ambas amplificaciones y se utilizaron como molde para una segunda ronda de amplificación utilizando IF-HAB110.S1+3c (Figura 26A, Id. de sec. n.º: 49) e IF-HAB110.s1-4r (Figura 26B, Id. de sec. n.º: 50) como cebadores. El fragmento resultante (que codifica HA B/Wisconsin/1/2010 Δa.a. 340-358 con un ligador GG entre fragmentos) se clonó en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV(m) utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 193 (Figura 26D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV(m). También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 26E (Id. de sec. n.º: 52). El constructo resultante recibió el número 1467 (figura 27C, Id. de sec. n.º: 57). La secuencia de aminoácidos de la HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con el bucle proteolítico eliminado se presenta en la Figura 27D (Id. de sec. n.º: 58). Una representación del plásmido 1467 se presenta en la Figura 27E.

D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Malasia/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (número de constructo 1631)

Se clonó una secuencia que codifica la HA de la gripe B/Malasia/2506/2004 en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprende el sistema de amplificación BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método basado en la PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA B Malasia sin su péptido señal de tipo salvaje utilizando los cebadores IF-HB-M-04.s2+4c (Figura 28A, Id. de sec. n.º: 59) e IF-HB-M-04.s1-4r (Figura 28B, Id. de sec. n.º: 60), utilizando el gen sintetizado de HA B Malasia (correspondiente al nt 31-1743 del número de registro Genbank EU124275. Las mutaciones silenciosas T759C y C888G se insertaron en la secuencia sintetizada para modificar los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción DraIII y BamHI) (Figura 28C, Id. de sec. n.º: 61) como plantilla. El producto de la PCR se clonó in-frame con el péptido señal PDI de alfalfa en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV (m) utilizando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). El constructo 194 (Figura 28D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se utilizó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. El constructo número 194 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV(m). También incorpora un constructo génico para la coexpresión del supresor del silenciamiento del TBSV P19 bajo el promotor y el terminador del gen de la plastocianina de la alfalfa. La estructura principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia de izquierda a derecha de los bordes del ADN-t se presenta en la figura 28E (Id. de sec. n.º: 62). El constructo resultante recibió el número 1631 (figura 28F, Id. de sec. n.º: 63). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Malasia/2506/2004 se presenta en la figura 28G (Id. de sec. n.º: 64). Una representación del plásmido 1631 se presenta en la Figura 28H.

Transfección de Agrobacterium

La cepa de *Agrobacterium* AGL1 se transfectó mediante electroporación con las construcciones de ADN utilizando los métodos descritos por D'Aoust et al 2008 (Plant Biotechnology Journal 6:930-940). Los *Agrobacterium* transfectados se cultivaron en medio YEB suplementado con 10 mM de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), 20 µM de acetosiringona, 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de carbenicilina pH5,6 hasta una DO₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes de su uso y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6).

Preparación de biomasa vegetal, inóculo y agroinfiltración

Los términos "biomasa" y "materia vegetal" utilizados en el presente documento se refieren a cualquier material derivado de una planta. La biomasa o materia vegetal puede comprender una planta entera, tejidos, células o

cualquier fracción de los mismos. Además, la biomasa o materia vegetal puede comprender componentes vegetales intracelulares, componentes vegetales extracelulares, extractos líquidos o sólidos de plantas, o una combinación de los mismos. Además, la biomasa o materia vegetal puede comprender plantas, células vegetales, tejidos, un extracto líquido, o una combinación de los mismos, de hojas, tallos, frutos, raíces o una combinación de los mismos.

Una parte de una planta puede comprender materia vegetal o biomasa.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en pisos rellenos de un sustrato comercial de musgo de turba. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperíodo de 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C de día/20 °C de noche. Tres semanas después de la siembra, se escogieron plántulas individuales, se trasplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales en las mismas condiciones ambientales.

Las agrobacterias transfectadas con cada constructo se cultivaron en un medio YEB suplementado con 10 mM de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), 20 µM de acetosiringona, 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de carbenicilina pH5,6 hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes de su uso y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante la noche. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en 2,5 volúmenes de cultivo y se dejaron calentar antes de su uso. Se colocaron plantas enteras de *N. benthamiana* boca abajo en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético bajo un vacío de 20-40 Torr durante 2 minutos. Las plantas se devolvieron al invernadero para un período de incubación de 2-6 días hasta la cosecha.

Cosecha de hojas y extracción de proteínas totales

Tras la incubación, se recogió la parte aérea de las plantas, se congeló a -80 °C y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron homogeneizando (Polytron) cada muestra de material vegetal triturado congelado en 3 volúmenes de Tris 50 mM pH 8,0 frío, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogeneización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y estos extractos crudos clarificados (sobrenadante) se mantuvieron para análisis.

Análisis de proteínas e inmunotransferencia

El contenido total de proteínas de los extractos crudos clarificados se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando albúmina sérica bovina como patrón de referencia. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransfirieron a membranas de difluoruro de polivinileno (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN) para inmunodetección. Antes de la inmunotransferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % y Tween-20 al 0,1 % en solución salina tamponada con Tris (TBS-T) durante 16-18 h a 4 °C.

La inmunotransferencia se realizó con una primera incubación con un anticuerpo primario (la tabla 4 presenta los anticuerpos y las condiciones usadas para la detección de cada HA), en 2 µg/ml en leche descremada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los anticuerpos secundarios utilizados para la detección de quimioluminiscencia fueron como se indica en la Tabla 4, diluidos como se indica en leche descremada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como sustrato (Roche Diagnostics Corporation). La conjugación enzimática con peroxidasa de rábano picante del anticuerpo IgG humano se llevó a cabo utilizando el kit de conjugación con peroxidasa activada EZ-Link Plus® (Pierce, Rockford, IL).

Tabla 4: Condiciones de electroforesis, anticuerpos y diluciones para inmunotransferencia de proteínas expresadas.

Subtipo de HA	Cepa de gripe	Condición de electroforesis	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
B	B/Brisbane/60/2008	No reductora	TGA, AS397	1:20000	Anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja (JIR 313-035-045)	1:10 000
B	B/Wisconsin/1/2010	No reductora	NIBSC 07/356	1:2000	Anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja (JIR 313-035-045)	1:10 000
B	B/Malasia/2506/2004	No reductora	NIBSC 07/184	1:2000	Anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja (JIR 313-035-045)	1:10 000
H3	A/Perth/16/2009 (H3N2)	No reductora	TGA, AS400	1:20000	Anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja (JIR 313-035-045)	1:10 000
H3	A/Victoria/361/2011	No reductora	TGA, AS400	1:20000	Anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja (JIR 313-035-045)	1:10 000
H1	A/California/07/2009 (H1N1)	Reductora	Sino, 11055-MMO1	1 µg/ml	Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (JIR 115-035-146)	1:7 500
H5	A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	Reductora	CBER, S-7858	1:4000	Anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja (JIR 313-035-045)	1:10 000
JIR: Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.; CBER: Center for Biologies Evaluation and Research, Rockville, MD, EE. UU. Sino: Sino Biological Inc., Pekín, China.						

Subtipo de HA	Cepa de gripe	Condición de electroforesis	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
TGA: Therapeutic Bobs Administration, Australia.						
NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido						

Ensayo de hemaglutinación

El ensayo de hemaglutinación se basó en un método descrito por Nayak y Reichl (2004). Brevemente, se hicieron diluciones dobles seriadas de las muestras de ensayo (100 µl) en placas microtitulación de 96 pocillos con fondo en V que contenían 100 µl de PBS, dejando 100 µl de muestra diluida por pocillo. Se añadieron 100 microlitros de una suspensión de hematíes de pavo al 0,25 % (Bio Link Inc., Syracuse, NY) a cada pocillo y se incubaron las placas durante 2 h a temperatura ambiente. El recíproco de la dilución más alta que muestra hemaglutinación completa se registró como actividad HA. Paralelamente, se diluyó en PBS un estándar de HA recombinante (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) y se utilizó como control en cada placa.

Ejemplo 1: Efecto de la coexpresión de M2 de la gripe sobre el nivel de acumulación de HA y H3 B

El efecto de la coexpresión de M2 de la gripe sobre el nivel de acumulación de HA de diferentes cepas de la gripe se analizó mediante los constructos de transferencia conjunta que impulsan la expresión de HA con un constructo para la expresión de M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1) en el sistema de transformación transitoria basado en agroinfiltración.

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos proteicos de plantas transformadas con constructos génicos que impulsan la expresión de HA de gripe B (de B/Brisbane/60/2008) (constructos n.º 1008, 1009 y 1029) en presencia o ausencia del constructo de expresión de M2 (constructo n.º 1261) mostró que la coexpresión de M2 resulta en una mayor acumulación de HA de gripe B (Figura 18). Del mismo modo, la coexpresión de M2 con H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (constructo n.º 1019+1261) dio lugar a una mayor acumulación de H3 en las plantas transformadas en comparación con las plantas transformadas únicamente con el constructo de expresión de H3 (constructo n.º 1019), como se muestra en la Figura 19.

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos proteicos de plantas que coexpresaban M2 con H1 de la gripe A/California/07/2009 mostró que la coexpresión de M2 con H1 producía una ligera disminución del nivel de acumulación de H1 (Figura 20, 484 frente a 484+1261). La coexpresión de M2 con H5 de gripe A/Indonesia/05/2005 también dio lugar a una menor acumulación de H5 en comparación con H5 expresado solo (figura 21, 489 vs 489+1261).

Además, se evaluó el impacto de la coexpresión de M2 en el nivel de acumulación de una HA de gripe B modificada. El constructo n.º 1059 codifica una HA de gripe B en la que el bucle proteolítico se sustituye por un ligador de 2 aminoácidos (GG en lugar de aa 341-359). Los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western presentados en la figura 22A muestran que la eliminación del bucle proteolítico provocó un aumento del nivel de acumulación de HA de gripe B (comparar 1008 con 1059) y que la coexpresión de M2 con la HA de gripe B modificada aumentó aún más el nivel de acumulación de HA (figura 22A, 1059 frente a 1059+1261). Un análisis de la actividad de hemaglutinación en extractos de proteína bruta de plantas transformadas con HA de gripe B con o sin modificación y con o sin coexpresión de M2 confirmó el efecto positivo de la coexpresión de M2 sobre el nivel de acumulación de la HA de gripe B nativa (Figura 22B, 1008 frente a 1008+1261) y de la HA de gripe B modificada (Figura 22B, 1059 frente a 1059+1261).

Se comparó la eficacia de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 para aumentar la acumulación de la HA y H3 modificadas de la gripe B con la de M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999. Para la HA modificada de la gripe B, la comparación se llevó a cabo mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos proteicos de plantas transformadas con los constructos 1059, 1059+1261 y 1059+859. Para H3, se realizó una comparación similar con extractos de proteínas de plantas transformadas con 1019, 1019+1261 y 1019+859. Los resultados obtenidos demostraron que la coexpresión de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (codificada por el constructo n.º 859) era tan eficiente como la coexpresión de M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (codificada por el constructo n.º 1261) para aumentar la acumulación tanto de la HA modificada de la gripe B (Figura 23A) como de H3 (Figura 23B).

Ejemplo 2: Efecto de la coexpresión de M2 de la gripe sobre el nivel de acumulación de diferentes cepas de HA y H3 B

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos proteicos de plantas transformadas con constructos génicos que impulsan la expresión de HA de gripe B (de B/Malasia/2506/2004) (constructos n.º 1631) en presencia o ausencia del constructo de expresión de M2 (constructo n.º 1261) mostró que la coexpresión de M2 resulta en una mayor acumulación de HA de gripe B (Figura 29).

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos proteicos de plantas transformadas con constructos génicos que impulsan la expresión de HA de gripe B (de B/Wisconsin/1/2010) (constructos n.º 1462) en presencia o ausencia del constructo de expresión de M2 (constructo n.º 1261) mostró que la coexpresión de M2 resulta en una mayor acumulación de HA de gripe B (Figura 30).

Además, se evaluó el impacto de la coexpresión de M2 en el nivel de acumulación de una HA de gripe B modificada. El constructo n.º 1467 codifica una HA de gripe B en la que el bucle proteolítico se sustituye por un ligador de 2 aminoácidos (GG en lugar de aa 341-359). Los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western presentados en la figura 30A muestran que la eliminación del bucle proteolítico provocó un aumento del nivel de acumulación de HA de gripe B (comparar 1462 con 1467) y que la coexpresión de M2 con la HA de gripe B modificada aumentó aún más el nivel de acumulación de HA (figura 30A, 1467 frente a 1467+1261). Un análisis de la actividad de hemaglutinación en extractos de proteína bruta de plantas transformadas con HA de gripe B con o sin modificación y con o sin coexpresión de M2 confirmó el efecto positivo de la coexpresión de M2 sobre el nivel de acumulación de la HA de gripe B nativa (Figura 30B, 1462 frente a 1462+1261) y de la HA de gripe B modificada (Figura 26B, 1467 frente a 1467+1261).

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos proteicos de plantas transformadas con constructos génicos que impulsan la expresión de H3 (de H3/Victoria/361/2011) (constructos n.º 1391) en presencia o ausencia del constructo de expresión de M2 (constructo n.º 1261) mostró que la coexpresión de M2 resulta en una mayor acumulación de H3 (Figura 31).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula similar a virus (VLP) en una planta que comprende,
 - a) introducir mediante transformación un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína hemaglutinina (HA) de la gripe seleccionada del grupo que consiste en B y H3 en la planta, o parte de la planta,
 - b) introducir mediante transformación un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de canal de protones seleccionada del grupo que consiste en M2 y BM2, y
 - c) incubar la planta o parte de la planta para producir la VLP.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende además una etapa de d) cosechar la planta y purificar la VLP.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método comprende además introducir mediante transformación un tercer ácido nucleico, comprendiendo el tercer ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica un supresor del silenciamiento.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el supresor del silenciamiento es HcPro o p19.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína del canal de protones se selecciona de gripe A/Puerto Rico/8/1934 o gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 y/o en donde la proteína del canal de protones comprende la secuencia de firma del canal de protones HXXXW.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe es una proteína HA0 y/o en donde la HA de la gripe B es de la gripe B/Brisbane/60/2008, B/Malaysia/2506/2004 o B/Wisconsin/1/2010 y/o en donde la H3 de la gripe es de la gripe A/Perth/16/2009 o de la gripe A/Victoria/361/2011.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se ha delecionado uno o más bucles proteolíticos de la proteína HA de la gripe B.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe:
 - a) tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de sec. n.º: 28, Id. de sec. n.º: 51 e Id. de sec. n.º: 61;
 - b) es tal como se muestra en al menos una de Id. de sec. n.º:30, Id. de sec. n.º:54 e Id. de sec. n.º:64;
 - c) tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de sec. n.º: 43 y la parte subrayada de la Id. de sec. n.º:57;
 - d) es tal como se muestra en al menos una de Id. de sec. n.º:41 e Id. de sec. n.º:58;
 - e) tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de sec. n.º: 23 e Id. de sec. n.º: 46; y/o
 - f) es tal como se muestra en al menos una de Id. de sec. n.º:25 e Id. de sec. n.º:48.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el primer ácido nucleico comprende la primera región reguladora unida operativamente con uno o más de un potenciador de comovirus, codificando la secuencia de nucleótidos para la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe, uno o más de un elemento de amplificación de geminivirus, y un tercer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una replicasa de geminivirus se introduce en la planta o parte de la planta.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el uno o más de un potenciador de comovirus es una UTR de comovirus.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la UTR del comovirus es una UTR del virus del mosaico del caupí (CPMV).
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el uno o más de un elemento de amplificación de geminivirus es una región intergénica larga del virus del enanismo amarillo de la judía (BeYDV LIR) y una región intergénica corta del BeYDV (BeYDV SIR).
13. Una materia vegetal que comprende la VLP producida mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la VLP comprende una proteína hemaglutinina (HA) de la gripe

seleccionada del grupo que consiste en B y H3, comprendiendo además la materia vegetal una proteína de canal de protones seleccionada del grupo que consiste en M2 y BM2.

- 5 14. Un suplemento alimenticio que comprende la materia vegetal de la reivindicación 13.
15. Un método para producir una partícula similar a virus (VLP) en una planta que comprende,
 - 10 a) introducir mediante transformación un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína B de la hemaglutinina (HA) de la gripe en la planta, o parte de la planta, en donde se ha delecionado uno o más bucles proteolíticos de la proteína HA de la gripe, y
 - b) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de los ácidos nucleicos, produciendo de este modo la VLP.
- 15 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o 15, en donde la transformación es una transformación transitoria.

A-2X35S/CPMV-HT/H5 Indonesia/NOS (número de constructo 489)

Figura 1A

IF-H5A-I-05.sl+3c Id. de sec. n.º 2

AAATTTGTCGGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC

Figura 1B

IF-H5dTm.r Id. de sec. n.º 3

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGATCCAT

Figura 1C

Representación esquemática del constructo 1191. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

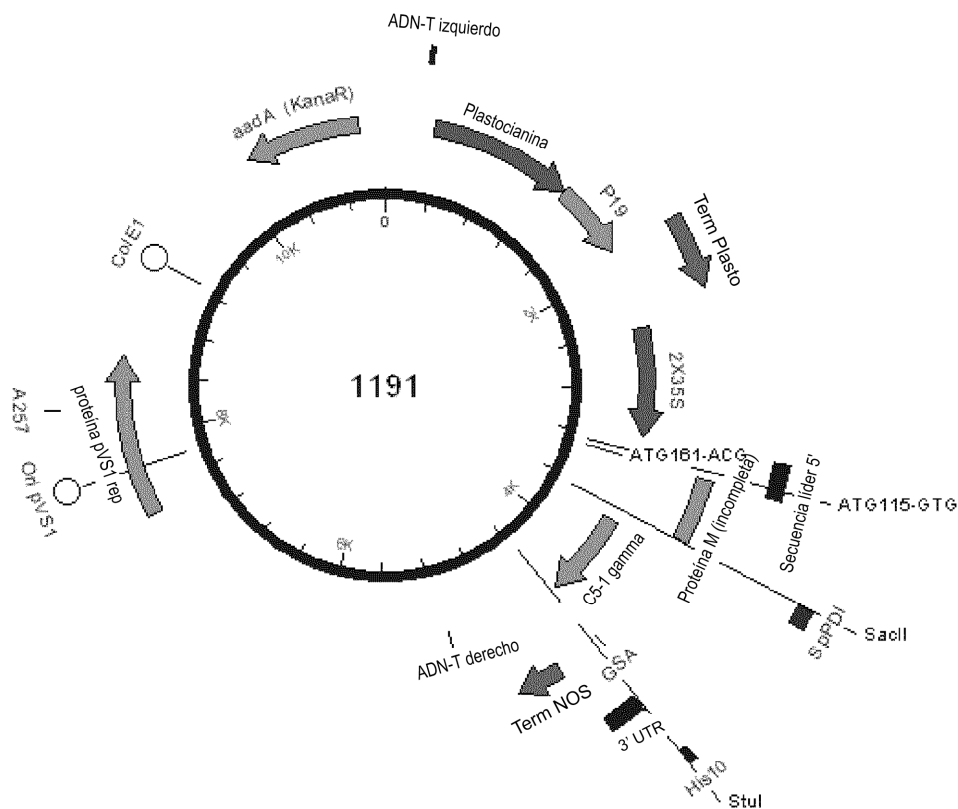


Figura 1D

Construeto 1191 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º 4)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
 ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAAACCATAAA
 AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATT
 TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTG
 CAACATTTGAGAAAAATTTGTGTTCTCTCTTTTATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
 GGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
 AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
 CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTA AAAAGAAAAGAAATAAATTATTTTAA
 AATTA AAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
 TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA
 AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATA
 ACATCCAATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
 ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
 AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCCCTGACGAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
 CTGCACAGAGTCCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTGCGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTTCGCGAACT
 CTTACAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
 TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTTGTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
 AGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACGATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
 ACACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATATGGTCAAGTT
 CAATAGATTAAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAAACCTTAACGTTATTAACCTA
 ATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCGCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCG
 TTGGGAATTACTAGCGCGTGTGACAAGCTTGCATGCCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCT
 ACTCAAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAA
 TATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGA
 AGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGT
 GGTUCCAAAGATGGACUCCCAACUACGAGGAGCATUGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACUACGTTCTTCA
 AAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGAT
 ACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGA
 TTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCC
 ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCC
 CACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGCTTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG
 ATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGG
 AAGTTTCATTTTATTTGGAGAGGTATTAATAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTGGGGAACCCG
 AACCACCTTCTTCTAAACTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTCTTCTGCGTGAGC
 GATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAG
 ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGCGGTGTTGCT
 TGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTC
 GGCGGTGCAATATCTTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTG

ATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAAG
 ATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGGCCCGCGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCG
 GCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCCTTCTCAGATCTTCGCCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAAACGACA
 CCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCT
 GGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC
 ACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTG
 GCCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGT
 GCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCC
 CAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAA
 GGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCC
 CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCA
 ATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTT
 TGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTT
 TATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTT
 AATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTT
 CAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTT
 CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTAT
 GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
 ATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAG
 TGGCACTGGCCGTCGTTTTACACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGC
 AGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
 CGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTA
 AACTATCAGTGTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 1E

Casete de expresión número 489 del promotor 2X35S al terminador NOS. El H5 de la gripe
 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) está subrayado. Id. de sec. n.º 5

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAG
 CAAACTTCTCTTGTCTTTCTTGGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCAGCGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGGC
 CCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTAC
CATGCAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAA
GACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGA
GATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGT
CTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGA

ACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCC
GATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTAGAAATGT
GGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGA
GGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAAC
CCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGAT
CCAAAGTAAACGGGCAAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAAACCTAATGATGCAATCA
ACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGC
AATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAATCCAATGGGGGCGATAAA
CTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAAAC
AGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACT
ATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCA
CCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGT
CACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAAT
AACTTAGAAAGGAGAAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTAT
AATGCCGAACCTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAAGCTTAGACTTTCATGACTCAAAATGTTAAGAACC
TCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTA
TCACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAGTATTTCAGA
AGAAGCAAGATTAAGAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATAC
TGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATG
TGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTT
ATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAAATTAAT
TTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAACATTTGGCA
ATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACG
TTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCG
CAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCG
GTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 1F

Secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) Id. de sec. n.º 6

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDL
 DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKH
 LLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYN
 NTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGR
 MEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPERYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKQTPMGAI
 NSSMPFHNHPLTIGCEPKYVKSRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQ
 GMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNN
 LERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN
 AKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIY
 STVASSLALAIMMAGLSLWMCNSGLQCRICI

Figura 1G secuencia de nucleótidos que codifica H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) Id. de sec. n.º 42)

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCA
 TGCAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGA
 CATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGA
 TTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCT
 TACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAA
 CTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAAATCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCG
 ATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTG
 GTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAG
 GATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACC
 CAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATC
 CAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAA
 CTTTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCA
 ATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAAC
 TCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACA
 GATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAGAGAGGACTA
 TTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCAC
 CATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTC
 ACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATA
 ACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATA
 ATGCCGAACCTTCTGGTTCTCATGGAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCTGACTCAAATGTTAAGAACCT
 CTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTAT
 CACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTCAGAA
 GAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACT
 GTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGT
 GCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

B-2X35S/CPMV HT/M2 Nueva Caledonia/NOS (número de constructo 1261)

Figura 2A

IF-S1-M1+M2ANC.C (Id. de sec. n.º 7)

AAATTTGTCGGGCCCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACG

Figura 2B

IF-S1-4-M2ANC.r (Id. de sec. n.º 8)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAA

Figura 2C

Gen M2 sintetizado (correspondiente a nt 1-26 unido a 715-982 del número de registro Genbank DQ508860) (Id. de sec. n.º 9)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGT
GATCCTCTTGTGTTGCCGCAAGTATAATTGGGATTGTGCACCTGATATTGTGGATTATTGATCGCCTTTTT
TCCAAAAGCATTATCGTATCTTTAAACACGGTTTAAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTACCAGAGT
CTATGAGGGAAGAATATCGAGAGGAACAGCAGAATGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTGTCAGCA
TAGAGCTGGAGTAA

Figura 2D

Casete de expresión número 1261 del promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1) está subrayado. (Id. de sec. n.º 10)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACCTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAAGGAA
AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACCTTATTGTGAAGATA
GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
ATCCTTCGCAAGACCCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGG
TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
CAAACTCTCTCTTGTCTTTCTTGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACG
TGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTTCAGCCCCA

TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
TTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTCGGGC
CCATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAA
GTGATCCTCTTGTGTGGCCGCAAGTATAATTGGGATTGTGCACCTGATATTGTGGATTATTGATCGCCTT
TTTTCCAAAAGCATTTATCGTATCTTTAAACACGGTTTAAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTACCAG
AGTCTATGAGGGAAGAATATCGAGAGGAAACAGCAGAATGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTA
GCATAGAGCTGGAGTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCCGGTGTGCATTTCTATGTTT
GGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGC
AGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGG
AATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAACACTTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATC
CTGTTGCCGGTCTTGCAGTATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATG
TAATTGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGAT
AGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 2E

Secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1) (Id. de sec. n.º 11)

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDPLVVAASIIGIVHLILWIIDRLFSKSIYRIFKHGLKRG
STEGVPESMREEYREEQQNAVDADDGHFVSIELE

C-2X35S/CPMV-HT/M2 Puerto Rico/NOS (número de constructo 859)

Figura 3A

Gen M2 sintetizado (correspondiente a nt 26-51 unido a nt 740-1007 del número de registro Genbank EF467824) (Id. de sec. n.º 12)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGT
GATCCTCTCACTATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCATTGACATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTT
TTCAAATGCATTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTAAAGT
CTATGAGGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTACGCA
TAGAGCTGGAGTAA

Figura 3B

Casete de expresión número 859 del promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) está subrayado. (Id. de sec. n.º 13)

GTCAACATGGTGGAGACGACACACTTGTCTACTCCAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
GTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
TGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
ACACACTTGTCTACTCCAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
GTGAAAAAGGAAGGTGGCTCTTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
TCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCACTGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
ACACCGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCT
ATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTAAAACTTTAATAG
TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
CAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAAGTACA
ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACG
TGTAATTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAAGCCCCA
TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
TTGCCGTGACTCTTTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTGCAAGTTGGAGAAAGATTGTTAAAGCTTCTGTATATTTCTGCCAAATTTGTCGGGC
CCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCATCAGAAACGAATTGGGGGTGACGATGCAACCGGTTCAA
GTGATCCTCTCACTATTGCCGCAAATATCATTTGGGATCTTGCACTTGACATTGTGGATTCTTGATCGTCTTT
TTTTCAAATGCATTTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAA
GTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTGAG
CATAGAGCTGGAGTAAAGGCCTATTTTCTTAAAGTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTT
GTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCA
GGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGA
ATTGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCC
TGTTGCCGGTCTTGCAGTATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGT
AATGCATGACGTTTATTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATA
GAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 3C

Secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (Id. de sec. n.º 14)

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILDRLEFFKCIYRRFKYGLKGG
PSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H1 California/NOS (número de constructo 484)

Figura 4A

IF-H1A-C-09.s2+4c (Id. de sec. n.º 15)

TCTCAGATCTTCGCCGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAACA

Figura 4B

IF-H1A-C-09.sl14r (Id. de sec. n.º 16)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTAAATACATATTCTACACTGTAGAGACCCA

Figura 4C

Gen H1 sintetizado (número de acceso Genbank FJ966974) (Id. de sec. n.º 17)

ATGAAGGCAACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACCGCAAATGCAGACACATTATGTATAGGTT
ATCATGCGAACAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTG
TTAACCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTGG
GTAAATGTAACTTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATG
GTCCTACATTGTGGAAACACCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGATTATGAG
GAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTTCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCTCAAGACAAGTTCAT
GGCCCAATCATGACTCGAACAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACA
AAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAAATCCTACATTAATGATAA
AGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTAT
CAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGGTCATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAATAGCA
ATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGA
CAAAATAACATTGCAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTGCAATGGAAAGAAATGC
TGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTCAAACACCCAAGGGT
GCTATAAACACACAGCCTCCCATTTGAGAATATACATCCGATCACAATTGGAAAATGTCCAAAATATGTAA
AAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATATCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGG
GGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCA
AAATGAGCAGGGGTCAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAA
CAAAGTAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCACCTG
GAAAAAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCCTGGACATTGGACTTACAATGCC
GAACTGTTGGTTCTATTGAAAAATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAGAAGTTATATG
AAAAGGTAAGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATTTGAAAACGGCTGCTTTGAATTTTACCACA
AATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAG
CAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGA
TCTATTCAACTGTCCGAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCT
AATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

Figura 4D

Representación esquemática del constructo 1192. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

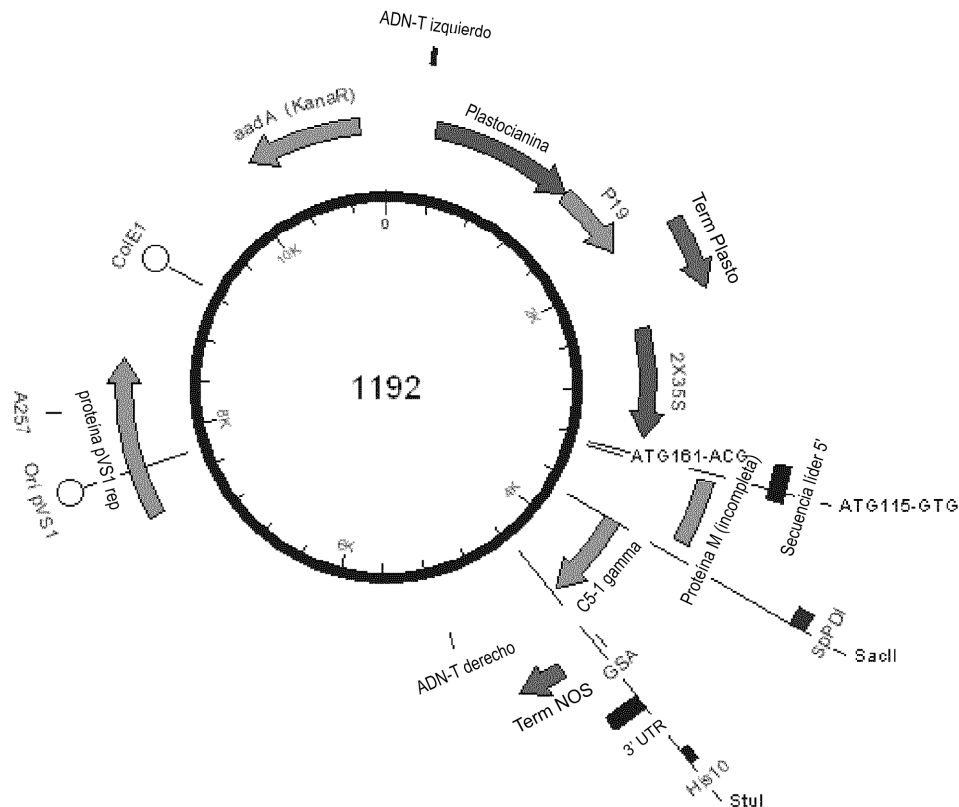


Figura 4E

Constructo 1192 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados).
 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento
 Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º 18)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
 ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
 AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATT
 TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTG
 CAACATTTGAGAAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
 GGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACAAAATAGTTGTAC
 AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
 CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAAATAAATTATTTTAA
 AATTAAGTTGAGTCATTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
 TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTGACATTTGATCTTTTCCCTATATATTGCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTATATTTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCAAAAA
 AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA

ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
 ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
 AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCCTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAAGTTGTATTAAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
 CTGCACAGAGTCCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTGCGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTGCGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTTCGCGAACT
 CTTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCAGTAAGTTAAAA
 TGCTTCTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTTGTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
 AGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
 ACAACTAAAAATGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
 CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTACTA
 ATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCG
 TTGGGAATTACTAGCGCGTGTGACAAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCT
 ACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAA
 TATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGA
 AGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGT
 GGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCA
 AAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGAT
 ACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAAATATCCGGAAACCTCCTCGGA
 TTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCC
 ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
 CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG
 ATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGG
 AAGTTCAATTCATTGGAGAGGTATTAATACTTAAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCG
 AACCAAACCTCTCTTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTCTCTCTTGTCTTCTTGTGCGTGAGC
 GATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACGATACAAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAG
 ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCAGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGCGTGTGGTCT
 TGGGAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTC
 GCGGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTCTCTTCTGCTG
 ATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAG
 ATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGCGGGCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTT
 ATTGTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGCGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCA
 TCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAA
 GGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTC
 CCAGCTGCTCTGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTTGCCCCA
 GCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAAGAAAATTGTGCCCA
 GGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAAG
 CCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATG
 ATCCCGAGGTCCAGTTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGA
 GGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGC
 AAGGAGCGATCGCTACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAAT
 TTAAGTGTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGT
 AATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTT
 TATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAC
 ATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGATGATTATCATATAATTTCTGTT
 GAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTA
 GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAAATAGGATAAATTTAT
 CGCGCGCGGTGCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGC

ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCA
 CATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA
 GCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACT
 ATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 4F

Casete de expresión número 484 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/H1 de la gripe
 A/California/7/2009 (H1N1) está subrayado. (Id. de sec. n.º 19)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTATTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTCTCACTGAAGCGAAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGATAGTGCAGGCGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTACAGCCCA
 TACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGTTTTTCGAACCTTGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGGGC
 CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCG
 CCGACACATTATGTATAGGTTATCATGCGAACAAATTCACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAAGA
 ATGTAACAGTAACACACTCTGTAAACCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACTAAGAG
 GGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAATGTAAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATC
 ACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCTACATTGTGAAACACCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCA
 GGAGATTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTATCATTTGAAAGGTTTGAGA
 TATCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGCTCTCATGC
 TGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAG
 CAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCCTCGTGCTATGGGGCATTCACCATCCATCTACTAGT
 GCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGGTTCATCAAGATACAGCAAGA
 AGTTCAAGCCGGAATAGCAATAAGACCAAGTGAGGGATCAAGAAAGGAGAATGAACTATTACTGG
 AACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTGGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCA
 TTCGCAATGGAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATAACACAGTCCAGATTGCAATACAA
 CTTGTCAAACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAAGCCTCCCATTTTCAGAATATACATCCGATCACAATTGG
 AAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATATCCCGTCTAT
 TCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGA
 TGGTACGGTTATCACCATCAAAATGAGCAGGGGTGAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAAT
 GCCATTGACGAGATTACTAACAAAGTAAATCTGTATTGAAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAG
 GTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAGAAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTGG
 ACATTTGGACTTACAATGCCGAACCTGTTGGTTCTATTGGAAGAAATGAAAGAACTTTGGACTACACGATT
 AAATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTAAGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATTTGGAACG
 GCTGCTTTGAATTTTACCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTA
 CCAAAAATACTCAGAGGAAGCAAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAA
 GGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTTATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCA

ATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAAAGGCCTATTTCTTTAG
 TTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTAT
 TTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATT
 TTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGT
 TCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATT
 TCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTA
 TGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATA
 AATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 4G

Secuencia de aminoácidos de PDISP-H1 de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) (Id. de sec. n.º 20)

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDK
 HNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFI
 DYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGN
 SYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAI
 RPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDC
 NTTCTQTPKGAINSTLPPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIE
 GGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTA VGK
 EFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQK
 NNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQIL
 AIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

E-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H3 Perth/NOS (número de constructo 1019)

Figura 5A

IF-S2+S4-H3 Per.c (Id. de sec. n.º 21)

TCTCAGATCTTCGCCCAAAAACCTTCCTGGAAATGACAACA

Figura 5B

IF-Sla4-H3 Per.r (Id. de sec. n.º 22)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTT

Figura 5C

Gen H3 sintetizado (correspondiente a nt 26-1726 del número de registro Genbank GQ293081)
(Id. de sec. n.º 23)

ATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCTACATTCTATGTCTGGTTTTTCGCTCAAAAACTTCCTGGAAATGACAA
CAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAAACAATCACGAA
TGACCAAATTGAAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGT
CCTCATCAGATCCTTGATGGAAAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATG
GCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTGTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAAACTGTTACCCCTTATGA
TGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCAGTGTGCTCATCCGGCAGCACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCT
TCAATTGGAGTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAAAAACAGTTTCTT
TAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAACTTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAAT
GAACAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCCACCCGGGTACGGACAAAGACCAAAATCTTCCTGT
ATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAAGAAGCCAACAAACCGTAAGCCCGAATATCG
GATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAAACCGGGAG
ACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAAATACGAAGTGGGAA
AAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGC
ATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAATGTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCAGATATGTTAAGC
AAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAACTAGAGGCATATTTGGCG
CAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAA
ATTCTGAGGGAAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAAATCAATGGGA
AGCTGAATAGATTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCATCAGATTGAAAAAGAATTCTCAGAAGTCG
AAGGGAGAATTACAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACTAAAAATAGATCTCTGGTCATACAACGCGG
AGCTTCTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAACTGTTTGA
AAAAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAAATATACCACAA
ATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGC
ATTAAACAACCGGTTTCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCAGGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATT
TCCTTTGCCATATCATGTTTTTGTCTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAAGGC
AACATTAGGTGCAACATTTGCATTGA

Figura 5D

Casete de expresión número 1019 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) está subrayado. (Id. de sec. n.º 24)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGG
 TTTTGATAAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAAACTTCTTCTAACTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGTCTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTCTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAAGTGGCGGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGC
 CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTTCCTTCTCAGATCTTCG
 CCAAAAACTTCTGGAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACG
 GAACGATAGTGAAAAAATCAGCAATGACCAATGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTC
 CTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCTCATCAGATCCTTGATGGAAAAACTGCACACTAATAGATGCT
 CTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAAGCAAG
 CCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGC
 AACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGCTCTGCTTGCA
 TAAGGAGATCTAAAAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAACTTCAAATACCCAGC
 ATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAACAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTTACCACCCGGGT
 ACGGACAAAGACCAATCTTCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAGAAGC
 CAACAAACCGTAAGCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATC
 TATTGGACAATAGTAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGG
 GTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAAATGCAATT
 CTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAATGTAAACAGGATCACATA
 CGGGGCCTGTCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGA
 GAAACAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGA
 TGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGGAAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCA
 AGCAGCAATCGATCAAAATCAATGGGAAGCTGAATAGATTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCA
 GATTGAAAAAGAATTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATTGAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACTAA
 AATAGATCTCTGGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGTGTCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACT
 GACTCAGAAATGAACAACTGTTTGAAGAAAAAGCAAGCAACTGAGGGAAAAATGCTGAGGATATGGG
 CAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTAT
 GACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAACAACCGGTTTCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCA
 GGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTGTCTTTGTGTTGCTTTGTTGGG
 TTTCATCATTTGGGCTGCCAAAAAGGCAACATATAGGTGCAACATTTGCATTTGAAGGCCTATTGTTTGA
 TTTGAATTTACTGTTATTCGGGTGTGCTTCTATGTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGATTGTTTAT
 TTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATT
 TTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGT
 TCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATT
 TCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTATGAGATGGGTTTTTA

TGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATA
AATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 5E

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) (Id. de sec. n.º 25)

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTTITNDQIEVT
NATELVQSSSTGEICDSPHQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNC
YPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNFNWTGVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTHL
NFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVSPNI
GSRPRVRNIPSRSIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSEC
ITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENG
WEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFS
EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFEKTKKQLRENA
EDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWI
SFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

F-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HAB Brisbane/NOS (número de constructo 1029)

Figura 6A

IF-S2+S4-B Bris.c (Id. de sec. n.º 26)

TCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATAACAT

Figura 6B

IF-Sla4-B Bris.r (Id. de sec. n.º 27)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCAAGAAACA

Figura 6C

Gen HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a nt 34-1791 del número de registro Genbank FJ766840) (Id. de sec. n.º 28)

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGAATAACAT
CGTCAAACTCACCACATGTCGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAATACCACT
GACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGGAACTATGCC
AAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAAAATACCCTC
GGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGA
ACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTA
TCAATGCAGAAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGGCCTAACATTACCA
ATGGAACCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAACAGCAACAA
ATCCATTAAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAAATTACCGTTTGGGGGTCCA
CTCTGACAACGAGACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCC
AACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCAATCAAACAGAAGACGGAGGACTA
CCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAAACAGGAACAATTACCTATC
AAAGGGGTATTTATTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCT
TGCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGAATTAACAAAAAGCAAGCCTTACTA
CACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAAATTGCCCAATATGGGTGAAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAA
TGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTC
TTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTA
GCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTG
AGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACCTCACAACGAAATACTA
GAACTAGATGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAAGCTCGCAGTCCTG
CTTTCCAATGAAGGAATAATAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAA
ATGCTGGGCCCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAACACAAGTGAACACAGACC
TGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTCTCTCCCACTTTGATTCACTGAA
TATTACTGCTGCATCTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTG
CCTCCAGTTTGGCTGTAACACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTT
GCTCCATCTGTCTATAA

Figura 6D

Casete de expresión número 1029 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (Id. de sec. n.º 29)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCTTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCAGCGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTTATCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGC
 CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCG
 CCGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCAAACCTGCTACTCAAGGGGA
 GGTCAATGTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAAATCTCAAAGGA
 ACAGAAACCAGGGGGAAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGA
 CCAAAATGCACGGGGAAAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTG
 GGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACA
 TATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGAGGACCTACAAAATTGGAAC
 CTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAACCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCGCTCCAAAAA
 AACGACAAATAACAAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCATAACATTTGTACAGAAGGAGAA
 GACCAAAATACCGTTTGGGGTTCCACTCTGCAACGAGACCCAAATGGCAAAAGCTCTATGGGGACTCAA
 AGCCCCAGAAAGTTCACTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCC
 AAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAAATC
 TGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCAGAAAGTGG
 CAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCCTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGG
 TGGATTAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATG
 GGTGAAAACACCCCTGAAGCTGGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAAGGAAAG
 GGGTTTTCTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGA
 TACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAAC
 AAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCC
 ATGGATGAATCCACAACGAAATACTAGAAGTAGATGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATA
 AGCTACAAATAGAACTCGCAGTCTGCTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCT
 TGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTG
 AAACCAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAAT
 TTTCTCTCCCCACCTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCAT
 ACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTT
 TATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGTCTCATCTGTCTATAAAGGCCATTTTCTTTAGTTTGAATTTA
 CTGTTATTCCGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAAT
 TTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTAT
 TAAAAAAGGAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATT
 TGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAA
 TTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAG

TCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCG
CGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 6E,

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 Id. de sec. n.º 30

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTK
SHFANLKGTTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGKIPSARVSILHEVRPVTSGCFPIM
HDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAW
AVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCA
SGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSYPYTGEGHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTK
YRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINK
ITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELAVLLSNEGIIN
SEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDS
LNITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFVYVMVSRDNVSCSICL

G-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA Brisbane/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+ Replicasa (número de constructo 1008)

Figura 6F

Representación esquemática del constructo 1194. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

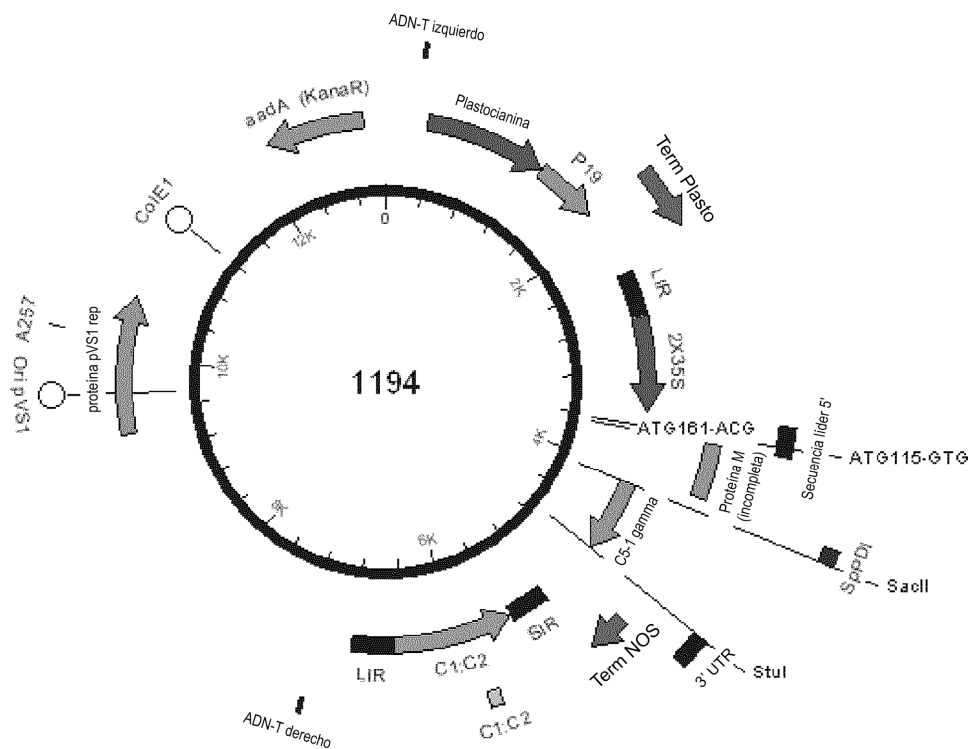


Figura 6G

Construto 1194 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados).
2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (Id. de sec. n.º 31)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATT
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTG
CAACATTGAGAAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAG
GGGAGATAAAAAACAATGTAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAATAGTTGTGAC
AAATATCATTAGGAATTTGACAAAAGCTACAAAATAAGGGTTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGA

CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTAA
 AATTAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
 TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA
 AAAAAACGGTATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA
 ACATCCAATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
 ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
 AAGTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTCAAACATCCCTGACGAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
 CTGCACAGAGTCTTGGATCTTGGACGGGAGATTGCGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAAT
 CTTGAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
 TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTGTTCCTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTTGTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
 AGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
 ACACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
 CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTACTA
 ATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCTTCAGTTTGCAAGCTGCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCG
 TTGGGAATTACTAGCGCGTGTGACACGCGTGGCGCGCCCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAG
 GGGTTGCCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGT
 AGTTAGTGGAATAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTT
 AATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAA
 GTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAG
 CGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTGCGATACGAATTATTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGTCAACATGGT
 GGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGA
 GACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTG
 TGAAGATGTTGGAAGGAAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATTCGATGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTG
 AAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAAG
 ACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTA
 CTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAAT
 ATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAGGAA
 GGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTG
 GTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAA
 AGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGA
 CCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTTGATAAAGC
 GAACGTGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCT
 TGCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAAGATCTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTTCA
 CTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTA
 TTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTACAGCCCCATACATTACTTGT
 ACGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCCTGACTTC
 TTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGT
 TTTGAACTTGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGGCCATGGCGAAAA
 ACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGCGGCTCCTC
 AGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTG
 ACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGT
 CCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTC
 CCCTCCAGACCTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGCGGACGACCAAGGTG
 GACAAGAAAATTGTGCGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCCATATGTACAGTCCCAAGGATATCATCTG
 TCTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTG

GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA
GCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGC
ACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATT
TCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTC
CTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTTATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAA
AGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAA
GATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATA
ATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTA
ATACGCGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGCATCTATGTT
ACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCGAGTGTACTTCAAGTCAGT
TGGAAATCAATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTCAATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTAC
ATAACACACGAAATAAAACAAAAAACACAATCCAAACAAACACCCCAAAACAAAATAACACTATATAT
ATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCACTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCCGTCACAC
ATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCTTCTGTTGACTTGTGATTGATAACATCCAGTCTTC
GTCAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTCTTCTTTTTCCATATTTAGGGTTGA
CAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGAT
GATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCAGTAGTTGTGTGCGCCGA
GACTTCTAGCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGAGTTGGTCCGAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCC
AGTCCTTCCCTCATCTGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTGAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAG
GATGTATGAAAGTGATAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCG
TGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTA CTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGG
CTGAATATTCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAGATAC
TCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATCGTGCCTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTAT
GATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTC
TAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCTTCAAATCGAAAAAAGAAAGATCCCTAATACAAGGTTTTTT
ATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAA
GAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTG
GGGTAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGAC
TCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTATCTTATAACCGGCGTGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGGTAAT
TTAAGTAGTTAGTGAAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCC
GAATTTTAATATTACCGGCGTGCGCCACCTTATCGCAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAG
TAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTTACACTATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTT
GATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACGGCCGCGCCACTAGTGGCA
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC
ATCCCCCTTTCCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTAT
CAGTGTGTTGACAGGATATATTGGCGGTTAAACCTAAGAGAAAAAGAGCGTTTA

Figura 6H

Casete de expresión número 1008 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV.
PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (Id. de sec. n.º 32)

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTATCTTATAACCGGCGTGAGGC
ATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGT
CTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGCGCCACCTTATCGCGAGTGCTTT
AGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTTACACTATAA
AAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTA
TTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
GATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCTC
GGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
GCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAC

CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAAGTGATTGAT
 GTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
 AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT
 CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC
 GTGGAAGAAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAAGTGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
 GGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAG
 AGGTATTAATACTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAA
 CTCTCTCTCATCTCTCTTAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGA
 TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGGGACCTGTAG
 TGGCGCGCATTAATAACGTGTACTTGTCTTCTTCTTGTCTGTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTG
 GAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGAATATCTCTAC
 TTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCT
 AGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTGGAGAAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATAT
 TCTGCCCAAATTTGTGCGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTGTGT
 GGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCA
 AAAGTCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAATCTC
 ATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGAAACTATGCCCAAAATGCCCTCAACTGCACAGATC
 TGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAAAATACCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATG
 AAGTCAGACCTGTACATCTGGGTGCTTTCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAA
 CCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGA
 GGACCCCTACAAAATTTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAA
 TGGCTTGGGCGCTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCAT
 ACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAAATTACCGTTTGGGGGTTCCACTCTGACAACGAGACCCAAATGG
 CAAAGCTCTATGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGT
 TTCACAGATTGGTGGCTTCCCAAAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTT
 GATTACATGGGTGCAAAAATCTGGGAAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCCTCAA
 AGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCCTTAAATGGAGAAGCAGATT
 GCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAAGGCCA
 TAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTGAAGCTGGCAATGGAACCAAAATATAGACCTCCTG
 CAAAACCTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAA
 TGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGA
 GCACTCAAGAGGCCATAAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATC
 TTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATG
 ATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAA
 CAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCCCTCTGCTGTAGA
 GATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGG
 TACCTTGATGCAGGAGAATTTCTCTCCCCACCTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATG
 ACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCCTCCAGTTTGGCTGTAACACTG
 ATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGTCTCCATCTGTCTATAAAGGCCT
 ATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAG
 AGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGTCTCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACA
 CAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAC
 CTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGCATGATT
 ATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAG
 ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAATATAGCGCGCA
 AACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGG
 GGTACCGAGCTCGAATTCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAATCAATAAAATGATTATTTTATGAATA
 TATTTCAATTGTGAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATAACACACGAAATAAACAAAAAACACAAT
 CCAAAACAAACACCCCAACAAAAATAACACTATATATATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCAAGTGAC
 TCGACGATTCGGAGCAAAAAAGTCTCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTA
 ATCCTTCTGTTGACTGTTCATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAGAATTATAGAAGGGATCC
 CACCTTTTATTTTCTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTTGCT
 TCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTTCATCGTAGTTGGT

GAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGA
GTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCCAGTCCTTCCCTCATCCTGGTTAGATCGGCCATC
CACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGGTAGGCATCGATGCTTACAT
GATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGA
CACGTA CTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCC
ATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAGATACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTT
CGCCATCGTGCGTCAGATTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCC
GTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCCTTCAA
AATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATAACAAGGTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAG
TGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAAGAAAAATAAGAAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGA
GAAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAAACATATTTAGATTGGA
GTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAA
CCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTAC
TTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTA
TCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTG
TTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCG
GATACGAATTATTCGTAC

Dominio transmembrana H-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA Brisbane/H5 Indonesia y cola citoplasmática (H5Indo TMCT)/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa (número de constructo 1009)

Figura 7A

B Bris-dTmH5I.c (Id. de sec. n.º 34)

TTGACAGTATTTGGTAATTATCCAATCCATCGTCATTAAAGATGCAGCA

Figura 7B

B Bris-dTmH5I.c (Id. de sec. n.º 34)

CATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATTACCAAATACTGTCAATTTAT

Figura 7C

IF-SlaS4-dTmH5I.r (Id. de sec. n.º 35)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGATCCAT

Figura 7D,

Casete de expresión número 1009 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA BBrisbane/H5Indo TMCT está subrayado. Id. de sec. n.º 36

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGC
ATGGAGGCAAGGGCATTGTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGT
CTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTT
AGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAA
AAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTA
TTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
GATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTC
GGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
GCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTAT
CTGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC
GTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
GGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTATTGGAG
AGGTATTAAAACTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTCTAAA

CTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTTCGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGA
 TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAG
 TGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCTG
 GAGGCTGCTGTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTAC
 TTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCT
 AGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATAT
 TCTGCCCAAATTTGTGCGGGCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTT
 GGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACTCACCACATGTCGTCA
 AAAGTGTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTC
 ATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGGAAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATC
 TGGAGCTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGAAAAATACCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATG
 AAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAA
 CCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGA
 GGACCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAA
 TGGCTTGGGCGCTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCAT
 ACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAAATTACCGTTTGGGGGTTCCACTCTGACAACGAGACCCAAATGG
 CAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGT
 TTCACAGATTGGTGGCTTCCCAAAATCAAACAGAAAGACGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTT
 GATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAA
 AGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCTTTAATTGGAGAAGCAGATT
 GCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAAGGCCA
 TAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTG
 CAAAATATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAA
 TGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGA
 GCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTGTAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATC
 TTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATG
 ATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAA
 CAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAGAAAGCTGAAGAAATGCTGGGCCCCCTCTGCTGTAGA
 GATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGG
 TACCTTTGATGCAGGAGAATTTCTCTCCCCACCTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATG
 ACGATGGATTGGATAATTACCAAATCTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTGACACTGGCAAT
 CATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGGC
 CTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTC
 AGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGG
 ACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATC
 GACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATG
 ATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTAT
 GAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGC
 GCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCG
 CGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCAATAAAATGATTATTTTATGA
 ATATATTTTATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATAACACAGAAATAACAAAAAACAC
 AATCCAAAACAAACACCCCAAAACAAAATAACACTATATATATCCTCGATGAGGAGAGGCACGTTCAAGT
 GACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCCGTACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAA
 GTAATCCTTCTGTTGACTTGTGATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGG
 ATCCACCTTTTATTTCTTCTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAAT
 TGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGT
 TGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTGCGCCGAGACTTCTAGCCAGGTGGTCTTTCCGGTA
 CGAGTTGGTCCGACAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCCTTCCCTCATCCTGGTTAGATCGGC
 CATCCACTCAAGGTGAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAGGCATCGATGCTT
 ACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGACAGATCTTCGTGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGG
 GCGACACGTAAGTGTGAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATTCAGCCATTGAAGCTTTGT
 TGCCCATTCATGAGGGAATTTCTTTGATCATGTCAAGGATACTCCTCCTTAGACGTTGCACTGTGATAA
 TAGTTCCGCATCGTGGGTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGTTTAAATA
 TCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTC

TTCAAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTG
GGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTC
CCAGAGAAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAAACATATTTAGA
TTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCT
TATAACCGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGTAGTTAGTGAAAAATGACGTC
ATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGCGTGGCCCC
ACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTA
AAGGTGTTCACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATT
TCCGTCGGATACGAATTATTCGTAC

Figura 7E,

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane/H5Indo TMCT (Id. de sec. n.º 37)

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTTPTK
SHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGKIPSARVSILHEVRPVTSGCFPI
HDRTKIRQLPNLLRGYEHRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAW
AVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKQVWCA
SGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTK
YRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINK
ITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGIIN
SEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDS
LNITAASLNDDGLDNYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI

I-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane con bucle proteolítico deleciónado/NOS en el sistema de amplificación de BeYYDV+Replicasa (número de constructo 1059)

Figura 8A,

1039+1059.r (Id. de sec. n.º 38)

CTTCCCATCCTCCACCAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGCCAGCTTCAA

Figura 8B

1039+1059.C (Id. de sec. n.º 39)

CAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAC

Figura 8C,

Casete de expresión número 1059 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV.
PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico deleciónado está subrayado.
(Id. de sec. n.º 40)

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGC
ATGGAGGCAAGGGCATTGTTGGTAATTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGT
CTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTT
AGCAGGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCGCGCCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAA
AAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTA
TTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
GATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTC
GGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
GCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT
CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATC
GTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
GGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTATTGGAG
AGGTATTAATACTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAAACCTTCTTCTAAA
CTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGA
TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAG
TGCGGCGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTG
GAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTAC
TTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCT
AGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTGAAGTGGAGAAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATAT
TCTGCCCAAATTTGTGCGGGCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGCGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTT
GGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCA
AAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAAACAACACCCACCAATCTC
ATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGGAAACTATGCCCAAAATGCCCTCAACTGCACAGATC

TGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATG
 AAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAA
 CCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGA
 GGACCCTACAAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAA
 TGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAAGTACCAT
 ACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAAATTACCGTTTGGGGGTTCCTCTGACAACGAGACCCAAATGG
 CAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGT
 TTCACAGATTGGTGGCTTCCCAAAATCAAAACAGAAGACGGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTT
 GATTACATGGGTGCAAAAAATCTGGGAAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAA
 AAGTGTGGTGCAGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCTTTAATTGGAGAAGCAGATT
 GCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAAGGCCA
 TAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAAACACCCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAAATATAGACCTCTG
 GTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGG
 TGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTG
 AGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAAC
 TAGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCTGCTTTC
 CAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAAATGCT
 GGGCCCCCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTC
 GACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCACCTTTGATTCACTGAATATTAC
 TGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCCTCCA
 GTTTGGCTGTAACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCC
 ATCTGTCTATAAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGA
 GCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTC
 GTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAGGATTTTCTTAAGATTGAATCCTGTT
 GCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATG
 CATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAA
 ACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTATCTATGTTACTAGATCTCTAGAG
 TCTCAAGCTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCAATAAAA
 TGATTATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGAATAACATATGTTACATAACACACGAAAAA
 AACAAAAAACACAATCCAAAAACAACACCCCAAGACAAAAATAACACTATATATATCTCGTATGAGGAG
 AGGCACGTTCAAGTGAAGTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCCGTCACACATATAGTGGGTGACG
 CAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCAATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAG
 AATTATAGAAGGGATCCACCTTTTATTTCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAATCAGACT
 GGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGC
 GTGTTATCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCAGTAGTTGTGTCGCCCCGAGACTTCTAGCCCAGG
 TGGTCTTCCGGTACGAGTTGGTCCGAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCTTCCCTCATCC
 TGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGTTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTA
 GGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGGCAGCGGAGATCT
 GATTCTGTGAAGGGCGACACGTAAGTCTGCTCAGGTGTGGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATCCAGCC
 ATTGAAGCTTTGTTGCCATTATGAGGGAATTTCTTTGATCATGTCAAGATACTCCTCTTATAGACGTT
 GCAGTCTGGAATAAGTTCCGATCGTGCCTCAGATTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTC
 CTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATAT
 TAGGGTGATTTCTTCAAATCGAAAAAAGAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTTATCAAGCTGGATAAG
 AGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAAATAAGAAAAAG
 GTGTGAGTTTCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAA
 AACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCC
 TCAAACCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTG
 GAAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTTAAATATTAC
 CGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGC
 CCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATT
 GTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTTCGTAC

Figura 8D

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado (Id. de sec. n.º 41)

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTGVIPLTTTPTK
SHFANLKGTTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGKIPSARVSILHEVRPVTSGCFPI
HDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAW
AVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKQVWCA
SGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTK
YRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQ
RLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMM
LGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGDLNH
TILLYYSTAASSLAVTLMIAIFVVYMVSRDNDVSCSICL

Figura 8E secuencia de nucleótidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico delecionado (Id. de sec. n.º 43)

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCC
GATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGG
TCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAAC
AGAAACCAGGGGGAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACC
AAAATGCACGGGGAAAATACCCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGG
TGCTTTCCTATAATGCACGACAGAAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACATA
TCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTC
AGGGTCTTGCCTAACATTACCAATGGAACCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAAC
GACAAAAACAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCATAACATTTGTACAGAAGGAGAAAGAC
CAAATTACCGTTTGGGGTTTCACTCTGACAACGAGACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGC
CCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCAA
TCAAACAGAAGACGGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGG
GAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAG
GAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCCTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGG
ATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGT
GAAAACACCCTTGAAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGAT
TGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCAGATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCAC
TCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCA
AAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATGATCT
CAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAG
TGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGAT
AGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAACACAAGTGAACCCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTAC
CTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCACCTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACG
ATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAAACTGATG
ATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAA

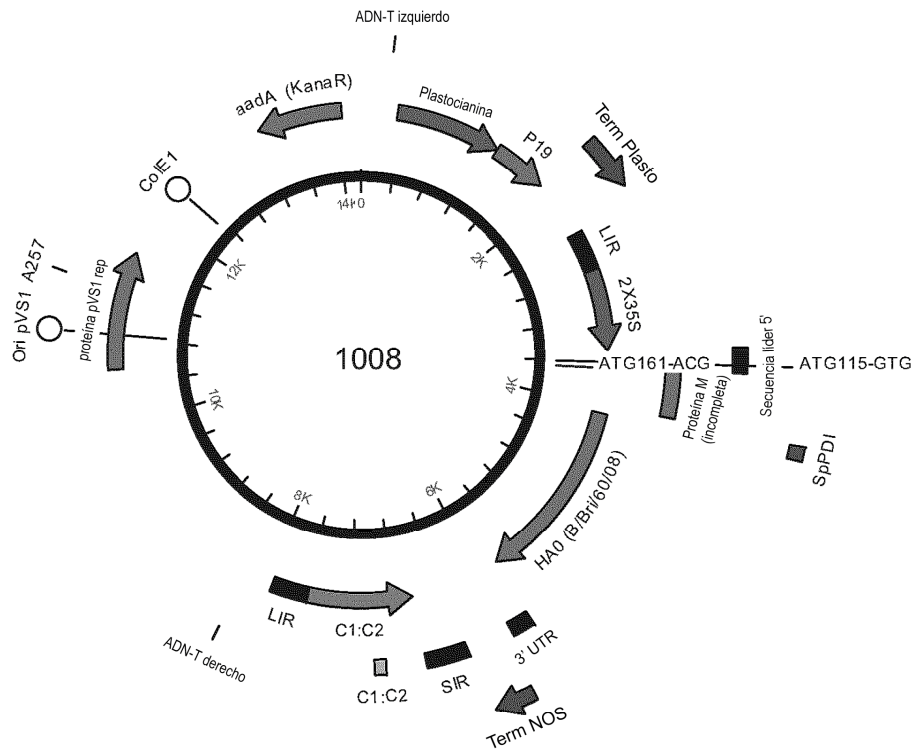


Figura 9

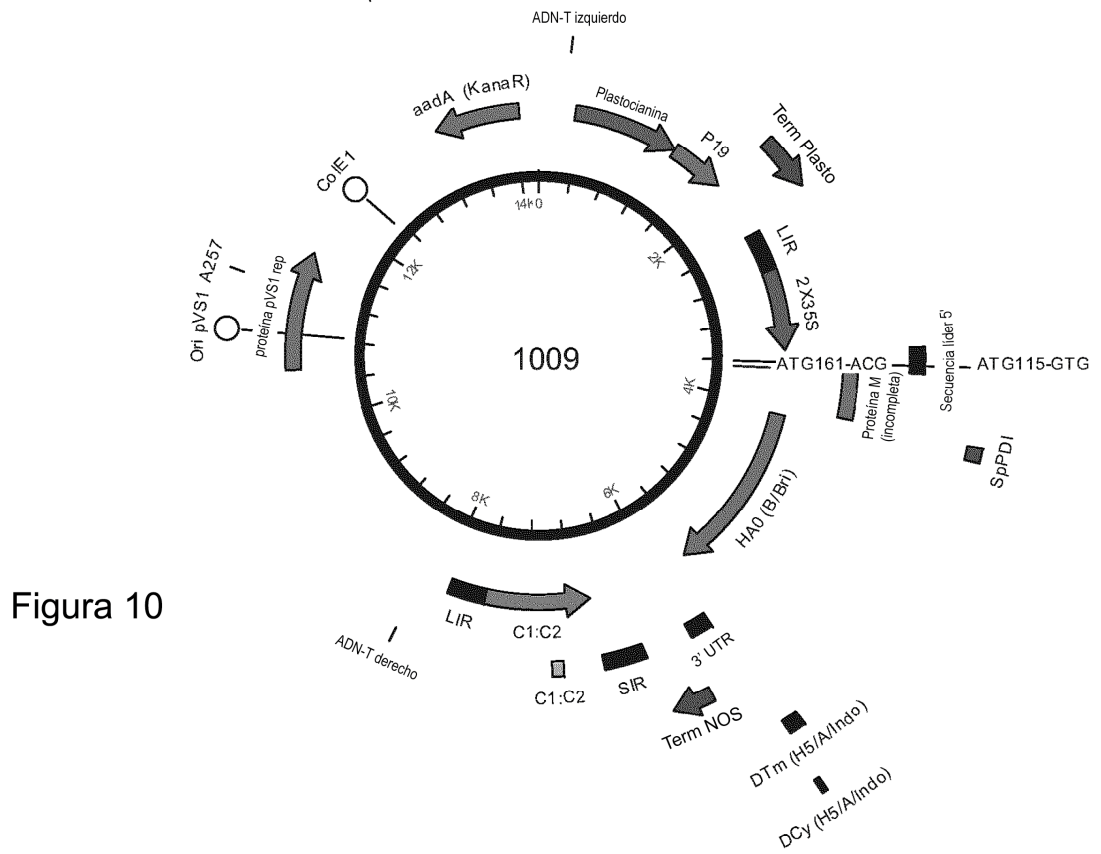


Figura 10

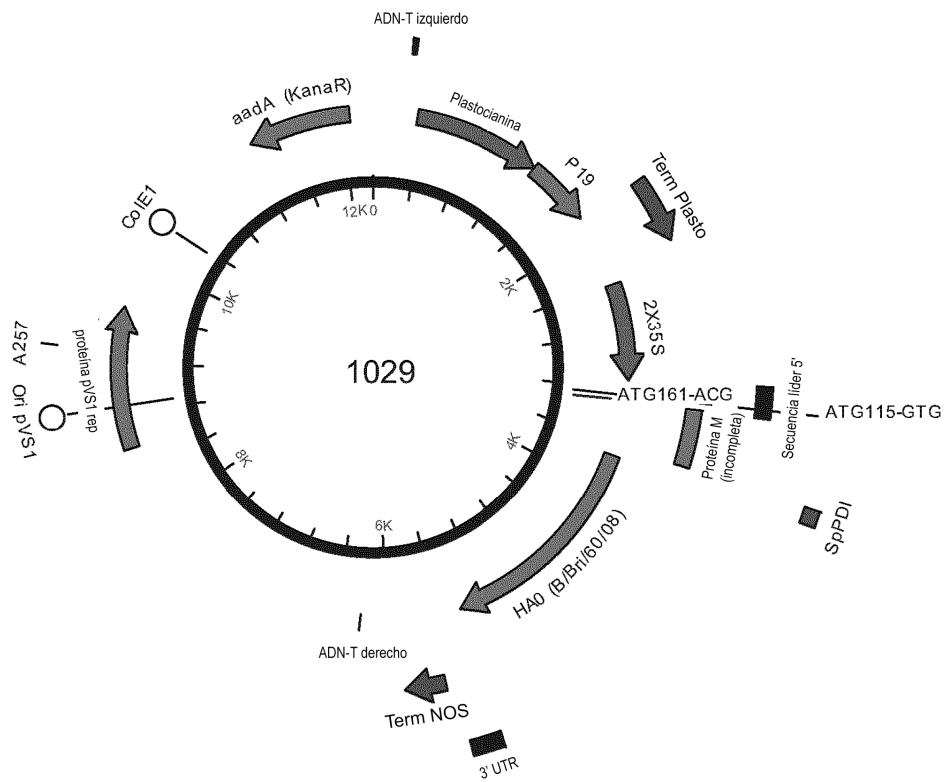


Figura 11

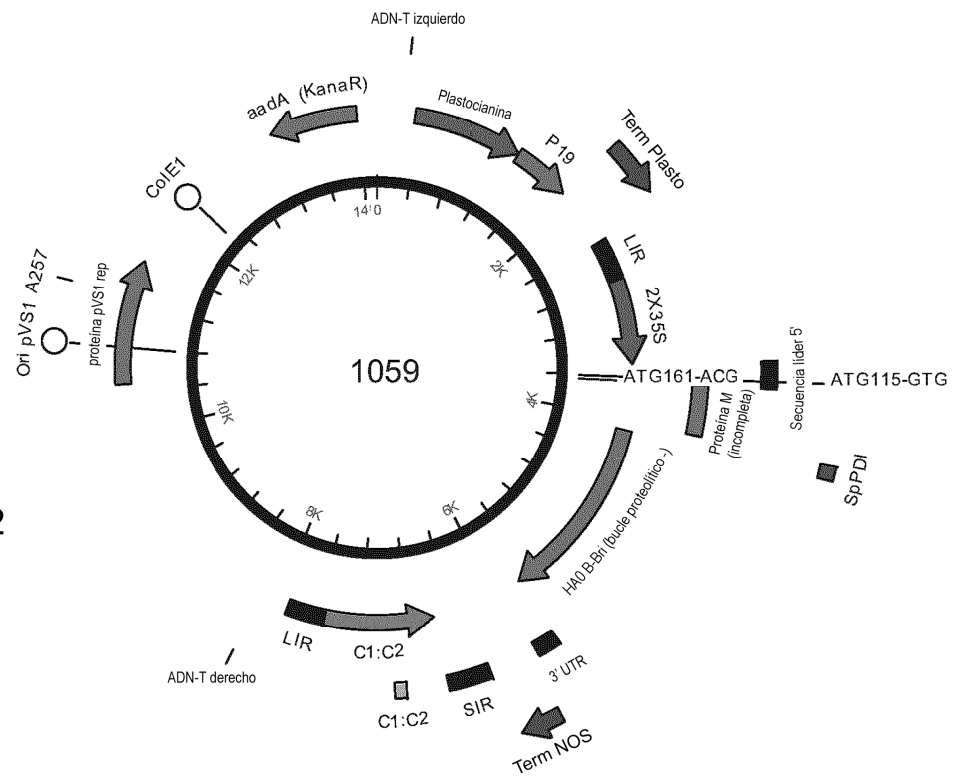


Figura 12

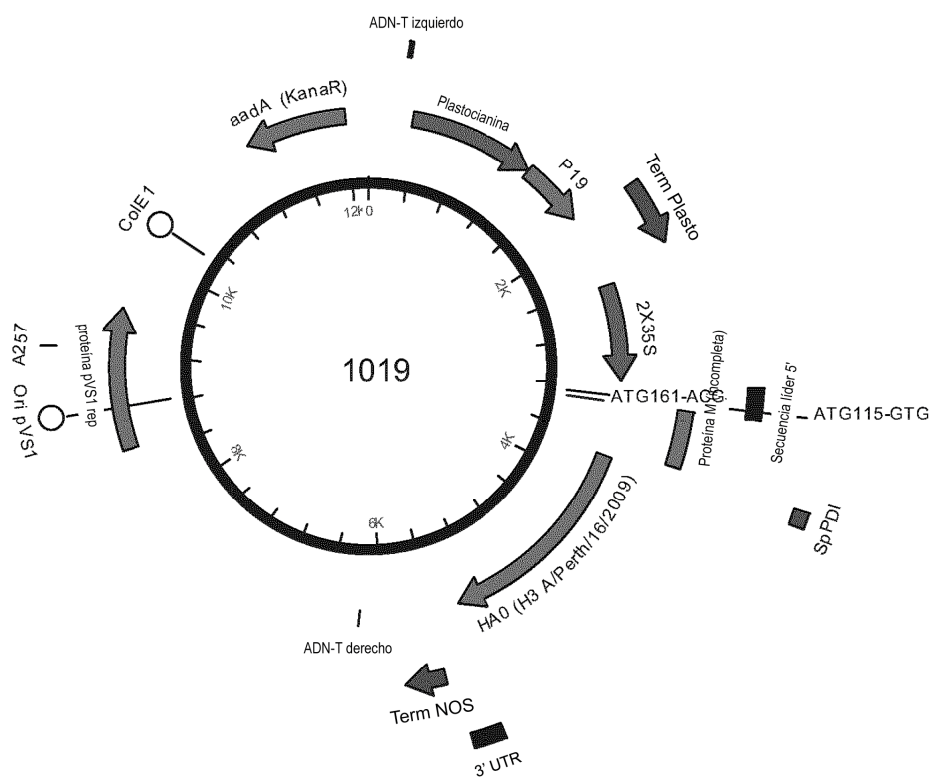


Figura 13

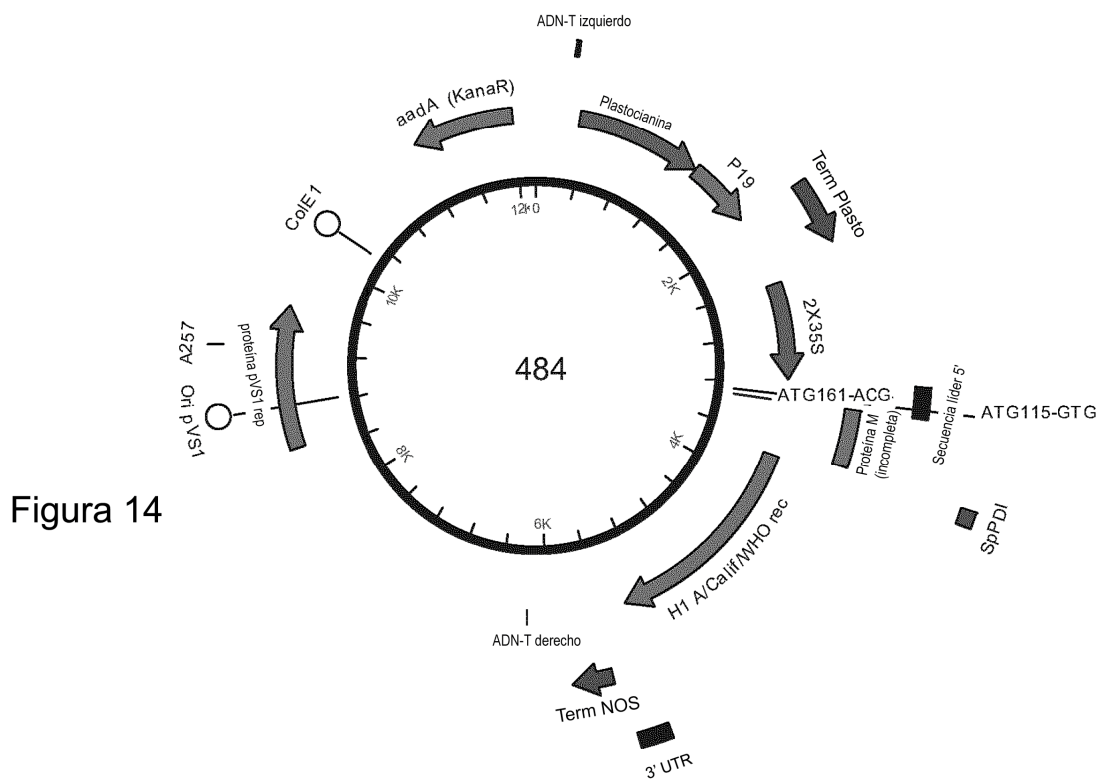


Figura 14

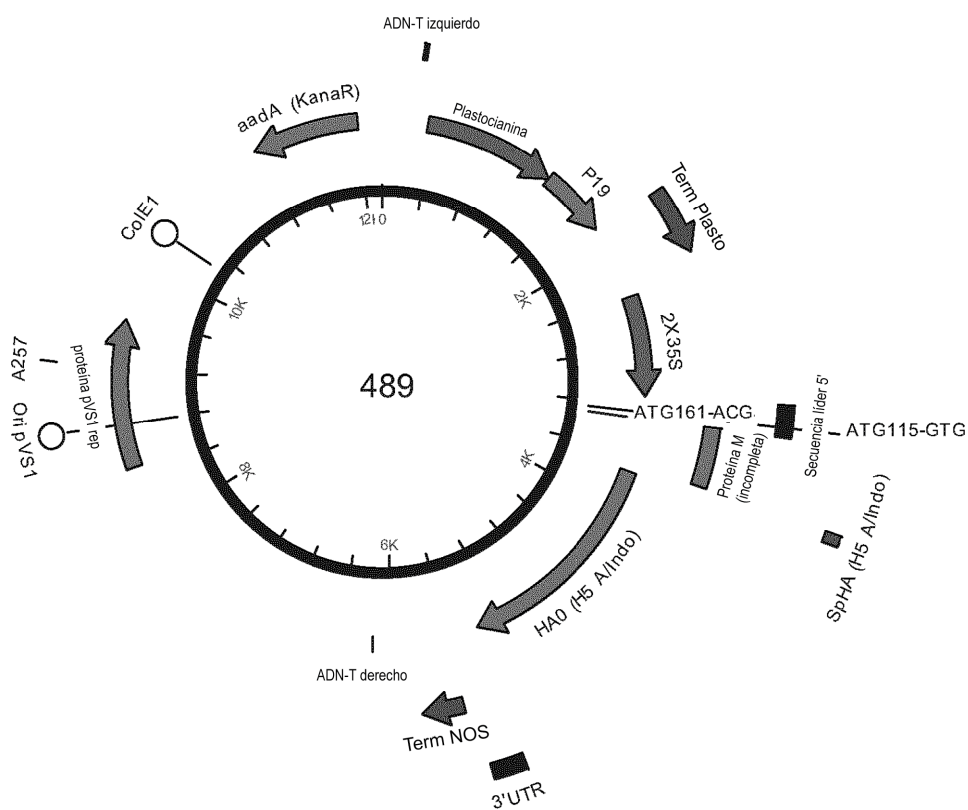


Figura 15

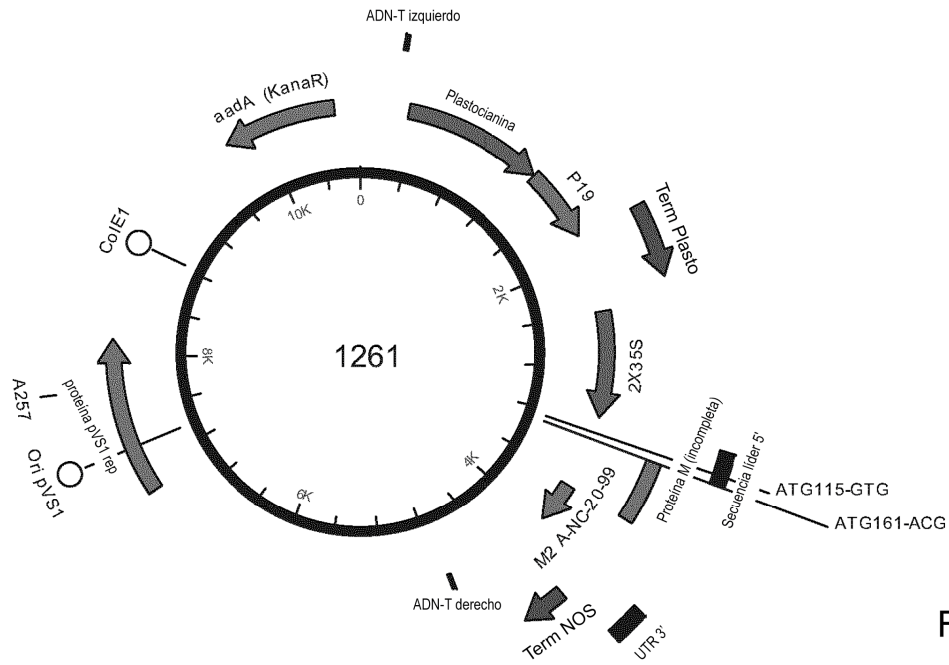


Figura 16

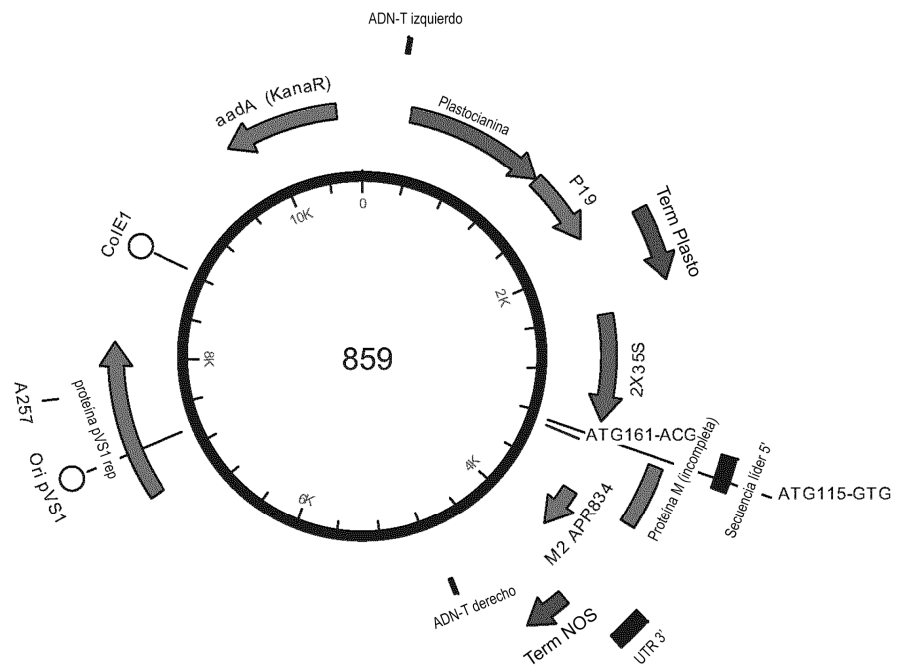


Figura 17

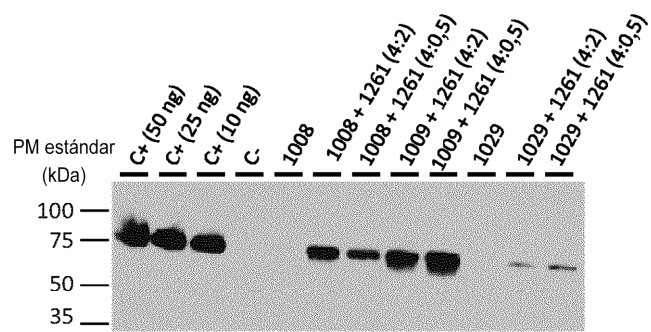


Figura 18

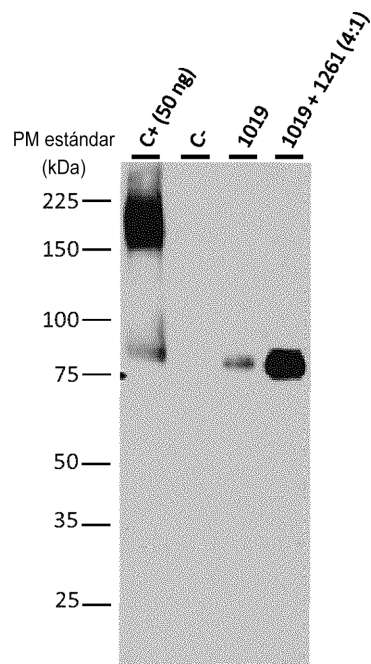


Figura 19

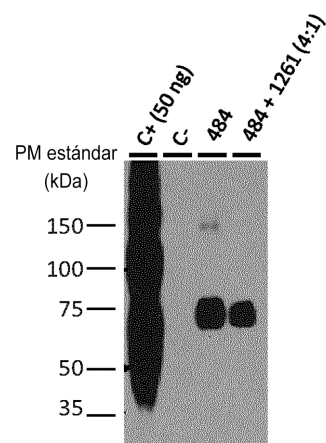


Figura 20

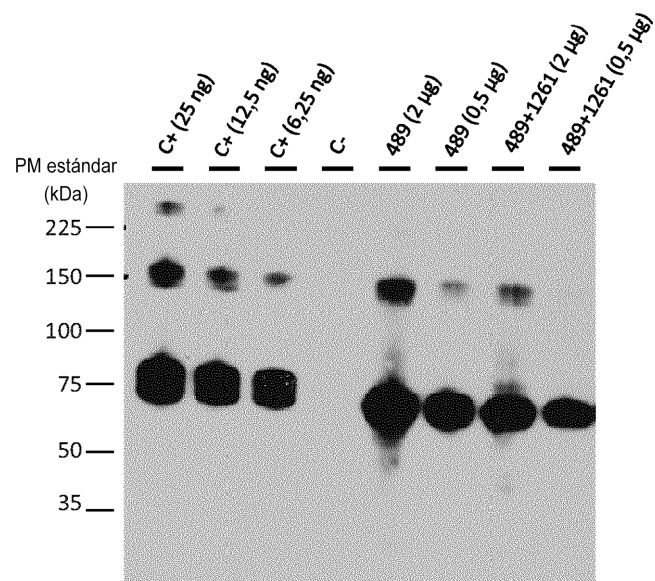


Figura 21

Figura 22A.

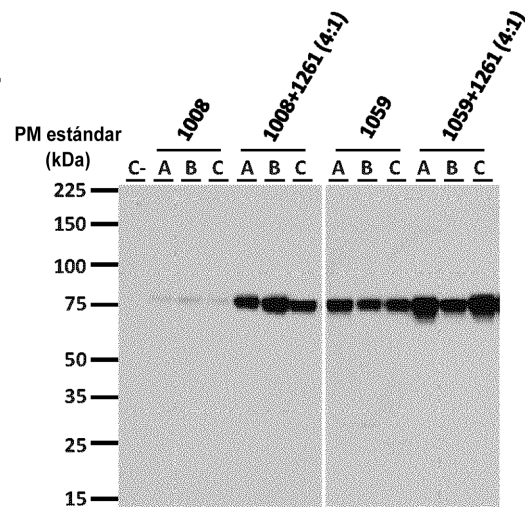


Figura 22B.

Número de constructo	Capacidad de hemaglutinación (unidades de HA/mg de proteína) ^a
1008	533
1008 + 1261 (4:1)	3200
1059	4267
1059 + 1261 (4:1)	34133

^a Inverso de la menor cantidad de proteína total necesaria para una reacción de hemaglutinación positiva en un volumen final de 200 µl.

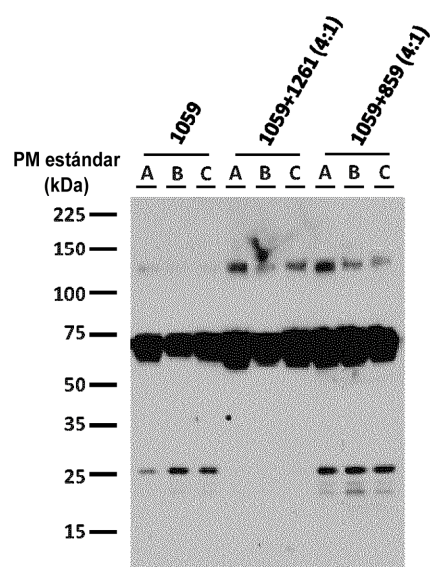


Figura 23A.

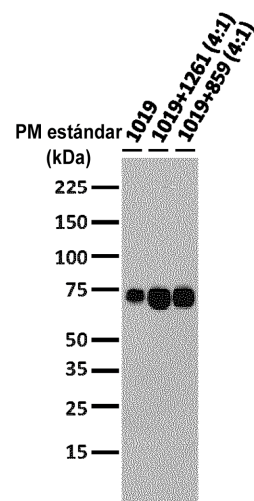


Figura 23B.

	250	260	270	280	290
H1 NCW CSI	V R S A K L R M V T G L R N	- - - - -	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G C	
H1 Brisbane	V R S A K L R M V T G L R N	- - - - -	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G C	
H1 Sollislands	V R S A K L R M V T G L R N	- - - - -	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G C	
H2 A_Singapur	V K S E K L V L A T G L R N	- - - - -	- - - - -	V P Q I E S R G L F G A I A G F I E G C	
H3 A_Brisbane	V K Q N T L K L A T G M R N	- - - - -	- - - - -	V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N C	
H3 A_WCN	V K Q N T L K L A T G M R N	- - - - -	- - - - -	V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N C	
H5 Anhui	V K S N K L V L A T G L R N	- - - - -	- - - - -	S P L R E R R R K R G L F G A I A G F I E G C	
H5 Indo	V K S N R L V L A T G L R N	- - - - -	- - - - -	S P Q R E S R R K K R G L F G A I A G F I E G C	
H5_Viet Ngm	V K S N R L V L A T G L R N	- - - - -	- - - - -	S P Q R E R R R K K R G L F G A I A G F I E G C	
H6 Tai_HK	V K S C G L R L A T G L R N	- - - - -	- - - - -	V P Q I C T R G L F G A I A G F I E G C	
H7 Eq_Praga	V K Q K S L M L A T G M K N	- - - - -	- - - - -	V P E A P A H K Q L T H M R K K R G L F G A I A G F I E N C	
H9 A_HK	V R V N S L K L A V G L R N	- - - - -	- - - - -	V P A R S S R G L F G A I A G F I E G C	
B_Florida	A K - A I G N C P I W Y K I P L K L A N G I K Y R P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G C				
B_Malasia	A K - A I G N C P I W Y K I P L K L A N G I K Y R P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G C				



Figura 24

A-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H3 Victoria/NOS (número de constructo 1391)

Figura 25A, Id. de sec. n.º 44

IF-H3V36111.S2+4c

TCTCAGATCTTCGCCCAAAAACTTCCTGGAAATGACAACAGCACGGCA

Figura 25B, Id. de sec. n.º 45

IF-H3V36111.sl-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTTGCCCTT

Figura 25C, Id. de sec. n.º 46

Gen H3 sintetizado (correspondiente a nt 25 a 1725 de la secuencia HA del aislado GISAIID número EPI ISL 101506)

ATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCCACATTCTATGTCTGGTTTTTCGCTCAAAAACTTCCTGGAAATGACAA
CAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAACAATCACGAA
TGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAATTCCTCAATAGGTGAAATATGCGACAGT
CCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATG
GCTTCCAAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGAAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCCTTATGA
TGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCAGTGTGCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCT
TCAATTGGAGTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGTTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAATAGTTCTT
TAGTAGATTAAATTGGTTGACCCACTTAAACTTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAAT
GAACAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTTACCACCCGGGTACGGACAAGGACCAAAATCTTCCTGT
ATGCTCAATCATCAGGAAGAATCACAGTATCTACCAAAGAAGCCAACAAGCTGTAATCCCGAATATCG
GATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAAAACGGGAG
ACATACTTTTGATTAAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAA
AAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAAGC
ATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAAATGTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCAGATATGTTAAGC
AAAGCACTCTGAAATTGGCAACAGGAATGCGAAATGTACCAGAGAAACAACTAGAGGCATATTTGGCG
CAATAGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAA
ATTCTGAGGGAAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAAATCAATGGGA
AGCTGAATCGATTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAATTCTCAGAAGTCG
AAGGGAGAATTACAGGACCTTGAGAAAATATGTTGAGGACACTAAAAATAGATCTCTGGTCATACAACGCGG
AGCTTCTTGTGGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAACTGTTTGA
AAAAACAAAGAAGCAACTAAGGGAAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAA
ATGTGACAAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGC
ATTAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCAGGGTACAAAGATTGGATCCTATGGAT
TTCCTTTGCCATATCATGTTTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAGGG
CAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGA

Figura 25D, Id. de sec. n.º 47

Casete de expresión número 1391 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 (H3N2) está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGG
 TTTTGATAAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTCTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGATAGTGCAGCGCCATTAATAACG
 TGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGACTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGGGC
 CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTTCCTTCTCAGATCTTCG
CCCAAACTTCTTGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAACG
GAACGATAGTGAACAAATCACGAATGACCAATGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAATTC
CTCAATAGGTGAAATATGCGACAGTCCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCT
CTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTGAACGAAGCAAAAG
CCTACAGCAACTGTTACCTTATGATGTGCCGATTATGCCTCCCTTAGGTCAGTGTGCTCATCCGGC
ACACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGTTCTGCTTGCA
TAAGGAGATCTAATAATAGTTTCTTATAGTAGATTAATTTGGTTGACCCACTTAACTTCAAATACCCAGC
ATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAACAATTTGACAAATTTGTACATTTGGGGGGTTCACACCCGGGT
ACGGACAAGGACCAATCTTCCTGTATGCTCAATCATCAGGAAGAATCACAGTATCTACCAAAAGAAGC
CAACAAGCTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATC
TATTGGACAATAGTAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGG
GTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAAATGCAATT
CTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAATGTAAACAGGATCACATA
CGGGGCTGTCCAGATATGTTAAGCAAAGCACTCTGAAATTGGCAACAGGAATGCGAAATGTACCAGA
GAAACAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATAGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGA
TGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATTTCTGAGGGAAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCA
AGCAGCAATCGATCAATCAATGGGAAGCTGAATCGATTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTTCCATCA
GATTGAAAAAGAATTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATTACAGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACTAA
AATAGATCTCTGGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACT
GACTCAGAAATGAACAACTGTTTGAaaaaaCAAAAGCAACTAAGGGAAAAATGCTGAGGATATGGG
CAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTAT
GACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCA
GGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTGTGTTGCTTTGTTGGGG
TTTCATCATGTTGGGCTGCCAAAAGGGCAACATTAGGTGCAACATTGCAATTTGAAGGCCTATTTCTTAG
TTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCAATTTCTATGTTTGGTGAGCGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTAT
TTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATT
TTAATTTTATTAaaaaaaaaaaaaaaaaaAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGT
TCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCAGTATTATCATATAATT
TCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTA

TGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATA
AATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

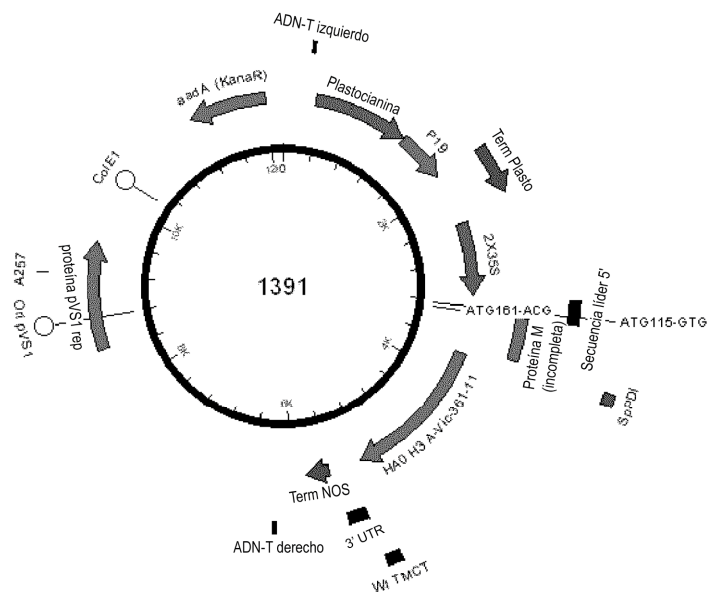
Figura 25E, Id. de sec. n.º 48

Secuencia de aminoácidos de PDISP-H3 de la gripe A/ Victoria/361/2011 (H3N2)

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVT
NATELVQNSSIGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNC
YPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNTGTGTQNGTSSACIRRSNNSFFSRLNWLTHL
NFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQA VIPNI
GSRPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECI
TPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENG
WEGMVDGWYGFRRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFS
EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLFEKTKKQLRENA
EDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWI
SFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI*

Figura 25F

Representación esquemática del número de constructo 1391



B-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+
Replicasa (número de constructo 1462)

Figura 26A, Id. de sec. n.º 49

IF-HAB110.SI+3c

AAATTTGTCTGGGCCCCATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAG

Figura 26B, Id. de sec. n.º 50

IF-HAB110.sl-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCATGAAACGTTGTCTCTG

Figura 26C, Id. de sec. n.º 51

HA B Wisconsin sintetizada (número de registro Genbank JN993010)

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACAT
CTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACT
GACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAAAACATATGCC
GGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCT
GCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAA
CAAAAATCAGGCAACTACCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTAT
CGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAG
TAAAATCGGATTTTTTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACCTACAAAAATGCAACGAACCCA
CTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAACTACTGTTGGGGGTTCCATTCAG
ATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGG
AGTAACCACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAA
AGCGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTATCAAAGA
GGTGTGTTTGTGCTCAAAAAGGTGTGGTGCAGGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAAGGGTCATTGCCTT
TAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAG
GAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAA
CCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTGAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCCTAGA
AGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGT
GGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAATAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGA
GCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACCTCACAAACGAAATACTCGAGCT
GGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCACAAATAGAACTTGCACTGCTTTCC
AACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACCTAAAGAAAATGCTG
GGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAAAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTA
GACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCACTTTTGATTTCATTGAACATTAC
TGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTA
GTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCC
ATCTGTCTATAA

Figura 26D

Representación esquemática del constructo 193. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

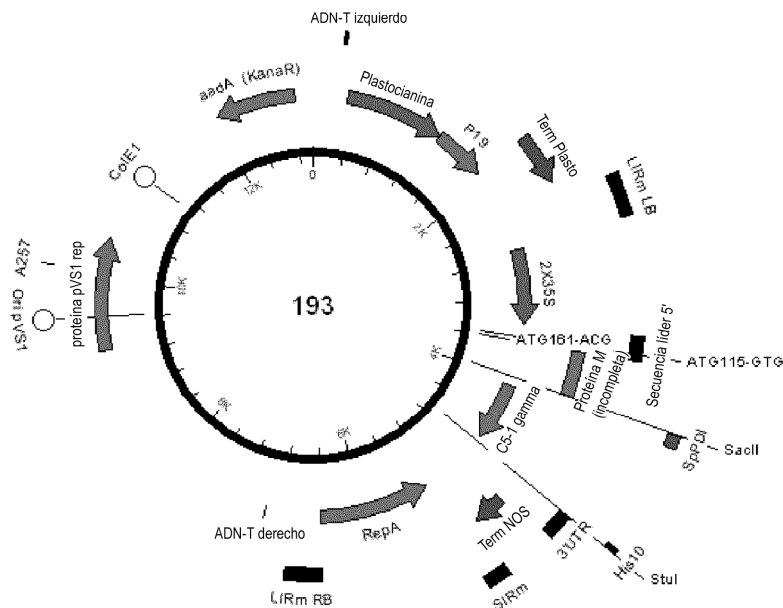


Figura 26E, Id. de sec. n.º 52

Constructo 193 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAACAAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATT
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTG
CAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAAATAAATTATTTTAA
AATTAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTATATTTTCATAGATCAAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATA
ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACA
TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAAACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC

AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
 CTGCACAGAGTCTTGGATCTTGGACGGGAGATTGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACT
 CTTACAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
 TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
 AGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACGATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
 ACAAATAAAATGAACATCTTTTGCCCAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATGGTCAAGTT
 CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAAGTACTA
 ATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCTTCAGTTTGAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCG
 TTGGGAATTACTAGCGCGTGTGAGACGCGTTGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTT
 ATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGATTTTGGTCAATTTAATAGATAGTGGAAAAATGACGTGG
 AATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCC
 CCCCCCTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAATTTCCCGCCCACTAGGGT
 TAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGGTCGACAAGCTTGCATGCCGGTCA
 ACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGG
 CAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCA
 CTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGC
 CATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGGA
 AAAAGAAGACGTTCCAACACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACAC
 ACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAA
 AGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGG
 AAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTG
 CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTCCAACCA
 CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCC
 TTCGAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTT
 GATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAA
 ACTTCTCTTGTCTTTCTTGGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGATCGTGTCTCGGACCCAGTACAAAG
 TTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGT
 ACTTGTCTATTCTTGTGCGTGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGTCTTACGCCCCATAC
 ATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCCGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTG
 CCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTT
 TTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGCGGCCCCG
 CGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCCGCTTATTGTTTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTC
 GCCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGATCTGCTGCCCAA
 ACTAATCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGA
 ACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC
 AGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCCGGCCA
 GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCC
 AGAAGTATCATCTGTCTTCTCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGG
 TCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGT
 GGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGA
 ACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACC
 ATCACCATTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAG
 CGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTTCAGGTCG
 TCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAGGATTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTG
 CCGGTCTTGGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGC
 ATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAA
 ACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAG

TCTCAAGCTTGGCGGCCATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTAC
 ATATGTTACATAACACACGAAATAAACAAAAAAGACAATCCAAAAACAAACACCCCAAAAAAATAA
 TCACTTTAGATAAACTCGTATGAGGAGAGGCACGTTTCAGTGACTCGACGATTCCCAGCAAAAAAAGTCT
 CCCCCTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTTAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCATTGATAAC
 ATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGATTATAGAAGGGATCCACCTTTTATTTCTTCTTTTCCATAT
 TTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGA
 TGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTTCATCGTAGTTGGTGAAATCGATGGTACCGTTCCAATAGTTG
 TGTCGTCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGAGTTGGTCCGAGATGTAGAGGCTGGGGT
 GTCGGATTCCATTCTTCCATTGTCCTGGTTAAATCGGCCATCCATTCAAGGTCAGATTGAGCTTGTTGGT
 ATGAGACAGGATGTATGTAAGTATAAGCGTCTATGCTTACATGGTATAGATGGGTTCCCTCCAGGAGTG
 TAGATCTTCGTGGCAGCGAAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACATACGGTTCCAGGTTGTGGAGGGAAT
 AATTTGTTGGCTGAATATCCAGCCATTGAAGTTTGTGTTGCCATTTCATGAGGGAATTTCTCTTGATCAT
 GTCAAGATATTCTCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCTCCATCGTGCCTCAGATTGCGAGGAG
 AGACCTTATGATCTCGGAAATCTCTCTGGTTTAAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGT
 TTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATAATTAGGGTGATTCTTCAAAATCGAAAAAGAAGGATCCCTAATAC
 AAGGTTTTTATCAAGCTGGAGAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAAC
 ACCAAGGAAGAAAAAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGA
 TGAGCACTTGGGATAGGTAAGGAAAAACATATTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTACTAGCAGAAGGCATG
 TTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGTA
 TTTTGGTCATTTTAAATAGATAGTGGAAAATGACGTGGAATTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGG
 GGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGCGTGCGCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGT
 CCAGATTTAAAGTAGAAAAATTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAAAAGCATATACGAT
 GTGATGGTATTTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTAC
 CCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
 CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTGCG
 TTTCCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAAGAG
CGTTTA

Figura 26F, Id. de sec. n.º 53

Casete de expresión número 1462 del promotor 2X3 5 S al terminador NOS. HA de la gripe
 B/Wisconsin/1/2010 está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACCTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCGTGAAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGACTTCTTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAATTTGTGGGGC
 CCATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAAC

ATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCA
 CTGACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGGAAACTATGC
 CCGGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTT
 CTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTGACACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAG
 AACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAAACGTT
 ATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACC
 AGTAAAATCGGATTTTTTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACCTACAAAAATGCAACGAAC
 CCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAATTACTGTTTGGGGGTTCCATT
 CAGATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAA
 TGGAGTAACCACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCA
 CAAAGCGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTATCAA
 AGAGGTGTTTTGTTGCCCTCAAAGGTGTGGTGCAGGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCATTG
 CCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACA
 CAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATG
 GAACCAATATAGACCTCCTGCAAACTATTGAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCCT
 AGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGC
 AGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAATAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAG
 TGAGCTAGAAGTAAAGAACCCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAATCCACAACGAAATACTCGA
 GCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCACAAATAGAAGTTGCAGTCTTGCTT
 TCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACCTAAAGAAAAATG
 CTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAAAACACAAATGCAACCAGACCTGC
 TTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCACTTTTGATTCAATTGAACAT
 TACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTT
 CTAGTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCT
 CCATCTGTCTATAAAGGCCTATTTTCTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGT
 GAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGG
 TCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAAT
 TCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG
 TTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAA
 TGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGA
 AAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

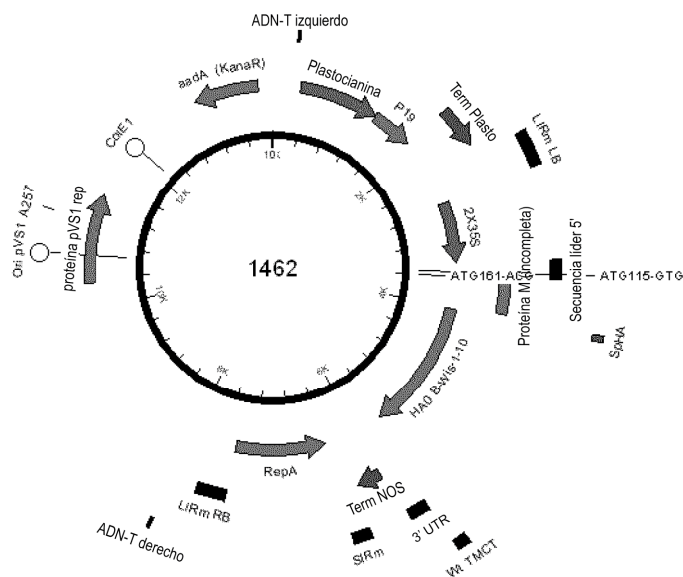
Figura 26G, Id. de sec. n.º 54

Secuencia de aminoácidos de la HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLN
 CTDLDVALGRPMC VGTPPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGG
 PYRLGTSGSCP NATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYG
 DSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGDFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASG
 RSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGHAHAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFG
 AIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHN
 EILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQCLD
 RIAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLM LAIFIVYMVSRDNVSCSICL*

Figura 26H

Representación esquemática del número de constructo 1462



C-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin con bucle proteolítico delecionado/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa (número de constructo 1467)

Figura 27A, Id. de sec. n.º 55

HAB110(PrL-).r

TCCTTCCCATCCTCCACCAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGCAAGCTTCAAAG

Figura 27B, Id. de sec. n.º 56

HAB110(PrL-).c

ATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGA

Figura 27C, Id. de sec. n.º 57

Casete de expresión número 1467 del promotor 2X35S al terminador NOS. HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico delecionado está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA

AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACCTTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCTTTGGAGAGGTATTAAAAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATTTCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGGTGGAGGCTGCTGTTGACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTGTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTGGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGC
 CCATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAAC
ATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCA
CTGACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGGAAACTATGC
CCGGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTT
CTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAG
AACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAAACGTT
ATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACC
AGTAAATCGGATTTTTTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACCTACAAAAATGCAACGAAC
CCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTGTACAGAAGGGGAAGACCAAAATTACTGTTTGGGGGTTCATT
CAGATAACAAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTACCTCATCTGCTAA
TGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCAGATCAAAACAGAAGACGGAGGACTACCA
CAAAGCGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACTGGGAAAAACAGGAACAATTGTCTATCAA
AGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCATTG
CCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACA
CAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATG
GAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTC
ACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAATAAGATAACA
AAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAA
ATCCACAACGAAATCTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCACAA
ATAGAACTTGACTTGTCTTCCAAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTG
AGAGAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAAAC
ACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAAATTTCTCTCCC
CACTTTTGATTCAATTGAACATTACTGCTGCATCTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGC
TCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTATTGTTTATATGGTCT
CCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAAAGGCCATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTG
 GTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAATTTCTT
 TGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAA
 AAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAA
 AGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAA
 GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAT
 TATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAAATATCGCGCGCGGTGT
 CATCTATGTTACTAGAT

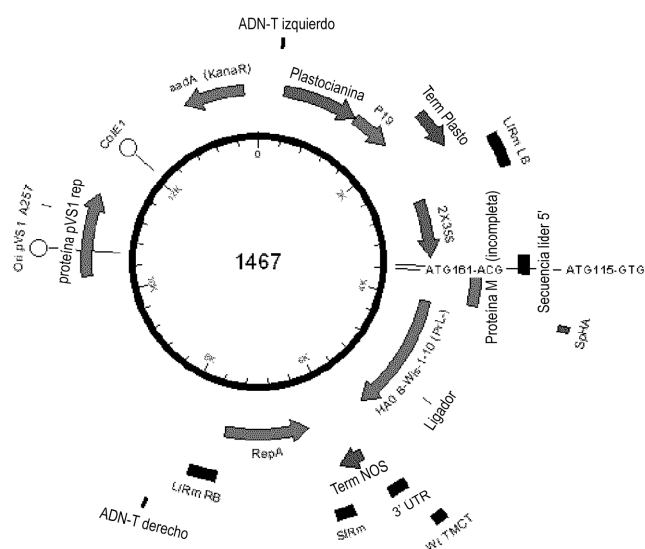
Figura 27D, Id. de sec. n.º 58

Secuencia de aminoácidos de HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico delecionado

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVGTGVIPLTTTPTKSYFANLKG
 TRTRGKLCPCDCLNCTDLDVALGRPMC VGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIMHDRTKIRO
 LPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGTSGSPNATSKIGFFATMAWAVPKDNY
 KNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYV
 SQIGDFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIK
 GSLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPGGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMD
 ELHNEILELDEKVDDLRA DTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDI
 GNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYYST
 AASSLAVTLM LAIFIVYMVS RDNVSCSICI*

Figura 27E

Representación esquemática del número de constructo 1467



D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HAB Malasia/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+
Replicasa (número de constructo 1631)

Figura 28A, Id. de sec. n.º 59

IF-HB-M-04.s2+4c

TCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTC

Figura 28B, Id. de sec. n.º 60

IF-HB-M-04.sl-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCAAGAAACATTG

Figura 28C, Id. de sec. n.º 61

HA B Malasia sintetizada (correspondiente a nt 31-1743 del número de registro Genbank EU124275). Las mutaciones T759C y C888G están subrayadas.

GATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACTCACCACATGTTGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGG
TCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAACAACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAAC
AGAAACCAGAGGGGAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACC
AAAATGCACGGGGAAACATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGG
TGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACTTCTCAGAGGATACGAACATA
TCAGGTTATCAACTCATAACGTTATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGAGGACCCCTACAAAAATTGGAACCTC
AGGGTCTTGCCTAACGTTACCAATGGAAACGGATTTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAAC
GACAACAACAAAACAGCAACAAATTCATTAACAATAGAAGTACCATAACATTTGTACAGAAGGAGAAGAC
CAAATTACCGTTTGGGGGTTCCACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGC
CCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCAAA
TCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAAATCTGG
GAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGAGGTATTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGGTGCGCAAGTGGCAG
GAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGG
ATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGT
GAAAACACCCTTGAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAAGGAAAGGGG
TTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATAC
ACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAAG
ATAACAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATG
GATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGACGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGC
TCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTCTTGG
CGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAAATGCTGGGCCCCCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAA
CCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTC
TCTCCCCACTTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTA
TACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATA
TGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 28D

Representación esquemática del constructo 194. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

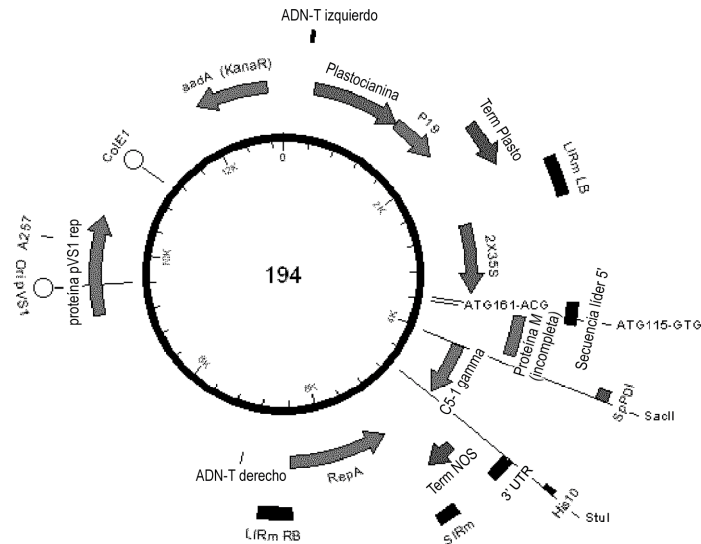


Figura 28E, Id. de sec. n.º 62

Construito 194 de izquierda a derecha bordes de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAAACCATAAA
AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAAATCATT
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTG
CAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTAA
AATTAAGAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATA
ACATCCAATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACA
TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAG
TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTAAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
CTGCACAGAGTCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTTCGCGAACT
CTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGGCCCAATCGAAGTGG
AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
TGCTTCTTCGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC

AGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
 ACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATATGGTCAAGTT
 CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTACTA
 ATTTTATATCATCCCCCTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCG
 TTGGGAATTACTAGCGCGTGTGAGACGCGTTGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTGCTCAAACTCTATCTT
 ATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGTATTTTGGTCATTTTAATAGATAGTGGAAAATGACGTGG
 AATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCC
 CCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAATTTCCCGCCCACTAGGGT
 TAAAGGTGTTACACTATAAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGGTCGACAAGCTGCATGCCGGTCA
 ACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGG
 CAATTGAGACTTTTCAACAAAAGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCA
 CTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGC
 CATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGA
 AAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACAC
 ACTTGCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAA
 AGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGG
 AAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTG
 CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCA
 CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCC
 TTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGTATTAATAATCTTAATAGGTTTT
 GATAAAAGCGAACGTGGGGAAAACCCGAACCAAACTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAA
 ACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTGTGATCGTGCTTCGGCACCAAGTACAACG
 TTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGT
 ACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTAGCCCCATAC
 ATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTG
 CCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTT
 TTCCCGTGGTTTTTCGAACCTTGAGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGCCCA
 TGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCCCG
 CGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAAC
 TCCATGGTGACCTGGGATGCCGTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTG
 GATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTTCCCTGCAGTCTGACCTCTACACTGTGACAGCTCA
 GTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCA
 CCAAGGTGGACAAGAAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCCAGAAAGT
 ATCATCTGTCTTCTCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACAGT
 GTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGT
 GCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAAGTGAACCTCCC
 ATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACC
 TTAAGGCCATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTT
 CTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCTGCCCTT
 AGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAGGAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAA
 GCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGTCT
 TGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGT
 TATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAT
 ATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAG
 CTTGGCGCGCCATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTT
 ACATAACACACGAAATAAACAAGGACAAATCCAAAAACAAACACCCCAAAAAATAATCACTTT
 AGATAAACTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCAAGTACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCCGT
 CACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTTAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTGATTGATAACATCCAG
 TCTTCGTGAGGATTGCAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTCTTTTCCATATTTAGGG
 TTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTCGT
 CGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGAATCGATGGTACCCTTCCAATAGTTGTGTCGT
 CCGAGACTTCTAGCCCAAGGTGGTCTTCCGGTACAGATTGGTCCGCGAGATGTAGAGGCTGGGGTGTGCGA
 TTCCATTCTTCCATTGTCTGGTTAAATCGGCCATCCATTCAAGGTGAGATTGAGCTTGTGGTATGAGA

CAGGATGTATGTAAGTATAAGCGTCTATGCTTACATGGTATAGATGGGTTTCCCTCCAGGAGTGTAGATC
 TTCGTGGCAGCGAAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACATACGGTTCAGGTTGTGGAGGGAATAATTTG
 TTGGCTGAATATTCCAGCCATTGAAGTTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCCTTGATCATGTCAAG
 ATATTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCTCCATCGTGCCTCAGATTTGCGAGGAGAGACCT
 TATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAG
 TTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCCTTCAAAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTT
 TTTTATCAAGCTGGAGAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAA
 GGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGC
 ACTTGGGATAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTACTAGCAGAAGGCATGTTGTT
 GTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAAACCAGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGTATTTG
 GTCATTTTAATAGATAGTGGAAAATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAAGTCTTTGCGACAAGGGGGG
 GCCCACGCCGAATTTAATATTACCGCGTGGCCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAG
 ATTTAAAGTAGAAAAATTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAAAAGCATATACGATGTGA
 TGGTATTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAA
 CTTAATCGCCTTGAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCGCCACCGATCGCC
 CTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTTC
 CCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAAGAGCGTT
TA

Figura 28F, Id. de sec. n.º 63

Casete de expresión número 1631 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP-HA de la gripe
 B/Malasia/2506/2004 está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
 AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
 TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGCTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
 ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
 ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
 ACCACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
 ATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGG
 TTTTGATAAAAGCGAACGTTGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
 CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
 ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAAGTGGCGGCCATTAAATAACG
 TGTACTTGTCTATTTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCA
 TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
 TTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGA
 GTTTTCCCGTGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCCAAATTTGTGGGGC
CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCG
CCGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACTCACCACATGTTGTCAAACTGCTACTCAAGGGGA
GGTCAATGTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACCCACCAAATCTCATTTTGCAAACTCAAAGGA
ACAGAAACCAGAGGGGAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGA
CCAAATGCACGGGGAACATACCCTCGGCAAGAGTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTG
GGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACTTCTCAGAGGATACGAACA
TATCAGGTTATCAACTCATAACGTTATCAATGCAGAAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACC
TCAGGCTCTTGCCCTAACGTTACCAATGGAAACGGATTTTCGCAACAATGGCTTGGGCGCTCCCAAAA
ACGACAACAACAAAACAGCAACAAATTCATTAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAG
ACCAAAATTACCGTTTGGGGTTCCACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGACTCAAA

GCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCA
AATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCT
GGGAAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGAGGTATTTTATTGCCTCAAAAAGTGGTGGCGCAAGTGGC
AGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGT
GGATTAACAAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGG
GTGAAAACACCCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAGGAAAGG
GGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGAT
ACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACA
AGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCA
TGGATGAAGTCCACAACGAAATACTAGAAGTACGAGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAA
GCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTCTT
GGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAAATGCTGGGCCCCCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGA
AACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTT
TCTCTCCCCACTTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATAC
TATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTA
TATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACT
GTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTT
AATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAACATTTG
GCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATT
ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTC
CCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAAATTATCGCGC
GCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

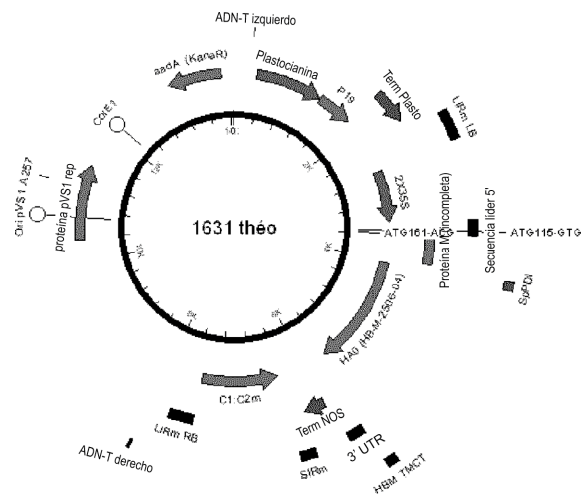
Figura 28G, Id. de sec. n.º 64

Secuencia de aminoácidos de la PDISP-HA de la gripe B/Malasia/2506/2004

MAKNVAIFFLLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTPTKSHFANLKGTTETRG
 KLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGNIPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPKLLRGYEHRLSTHNVIN
 AENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNET
 QMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGITYQRGILLPQ
 KVWCASGRSKVIKGLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKL
 LKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSG
 AMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKH
 KCNQTCLEDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGDLNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDN
 VSCSICL*

Figura 28H

Representación esquemática del número de constructo 1631



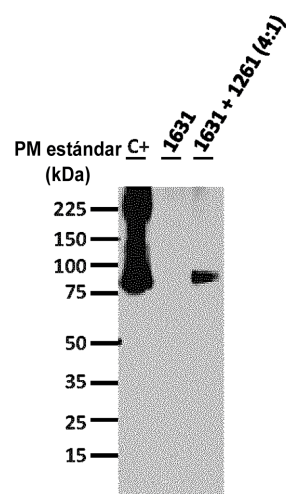


Figura 29.

Figura 30A.

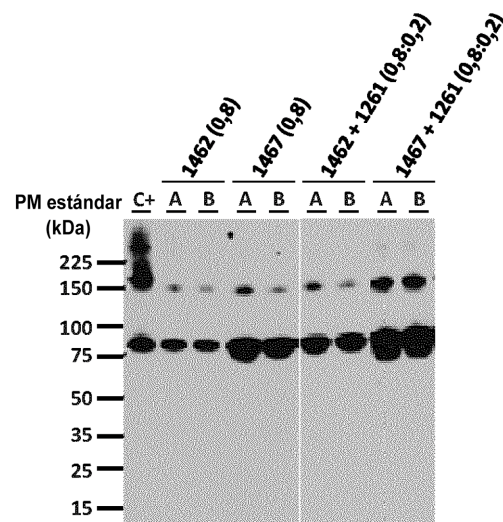


Figura 30B.

Número de constructo	Capacidad de hemaglutinación (título de HA) ^a
1462 (0,8)	136 ± 48
1467 (0,8)	2660 ± 384
1462 + 1261 (0,8:0,2)	941 ± 192
1467 + 1261 (0,8:0,2)	4344 ± 1536

^a Inverso de la dilución más alta capaz de aglutinar glóbulos rojos.

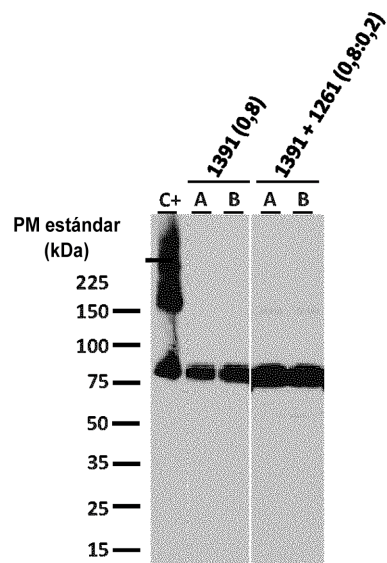


Figura 31