República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0906960-7 B1

(22) Data do Depósito: 12/01/2009

(45) Data de Concessão: 11/07/2023

(54) Título: ÁCIDO NUCLEICO COMPREENDENDO UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS CODIFICANDO UMA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DE INFLUENZA (HA), PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLPS), SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E USO DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; A01H 5/00; A61K 35/76; A61K 39/145; A61P 31/16; (...).

(30) Prioridade Unionista: 11/07/2008 CA pct/ca2008/001281; 21/01/2008 CA 2615372; 22/01/2008 US 61/022,775.

(73) Titular(es): MEDICAGO INC..

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

(86) Pedido PCT: PCT CA2009000032 de 12/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/076778 de 25/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/07/2010

(57) Resumo: PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS DE INFLUENZA (VLPS) RECOMBINANTE EM PLANTAS TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO HEMAGLUTININA. A presente invenção refere-se a um método para sintetizar partículas semelhantes a vírus de influenza (VLPs) dentro de uma planta ou uma parte de uma planta. O método envolve a expressão de HA de influenza em plantas e a purificação por cromatografia por exclusão de tamanho. A invenção é também direcionada a uma VLP compreendendo proteína HA de influenza e lipídios de plantas. A invenção é também direcionada a um ácido nucleico codificando HA de influenza bem como vetores. As VLPs podem ser usadas para formular vacinas contra a influenza, ou podem ser usadas para enriquecer as vacinas existentes.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ÁCIDO NUCLEICO COMPREENDENDO UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS CODIFICANDO UMA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DE INFLUENZA (HA), PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLPS), SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E USO DOS MESMOS".**

[001] Este pedido é uma continuação em parte do Pedido PCT No. PCT/CA2008/001281, depositado em 11 de julho de 2008 e reivindica sua prioridade. Este pedido também reivindica prioridade do Pedido Canadense No. 2.615.372 depositado em 21 de janeiro de 2008, e Pedido US No. 61/022.775 depositado em 22 de janeiro de 2008.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção refere-se à produção de partículas semelhantes a vírus. Mais especificamente, a presente invenção é direcionada à produção de partículas semelhantes a vírus compreendendo antígenos de Influenza.

Antecedentes da Invenção

[003] A Influenza é a causa principal de morte em seres humanos devido a vírus respiratórios. Os sintomas comuns incluem febre, dor de garganta, falta de ar, e dor muscular, entre outros. Durante a estação da gripe, os vírus de Influenza infectam 10 a 20% da população mundial, levando a 250.000 a 500.000 mortes por ano.

[004] Os vírus de Influenza são vírus envelopados que se originam da membrana plasmática de células de aves e de mamíferos infectados. Eles são classificados em tipos A, B ou C, com base nas nucleoproteínas e antígenos de proteína matriz presentes. Os vírus de Influenza tipo A podem ser ainda divididos em subtipos de acordo com a combinação de glicoproteínas de superfície apresentadas, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). A HA governa a capacidade do vírus se ligar e penetrar na célula hospedeira. A NA remove os

resíduos de ácido siálico terminais de cadeias de glicano em células hospedeiras e em proteínas da superfície viral, que impede a agregação viral e facilita a mobilidade do vírus. Atualmente, 16 subtipos de HA (H1 a H16) e 9 subtipos de NA (N1 a N9) são reconhecidos. Cada vírus de Influenza tipo A apresenta um tipo de glicoproteína HA e um tipo de glicoproteína NA. Geralmente, cada subtipo exibe especificidade de espécie; por exemplo, todos os subtipos de HA e NA são conhecidos por infectar pássaros, enquanto somente os subtipos H1, H2, H3, H5, H7, H9, H10, N1, N2, N3 e N7 se mostraram infectar humanos (Horimoto 2006, Suzuki 2005). Os vírus de Influenza compreendendo H5, H7 e H9 são considerados as formas mais altamente patogênicas de vírus de Influenza A, e as mais prováveis de causar futuras pandemias.

[005] As pandemias de Influenza são geralmente causadas por vírus de Influenza virulentos e altamente transmissíveis, e podem levar a níveis globalmente elevados de doença e morte. O surgimento de novos tipos de Influenza A resultaram nas 4 maiores pandemias do século 20. A gripe espanhola, causada por um vírus H1N1 em 1918 a 1919, levou à morte de 50 milhões de pessoas pelo mundo entre 1917 e 1920. Atualmente, o risco do surgimento de um novo subtipo, ou da transmissão para seres humanos de um subtipo endêmico em animais, está sempre presente. É de particular interesse uma forma altamente virulenta de Influenza aviária (também chamada "gripe dos pássaros"), cujas epidemias foram relatadas em vários países ao redor do mundo. Em muitos casos, essa gripe aviária pode resultar em taxas de mortalidade próximas de 100% dentro de 48 horas. Avaliou-se que a propagação do vírus de influenza aviária (H5N1), primeiro identificada em Hong Kong em 1997, para outros países Asiáticos e Europa esteja ligada aos padrões migratórios de pássaros selvagens.

[006] O método atual de combater influenza em seres humanos é por vacinação anual. A vacina é geralmente uma combinação de várias

cepas que são preditas como cepas dominantes para a futura "estação de gripe". A predição é coordenada pela Organização Mundial de Saúde. Geralmente, o número de doses de vacina produzidas a cada ano não é suficiente para vacinar a população mundial. Por exemplo, o Canadá e os Estados Unidos obtêm doses de vacinas suficientes para imunizar aproximadamente um terço de sua população, enquanto somente 17% da população da União Europeia pode ser vacinada. É evidente que a produção mundial atual de vacina de influenza é insuficiente face à pandemia de gripe mundial. Mesmo se a produção anual necessária pudesse ser alcançada de alguma forma em um dado ano, as cepas dominantes mudam de ano para ano, assim estocar matéria-prima em tempos de baixa necessidade no ano não é prático. A produção em grande escala econômica de uma vacina de influenza eficaz é de significativo interesse para o governo e igualmente para a indústria privada.

[007] Os estoques virais para uso em vacinas são produzidos em ovos fertilizados. As partículas de vírus são colhidas, e para uma vacina viral inativada, rompidas por detergente para inativar. As vacinas vivas atenuadas são produzidas de vírus de influenza que foram adaptados para o crescimento em baixa temperatura, o que significa que em temperatura corporal normal, a vacina é atenuada. Tal vacina é licenciada nos Estados Unidos para uso em indivíduos de 5 a 49 anos de idade. As vacinas de vírus integral inativo são tornadas inofensivas através da inativação com agentes químicos e elas foram produzidas em ovos embrionários ou cultura de células de mamíferos. Todos esses tipos de vacinas mostram algumas vantagens e desvantagens específicas. Uma vantagem das vacinas derivadas de vírus integrais é o tipo de imunidade induzida por tais vacinas. Em geral, as vacinas de vírus fracionado induzem uma forte resposta de anticorpo enquanto as vacinas produzidas com vírus integrais induzem tanto uma resposta de

anticorpo (humoral) quanto celular. Mesmo que uma resposta de anticorpo funcional seja um critério para licenciamento que se correlaciona com a proteção induzida por uma vacina, há evidência crescente de que uma resposta de célula T seja também importante na imunidade contra influenza – isso pode também fornecer melhor proteção nos idosos.

[008] De modo a induzir uma resposta imune celular, as vacinas produzidas de vírus integrais foram desenvolvidas. Devido à alta patogenicidade da cepa de influenza (por exemplo, H5N1), essas vacinas são produzidas em BL3 + instalação. Para cepas de influenza altamente patogênicas, tal como H5N1, alguns fabricantes modificaram a sequência gênica da hemaglutinina de modo a reduzir a patogenicidade da cepa de influenza e torná-la avirulenta e mais facilmente produzida em ovos embrionários ou cultura de células de mamíferos. Outros também usam cepas de influenza reordenadas geneticamente nas quais as sequências genéticas para as proteínas hemaglutinina e neuraminidase são clonadas em uma cepa doadora de influenza pouco patogênica e de alto rendimento (A/PR/8/34; Quan F-S e outros, 2007). Enquanto esses métodos podem produzir vacinas úteis, eles não fornecem uma solução para a necessidade de produção rápida, de baixo custo e em grande volume de vacinas na escala necessária para alcançar a necessidade global em um ano normal, e quaser certamente seria insuficiente face a uma pandemia.

[009] Usando-se essa tecnologia de genética reversa, poder-se-ia também precisar mutar a sequência genética da proteína HA para torná-la virulenta. Para cepas de influenza altamente patogênicas, a produção de vacinas de vírus integral ou exige procedimentos de confinamento ou as vacinas resultantes não combinam exatamente com a sequência genética do vírus circulante. No caso de vacinas vivas atenuadas, há ainda um risco de que a vacina administrada possa recombinar com um

vírus de influenza do hospedeiro, levando a um novo vírus de influenza.

[0010] Enquanto esse método mantém o epitopo antigênico e modificações pós-traducionais, há um número de desvantagens para esse método, incluindo o risco de contaminação devido ao uso de vírus integral e rendimentos variáveis dependendo da cepa de vírus. Os níveis subótimos de proteção podem resultar da heterogeneidade genética no vírus devido a sua introdução nos ovos. Outras desvantagens incluem planejamento extensivo para obter ovos, riscos de contaminação devido a produtos químicos usados na purificação, e longos tempos de produção. Também, pessoas hipersensíveis a proteínas do ovo podem não ser candidatos qualificados para receber a vacina.

[0011] No caso de uma pandemia, a produção de vacinas de vírus fracionado é limitada pela necessidade de adaptar a cepa para crescimento em ovos e os rendimentos de produção variáveis alcançados. Embora essa tecnologia tenha sido usada por anos para a produção de vacinas sazonais, ela pode dificilmente responder em um intervalo de tempo razoável a uma pandemia e a capacidade de fabricação mundial é limitada.

[0012] Para evitar o uso de ovos, os vírus de influenza também foram produzidos em cultura de células de mamíferos, por exemplo, em células MDCK ou PERC.6, ou seus similares. Outra abordagem é genética reversa, na qual os vírus são produzidos por transformação celular com genes virais. Esses métodos, entretanto, também exigem o uso de vírus integral, bem como métodos elaborados e ambientes de cultura específicos.

[0013] Vários produtos recombinantes foram desenvolvidos como candidatos à vacina de influenza recombinante. Essas abordagens têm focado na expressão, produção, e purificação de proteínas HA e NA de influenza tipo A, incluindo a expressão dessas proteínas usando células

de inseto infectadas por baculovírus (Crawford e outros, 1999; Johansson, 1999), vetores virais, e construtos de vacina de DNA (Olsen e outros, 1997).

[0014] Específicos de uma infecção com vírus de influenza são bem conhecidos. Resumidamente, o ciclo infeccioso é iniciado pela ligação da proteína HA na superfície do virion a um receptor celular contendo ácido siálico (glicoproteínas e glicolipídios). A proteína NA media o processamento do receptor de ácido siálico, e a penetração do vírus na célula depende da endocitose mediada por receptor dependente de HA. Nos limites ácidos de endossomas internalizados contendo um virion de influenza, a proteína HA passa por mudanças conformacionais que levam à fusão de membranas virais e celulares e não revestimento do vírus e liberação mediada por M2 de proteínas MI de ribonucleo-proteínas associadas a nucleocapsídeo (RNPs), que migram para o núcleo celular para síntese de RNA viral. Os anticorpos para proteínas HÁ impedem a infecção com vírus neutralizando a infectividade do vírus, sendo que os anticorpos para proteínas NA mediam seu efeito nas etapas precoces da replicação viral.

[0015] Crawford e outros (1999) descrevem a expressão de HA de influenza em células de inseto infectadas com baculovírus. As proteínas expressas são descritas como sendo capazes de impedir doença de influenza letal causada por subtipos de influenza aviária H5 e H7. Johansson e outros (1999) ensinam que as proteínas HA e NA de influenza expressas em baculovírus induzem as respostas imunes em animais superiores aos induzidos por uma vacina convencional. A imunogenicidade e a eficácia de hemaglutinina expressa em baculovírus de vírus de influenza equino foram comparadas para um candidato à vacina de DNA homólogo (Olsen e outros, 1997). Coletivamente, esses dados demonstram que um alto grau de proteção contra provocação com vírus de influenza pode ser induzido com

proteínas HA e NA recombinantes, usando várias abordagens experimentais e em diferentes modelos animais.

[0016] Como a pesquisa anterior mostrou que as glicoproteínas de influenza de superfície, HA e NA, são os alvos principais para a produção de imunidade protetora contra o vírus de influenza e que M1 fornece um alvo conservado para a imunidade celular à influenza, um novo candidato à vacina pode inclui esses antígenos virais como uma partícula macromolecular de proteína, tal como partículas semelhantes a vírus (VLPs). Como os produtos de vacina, as VLPs oferecem a vantagem de serem mais imunogênicas do que antígenos de subunidade ou recombinantes e são capazes de estimular ambas a resposta imune humoral e celular (Grgacic e Anderson, 2006). Ademais, a partícula com esses antígenos de influenza pode exibir epítopos conformacionais que produzem anticorpos neutralizantes para múltiplas cepas de vírus de influenza.

[0017] A produção de uma cepa de vírus de influenza não infecciosa para propósitos de vacina é uma forma de evitar a infecção acidental. Alternativamente, as partículas semelhantes a vírus (VLPs) como substitutos para o vírus cultivado foram investigadas. As VLPs imitam a estrutura do capsídeo viral, mas carecem de um genoma, e assim não se replicam ou fornecem um meio para uma infecção secundária.

[0018] Vários estudos demonstraram que as proteínas de influenza recombinantes se autorreúnem em VLPs na cultura celular usando plasmídeos de expressão em mamíferos ou vetores de baculovírus (Gomez-Puertas e outros, 1999; Neumann e outros, 2000; Latham e Galarza, 2001). Gomez-Puertas e outros (1999) descrevem que a formação eficaz de VLP de influenza depende dos níveis de expressão de várias proteínas virais. Neumann e outros (2000) estabeleceram um sistema baseado em plasmídeo de expressão em mamíferos para gerar partículas semelhantes a vírus de influenza infecciosas inteiramente de

cDNAs clonados. Latham e Galarza (2001) relataram a formação de VLPs de influenza em células de insetos infectadas com baculovírus recombinante coexpressando HA, NA e genes M1 e M2. Esses estudos demonstraram que as proteínas de virion de influenza podem se autorreunir mediante a coexpressão em células eucarióticas.

[0019] Gomez-Puertas e outros (2000) ensinam que, em adição à hemaglutinina (HA), a proteína matriz (M1) do vírus de influenza é essencial para germinar VLP de células de insetos. Entretanto, Chen e outros (2007) ensinam que M1 pode não ser exigida para a formação de VLP, e observou-se que a liberação eficaz de M1 e VLPs exigiu a presença de HA e atividade de sialidase fornecida por NA. A NA cliva os ácidos siálicos das glicoproteínas na superfície das células produzindo as VLPs, e libera as VLPs no meio.

[0020] Quan e outros, 2007 ensina que uma vacina de VLP produzida em um sistema de expressão de baculovírus (célula de inseto) induz uma imunidade protetora contra algumas cepas de vírus de influenza (A/PR8/34 (H1N1)). As VLPs estudadas por Quan foram observadas por germinar a partir da membrana plasmática, e foram consideradas do tamanho e morfologia corretos, similar às obtidas em um sistema de mamíferos (células MDCK).

[0021] As Publicações PCT WO 2004/098530 e WO 2004/098533 citam a expressão de HN de vírus da Doença Newcastle ou Influenza A aviária/peru/Wisconsin/68 (H5N9) em células NT-1 (tabaco) transformadas em cultura. As composições compreendendo os polipeptídeos expressos em cultura de células de plantas produzem respostas imunes variadas em coelhos e galinhas.

[0022] Os vírus envelopados podem obter seu envelope de lipídio quando ‘germinando’ fora da célula infectada e obter a membrana da membrana plasmática, ou dessa de uma organela interna. As partículas de vírus de influenza e as VLPs germinam a partir da membrana

plasmática da célula hospedeira. Em sistemas de células de mamíferos ou de baculovírus, por exemplo, influenza germina a partir da membrana plasmática (Quan e outros, 2007). Somente poucos vírus envelopados são conhecidos por infectar plantas (por exemplo, membros dos Topovírus e Rhabdovírus). Dos vírus envelopados de plantas conhecidos, eles são caracterizados por germinar a partir de membranas internas da célula hospedeira, e não da membrana plasmática. Embora um pequeno número de VLPs recombinantes tenha sido produzido em plantas hospedeiras, nenhuma foi derivada da membrana plasmática, levantando a questão de se as VLPs derivadas da membrana plasmática, incluindo as VLPs de influenza, podem ser produzidas em plantas.

[0023] As tecnologias de produção de VLP de influenza atuais contam com a coexpressão de múltiplas proteínas virais, e essa dependência representa uma desvantagem dessas tecnologias como no caso de uma pandemia e de epidemias anuais, o tempo de resposta é crucial para a vacinação. Um sistema de produção de VLP mais simples, por exemplo, um que conta com a expressão de somente uma ou poucas proteínas virais sem exigir a expressão de proteínas virais não estruturais, é desejável para acelerar o desenvolvimento de vacinas.

[0024] De modo a proteger a população mundial de influenza e para protelar futuras pandemias, os fabricantes de vacinas precisarão desenvolver métodos rápidos e eficazes de produzir doses de vacinas. O uso atual de ovos fertilizados para produzir vacinas é insuficiente e envolve um longo processo.

Sumário da Invenção

[0025] É um objetivo da invenção fornecer partículas semelhantes a vírus (VLPs) de influenza.

[0026] De acordo com a presente invenção, é fornecido um ácido

nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando um antígeno a partir de um vírus envelopado ligado de forma funcional a uma região reguladora ativa em uma planta. O antígeno pode ser uma hemaglutinina de influenza (HA).

[0027] A HA pode compreender um peptídeo sinal nativo ou um não nativo; o peptídeo sinal não nativo pode ser um peptídeo sinal de proteína dissulfeto isomerase.

[0028] A HA codificada pelo ácido nucleico pode ser uma HA de influenza tipo A, de influenza tipo B ou é um subtipo de influenza tipo A, selecionado a partir do grupo que consiste em H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 e H16. Em alguns aspectos da invenção, a HA codificada pelo ácido nucleico pode ser de influenza tipo A, e selecionada a partir do grupo que compreende H1, H2, H3, H5, H6, H7 e H9.

[0029] A presente invenção também fornece um método para produzir partículas semelhantes a vírus (VLPs) de influenza em uma planta compreendendo:

a) introduzir o ácido nucleico codificando um antígeno de um vírus envelopado, por exemplo, uma hemaglutinina de influenza (HA), ligado de maneira funcional a uma região reguladora ativa na planta, ou parte da planta, e

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

[0030] O método pode ainda compreender as etapas de colher a planta e purificar ou separar as VLPs a partir do tecido da planta.

[0031] O método pode ainda compreender, na etapa de introduzir (etapa a), um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando um ou mais proteínas chaperonas.

[0032] Uma ou mais proteínas chaperonas podem ser selecionadas

a partir do grupo que compreende Hsp40 e Hsp70.

[0033] A presente invenção inclui o método acima onde, na etapa de introduzir (etapa a), o ácido nucleico pode ser ou expresso transitoriamente na planta, ou expresso estavelmente na planta. Ademais, as VLPs podem ser purificadas usando cromatografia por exclusão de tamanho.

[0034] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para produzir partículas semelhantes a vírus (VLPs) de influenza em uma planta compreendendo fornecer uma planta, ou uma parte de uma planta, compreendendo um ácido nucleico com uma sequência de nucleotídeo codificando um antígeno de um vírus envelopado ligado de maneira funcional a uma região reguladora ativa em uma planta, e incubar a planta ou parte da planta sob condições que permitem a expressão do ácido nucleico, produzindo desse modo as VLPs.

[0035] O método ainda pode compreender as etapas de colher a planta e purificar ou separar as VLPs do tecido da planta.

[0036] A presente invenção inclui o método acima, em que seguindo a etapa de fornecer, um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando uma ou mais proteínas chaperonas ligadas de maneira funcional a uma região reguladora ativa em uma planta é introduzido, e a planta ou parte da planta incubada sob condições que permitem a expressão do ácido nucleico, produzindo desse modo as VLPs.

[0037] Uma ou mais proteínas chaperonas podem ser selecionadas a partir do grupo que compreende Hsp40 e Hsp70.

[0038] A presente invenção inclui o método acima onde, na etapa de introduzir (etapa a), o ácido nucleico codificando a HA é estavelmente expresso na planta. Ademais, as VLPs podem ser purificadas usando cromatografia por exclusão de tamanho.

[0039] A presente invenção também fornece uma partícula semelhante a vírus (VLP) compreendendo uma proteína HA de vírus de influenza e um ou mais lipídios derivados de uma planta.

[0040] A proteína HA da VLP pode ser de uma influenza tipo A, influenza tipo B ou é um subtipo de HA de influenza tipo A selecionado a partir do grupo que consiste em H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 e H16. Em alguns aspectos da invenção, a HA é de uma influenza tipo A, selecionada a partir do grupo que consiste em H1, H2, H3, H5, H6, H7 e H9.

[0041] Está também incluída na presente invenção uma composição compreendendo uma dose eficaz de uma VLP, a VLP compreendendo uma proteína HA de vírus influenza, um ou mais lipídios de planta, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0042] A presente invenção também abrange fragmentos ou partes de HA que formam VLPs em uma planta.

[0043] A presente invenção também pertence a uma VLP compreendendo uma HA de vírus de influenza produzindo N-glicanos específicos de plantas ou N-glicanos modificados. A proteína HA da VLP pode ser de uma influenza tipo A, influenza tipo B ou é um subtipo de HA de influenza tipo A selecionado a partir do grupo que consiste em H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 e H16. Em alguns aspectos da invenção, a HA é de uma influenza tipo A, selecionada a partir do grupo que consiste em H1, H2, H3, H5, H6, H7 e H9.

[0044] A VLP pode compreender uma proteína HA de um ou mais subtipos, incluindo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ou H16 ou fragmento ou parte desses. Exemplos de subtipos compreendendo tais proteínas HA incluem A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova Iorque/1995, A/gaivota argêntea/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003,

A/marreco canadense/MN/33/00, A/pato/Xangai/1/2000, A/marreca-arrebio/TX/828189/02, A/peru/Ontário/6118/68 (H8N4), A/marreca/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949 (H10N7), A/pato/Inglaterra/56 (H11N6), A/pato/Alberta/60/76 (H12N5), A/gaivota/Maryland/704/77 (H13N6), A/marreco canadense/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99 (H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).

[0045] Em um aspecto da invenção, a proteína HA pode ser um subtipo H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9. Em outro aspecto, a proteína H1 pode ser da cepa A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), ou A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1). A proteína H3 pode também ser da cepa A/Brisbane 10/2007 (H3N2) ou A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). Em um aspecto adicional da invenção, a proteína H2 pode ser da cepa A/Cingapura/1/57 (H2N2). A proteína H5 pode ser da cepa A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), ou A/Indonésia/5/2005. Em um aspecto da invenção, a proteína H6 pode ser da cepa A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1). A proteína H7 pode ser da cepa A/Equino/Praga/56 (H7N7). Em um aspecto da invenção, a proteína H9 é da cepa A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Em um aspecto adicional da invenção, a proteína HA pode ser de um vírus de influenza que pode ser um vírus B, incluindo B/Malásia/2506/2004 ou B/Flórida/4/2006. Os exemplos de sequências de aminoácidos das proteínas HA dos subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 ou B incluem SEQ ID NOs: 48 a 59.

[0046] A proteína HA do vírus de influenza pode ser H5 da Indonésia.

[0047] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico compreendendo sequências codificando uma proteína HA. As moléculas de ácido nucleico podem ainda compreender uma ou mais regiões reguladoras ligadas de maneira funcional à sequência codificando uma proteína HA. As moléculas de ácido nucleico podem compreender uma sequência codificando um H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, B ou C. Em outro aspecto da invenção, a proteína HA codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser um subtipo H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9, ou B. A proteína H1 codificada pela molécula de ácido nucleico é da cepa A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), ou A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1). Em um aspecto da invenção, a proteína H3 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser da cepa A/Brisbane 10/2007 (H3N2), ou A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). Em um aspecto adicional da invenção, a proteína H2 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser da cepa A/Cingapura/1/57 (H2N2). A proteína H5 codificada pela molécula de ácido nucleico pode também ser da cepa A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), ou A/Indonésia/5/2005. Em um aspecto da invenção, a proteína H6 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser da cepa A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1). A proteína H7 codificada pela molécula de ácido nucleico pode também ser da cepa A/Equino/Praga/56 (H7N1). Adicionalmente, a proteína H9 codificada pela molécula de ácido nucleico pode ser da cepa A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). A proteína HA do subtipo B codificada pelo ácido nucleico pode ser da cepa B/Flórida/4/2006, ou B/Malásia/2506/2004. Os exemplos de sequências de moléculas de ácido nucleico codificando tais proteínas HA a partir dos subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 ou B

incluem SEQ ID NOs: 36 a 47 e 60 a 73.

[0048] A sequência de ácido nucleico pode codificar a proteína HA de vírus de influenza H5 da Indonésia.

[0049] As regiões reguladoras, que podem estar ligadas de maneira funcional a uma sequência codificando uma proteína HA, incluem aquelas que são funcionais em uma célula de planta, uma célula de inseto ou uma célula de levedura. Tais regiões reguladoras podem incluir uma região reguladora de plastocianina, uma região reguladoras de Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO), proteína de ligação à clorofila a/b (CAB), ST-LS1, uma região reguladora de poliedrina, ou uma região reguladora de gp64. Outras regiões reguladoras incluem 5’ UTR, 3’ UTR ou sequências terminadoras. A região reguladora de plastocianina pode ser uma região reguladora de plastocianina de alfafa; as sequências 5’ UTR, 3’ UTR ou terminadoras podem também ser sequências de alfafa.

[0050] Um método para induzir a imunidade a uma infecção por vírus de influenza em um sujeito é também fornecido, o qual compreende administrar a partícula semelhante a vírus compreendendo uma proteína HA de vírus de influenza, um ou mais lipídios de planta, e um veículo farmaceuticamente aceitável. A partícula semelhante a vírus pode ser administrada a um sujeito de forma oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ou subcutânea.

[0051] A presente invenção também pertence a uma partícula semelhante a vírus (VLP) compreendendo uma ou mais proteínas derivadas de um vírus selecionado a partir do grupo que consiste em Influenza, Sarampo, Ebola, Marburg e HIV, e um ou mais lipídios derivados de uma célula de produção de hospedeiro sem sialilação. A proteína de HIV pode ser p24, gp120 ou gp41; a proteína do vírus Ebola pode ser VP30 ou VP35; a proteína do vírus Marburg pode ser Gp/SGP; a proteína do vírus do Sarampo pode ser proteína H ou proteína F.

[0052] Adicionalmente, a presente invenção refere-se a uma partícula semelhante a vírus (VLP) compreendendo uma proteína HA de vírus de influenza e um ou mais lipídios hospedeiros. Por exemplo, se o hospedeiro é inseto, então a partícula semelhante a vírus (VLP) pode compreender uma proteína HA de vírus de influenza e um ou mais lipídios de inseto, ou se o hospedeiro é uma levedura, então a partícula semelhante a vírus (VLP) pode compreender uma proteína HA de vírus de influenza e um ou mais lipídios de levedura.

[0053] A presente invenção também se refere às composições compreendendo VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos de influenza. Os dois ou mais subtipos ou cepas podem ser selecionados a partir do grupo que compreende: A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova Iorque/1995, A/gaivota argêntea/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/marreco canadense/MN/33/00, A/pato/Xangai/1/2000, A/marreca-arrebio/TX/828189/02, A/peru/Ontário/6118/68 (H8N4), A/marreca/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949 (H10N7), A/pato/Inglaterra/56 (H11N6), A/pato/Alberta/60/76 (H12N5), A/gaivota/Maryland/704/77 (H13N6), A/marreco canadense/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99 (H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7) ou A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Os dois ou mais subtipos ou cepas de VLPs podem estar presentes em quantidades aproximadamente equivalentes; alternativamente, um ou mais dos subtipos ou cepas podem ser a maioria das cepas ou subtipos representados.

[0054] A presente invenção pertence a um método para induzir a imunidade à infecção com vírus de influenza em um animal ou organismo-alvo compreendendo administrar uma dose eficaz de uma vacina compreendendo uma ou mais VLPs, a VLP produzida usando um hospedeiro de não sialiação, por exemplo, um hospedeiro planta, um hospedeiro inseto, ou um hospedeiro levedura. A vacina pode ser administrada de forma oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ou subcutânea. O organismo-alvo pode ser selecionado a partir do grupo que compreende seres humanos, primatas, cavalos, porcos, pássaros (aves), aves aquáticas, pássaros migratórios, codornas, patos, gansos, galinhas, camelos, caninos, cachorros, felinos, gatos, tigres, leopardos, algálias, martas, fuinhas, animais domésticos, animais de fazenda, camundongos, ratos, focas, baleias e seus similares.

[0055] A presente invenção fornece um método para produzir VLPs contendo hemaglutinina (HA) a partir de diferentes cepas de influenza em um hospedeiro adequado capaz de produzir uma VLP, por exemplo, uma planta, inseto ou levedura. As VLPs que são produzidas em plantas contêm lipídios de origem vegetal, as VLPs produzidas em células de inseto compreendem lipídios a partir da membrana plasmática de células de inseto (geralmente referidas como "lipídios de insetos"), e as VLPs produzidas em leveduras compreendem lipídios a partir da membrana plasmática de células de levedura (geralmente referidas como "lipídios de levedura").

[0056] A presente invenção também pertence a uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreendendo um ácido nucleico com uma sequência de nucleotídeo codificando um antígeno de um vírus envelopado ligado de maneira funcional a uma região reguladora ativa em uma planta. O antígeno pode ser uma hemaglutinina de influenza (HA).

[0057] A planta pode ainda compreender um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando uma ou mais proteínas chaperonas ligadas de maneira funcional a uma região reguladora ativa em uma planta. Uma ou mais proteínas chaperonas podem ser selecionadas a partir do grupo que compreende Hsp40 e Hsp70.

[0058] A produção de VLPs em plantas apresenta várias vantagens sobre a produção dessas partículas na cultura de células de insetos. Os lipídios vegetais podem estimular as células imunes específicas e otimizar a resposta imune induzida. As membranas vegetais são feitas de lipídios, fosfatidil colina (PC) e fosfatidil etanolamina (PE), e também contêm glicoesfingolipídios que são exclusivos das plantas e algumas bactérias e protozoários. Os esfingolipídios são incomuns, já que eles não são ésteres de glicerol como PC ou PE, mas de preferência consistem em amino álcool de cadeia longa que forma uma ligação amida com a cadeia de ácido graxo contendo mais de 18 carbonos. PC e PE, bem como os glicoesfingolipídios, podem se ligar a moléculas CD1 expressas por células imunes de mamíferos, tal como células apresentando antígeno (APCs) como células dendríticas e macrófagos e outras células incluindo linfócitos B e T no timo e fígado (Tsuji M., 2006). Ademais, em adição ao efeito adjuvante potencial da presença de lipídios vegetais, a capacidade dos N-glicanos de plantas facilitarem a captura de antígenos de glicoproteína por células apresentando antígeno (Saint-Jore-Dupas, 2007), pode ser vantajosa para a produção de VLPs em plantas.

[0059] Sem desejar se limitar à teoria, antecipa-se que as VLPs de plantas induzirão uma reação imune mais forte do que as VLPs produzidas em outros sistemas de fabricação e que a reação imune induzida por essas VLPs produzidas em plantas será mais forte quando comparado à reação imune induzida por vacinas de vírus integral

atenuado ou vivo.

[0060] Ao contrário de vacinas feitas de vírus integrais, as VLPs fornecem a vantagem de serem não infecciosas, assim a contenção biológica restritiva não é um problema significativo como seria trabalhar com um vírus infeccioso integral, e não é exigida para a produção. As VLPs produzidas em plantas fornecem mais uma vantagem permitindo que o sistema de expressão seja cultivado em uma estufa ou campo, assim sendo significativamente mais econômicas e adequadas para grande escala.

[0061] Adicionalmente, as plantas não compreendem as enzimas envolvidas em sintetizar e adicionar resíduos de ácido siálico a proteínas. As VLPs podem ser produzidas na ausência de neuraminidase (NA), e não há necessidade de coexpressar NA, ou tratar as células produzidas ou extrair com sialidase (neuraminidase), para assegurar a produção de VLP em plantas.

[0062] As VLPs produzidas de acordo com a presente invenção não compreendem a proteína M1 que é conhecida por ligar a RNA. O RNA é um contaminante da preparação da VLP e é indesejado quando obtendo aprovação reguladora para o produto VLP.

[0063] Este sumário da invenção não descreve necessariamente todas as características da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

[0064] Essas e outras características da invenção se tornarão mais claras a partir da seguinte descrição na qual referência é feita aos desenhos em anexo, em que:

[0065] A figura 1A mostra uma sequência de um cassete de expressão baseado em plastocianina de alfafa usado para a expressão de H1 a partir da cepa A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) de acordo com uma modalidade da presente invenção (SEQ ID NO: 8). O peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase (PDI) está sublinhado. Os sítios de

restrição Bg1II (AGATCT) e SacI (GAGCTC) usados para clonagem são mostrados em negrito. A figura 1B mostra um diagrama esquemático de domínios funcionais de hemaglutinina de influenza. Após a clivagem de HA0, os fragmentos HA1 e HA2 permanecem ligados juntos por uma ponte dissulfeto.

[0066] A figura 2A mostra uma representação do plasmídeo 540 montado para a expressão de HA subtipo H1 da cepa A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1). A figura 2B mostra uma representação do plasmídeo 660 montado para a expressão de HA subtipo H5 da cepa A/Indonésia/5/2005 (H5N1).

[0067] A figura 3 mostra uma cromatografia por exclusão de tamanho de extratos de proteína de folhas produzindo hemaglutinina H1 ou H5. A figura 3A mostra o perfil de eluição de azul de dextrana 2000 (triângulos) e proteínas (diamantes). A figura 3B mostra a imunodetecção (western blot; anti H1) de frações de eluição de H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) seguindo a cromatografia por exclusão de tamanho (cápsulas S500HR). A figura 3C mostra o perfil de eluição de H5; azul de dextrana 2000 (triângulos) e proteínas (diamantes). A figura 3D mostra a imunodetecção (western blot; anti H5) de frações de eluição de H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) seguindo cromatografia por exclusão de tamanho (cápsulas S500HR).

[0068] A figura 4A mostra a sequência codificando o fragmento N terminal de H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) (SEQ ID NO: 1). A figura 4B mostra a sequência codificando o fragmento C terminal de H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) (SEQ ID NO: 2).

[0069] A figura 5 mostra a sequência completa codificando HA0 de H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) (SEQ ID NO: 28).

[0070] A figura 6 mostra a sequência codificando H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) flanqueada por um sítio HindIII imediatamente a montante do ATG inicial, e um sítio SacI

imediatamente a jusante do códon de parada (TAA) (SEQ ID NO: 3).

[0071] A figura 7A mostra a sequência do iniciador Plasto-443c (SEQ ID NO: 4). A figura 7B mostra a sequência do iniciador SpHA(Ind)-Plasto.r (SEQ ID NO: 5). A figura 7C mostra a sequência do iniciador Plasto-SpHA(Ind).c (SEQ ID NO: 6). A figura 7D mostra a sequência do iniciador HA(Ind)-Sac.r (SEQ ID NO: 7).

[0072] A figura 8A mostra a sequência de aminoácido da sequência de peptídeo H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) (SEQ ID NO: 9). A figura 8B mostra a sequência de aminoácido da sequência de peptídeo H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) (SEQ ID NO: 10). O peptídeo sinal nativo é indicado em negrito.

[0073] A figura 9 mostra a sequência de nucleotídeo de HA de influenza A subtipo H7 (SEQ ID NO: 11).

[0074] A figura 10A mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H2 (SEQ ID NO: 12). A figura 10B mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H3 (SEQ ID NO: 13). A figura 10C mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H4 (SEQ ID NO: 14). A figura 10D mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H5 (SEQ ID NO: 15). A figura 10E mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H6 (SEQ ID NO: 16). A figura 10F mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H8 (SEQ ID NO: 17). A figura 10G mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H9 (SEQ ID NO: 18). A figura 10H mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H10 (SEQ ID NO: 19). A figura 10I mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H11 (SEQ ID NO: 20). A figura 10J mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H12 (SEQ ID NO: 21). A figura 10K mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H13 (SEQ ID NO: 22). A figura 10L mostra a

sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H14 (SEQ ID NO: 23). A figura 10M mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H15 (SEQ ID NO: 24). A figura 10N mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza A, subtipo H16 (SEQ ID NO: 25). A figura 10O mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza B, subtipo HA (SEQ ID NO: 26). A figura 10P mostra a sequência de nucleotídeo de HA de Influenza C (SEQ ID NO: 27). A figura 10Q mostra a sequência de nucleotídeo do iniciador XmaI-pPlas.c (SEQ ID NO: 29). A figura 10R mostra a sequência de nucleotídeo do iniciador SacI-ATG-pPlas.r (SEQ ID NO: 30). A figura 10S mostra a sequência de nucleotídeo do iniciador SacI-PlasTer.c (SEQ ID NO: 31). A figura 10T mostra a sequência de nucleotídeo do iniciador EcoRI-PlasTer.r (SEQ ID NO: 32).

[0075] A figura 11 mostra uma representação esquemática de vários construtos como usados aqui. O construto 600 compreende a sequência de nucleotídeo para codificar a HA subtipo H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) ligado de maneira funcional ao promotor de plastocianina (plasto) e terminador (Pter); o construto 540 compreende a sequência de nucleotídeo para codificar a HA subtipo H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) em combinação com um sinal peptídeo de proteína dissulfeto isomerase de alfafa (SP PDI), e está ligado de maneira funcional a um promotor de plastocianina (Plasto) e terminador (Pter); e o construto 750 para a expressão da região de codificação de M1 de influenza A/PR/8/34 é combinado com a 5’ UTR do vírus etch do tabaco (TEV), e ligado de maneira funcional com o promotor 35S duplo e o terminador Nos.

[0076] A figura 12 mostra a imunodetecção de H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)), usando anticorpos anti-H5 (Vietnã), em extratos de proteína de folhas de *N. benthamiana* transformados com o construto 660 (faixa 2).

[0077] A figura 13 mostra a caracterização de estruturas de hemaglutinina através de cromatografia por exclusão de tamanho. O extrato de proteína de biomassas separadas produzindo H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)), H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)), H1 solúvel, ou H1 e M1 separados por filtração em gel em S-500 HR. O H1 comercial (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) na forma de roseta foi também fracionado (roseta H1). A figura 13A mostra as frações de eluição analisadas para o teor de proteína relativo (Nível de Proteína Relativo – um perfil de eluição de proteína padrão de um fracionamento de biomassa é mostrado). O pico de eluição de azul de dextrana 2000 (padrão de referência 2 MDa) é indicado. A figura 13B mostra as frações de eluição analisadas quanto a presença de hemaglutinina por immunoblotting com anticorpos (para H5) anti-H5 (Vietnã). A figura 13C mostra as frações de eluição analisadas para anticorpos para H1 anti-influenza A. A figura 13D mostra as frações de eluição analisadas para anticorpos para H1 solúvel anti-influenza A. A figura 13E mostra as frações de eluição analisadas para anticorpos para H1 roseta anti-influenza A. A figura 13F mostra as frações de eluição analisadas para anticorpos para H1 + M1 anti-influenza A.

[0078] A figura 14 mostra a concentração de estruturas H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) de influenza por centrifugação em gradiente de sacarose e exame de microscopia de elétrons de frações concentradas de hemaglutinina. A figura 14A mostra a caracterização de frações a partir da centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. Cada fração foi analisada quanto à presença de H5 por immunoblotting usando anticorpos (painel superior) anti-H5 (Vietnã), e quanto a seu teor de proteína relativo e capacidade de hemaglutinina (gráfico). A figura 14B mostra o exame de microscopia de elétrons por transmissão de coloração negativa de frações agrupadas 17, 18 e 19 a partir de centrifugação em gradiente de sacarose. A

barra representa 100 nm.

[0079] A figura 15 mostra a purificação de VLPs de influenza subtipo H5. A figura 15A mostra análise SDS-PAGE colorida com azul de coomassie de teor de proteína nas etapas de clarificação – faixa 1, extrato bruto; faixa 2, extrato com pH ajustado para pH 6; faixa 3, extrato tratado a quente; faixa 4, extrato filtrado em DE; as etapas de purificação de afinidade de fetuína: faixa 5, carga; faixa 6, escoamento; faixa 7, eluição (concentrado 10x). A figura 15B mostra o exame de microscopia de elétrons por transmissão de coloração negativa da amostra de VLP H5 purificada. A barra representa 100 nm. A figura 15C mostra VLP H5 isolada aumentada para mostrar os detalhes da estrutura. A figura 15D mostra o produto VPL H5 em um SDS-PAGE de redução de coloração Coomassie (faixa A) e Western Blot (faixa B) usando anticorpo policlonal de coelho levantado contra HA da cepa A/Vietnã/1203/2004 (H5N1).

[0080] A figura 16 mostra uma sequência de nucleotídeo para o gene de hemaglutinina (HA) do vírus de influenza A (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)), cds. Completos No. Acesso ao GenBank AY289929 (SEQ ID NO: 33).

[0081] A figura 17 mostra uma sequência de nucleotídeo para mRNA de *Medicago sativa* para a proteína dissulfeto isomerase. No. Acesso ao GenBank Z11499 (SEQ ID NO: 34).

[0082] A figura 18 mostra uma sequência de nucleotídeo para o segmento 7 do vírus de influenza A (A/Porto Rico/8/34 (H1N1)), sequência completa. No. Acesso ao GenBank NC_002016.1 (SEQ ID NO: 35).

[0083] A figura 19 mostra a localização de acúmulo de VLP por observação de microscopia de elétrons por transmissão de coloração positiva de tecido produzindo H5. CW: parede celular, ch: cloroplasto, pm: membrana plasmática, VLP: partícula semelhante a vírus. A barra representa 100 nm.

[0084] A figura 20 mostra a indução de respostas de anticorpo sérico 14 dias após o estímulo em camundongos Balb/c vacinados com VLP H5 de influenza produzindo em planta (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) ou respostas de anticorpo de H5 solúvel recombinante (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). A figura 20(A) mostra as respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de injeção intramuscular. A figura 20(B) mostra as respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de administração intranasal. As respostas de anticorpo foram medidas contra vírus integrais de H5N1 (A/Indonésia/5/05). GMT: titulação média geométrica. Os valores são o GMT (ln) de titulações finais recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam o desvio médio. * $p < 0,05$ comparado a H5 solúvel recombinante.

[0085] A figura 21 mostra a resposta de anticorpo à inibição de hemaglutinina (HAI) 14 dias após o estímulo em camundongos Balb/c vacinados com VLP H5 de influenza produzido em planta (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) ou H5 solúvel recombinante (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). A figura 21(A) mostra as respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de injeção intramuscular. A figura 21(B) mostra as respostas de anticorpo de camundongos imunizados através de administração intranasal. As respostas de anticorpo HAI foram medidas usando os vírus H5N1 integrais inativos (A/Indonésia/5/05). GMT: titulação de média geométrica. Os valores são o GMT (ln) de titulações finais recíprocos de cinco camundongos por grupo. As barras representam o desvio médio. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado a H5 solúvel recombinante.

[0086] A figura 22 mostra o efeito de adjuvante na imunogenicidade das VLPs em camundongos Balb/c. A figura 22(A) mostra o efeito de alume em camundongos imunizados através de injeção intramuscular. A figura 22(B) mostra o efeito de quitosana em camundongos

imunizados através de administração intranasal. As respostas de anticorpo HAI foram medidas usando vírus H5N1 integrais inativos (A/Indonésia/5/05). GMT: titulação de média geométrica. Os valores são a GMT (ln) de titulações finais recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam o desvio médio. * $p < 0,05$ comparado a H5 solúvel recombinante correspondente.

[0087] A figura 23 mostra a resposta de anticorpo à administração de VLP H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). A figura 23(A) mostra o isotipo de imunoglobulina Anti-Indonésia/5/05 em camundongos imunizados através de administração intramuscular, 30 dias após estímulo. Os valores são a GMT (log_2) de titulações finais recíprocas de cinco camundongos por grupo. ELISA executado usando os vírus H5N1 inativos integrais (A/Indonésia/5/2005) como o agente de revestimento. As barras representam o desvio médio. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ comparado ao H5 solúvel recombinante correspondente (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). A figura 23(B) mostra as titulações de anticorpo contra os vírus inativos integrais (A/Indonésia/5/2005 (H5N1) e (A/Vietnã/1194/04 (H5N1))). Todos os grupos são estatisticamente diferentes do controle negativo.

[0088] figura 24 mostra a titulação de anticorpo contra os vírus inativos integrais homólogos (A/Indonésia/5/05), 14 dias após a primeira dose (semana 2), 14 dias após o estímulo (semana 5) ou 30 dias após o estímulo (semana 7) de camundongos Balb/c imunizados com VLP H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). GMT: titulação de média geométrica. Os valores são a GMT (ln) de titulações finais recíprocos de cinco camundongos por grupo. * $p < 0,05$ comparado a H5 solúvel recombinante.

[0089] A figura 25 mostra a reatividade cruzada *in vitro* de anticorpos séricos de camundongos Balb/c imunizados com VLP H5 (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)) 30 dias após o estímulo. (A) As titulações

de anticorpo de vírus inativos integrais. (B) As titulações de inibição de hemaglutinina contra vários vírus inativos integrais. Os valores são a GMT (ln) de titulações finais recíprocas de cinco camundongos por grupo. As barras representam o desvio médio. Todos os grupos são estatisticamente diferentes do controle negativo. * $p < 0,05$ comparado a H5 solúvel recombinante correspondente. A todos os valores menores de 10 foram dados um valor arbitrário de 5 (1,6 para ln) e são considerados negativos.

[0090] A figura 26 mostra a eficácia da VLP H5 produzida a partir de uma planta (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). (A) Taxa de sobrevida de camundongos após a provocação com 1000 LD_{50} (4,09 x 106 $CCID_{50}$) da cepa de influenza A/Turquia/582/06 (H5N1) (B) peso corporal de camundongos imunizados após a provocação. Os valores são o peso corporal médio de camundongos sobreviventes.

[0091] A figura 27 mostra a origem de VLPs de influenza derivados de planta. (A) A composição de lipídio polar de VLPs de influenza purificadas. Os lipídios contidos em um equivalente de 40 µg de proteínas, foram extraídos de VLP como descrito, separados por HP-TLC, e comparados ao perfil de migração de lipídios isolados de membrana plasmática (PM) de tabaco altamente purificada. As abreviações de lipídios são como segue: DGDG, Digalactosildi-acilglicerol; gluCER, glucosil-ceramida; PA, ácido fosfático; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; SG, Estearil-glicosídeo. (B) Composição de lipídio neutro de VLPs de influenza purificadas. Os lipídios contidos em um equivalente de 20 µg de proteínas foram extraídos da VLP como descrito, separados por HP-TLC e comparados à migração de sitoesterol. (C) Imunodetecção da ATPases de bomba de prótons marcadora de membrana plasmática (PMA) em VLPs purificadas e PM altamente purificada de folhas de tabaco (PM_L) e

células de tabaco BY2 (PM_{BY2}). Dezoito microgramas de proteína foram carregados em cada faixa.

[0092] A figura 28 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 774 – sequência de nucleotídeo de A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 36). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0093] A figura 29 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 775 – sequência de nucleotídeo de A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 37). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0094] A figura 30 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 776 – sequência de nucleotídeo de A/Brisbane 10/2007 (H3N2) (SEQ ID NO: 38). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0095] A figura 31 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 777 – sequência de nucleotídeo de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (SEQ ID NO: 39). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0096] A figura 32 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 778 – sequência de nucleotídeo de A/Malásia/2506/2004 (SEQ ID NO: 40). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0097] A figura 33 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 779 – sequência de nucleotídeo de A/Flórida/4/2006 (SEQ ID NO: 41). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0098] A figura 34 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 780 – sequência de nucleotídeo de A/Cingapura/1/57 (H2N2) (SEQ ID NO: 42). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[0099] A figura 35 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 781 – sequência de nucleotídeo de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (SEQ ID NO: 43). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5' e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3'. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[00100] A figura 36 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 782 – sequência de nucleotídeo de A/Vietnã/1194/2004

(H5N1) (SEQ ID NO: 44). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5’ e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3’. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[00101] A figura 37 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 783 – sequência de nucleotídeo de A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (SEQ ID NO: 45). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5’ e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3’. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[00102] A figura 38 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 784 – sequência de nucleotídeo de A/Equino/Praga/56 (H7N7) (SEQ ID NO: 46). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5’ e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3’. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[00103] A figura 39 mostra a sequência abrangendo os sítios DraIII a SacI do clone 785 – sequência de nucleotídeo de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (SEQ ID NO: 47). A sequência de codificação é flanqueada por uma região reguladora de plastocianina, começando com um sítio de restrição DraIII na extremidade 5’ e por um códon de parada e um sítio SacI na extremidade 3’. Os sítios de restrição são sublinhados; ATG está em negrito e sublinhado.

[00104] A figura 40A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 48) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 774 (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)). A fase aberta de leitura do clone 774 começa com o ATG indicado na figura 28. A figura 40B mostra a sequência de aminoácido

(SEQ ID NO: 49) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 775 (A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1)). A fase aberta de leitura do clone 775 começa com o ATG indicado na figura 29.

[00105] A figura 41A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 50) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 776 (A/Brisbane/10/2007 (H3N2)). A fase aberta de leitura do clone 776 começa com o ATG indicado na figura 30. A figura 41B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 51) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 777 (A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)). A fase aberta de leitura do clone 777 começa com o ATG indicado na figura 31.

[00106] A figura 42A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 52) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 778 (A/Malásia/2506/2004). A fase aberta de leitura do clone 778 começa com o ATG indicado na figura 32. A figura 42B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 53) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 779 (B/Flórida/4/2006). A fase aberta de leitura do clone 779 começa com o ATG indicado na figura 33.

[00107] A figura 43A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 54) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 780 (A/Cingapura/1/57 (H2N2)). A fase aberta de leitura do clone 780 começa com o ATG indicado na figura 34. A figura 43B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 55) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 781 (A/Anhui/1/2005 (H5N1)). A fase aberta de leitura do clone 781 começa com o ATG indicado na figura 35.

[00108] A figura 44A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 56) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 782 (A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)). A fase aberta de leitura do clone 782 começa com o ATG indicado na figura 36. A figura 44B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 57) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 783 (A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1)). A fase aberta de leitura do

clone 783 começa com o ATG indicado na figura 37.

[00109] A figura 45A mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 58) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 784 (A/Equino/Praga/56 (H7N7)). A fase aberta de leitura do clone 784 começa com o ATG indicado na figura 38. A figura 45B mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 59) do polipeptídeo traduzido a partir do clone 785 (A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)). A fase aberta de leitura do clone 785 começa com o ATG indicado na figura 39.

[00110] A figura 46 mostra a imunodetecção (western blot) das frações de eluição 7 a 17 de VLPs produzidas por plantas, seguindo cromatografia por exclusão de tamanho. O pico de eluição (fração 10) de azul de dextrana é indicado pela seta. Os subtipos de hemaglutinina H1, H2, H3, H5, H6 e H9 são mostrados. A hemaglutinina é detectada nas frações 7 a 14, correspondendo à eluição das VLPs.

[00111] A figura 47 mostra uma análise de "immunoblot" de expressão de uma série de hemaglutinina a partir de cepas epidêmicas anuais. Dez e vinte microgramas de extratos de proteína de folha foram carregados nas faixas 1 e 2, respectivamente, para plantas expressando HA a partir de várias cepas de influenza (indicado no topo dos "immunoblots").

[00112] A figura 48A mostra uma análise de "immunoblot" de expressão de uma série de hemaglutinina H5 a partir de cepas pandêmicas anuais. Dez e vinte microgramas de extratos de proteína foram carregados nas faixas 1 e 2, respectivamente. A figura 48B mostra uma análise de "immunoblot" de expressão de hemaglutinina H2, H7 e H9 a partir de cepas de influenza selecionadas. Dez e vinte microgramas de extratos de proteína foram carregados nas faixas 1 e 2, respectivamente.

[00113] A figura 49 mostra um "immunoblot" de H5 a partir da cepa A/Indonésia/5/2005 em extratos de proteína a partir de folhas de

Nicotiana tabacum, agroinfiltradas com AGL1/660. Duas plantas (planta 1 e planta 2) foram infiltradas e 10 e 20 µg de proteína solúvel extraída a partir de cada planta foram carregados nas faixas 1 e 2, respectivamente.

[00114] A figura 50 mostra a reatividade cruzada *in vitro* de anticorpos séricos. As titulações de inibição de hemaglutinina (HI) em soros de furão, 14 dias (A) após a 1ª imunização e (B) após o 2º estímulo com VLP H5 de influenza produzido em planta (A/Indonésia/5/2005 (H5N1)). As respostas de anticorpo HAI foram medidas usando os seguintes vírus H5N1 integrais inativos: A/peru/Turquia/1/05, A/Vietnã/1194/04, A/Anhui/5/05 e a cepa homóloga A/Indonésia/5/05. Os valores da GMT (log_2) das titulações finais recíprocas de cinco furões por grupo. Faixa Diagonal – A/Indonésia/6/06 (clado 2.1.3); verificado – A/peru/Turquia/1/05 (clado 2.2); barra branca – A/Vietnã/1194/04 (clado 1); barra preta - A/Anhui/5/05. Os respondedores são indicados. As barras representam o desvio médio.

[00115] A figura 51 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 60) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H5 a partir de A/Indonésia/5/2005 (Construto # 660), 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00116] A figura 52 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 61) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H1 a partir de A/Nova Caledônia/20/1999 (Construto # 540), 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00117] A figura 53 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 62) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H1 a partir de A/Brisbane/59/2007 (Construto # 774), 3’

UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00118] A figura 54 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 63) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H1 a partir de A/ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (Construto # 775), 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00119] A figura 55 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 64) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H2 a partir de A/Cingapura/1/57 (H2N2) (Construto # 780), 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00120] A figura 56 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 65) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H5 a partir de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (Construto # 781), 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00121] A figura 57 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 66) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H5 a partir de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (Construto # 782), 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00122] A figura 58 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 67) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H6 a partir de A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (Construto # 783), 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00123] A figura 59 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 68) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de

hemaglutinina H9 a partir de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Construto # 785), 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00124] A figura 60 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 69) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H3 a partir de A/Brisbane/10/2007 (H3N2), 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00125] A figura 61 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 70) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H3 a partir de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00126] A figura 62 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 71) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina H7 a partir de A/Equino/Praga/56 (H7N7), 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00127] A figura 63 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 72) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de HA a partir de B/Malásia/2506/2004, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00128] A figura 64 mostra a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 73) de um cassete de expressão de HA compreendendo promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de HA a partir de B/Flórida/4/2006, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.

[00129] A figura 65 mostra uma sequência de aminoácido consenso (SEQ ID NO: 74) para HA de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (codificada por SEQ ID NO: 33), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID

NO: 48), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 49) e SEQ ID NO: 9. X1 (posição 3) é A ou V; X2 (posição 52) é D ou N; X3 (posição 90) é K ou R; X4 (posição 99) é K ou T; X5 (posição 111) é Y ou H; X6 (posição 145) é V ou T; X7 (posição 154) é E ou K; X8 (posição 161) é R ou K; X9 (posição 181) é V ou A; X10 (posição 203) é D ou N; X11 (posição 205) é R ou K; X12 (posição 210) é T ou K; X13 (posição 225) é R ou K; X14 (posição 268) é W ou R; X15 (posição 283) é T ou N; X16 (posição 290) é E ou K; X17 (posição 432) é I ou L; X18 (posição 489) é N ou D.

[00130] A figura 66 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 75) de H1 de Nova Caledônia (AAP34324.1) codificada por SEQ ID NO: 33.

[00131] A figura 67 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 76) de H1 de Porto Rico (NC_0409878.1) codificada por SEQ ID NO: 35.

[00132] A figura 68 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do cassete de expressão número 828, de PacI (promotor a montante) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência 5'UTR de HT CPMV sublinhada com ATC mutada. O sitio de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG da sequência de codificação de proteína a ser expresso, nesse caso cadeia leve C5-1 kapa).

[00133] A figura 69 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 663, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de plastocianina). A sequência de codificação de H5 (de A/Indonésia/5/2005) em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00134] A figura 70 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 787, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de plastocianina) a EcoRI (imediatamente a

jusante do terminador de plastocianina). A sequência de codificação de H1 (de A/Brisbane/59/2007) em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00135] A figura 71 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 790, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de plastocianina). A sequência de codificação de H3 (de A/Brisbane/10/2007) em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00136] A figura 72 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 798, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de plastocianina). A sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006 em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00137] A figura 73 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 580, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H1 (de A/Nova Caledônia/20/1999) em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00138] A figura 74 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 685, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H5 de A/Indonésia/5/2005 está sublinhada.

[00139] A figura 75 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 686, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H5 de A/Indonésia/5/2005 em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00140] A figura 76 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 732, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H1 de A/Brisbane/59/2007 está sublinhada.

[00141] A figura 77 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 733, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H1 de A/Brisbane/59/2007 em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00142] A figura 78 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 735, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H3 de A/Brisbane/10/2007 está sublinhada.

[00143] A figura 79 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 736, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de H3 de A/Brisbane/10/2007 em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00144] A figura 80 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 738, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006 está sublinhada.

[00145] A figura 81 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número 739, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006 em fusão com PDI SP está sublinhada.

[00146] A figura 82 mostra uma sequência de ácido nucleico codificando Msj1 (SEQ ID NO: 114).

[00147] A figura 83 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número R850, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de HSP40 está sublinhada.

[00148] A figura 84 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número R860, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de HSP70 está sublinhada.

[00149] A figura 85 mostra a sequência de ácido nucleico de uma parte do construto número R870, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador NOS). A sequência de codificação de HSP40 está em itálico e sublinhada e a sequência de codificação HSP70 está sublinhada. (A) nucleotídeos 1 a 5003; (B) nucleotídeos 5004 a 9493.

[00150] A figura 86 mostra uma representação esquemática do construto R472.

[00151] A figura 87 mostra uma análise "immunoblot" de expressão de HA usando um peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase de alfafa. Vinte miligramas de extrato de proteína de folha obtido a partir de 3 plantas separadas foram carregados no SDS-PAGE exceto pelo H1 (A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)) onde cinco microgramas foram usados. Os controles indicados (vírus inativo integral (WIV) de cepa homóloga) foram marcados em cinco ou vinte microgramas de plantas infiltradas com mock. (a) A expressão de H1 de A/Nova Caledônia/20/99), (b) expressão de H1 de A/Brisbane/59/2007, (c) expressão de H3 de A/Brisbane/10/2007, (d) expressão de H5 de A/Indonésia/5/2005, (e) expressão de HA de B/Flórida/4/2006. As setas indicam a imunobanda correspondente para HA0. SP WT: peptídeo sinal nativo, OS PDI: peptídeo sinal PDI de alfafa.

[00152] A figura 88 mostra uma comparação de estratégias de expressão de HA por análise de "immunoblot" de extratos de proteína de folha. HA foi produzida usando cassetes baseados em plastocianina ou baseados em CPMV-HT. Para CPMV-HT, o peptídeo sinal de HA de

ocorrência natural e o peptídeo sinal de PDI de alfafa foram também comparados. Vinte microgramas de extrato de proteína foram carregados no SDS-PAGE para subtipo de HA analisado, exceto para o H1 de Nova Caledônia para o qual cinco microgramas de proteínas foram carregados. (a) Expressão de H1 de A/Nova Caledônia/20/1999, (b) expressão de H1 de A/Brisbane/59/2007, (c) expressão de H3 de A/Brisbane/10/2007, (d) expressão de H5 de A/Indonésia/5/2005, e (e) expressão de B de B/Flórida/4/2006. As setas indicam a imunobanda correspondente a HA0; cepas de *Agrobactéria* específicas compreendendo os vetores específicos usados para a expressão de HA são indicadas no topo das faixas.

[00153] A figura 89 mostra um "immunoblot" de acúmulo de HA quando coexpresso com Hsp 40 e Hsp 70. H1 de Nova Caledônia (AGL 1/540) e H3 de Brisbane (AGL 1/790) foram expressos independentemente ou coexpressos com AGL 1/R870. O nível de acúmulo de HA foi avaliado por análise de "immunoblot" de extratos de proteína de folhas infiltradas. Os vírus inativos integrais (WIV) de cepa A/Nova Caledônia/20/99 ou Brisbane/10/2007 foram usados como controles.

Descrição Detalhada da Invenção

[00154] A presente invenção refere-se à produção de partículas semelhantes a vírus. Mais especificamente, a presente invenção é direcionada à produção de partículas semelhantes a vírus compreendendo antígenos de influenza.

[00155] A seguinte descrição é de uma modalidade preferencial.

[00156] A presente invenção fornece um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando um antígeno de um vírus envelopado, por exemplo, a hemaglutinina de influenza (HA), ligado de maneira funcional a uma região reguladora ativa em uma planta.

[00157] Ademais, a presente invenção fornece um método para produzir partículas semelhantes a vírus (VLPs) em uma planta. O método envolve introduzir um ácido nucleico codificando um antígeno ligado de maneira funcional a uma região reguladora ativa na planta, para a planta, ou parte da planta, e incubar a planta ou uma parte da planta sob condições que permitem a expressão do ácido nucleico, produzindo desse modo as VLPs.

[00158] As VLPs podem ser produzidas a partir de vírus de influenza, entretanto, as VLPs podem também ser produzidas a partir de outros vírus derivados de membrana plasmática incluindo, mas não limitados a Sarampo, Ebola, Marburg e HIV.

[00159] A invenção inclui VLPs de todos os tipos de vírus de influenza que podem infectar seres humanos, incluindo, por exemplo, mas não limitados ao subtipo A predominante (H1N1) (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)), o subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1) (SEQ ID NO: 60) e o tipo B menos comum (por exemplo, SEQ ID NO: 26, figura 10O), e o tipo C (SEQ ID NO: 27, figura 10P), e a HAs obtidas a partir de outros subtipos de influenza. As VLPs de outros subtipos de influenza são também incluídas na presente invenção, por exemplo, A/Brisbane/59/2007 (H1N1; SEQ ID NO: 48), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1; SEQ ID NO: 49), A/Cingapura/1/57 (H2N2; SEQ ID NO: 54), A/Anhui/1/2005 (H5N1; SEQ ID NO: 55), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1; SEQ ID NO: 56), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1; SEQ ID NO: 57), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2; SEQ ID NO: 59), A/Brisbane/10/2007 (H3N2; SEQ ID NO: 50), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2; SEQ ID NO: 51), A/Equino/Praga/56 (H7N7; SEQ ID NO: 58), B/Malásia/2506/2004 (SEQ ID NO: 52), ou B/Flórida/4/2006 (SEQ ID NO: 53).

[00160] A presente invenção também pertence a vírus de influenza que infectam outros mamíferos ou animais hospedeiros, por exemplo, seres humanos, primatas, cavalos, porcos, pássaros, aves aquáticas,

pássaros migratórios, codornas, patos, gansos, galinhas, camelos, caninos, cachorros, felinos, gatos, tigres, leopardos, algálias, martas, fuinhas, animais domésticos, animais de fazenda, camundongos, ratos, focas, baleias e seus similares.

[00161] Exemplos não limitantes de outros antígenos que podem ser expressos nos vírus derivados da membrana plasmática incluem, a proteína capsidial de HIV – p24; gp120, gp41 – proteínas de envelope, as proteínas estruturais VP30 e VP35; Gp/SGP (uma proteína de membrana integral glicosilada) de Filovírus, por exemplo, Ebola ou Marburg, ou a proteína H, e proteína F de Paramixovírus, por exemplo, Sarampo.

[00162] A invenção também inclui, mas não está limitada a VLPs derivadas de influenza que obtêm um envelope de lipídio a partir da membrana plasmática da célula na qual as proteínas VLP são expressas. Por exemplo, se a VLP é expressa em um sistema baseado em planta, a VLP pode obter um envelope de lipídio a partir da membrana plasmática da célula.

[00163] Geralmente, o termo "lipídio" refere-se a moléculas ocorrendo naturalmente solúveis em gordura (lipofílicas). O termo é também usado mais especificamente para se referir a ácidos graxos ou seus derivados (incluindo tri-, di- e monoglicerídeos e fosfolipídios), bem como outros metabólitos contendo esterol ou esteróis solúveis em gordura. Os fosfolipídios são o componente principal de todas as membranas biológicas, junto com glicolipídios, esteróis e proteínas. Os exemplos de fosfolipídios incluem fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e seus similares. Os exemplos de esteróis incluem zooesteróis (por exemplo, colesterol) e fitosteróis (por exemplo, sitosterol) e estearil-glicosídeo. Mais de 200 fitosteróis foram identificados em várias espécies de plantas, os mais comuns sendo campesterol, stigmasterol, ergosterol, brassicasterol,

delta-7-stigmasterol, delta-7-avenasterol, daunosterol, sitosterol, 24-metilcolesterol, colesterol ou beta-sitosterol. Como um versado na técnica entenderia, a composição de lipídio da membrana plasmática de uma célula pode variar com a cultura ou condições de crescimento da célula ou organismo a partir do qual a célula é obtida.

[00164] As membranas celulares geralmente compreendem bicamadas de lipídios, bem como proteínas para várias funções. As concentrações localizadas de lipídios particulares podem ser encontradas na bicamada de lipídio, referida como ‘balsas lipídicas’. Sem querer se limitar à teoria, as balsas lipídicas podem ter funções significativas em endocitose e exocitose, entrada ou saída de vírus ou outros agentes infecciosos, transdução de sinal intercélulas, interação com outros componentes estruturais da célula ou organismo, tal como matrizes intracelulares e extracelulares.

[00165] Com relação ao vírus de influenza, o termo "hemaglutinina" ou "HA", como usado aqui, refere-se a uma glicoproteína encontrada no exterior de partículas virais de influenza. A HA é uma glicoproteína tipo I da membrana homotrimérica, geralmente compreendendo um peptídeo sinal, um domínio HA1, e um domínio HA2 compreendendo um sítio âncora abordando membrana no C-terminal e uma pequena cauda citoplásmica (figura 1B). As sequências de nucleotídeo codificando HA são bem conhecidas e estão disponíveis – ver, por exemplo, a base BioDefence Public Health (Vírus de Influenza, ver: URL: biohealthbase.org) ou National Center for Biotechnology Information (ver URL: ncbi.nlm.nih.gov), ambos são incorporados aqui a título de referência.

[00166] O termo "homotrímero" ou "homotrimérico" indica que um oligômero é formado por três moléculas de proteína HA. Sem querer se limitar à teoria, a proteína HA é sintetizada como proteína precursora monomérica (HA0) de aproximadamente 75 kDa, que é montada na

superfície em uma proteína trimérica alongada. Antes que a trimerização ocorra, a proteína precursora é clivada em um sítio de clivagem de ativação conservada (também referido como peptídeo de fusão) em 2 cadeias de polipeptídeo, HA1 e HA2 (compreendendo a região transmembrana), ligadas por uma ligação dissulfeto. O segmento HA1 pode ter 328 aminoácidos de comprimento, e o segmento HA2 pode ter 221 aminoácidos de comprimento. Embora essa clivagem possa ser importante para a infectividade do vírus, ela pode não ser essencial para a trimerização da proteína. A inserção de HA dentro da membrana do retículo endoplásmico (ER) da célula hospedeira, a clivagem do peptídeo sinal e a glicosilação da proteína são eventos cotraducionais. O redobramento correto de HA exige glicosilação da proteína e formação de 6 ligações dissulfeto intracadeia. O trímero de HA monta dentro do complexo cis- e trans-Golgi, o domínio transmembrana desempenhando uma função no processo de trimerização. As estruturas de cristal das proteínas HA tratadas com bromelaína, que faltam no domínio transmembrana, têm mostrado uma estrutura altamente conservada contra cepas de influenza. Também se estabeleceu que a HA passa por mudanças conformacionais maiores durante o processo de infecção, que exige que o precursor HA0 seja clivado nas 2 cadeias de polipeptídeo HA1 e HA2. A proteína HA pode ser processada (isto é, compreende domínios HA1 e HA2), ou pode ser não processada (isto é, compreende o domínio HA0).

[00167] A presente invenção pertence ao uso de uma proteína HA compreendendo o domínio transmembrana e inclui os domínios HA1 e HA2, por exemplo, a proteína HA pode ser HA0, ou HA processada compreendendo HA1 e HA2. A Proteína HA pode ser usada na produção ou formação de VLPs usando um sistema de expressão de uma planta, ou célula de planta.

[00168] A HA da presente invenção pode ser obtida a partir de

qualquer subtipo. Por exemplo, a HA pode ser do subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 ou influenza tipo B. A HA recombinante da presente invenção pode também compreender uma sequência de aminoácido baseada na sequência de qualquer hemaglutinina conhecida na técnica – ver, por exemplo, a base BioDefence Public Health (Vírus de Influenza, ver: URL: biohealthbase.org) ou National Center for Biotechnology Information (ver URL: ncbi.nlm.nih.gov). Ademais, a HA pode ser baseada na sequência de uma hemaglutinina que é isolada de um ou mais vírus de influenza recentemente identificados ou surgindo.

[00169] A presente invenção também inclui VLPs que compreendem HAs obtidas a partir de um ou mais subtipos de influenza. Por exemplo, as VLPs podem compreender uma ou mais HA do subtipo H1 (codificado por SEQ ID NO: 28), H2 (codificado por SEQ ID NO: 12), H3 (codificado por SEQ ID NO:13), H4 (codificado por SEQ ID NO:14), H5 (codificado por SEQ ID NO:15), H6 (codificado por SEQ ID NO:16), H7 (codificado por SEQ ID NO:11), H8 (codificado por SEQ ID NO:17), H9 (codificado por SEQ ID NO:18), H10 (codificado por SEQ ID NO:19), H11 (codificado por SEQ ID NO:20), H12 (codificado por SEQ ID NO:21), H13 (codificado por SEQ ID NO:27), H14 (codificado por SEQ ID NO:23), H15 (codificado por SEQ ID NO:24), H16 (codificado por SEQ ID NO:25), ou influenza tipo B (codificado por SEQ ID NO: 26), ou uma combinação desses. Uma ou mais HA de um ou mais subtipos de influenza podem ser coexpressas dentro de uma célula de planta ou inseto para assegurar que a síntese de uma ou mais HA resulta na formação de VLPs compreendendo uma combinação de subtipos de HA, enquanto as VLPs úteis para inocular humanos podem compreender um ou mais dos subtipos H1, H2, H3, H5, H7, H9, H10, N1, N2, N3 e N7. Entretanto, outras combinações de subtipo de HA podem ser preparadas dependendo do uso do inóculo.

[00170] Então, a presente invenção é direcionada a uma VLP compreendendo um ou mais dos subtipos de HA, por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais subtipos de HA.

[00171] A presente invenção também fornece ácidos nucleicos codificando hemaglutininas que formas as VLPs quando expressas em plantas.

[00172] Os ácidos nucleicos exemplificados podem compreender sequências de nucleotídeo de hemaglutinina de cepas selecionadas de subtipos de influenza. Por exemplo, um subtipo A (H1N1) tal como A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (SEQ ID NO: 33), o subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1) (compreendendo o construto # 660; SEQ ID NO: 60) e o tipo B menos comum (por exemplo, SEQ ID NO: 26, figura 10O), e o tipo C (SEQ ID NO: 27, figura 10P), e HAs obtidas a partir de outros subtipos de influenza. As VLPs de outros subtipos de influenza estão também incluídas na presente invenção, por exemplo, A/Brisbane/59/2007 (H1N1; SEQ ID NO: 36), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1; SEQ ID NO: 37), A/Cingapura/1/57 (H2N2; SEQ ID NO: 42), A/Anhui/1/2005 (H5N1; SEQ ID NO: 43), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1; SEQ ID NO: 44), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1; SEQ ID NO: 45), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2; SEQ ID NO: 47), A/Brisbane/10/2007 (H3N2; SEQ ID NO: 38), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2; SEQ ID NO: 39), A/Equino/Praga/56 (H7N7; SEQ ID NO: 46), B/Malásia/2506/2004 (SEQ ID NO: 40), ou B/Flórida/4/2006 (SEQ ID NO: 41).

[00173] O dobramento correto das hemaglutininas pode ser importante para a estabilidade da proteína, formação de multímeros, formação de VLPs e função da HA (capacidade de hemaglutinar), dentre outras características de hemaglutininas de influenza. O dobramento de uma proteína pode ser influenciado por um ou mais fatores, incluindo, mas não limitados à sequência da proteína, à abundância relativa da proteína, ao grau de agrupamento intracelular, à disponibilidade de

cofatores que podem se ligar ou serem transitoriamente associados com a proteína dobrada, parcialmente dobrada ou desdobrada, à presença de uma ou mais proteínas chaperonas, ou seus similares.

[00174] As proteínas de choque térmico (Hsp) ou proteínas de estresse são exemplos de proteínas chaperonas, que podem participar em vários processos celulares incluindo a síntese de proteínas, o tráfego intracelular, prevenção de mau dobramento, prevenção de agregação de proteína, montagem e desmontagem de complexos de proteína, dobramento de proteína, e desagregação de proteína. Os exemplos de tais proteínas chaperonas incluem, mas não estão limitados a Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBPs, ciclofilinas, ClpP, GrpE, ubiquitina, calnexina, e proteína dissulfeto isomerase. Ver, por exemplo, Macario, A.J.L., *Cold Spring Harbor Laboratory Res.* 25: 59 a 70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. *Ann. Rev. Genet.* 27: 437 a 496 (1993); Patente U.S. No. 5.232.833. Em alguns exemplos, um grupo particular de proteínas chaperonas inclui Hsp40 e Hsp70.

[00175] Os exemplos de Hsp70 incluem Hsp72 e Hsc73 de células de mamíferos, DnaK de bactérias, particularmente micobactérias tais como *Mycobacterium* leprae, *Mycobacterium tuberculosis,* e *Mycobacterium bovis* (tal como Bacille-Calmette Guerin: referido aqui como Hsp7l). DnaK de *Escherichia coli,* levedura e outros procariotos, e BiP e Grp78 de eucariotos, tal como *A. thaliana* (Lin e outros, 2001 (Cell Stress and Chaperones 6: 201 a 208). Um exemplo particular de um Hsp70 é Hsp70 de *A. thaliana* (codificado por SEQ ID NO: 122, ou SEQ ID NO: 123). O Hsp70 é capaz de especificamente se ligar a ATP, bem como, polipeptídeos e peptídeos desdobrados, participando desse modo no dobramento e desdobramento de proteínas, bem como na montagem e desmontagem de complexos de proteínas.

[00176] Os exemplos de Hsp40 incluem DnaJ de procariotos tal

como E. coli e micobactérias e HSJ1, HDJ1 e Hsp40 de eucariotos, tal como alfafa (Frugis e outros, 1999. Plant Molecular Biology 40: 397 a 408). Um exemplo particular de um Hsp40 é M. sativa MsJ1 (codificado por SEQ ID NO: 121, 123 ou 114). Hsp40 desempenha uma função como uma chaperona molecular no dobramento de proteína, termotolerância e replicação de DNA, entre outras atividades celulares.

[00177] Dentre Hsps, Hsp70 e sua cochaperona, Hsp40, estão envolvidos na estabilização de polipeptídeos de tradução e recentemente sintetizados antes da síntese estar completa. Sem querer se limitar à teoria, Hsp40 se liga aos emplastros hidrofóbicos de polipeptídeos desdobrados (nascentes ou recentemente transferidos), facilitando assim a interação do complexo Hsp70-ATP com o polipeptídeo. A hidrólise de ATP leva à formação de um complexo estável entre o polipeptídeo, Hsp70 e ADP, e liberação de Hsp40. A associação do complexo Hsp70-ADP com os emplastros hidrofóbicos do polipeptídeo impede sua interação com outros emplastros hidrofóbicos, impedindo o dobramento incorreto e a formação de agregados com outras proteínas (revisado em Hartl, FU. 1996, Nature 381: 571 a 579).

[00178] Novamente, sem querer se limitar à teoria, à medida que a produção de proteína aumenta em um sistema de expressão de proteína recombinante, os efeitos de agrupar a expressão de proteína recombinante pode resultar em agregação de polipeptídeo mau dobrado. As proteínas chaperonas nativas podem ser capazes de facilitar o dobramento correto de baixos níveis de proteína recombinante, mas à medida que os níveis aumentam, as chaperonas nativas podem se tornar um fator limitante. Altos níveis de expressão de hemaglutinina nas folhas agroinfiltradas podem levar ao acúmulo de polipeptídeos da hemaglutinina no citosol, e a coexpressão de uma ou mais proteínas chaperonas tal como Hsp70, Hsp40 ou ambas Hsp70 e

Hsp40 podem aumentar a estabilidade no citosol das células expressando as células de polipeptídeos, assim reduzindo o nível de polipeptídeos de hemaglutinina mau dobrados ou agregados, e aumentando o número de polipeptídeos acumulados como hemaglutinina estável, exibindo características estruturais terciárias e quaternárias que permitem a hemaglutinação e/ou formação de partículas semelhantes a vírus.

[00179] Então, a presente invenção também fornece um método para produzir VLPs de influenza em uma planta, em que um primeiro ácido nucleico codificando uma HA de influenza é coexpresso com um segundo ácido nucleico codificando uma chaperona. O primeiro e o segundo ácido nucleico podem ser introduzidos na planta na mesma etapa, ou podem ser introduzidos na planta sequencialmente. A presente invenção também fornece um método para produzir VLPs de influenza em uma planta, em que a planta compreende o primeiro ácido nucleico, e o segundo ácido nucleico é subsequencialmente introduzido.

[00180] A presente invenção também fornece uma planta compreendendo um ácido nucleico codificando uma ou mais hemaglutininas de influenza e um ácido nucleico codificando uma ou mais chaperonas.

[00181] Propôs-se que o processamento de uma sequência de peptídeo sinal (SP) N-terminal durante a expressão e/ou secreção de hemaglutininas de influenza tenha uma função no processo de dobramento. O termo "peptídeo sinal" refere-se geralmente a uma sequência curta (aproximadamente 5 a 30 aminoácidos) de aminoácidos, encontrada geralmente no terminal N de um polipeptídeo de hemaglutinina que pode dirigir a translocação do polipeptídeo recentemente traduzido para uma organela particular, ou ajudar no posicionamento de domínios específicos do polipeptídeo. O peptídeo sinal de hemaglutininas se dirige à translocação da proteína no retículo

endoplásmico e auxilia no posicionamento do domínio proximal ao terminal N em relação a um domínio âncora de membrana do polipeptídeo de hemaglutinina nascente para ajudar na clivagem e dobramento da hemaglutinina madura. A remoção de um peptídeo sinal (por exemplo, por uma peptidase sinal, pode exigir clivagem precisa e remoção do peptídeo sinal para fornecer a hemaglutinina madura – essa clivagem precisa pode ser dependente de quaisquer de vários fatores, incluindo uma parte ou todo o peptídeo sinal, sequência de aminoácido flanqueando o sítio de clivagem, o comprimento do peptídeo sinal, ou uma combinação desses, e nem todos os fatores podem se aplicar a qualquer dada sequência.

[00182] Um peptídeo sinal pode ser nativo à hemaglutinina sendo expressa, ou uma hemaglutinina recombinante compreendendo um peptídeo sinal de um primeiro tipo, subtipo ou cepa de influenza com o equilíbrio da hemaglutinina de um segundo tipo, subtipo ou cepa de influenza. Por exemplo, o SP nativo de HA subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 ou influenza tipo B pode ser usado para expressar a HA em um sistema de planta.

[00183] Um peptídeo sinal pode também ser não nativo, por exemplo, de uma proteína estrutural ou hemaglutinina de um vírus além do influenza, ou de um polipeptídeo de planta, animal ou bactéria. Um peptídeo sinal exemplificado é aquele da proteína dissulfeto isomerase da alfafa (PDISP) (nucleotídeos 32 a 103 de No. de Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17; sequência de aminoácido MAKNVAIFGLLFSLLLLVPSQIFAEE).

[00184] A presente invenção também fornece uma hemaglutinina de influenza compreendendo um peptídeo sinal nativo ou não nativo, e ácidos nucleicos codificando tais hemaglutininas.

[00185] As proteínas HA de influenza exibem uma faixa de similar-dades e diferenças com relação ao peso molecular, ponto isoelétrico,

tamanho, complemento de glicano e seus similares. As propriedades físico-químicas das várias hemaglutininas podem ser úteis para permitir a diferenciação entre as HAs expressas em uma planta, célula de inseto ou sistema de levedura, e podem ser de particular uso quando mais de uma HA é coexpressa em um único sistema. Os exemplos de tais propriedades físico-químicas são fornecidos na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades Físico-químicas de hemaglutininas de influenza 45

Clone No	Tipo	Cepas de Influenza	AA			Glicanos			Peso Molecular (kDA)						Ponto Isoelétrico		
			HA0	HA1	HA2	HA0	HA1	HA2	HA0	HA0[1]	HA1	HA1[1]	HA2	HA2[1]	HA0	HA1	HA2
774	H1	A/Brisbane/59/2007	548	326	222	9	7	2	61	75	36	47	25	28	6,4	7,5	5,3
775	H1	A/Ilhas Salomão/3/2006	548	326	222	9	7	2	61	75	36	47	25	28	6,1	6,7	5,3
776	H3	A/Brisbane/10/2007	550	329	221	12	11	1	62	80	37	54	25	27	8,5	9,6	5,2
777	H3	A/Wisconsin/67/2005	550	329	221	11	10	1	62	79	37	52	25	27	8,8	9,6	5,3
778	B	B/Malásia/2506/2004	570	347	223	12	8	4	62	80	38	50	24	30	8,0	9,7	4,5
779	B	B/Flórida/4/2006	569	346	223	10	7	3	62	77	38	48	24	29	8,0	9,7	4,5
780	H2	A/Cingapura/1/57	547	325	222	6	4	2	62	71	36	42	25	28	6,0	7,5	4,9
781	H5	A/Anhui/1/2005	551	329	222	7	5	2	62	73	37	45	25	28	6,2	8,9	4,7
782	H5	A/Vietnã/1194/2004	552	330	222	7	5	2	63	74	38	45	25	28	6,4	9,1	4,8
783	H6	A/marreco/Hong Kong/W312/97	550	328	222	8	5	3	62	75	37	45	25	30	5,7	5,9	5,6
784	H7	A/Equino/Praga/56	552	331	221	6	4	2	62	71	37	43	25	28	8,9	9,7	4,9
785	H9	A/Hong Kong/1073/99	542	320	199	9	7	2	61	75	36	46	23	26	8,4	9,5	5,3

[00186] A presente invenção também inclui as sequências de nucleotídeos SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, codificando HA a partir de H1, H5 ou H7, respectivamente A presente invenção também inclui uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11. A presente invenção também inclui uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização rigorosas para um complemento de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1. Essas sequências de nucleotídeo que hibridizam para SEQ ID ou um complemento de SEQ ID codificam uma proteína hemaglutinina que, quando expressa forma uma VLP, e a VLP inclui a produção de um anticorpo quando administrado a um sujeito. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros de um ou mais tipos ou subtipos de influenza. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00187] A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47. A presente invenção também inclui uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO:

24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47. A presente invenção também inclui uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização rigorosas a um complemento de SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47. Essas sequências de nucleotídeo que hibridizam para SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47 ou um complemento de SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47 codificam uma proteína hemaglutinina que, quando expressa forma uma VLP, e a VLP induz a

produção de um anticorpo quando administrado a um sujeito. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros de um ou mais tipos ou subtipo de influenza. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00188] Em algumas modalidades, a presente invenção também inclui sequências de nucleotídeo SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47, codificando HA a partir dos subtipos H1, H2, H3, H5, H7 ou H9 de influenza A, ou HA de influenza tipo B. A presente invenção também inclui uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização rigorosas para SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47. A presente invenção também inclui uma sequência de nucleotídeo que hibridiza sob condições de hibridização rigorosas para um complemento de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47. Essas sequências de nucleotídeo que hibridizam para SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47 ou um complemento de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID

NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47 codificam uma proteína hemaglutinina que, quando expressa forma uma VLP, e a VLP induz a produção de um anticorpo quando administrado a um sujeito. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros de um ou mais tipos ou subtipos de influenza. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00189] A hibridização sob condições de hibridização rigorosas é conhecida na técnica (ver, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel e outros, eds. 1995 e suplementos; Maniatis *e outros*, em Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; Sambrook e Russell, em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edição, 2001; cada um dos quais é incorporado aqui a título de referência). Um exemplo de tais condições de hibridização rigorosas pode ser aproximadamente 16 a 20 horas de hibridização em 4 x SSC a 65º C, seguido por lavagem em 0,1 x SSC a 65º C por uma hora, ou 2 lavagens em 0,1 x SSC a 65º C cada por 20 ou 30 minutos. Alternativamente, uma condição de hibridização rigorosa exemplificada poderia ser de um dia para o outro (16 a 20 horas) em 50% de formamida, 4 x SSC a 42º C, seguido por lavagem em 0,1 x SSC a 65º C por uma hora, ou 2 lavagens em 0,1 x SSC a 65º C cada por 20 ou 30 minutos, ou de um dia para o outro (16 a 20 horas), ou hibridização em tampão de fosfato aquoso Church (7% SDS; 0,5M tampão de $NaPO_4$ pH 7,2; 10mM EDTA) a 65º C, com 2 lavagens ou a 50º C em 0,1 x SSC, 0,1% SDS por 20 ou 30 minutos cada, ou 2 lavagens a 65º C em 2 x SSC, 0,1% SDS por 20 ou 30 minutos cada.

[00190] Adicionalmente, a presente invenção inclui sequências de nucleotídeo que são caracterizadas como tendo aproximadamente 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% ou qualquer

quantidade entre essas, de identidade de sequência, ou similaridade de sequência, com a sequência de nucleotídeo codificando HA a partir de H1 (SEQ ID NO: 28), H5 (SEQ ID NO: 3) ou H7 (SEQ ID NO: 11), em que a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína hemaglutinina que quando expressa, forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00191] Adicionalmente, a presente invenção inclui sequências de nucleotídeo que são caracterizadas como tendo aproximadamente 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% ou qualquer quantidade entre essas, de identidade de sequência, ou similaridade de sequência, com a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47, em que a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína hemaglutinina, que quando expressa, forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00192] Adicionalmente, a presente invenção inclui sequências de

nucleotídeo que são caracterizadas como tendo aproximadamente 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% ou qualquer quantidade entre essas, de identidade de sequência, ou similaridade de sequência, com a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47, em que a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína hemaglutinina, que quando expressa, forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00193] Similarmente, a presente invenção inclui HAs associadas com os seguintes subtipos H1 (codificado por SEQ ID NO: 28), H2 (codificado por SEQ ID NO: 12), H3 (codificado por SEQ ID NO: 13), H4 (codificado por SEQ ID NO: 14), H5 (codificado por SEQ ID NO: 15), H6 (codificado por SEQ ID NO: 16), H7 (codificado por SEQ ID NO: 11), H8 (codificado por SEQ ID NO: 17), H9 (codificado por SEQ ID NO: 18), H10 (codificado por SEQ ID NO: 19), H11 (codificado por SEQ ID NO: 20), H12 (codificado por SEQ ID NO: 21), H13 (codificado por SEQ ID NO: 27), H14 (codificado por SEQ ID NO: 23), H15 (codificado por SEQ ID NO: 24), H16 (codificado por SEQ ID NO: 25), ou influenza tipo B (codificado por SEQ ID NO: 26); ver figuras. 10A a 100), e sequências de nucleotídeo que são caracterizadas como tendo de aproximadamente 70 a 100% ou qualquer quantidade entre elas, 80 a 100% ou qualquer quantidade entre elas, 90 a 100% ou qualquer quantidade entre elas, ou 95 a 100% ou qualquer quantidade entre elas, de identidade de sequência com H1 (SEQ ID NO: 28), H2 (SEQ ID NO:

12), H3 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 11), H8 (SEQ ID NO: 17), H9 (SEQ ID NO: 18), H10 (SEQ ID NO: 19), H11 (SEQ ID NO: 20), H12 (SEQ ID NO: 21), H13 (SEQ ID NO: 27), H14 (SEQ ID NO: 23), H15 (SEQ ID NO: 24), H16 (SEQ ID NO: 25), em que a sequência de nucleotídeo codifica uma proteína hemaglutinina que, quando expressa, forma uma VLP, e que a VLP induz a produção de um anticorpo. Por exemplo, a expressão da sequência de nucleotídeo dentro de uma célula de planta forma uma VLP, e a VLP pode ser usada para produzir um anticorpo que é capaz de se ligar a HA, incluindo HA, HA0, HA1, ou HA2 maduros. A VLP, quando administrada a um sujeito, induz uma resposta imune.

[00194] Uma "resposta imune" geralmente se refere a uma resposta do sistema imune adaptativo. O sistema imune adaptativo geralmente compreende uma resposta humoral, e uma resposta mediada por célula. A resposta humoral é o aspecto de imunidade que é mediado por anticorpos secretados, produzidos nas células da linhagem de linfócito B (célula B). Os anticorpos secretados se ligam a antígenos nas superfícies de micróbios invasores (tal como vírus ou bactérias), que os sinaliza para destruição. A imunidade humoral é usada geralmente para se referir à produção de anticorpo e os processos que a acompanham, bem como as funções efetoras de anticorpos, incluindo a ativação de célula Th2 e produção de citocina, geração de célula de memória, promoção de opsonina de fagocitose, eliminação de patógenos e seus similares. Os termos "modular" ou "modulação" ou seus similares referem-se a um aumento ou redução em uma resposta ou parâmetro particular, como determinado por quaisquer de vários ensaios geralmente conhecidos ou usados, alguns dos quais são exemplificados aqui.

[00195] Uma resposta mediada por célula é uma resposta imune que não envolve anticorpos, mas de preferência envolve a ativação de macrófagos, células exterminadoras naturais (NK), T-linfócitos

citotóxicos específicos de antígeno, e a liberação de várias citocinas em resposta a um antígeno. A imunidade mediada por célula é usada geralmente para se referir a alguma ativação de célula Th, ativação de célula Tc e respostas mediadas por célula T. A imunidade mediada por célula é de particular importância em resposta a infecções virais.

[00196] Por exemplo, a indução de linfócitos T CD8 positivos específicos de antígeno pode ser medida usando um ensaio ELISPOT; a estimulação de linfócitos T CD4 positivos pode ser medida usando um ensaio de proliferação. As titulações de anticorpo anti-influenza podem ser quantificadas usando um ensaio ELISA; os isótopos de anticorpos reativos cruzados ou específicos de antígeno podem ser também medidos usando anticorpos anti-isótopo (por exemplo, anti-IgG, IgA, IgE ou IgM). Os métodos e técnicas para executar tais ensaios são bem conhecidos na técnica.

[00197] Um ensaio de inibição de hemaglutinação (HI, ou HAI) pode ser também usado para demonstrar a eficácia de anticorpos induzidos por uma vacina, ou composição de vacina pode inibir a aglutinação de células vermelhas do sangue (CVS) por HA recombinante. As titulações de anticorpo inibidor de hemaglutinação de amostras de soro podem ser avaliadas por HAI de microtitulação (Aymard e outros, 1973). Os eritrócitos de qualquer de várias espécies podem ser usados – por exemplo, cavalo, peru, galinha ou seus similares. Esse ensaio fornece informação indireta na montagem do trímero de HA na superfície da VLP, confirmando a apresentação apropriada de sítios antigênicos nas HAs.

[00198] As titulações de HAI de reatividade cruzada podem também ser usadas para demonstrar a eficácia de uma resposta imune a outras cepas de vírus relacionadas ao subtipo da vacina. Por exemplo, o soro de um sujeito imunizado com uma composição de vacina de uma primeira cepa (por exemplo, VLPs de A/Indonésia/5/05) pode ser usado em um ensaio HAI com uma segunda cepa de vírus integral ou

partículas de vírus (por exemplo, A/Vietnã/1194/2004), e a titulação de HAI determinada.

[00199] A presença ou níveis de citocina podem também ser quantificados. Por exemplo, uma resposta a célula T auxiliar (Th1/Th2) será caracterizada pela medição de células secretando IFN-γ e IL-4 usando por ELISA (por exemplo, kits BD Biosciences OptEIA). As células mononucleares sanguíneas periféricas (PMNC) ou esplenócitos obtidos a partir de um sujeito podem ser cultivadas, e o sobrenadante analisado. Os linfócitos T podem ser também quantificados por separação de célula ativada por fluorescência (FACS), usando rótulos fluorescentes específicos de marcador e métodos conhecidos na técnica.

[00200] Um ensaio de microneutralização pode também ser conduzido para caracterizar uma resposta imune em um sujeito, ver, por exemplo, os métodos de Rowe e outros, 1973. As titulações de neutralização de vírus podem ser obtidas de várias formas, incluindo: (1) enumeração de placas de lise (ensaio de placas) seguida de fixação/coloração de células com cristal violeta; (2) observação microscópica de lise celular em cultura; (3) ELISA e detecção espectrofotométrica de proteína de vírus NP (correlacionar com infecção viral de células hospedeiras).

[00201] A identidade de sequência ou similaridade de sequência pode ser determinada usando um programa de comparação de sequência de nucleotídeo, tal como o fornecido em DNASIS (por exemplo, usando, mas não limitado aos seguintes parâmetros: penalidade de gap 5, # de diagonais de topo 5, penalidade de GAP fixo 10, k-tuple 2, gap flutuante 10, e tamanho de janela 5). Entretanto, outros métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica, por exemplo, os algoritmos de Smith & Waterman (1981, Adv. Appl. Math. 2:482), Needleman & Wunsch (J.

Mol. Biol. 48:443, 1970), Pearson & Lipman (1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444), e por implementações computadorizadas desses algoritmos (por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, e BLAST), ou por alinhamento manual e inspeção visual.

[00202] O termo "domínio de hemaglutinina" refere-se a um peptídeo compreendendo ou o domínio HA0, ou os domínios HA1 e HA2 (alternativamente referidos como fragmentos HA1 e HA2). HA0 é um precursor dos fragmentos HA1 e HA2. O monômero de HA pode ser geralmente subdividido em 2 domínios funcionais – o domínio de haste e a cabeça globular, ou domínio de cabeça. O domínio de haste está envolvido na infectividade e patogenicidade do vírus via a alteração conformacional pela qual ele passa quando exposto a pH ácido. O domínio de haste pode ser ainda subdividido em 4 subdomínios ou fragmentos – o subdomínio de fusão ou peptídeo (um estiramento hidrofóbico de aminoácidos envolvidos em fusão com a membrana hospedeira no estado conformacional de pH ácido), o subdomínio de haste (pode acomodar as duas ou mais conformações), o domínio ou subdomínio transmembrana (TmD) (envolvido na afinidade da HA para enxertos de lipídio), e a calda citoplásmica (subdomínio de cauda citoplásmica) (Ctail) (envolvido na secreção de HA). A cabeça globular é dividida em 2 subdomínios, o subdomínio RB e o domínio de esterase vestigial (E). O subdomínio E pode ser parcial ou completamente enterrado e não exposto na superfície da cabeça globular, assim alguns anticorpos levantados contra HA se ligam ao subdomínio RB.

[00203] O termo "partícula semelhante a vírus" (VLP), ou "partículas semelhantes a vírus" ou "VLPs" refere-se a estruturas que se automontam e compreendem proteínas estruturais tal como proteína HA de influenza. As VLPs são geralmente morfológica e antigenicamente similares a virions produzidos em uma infecção, mas carecem de informação genética suficiente para replicar e assim não infecciosas.

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

[00204] As VLPs produzidas a partir de proteínas derivadas de influenza, de acordo com a presente invenção, não compreendem a proteína M1. A proteína M1 é conhecida por se ligar ao RNA (Wakefield e Brownlee, 1989) que é um contaminante da preparação de VLP. A presença de RNA é indesejada quando obtendo aprovação reguladora para o produto VLP, então uma preparação de VLP com ausência de RNA pode ser vantajosa.

[00205] As VLPs da presente invenção podem ser produzidas em uma célula hospedeira que é caracterizada pela falta de capacidade de sialilar proteínas, por exemplo, uma célula de planta, uma célula de inseto, de fungo, e outros mecanismos incluindo esponjas, celenterados, anelídeos, artrópodes, moluscos, nematelmintos, troquelmintos, platelmintos, quetognatas, tentaculados, clamídias, espiroquetas, bactérias gram-positivas, cianobactérias, arqueobactérias, ou seus similares. Ver, por exemplo, Glycoforum (URL: glycoforum.gr.jp/science/word/evolution/ES-A03E.html) ou Gupta e outros, 1999. Nucleic Acids Research 27: 370 a 372; ou Toukach e outros, 2007. Nucleic Acids Research 35: D280 a

D286; ou URL:glycostructures.jp (Nakahara e outros, 2008. Nucleic Acids Research 36: D368 a D371; publicado em linha direta em 11 de outubro de 2007 doi:10.1093/NAR/gkm833). As VLPs produzidas como descrito aqui não compreendem tipicamente neuraminidase (NA). Entretanto, NA pode ser coexpressa com HA, as VLPs compreendendo HA e NA deveriam ser desejadas.

[00206] Uma VLP produzida a partir de uma planta de acordo com alguns aspectos da invenção pode ser complexada com lipídios derivados de planta. A VLP pode compreender um peptídeo HA0, HA1 ou HA2. Os lipídios derivados de planta podem estar na forma de uma bicamada de lipídio, e podem ainda compreender um envelope circundando a VLP. Os lipídios derivados de planta podem compreender componentes de lipídios da membrana plasmática da planta onde a VLP é produzida, incluindo, mas não limitada a, fosfatidil colina (PC), fosfatidil etanolamina (PE), glicosfingo lipídios, fitosteróis ou uma combinação desses. Um lipídio derivado de planta pode alternativamente ser referido como um 'lipídio de planta'. Exemplos de fitosteróis são conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol e colesterol – ver, por exemplo, Mongrand e outros, 2004.

[00207] As VLPs podem ser avaliadas quanto à estrutura e tamanho, por exemplo, por ensaio de hemaglutinação, microscopia de elétrons, ou cromatografia por exclusão de tamanho.

[00208] Para cromatografia por exclusão de tamanho, as proteínas solúveis totais podem ser extraída do tecido da planta homogeneizando-se (Polytron) amostra de material de planta picado congelado em tampão de extração, e o material insolúvel removido por centrifugação. A precipitação com PEG pode também ser de benefício. A proteína solúvel é quantificada, e o extrato passado através de uma coluna Sephacryl™. Azul de dextrana 2000 pode ser usado como um padrão de calibração. Seguindo a cromatografia, as frações podem ser ainda analisadas por

‘immunoblot’ para determinar o complemento de proteína da fração.

[00209] Sem querer ser limitado pela teoria, a capacidade de HA se ligar a CVS de diferentes animais é acionada pela afinidade de HA com ácidos siálicos α2,3 ou α2,3 e pela presença desses ácidos siálicos na superfície de CVS. HA de equinos e de aves de vírus de influenza aglutinam eritrócitos de todas as várias espécies, incluindo perus, galinhas, patos, porquinhos da Índia, humanos, ovelhas, cavalos e vacas; onde as HAs humanas se ligarão a eritrócitos de peru, galinhas, patos, porquinhos da Índia, seres humanos e ovelhas (ver também Ito T. e outros, 1997, Virology, vol 227, pág. 493 a 499; e Medeiros R e outros, 2001, Virology, vol 289 pág. 74 a 85). Os exemplos da reatividade em espécies de HAs de diferentes cepas de influenza são mostrados nas Tabelas 2A e 2B.

iTabela 2A: Espécie de CVS ligadas por HAs de cepas de influenza sazonal selecionadas.

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

Tabela 2B: Espécie de CVS ligadas por HAs de cepas de influenza pandêmica selecionadas.

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

[00210] Um fragmento ou parte de uma proteína, proteína de fusão ou polipeptídeo inclui um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo um subconjunto do complemento de aminoácido de uma proteína ou polipeptídeo particular, já que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa. O fragmento pode, por exemplo, compreender uma região de antígeno, uma região induzindo a resposta a estresse, ou uma região compreendendo um domínio funcional da proteína ou polipeptídeo. O fragmento pode também compreender uma região ou domínio comum a proteínas da mesma família geral, ou o fragmento pode incluir suficiente sequência de aminoácido para especificamente identificar a proteína de comprimento total a partir da qual ele é derivado.

[00211] Por exemplo, um fragmento ou porção pode compreender de aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, do comprimento total da proteína, ou qualquer quantidade entre elas, já que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa. Por exemplo, de aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, do comprimento total da proteína, ou qualquer quantidade entre elas. Alternativamente, um fragmento ou porção pode ser de aproximadamente 150 a aproximadamente 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas, dependendo da HA, e já que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa. Por exemplo, um fragmento pode ser de 150 a aproximadamente 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas, de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas, de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas,

de aproximadamente 400 a aproximadamente 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas, de aproximadamente 450 a aproximadamente 500 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas, dependendo da HA, e já que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa. Por exemplo, aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40 ou 50 aminoácidos, ou qualquer quantidade entre elas, podem ser removidos do C terminal, do N terminal ou ambos o N e C terminal de uma proteína HA, já que o fragmento pode formar uma VLP quando expressa.

[00212] A numeração dos aminoácidos em qualquer dada sequência é relativa à sequência particular, entretanto, um versado na técnica pode prontamente determinar a 'equivalência' de um aminoácido particular em uma sequência baseada em estrutura e/ou sequência. Por exemplo, se 6 aminoácidos N terminal foram removidos quando construindo um clone para cristalografia, isso mudaria a identidade numérica específica do aminoácido (por exemplo, em relação ao comprimento total da proteína), mas não alteraria a posição relativa do aminoácido na estrutura.

[00213] As comparações de uma sequência ou sequências pode ser feita usando um algoritmo BLAST (Altschul e outros, 1990. J. Mol Biol 215: 403 a 410). Uma busca BLAST permite a comparação de uma sequência de consulta com uma sequência específica ou grupo se sequências, ou com uma biblioteca ou banco de dados maior (por exemplo, GenBank ou GenPept) de sequências, e identifica não somente sequências que exibem 100% de identidade, mas também aquelas com graus menores de identidade. As sequências de ácido nucleico ou de aminoácido podem ser comparadas usando um algoritmo BLAST. Ademais, a identidade entre duas ou mais sequências pode ser determinada alinhando-se as sequências juntas e determinando-se a % de identidade entre as sequências. O alinhamento pode ser executado usando o algoritmo BLAST (por exemplo, como

disponível através do GenBank; URL: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/ usando parâmetros padrão: Programa: blastn; Banco de dados: nr; Expect 10; filtro: padrão; Alinhamento: por pares; Códigos genéticos de Consulta: Padrão(1)), ou BLAST2 através de EMBL URL: embl-heidelberg.de/Services/ index.html usando parâmetros padrão: Matriz BLOSUM62; Filtro: padrão, eco filro: on, Expect:10, corte: padrão; Fita: ambas; Descrições: 50, Alinhamentos: 50; ou FASTA, usando parâmetros padrão), ou comparando manualmente as sequências e calculando a % de identidade.

[00214] A presente invenção descreve, mas não está limitada à clonagem de um ácido nucleico codificando HA em um vetor de expressão de planta, e a produção de VLPs de influenza a partir da planta, adequado para a produção de vacinas. Exemplos de tais ácidos nucleicos incluem, por exemplo, mas não limitados a uma HA de vírus de influenza A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 61), uma HA do subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 60), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 36, 48,62), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 37, 49, 63), A/Cingapura/1/57 (H2N2) (por exemplo, SEQ ID NO: 42, 54, 64), A/Anhui/1/2005 (H5N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 43, 55, 65), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 44, 56, 66), A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (por exemplo, SEQ ID NO: 45, 57, 67), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (por exemplo, SEQ ID NO: 47, 59, 68), A/Brisbane/10/2007 (H3N2) (por exemplo, SEQ ID NO: 38, 50, 69), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (por exemplo, SEQ ID NO: 39, 51, 70), A/Equino/Praga/56 (H7N7) (por exemplo, SEQ ID NO: 46, 58, 71), B/Malásia/2506/2004 (por exemplo, SEQ ID NO: 40, 52, 72), B/Flórida/4/2006 (por exemplo, SEQ ID NO: 41, 53, 73). Os números dos clones ou construtos correspondentes para essas cepas são fornecidos na Tabela 1. As sequências de ácido nucleico

correspondentes a SEQ ID NOS: 36 a 47 compreendem uma plastocianina a montante e ligadas de maneira funcional à sequência de codificação da HA para cada um dos tipo ou subtipos, como ilustrado nas figuras. 28 a 39. As sequências de ácido nucleico correspondentes a SEQ ID NO: 60 a 73 compreendem um cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, a sequência de codificação de hemaglutinina de uma HA, plastocianina de alfafa 3' UTR e sequências terminadoras, como ilustrado nas figuras. 51 a 64.

[00215] As VLPs podem também ser usadas para produzir reagentes compreendidos de proteínas estruturais de influenza recombinante que automontam em estruturas de proteína macromoleculares homotípicas imunogênicas, incluindo partículas de influenza subviral e VLP influenza, em células hospedeiras transformadas, por exemplo, células de plantas ou células de insetos.

[00216] Portanto, a invenção fornece VLPs, e um método para produzir VLPs virais em um sistema de expressão de planta, a partir da expressão de uma única proteína de envelope. As VLPs podem ser VLPs de influenza, ou VLPs produzidas a partir de outros vírus derivados de membrana plasmática incluindo, mas não limitados a Sarampo, Ebola, Marburg e HIV.

[00217] As proteínas de outros vírus envelopados, por exemplo, mas não limitadas a Filoviridae (por exemplo, vírus Ebola, vírus Marburg, ou seus similares), Paramyxoviridae (por exemplo, vírus do Sarampo, vírus da caxumba, vírus sincicial respiratório, pneumovírus, ou seus similares), Retroviridae (por exemplo, vírus da Imunodeficiência humana tipo 1, vírus da Imunodeficiência humana tipo 2, vírus da leucemia humana de células T tipo 1, ou seus similares), Flaviviridae (por exemplo, Encefalite do Nilo Ocidental, vírus da Dengue, vírus da Hepatite C, vírus da febre amarela, ou seus similares), Bunyaviridae (por

exemplo, Hantavírus ou seus similares), Coronaviridae (por exemplo, coronavírus, SARS, ou seus similares), como seria conhecido pelos versados na técnica, podem também ser usadas. Exemplos não limitantes de antígenos que podem ser expressos nos vírus derivados da membrana plasmática incluem, a proteína capsidial de HIV – p24; glicoproteínas de HIV gp120 ou gp41, proteínas de Filovírus incluindo VP30 ou VP35 do vírus Ebola ou Gp/SGP de vírus Marburg ou a proteína H ou proteína F do paramixovírus do Sarampo. Por exemplo, P24 de HIV (por exemplo, gi de referência no GenBank: 19172948) é a proteína obtida pela tradução e clivagem da sequência gag do genoma do vírus HIV (por exemplo, gi de referência no GenBank: 9629357), gp 120 e gp 41 de HIV são glicoproteínas obtidas pela tradução e clivagem da proteína gp 160 (por exemplo, gi de referência no GenBank: 9629363), codificado por env do genoma do vírus HIV. VP30 do vírus Ebola (gi de referência no GenPept: 55770813) é a proteína obtida pela tradução da sequência vp30 do genoma do vírus Ebola (por exemplo, gi de referência no GenBank: 55770807), VP35 do vírus Ebola (gi de referência no GenPept: 55770809) é a proteína obtida pela tradução da sequência vp35 do genoma do vírus Ebola. Gp/SGP do vírus Marburg (gi de referência no GenPept: 296965) é a proteína obtida pela tradução da sequência do genoma do vírus Marburg (gi de referência no GenBank: 158539108). A proteína H (gi de referência no GenPept: 9626951) é a proteína da sequência H do genoma do vírus do Sarampo (gi de referência no GenBank: 9626945), a proteína F (gi de referência no GenPept: 9626950) é a proteína da sequência F do genoma do vírus do Sarampo.

[00218] Entretanto, outras proteínas de envelope podem ser usadas dentro dos métodos da presente invenção como seria conhecido pelos versados na técnica.

[00219] A invenção, então, fornece uma molécula de ácido nucleico

compreendendo uma sequência codificando HIV-p24, HIV-gp120, HIV-gp41, vírus Ebola-VP30, vírus Ebola-VP35, vírus Marburg Gp/SGP, proteína H do vírus do Sarampo ou proteína F. A molécula de ácido nucleico pode ser ligada de maneira funcional a uma região reguladora ativa em uma célula de inseto, levedura ou planta, ou em um tecido de planta particular.

[00220] A presente invenção ainda fornece a clonagem de um ácido nucleico codificando uma HA, por exemplo, mas não limitada a HA do vírus influenza A/Indonésia/5/05 humano (H5N1) para um vetor de expressão de planta ou inseto (por exemplo, vetor de expressão de baculovírus) e produção de candidatos ou reagentes à vacina contra influenza compreendidos de proteínas estruturais de influenza recombinantes que se automontam em estruturas de proteínas macromoleculares homotípicas imunogênicas, incluindo partículas de influenza subviral e VLP de influenza, em células de plantas transformadas ou células de insetos transformadas.

[00221] O ácido nucleico codificando a HA de subtipos de influenza, por exemplo, mas não limitados a A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, pode ser expresso, por exemplo, usando um Sistema de Expressão de Baculovírus em uma linhagem celular apropriada, por exemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (por exemplo, linhagem de células Sf-9; ATCC PTA-4047).

[00222] O ácido nucleico codificando a HA pode ser, alternativamente, expresso em uma célula de planta, ou em uma planta. O ácido nucleico codificando a HA pode ser sintetizado por transcrição

reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR) usando RNA de HA. Como um exemplo, o RNA pode ser isolado do vírus de influenza A/Nova Caledônia/20/99 humano (H1N1) ou vírus de influenza A/Indonésia/5/05 humano (H5N1), ou outros vírus de influenza, por exemplo, A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, ou de células infectadas com um vírus de influenza. Para a transcrição reversa e PCR, os iniciadores de oligonucleotídeo específicos para RNA de HA, por exemplo, mas não limitados a sequências de HA de vírus de influenza A/Nova Caledônia/20/99 humano (H1N1) ou sequências de HA0 de vírus de influenza A/Indonésia/5/05 humano (H5N1), ou sequências de HA dos subtipos A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006 podem ser usados. Adicionalmente, um ácido nucleico codificando HA pode ser quimicamente sintetizado usando métodos conhecidos pelos versados na técnica.

[00223] As cópias de cDNA resultantes desses genes podem ser clonadas em um vetor de expressão adequado como exigido pelo sistema de expressão hospedeiro. Os exemplos de vetores de expressão apropriados para plantas são descritos abaixo, alternativamente, vetor de expressão de baculovírus, por exemplo, pFastBacl (InVitrogen), resultando em plasmídeos baseados em pFastBacl, usando métodos conhecidos, e informação fornecida pelas

instruções do fabricante pode ser usada.

[00224] A presente invenção é ainda direcionada para um construto de gene compreendendo um ácido nucleico codificando HA, como descrito acima, ligado de maneira funcional a um elemento regulador que é funcional em uma planta. Os exemplos de elementos reguladores funcionais em uma célula de planta e que podem ser usados de acordo com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a uma região reguladora de plastocianina (US 7.125.978, que é incorporada aqui a título de referência), ou uma região reguladora de Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO; US 4.962.028; que é aqui incorporada a título de referência), proteína de ligação clorofila1 a/b (CAB; Leutwiler e outros, 1986; que é aqui incorporado a título de referência), ST-LS1 (associado com o complexo de evolução de oxigênio do fotossistema II e descrito por Stockhaus e outros, 1987, 1989; que é incorporado aqui a título de referência). Um exemplo de uma região reguladora de plastocianina é uma sequência compreendendo os nucleotídeos 10 a 85 da SEQ ID NO: 36, ou uma região similar de qualquer uma das SEQ ID NOS: 37 a 47. Um elemento regulador ou região reguladora pode melhorar a tradução de uma sequência de nucleotídeo à qual ela está ligada de maneira funcional – a sequência de nucleotídeo pode codificar uma proteína ou polipeptídeo. Outro exemplo de uma região reguladora é aquela derivada das regiões não traduzidas do vírus do Mosaico do Feijão de corda (CPMV), que pode ser usado para preferencialmente traduzir a sequência de nucleotídeo a qual ele está ligado de maneira funcional. Essa região reguladora de CPMV compreende um sistema CPMV-HT – ver, por exemplo, Sainsbury e outros, 2008, Plant Physiology 148: 1212 a 1218.

[00225] Se o construto for expresso em uma célula de inseto, os exemplos de elementos reguladores funcionais em uma célula de inseto

incluem, mas não estão limitados ao promotor da poliedrina (Possee e Howard 1987. Nucleic Acids Research 15: 10233 a 10248), o promotor de gp64 (Kogan e outros, 1995. J Virology 69: 1452 a 1461) e seus similares.

[00226] Então, um aspecto da invenção fornece um ácido nucleico compreendendo uma região reguladora e uma sequência codificando uma HA de influenza. A região reguladora pode ser um elemento regulador de plastocianina, e a HA de influenza pode ser selecionada a partir do grupo de cepas ou subtipos de influenza compreendendo A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), subtipo A/Indonésia/5/05 (H5N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1), A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Equino/Praga/56 (H7N7), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006. As sequências de ácido nucleico compreendendo um elemento regulador de plastocianina e um HA de influenza são exemplificadas aqui por SEQ ID NO: 36 a 47.

[00227] Sabe-se que pode haver diferenças na sequência de aminoácidos de hemaglutinina de influenza, ou os ácidos nucleicos codificando-as, quando o vírus de influenza é cultivado em ovos, ou células de mamíferos (por exemplo, células MDCK) ou quando isoladas a partir de um sujeito infectado. Exemplos não limitantes de tais diferenças são ilustrados aqui, incluindo o Exemplo 18. Ademais, como um versado na técnica poderia perceber, a variação adicional pode ser observada dentro de hemaglutininas de influenza obtidas a partir de novas cepas à medida que mutações adicionais continuam a ocorrer. Devido à variabilidade de sequência conhecida entre as hemaglutininas de influenza diferentes, a presente invenção inclui VLPs que podem ser produzidas usando qualquer hemaglutinina de influenza já que quando

expressa em um hospedeiro como descrito aqui, a hemaglutinina de influenza forma uma VLP.

[00228] Os alinhamentos de sequência e sequências consenso podem ser determinados usando quaisquer dos vários pacotes de software conhecidos na técnica, por exemplo, MULTALIN (F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881 a 10890), ou as sequências podem ser alinhadas manualmente e as similaridades e diferenças entre as sequências determinadas.

[00229] A estrutura das hemaglutininas é bem conhecida e sabe-se que as estruturas são altamente conservadas. Quando as estruturas de hemaglutinina são sobrepostas, um alto grau de conservação estrutural é observado (rmsd < 2A). Essa conservação estrutural é observada mesmo que a sequência de aminoácido possa variar em algumas posições (ver, por exemplo, Skehel e Wiley, 2000 Ann Rev Biochem 69:531 a 569; Vaccaro e outros, 2005). As regiões de hemaglutinina são também bem conservadas, por exemplo:

- Domínios estruturais: A poliproteína HA0 é clivada para fornecer HA madura. A HA é um homotrímero com cada monômero compreendendo um domínio de ligação ao receptor (HA1) e um domínio de ancoragem de membrana (HA2) ligados por uma única ligação dissulfeto; os 20 resíduos N-terminal da subunidade HA2 podem também ser referidos como o domínio ou sequência de fusão de HA. Uma região de ‘cauda’ (interna ao envelope de membrana) está também presente. Cada hemaglutinina compreende essas regiões ou domínios. As regiões ou domínios individuais têm seus comprimentos tipicamente conservados.

- Todas as hemaglutininas contêm o mesmo número e posição de pontes dissulfeto intra- e intermolecular. A quantidade e a posição na sequência de aminoácido das cisteínas que participam na rede de ponte dissulfeto são conservadas entre as HAs. Os exemplos

de estruturas ilustrando as pontes dissulfeto intra- e intermoleculares características e outros aminoácidos conservados e suas posições relativas são descritos, por exemplo, em Gamblin e outros, 2004 (Science 303: 1838 a 1842). As estruturas e sequências exemplificadas incluem 1RVZ, 1RVX, 1RVT, 1RV0, 1RUY, 1RU7, disponíveis a partir do Banco de Dados de Proteínas (Berman e outros, 2003. Nature Structural Biology 10:980; URL: rcsb.org).

- Cauda citoplásmica – a maior parte das hemaglutininas compreende 3 cisteínas em posições conservadas. Uma ou mais dessas cisteínas podem ser palmitoiladas como uma modificação pós-traducional.

[00230] A variação de aminoácido é tolerada em hemaglutininas de vírus de influenza. Essa variação fornece novas cepas que são continuamente identificadas. A infectividade entre as novas cepas pode variar. Entretanto, a formação de trímeros de hemaglutinina, que subsequentemente formam as VLPs, é mantida. A presente invenção, então, fornece uma sequência de aminoácido de hemaglutinina, ou um ácido nucleico codificando uma sequência de aminoácido de hemaglutinina, que forma VLPs em uma planta, e inclui sequências conhecidas e sequências variantes que podem se desenvolver.

[00231] A figura 65 ilustra um exemplo de tal variação conhecida. Essa figura mostra uma sequência de aminoácido consenso (SEQ ID NO: 74) para HA das seguintes cepas de H1N1:

1 A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (codificado por SEQ ID NO: 33),

2 A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 48),

3 A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 49) e

SEQ ID NO: 9. X1 (posição 3) é A ou V; X2 (posição 52) é D ou N; X3 (posição 90) é K ou R; X4 (posição 99) é K ou T; X5 (posição 111) é Y ou H; X6 (posição 145) é V ou T; X7 (posição 154) é E ou K;

X8 (posição 161) é R ou K; X9 (posição 181) é V ou A; X10 (posição 203) é D ou N; X11 (posição 2o5) é R ou K; X12 (posição 210) é T ou K; X13 (posição 225) é R ou K; X14 (posição 268) é W ou R; X15 (posição 283) é T ou N; X16 (posição 290) é E ou K; X17 (posição 432) é I ou L; X18 (posição 489) é N ou D.

[00232] Como outro exemplo de tal variação, um alinhamento de sequência e sequência consenso para HA de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (codificado por SEQ ID NO: 33), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (SEQ ID NO: 48), A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (SEQ ID NO: 49), A/Porto Rico/8/34 (H1N1) e SEQ ID NO: 9 são mostrados abaixo na Tabela 3.

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

SEQ ID NO.	Sequência
	1 50
75	MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
9	MKAKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
48	MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
49	MKVKLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL
76	....
Consenso	mkxkllvllc tftatyadti cigyhannst dtvdtvlekn vtvthsvnll
	51 100
75	EDSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP
9	EDSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP
48	ENSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP
49	EDSHNGKLCL LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISR ESWSYIVEKP
76	....
Consenso	exshngklcl lkgiaplqlg ncsvagwilg npecellis. eswsyive.p
	101 150
75	NPENGTCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA
9	NPENGTCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA
48	NPENGTCYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA
49	NPENGTCYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTTTGVSA
76	....
Consenso	npengtcypg xfadyeelre qlssvssfer feifpkessw pnhtxtgvsa
	151 200

```
        75  SCSHNGKSSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YVNNKEKEVL VLWGVHHPPN
         9  SCSHNGKSSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YVNNKEKEVL VLWGVHHPPN
        48  SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPPN
        49  SCSHNGESSF YKNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPPN
        76  .......... .......... .......... .......... ..........
Consenso    scshngxssf yxnllwltgk nglypnlsks yxnnkekevl vlwgvhhppn
            201                                                 250
        75  IGNQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL
         9  IGNQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL
        48  IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL
        49  IGDQRALYHK ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL
        76  .......... .....MSLLT EVETYVLSII PSGPLKAEIA QRLEDVFAGK
Consenso    igxqxalyhx enayvsvvss hysrxftpeI akrPkvr#qe gRi#yywtll
            251                                                 300
        75  EPGDTIIFEA NGNLIAPWYA FALSRGFGSG IITSNAPMDE CDAKCQTPQG
         9  EPGDTIIFEA NGNLIAPWYA FALSRGFGSG IITSNAPMDE CDAKCQTPQG
        48  EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRGFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG
        49  EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRGFGSG IINSNAPMDE CDAKCQTPQG
        76  NTDLEVLMEW ...LKTRPIL SPLTKGILGF VFTLTVPSER GLQRRRFVQN
Consenso    #pgdt!ifEa ngnLiapxya faLsrGfgsg !itsnaPm#x cdakcqtpQg
            301                                                 350
        75  AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI
         9  AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI
        48  AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI
        49  AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI
        76  ALNG.....N GDPNNMDKAV KLYRKLKREI TFHGAKEISL SYSAGALASC
Consenso    AiNsslpfqN vhPvtigecp KyvRsaKlrm vtxGlr#Ips iqSrGlfgai
            351                                                 400
        75  AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
         9  AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
        48  AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
        49  AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
        76  MGLIYNRM.G AVTTEVAFGL VCATCEQIAD SQHRSHRQMV TTTNPLIRHE
Consenso    aGfIeggwtG mVdgwyg%hh qneqgsgyAa dQkstqnain giTNkvnsvi
            401                                                 450
        75  EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER
         9  EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER
        48  EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLLENER
        49  EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLLENER
        76  NRMVLASTTA .KAMEQMAGS SEQAAEAMEV A........S QARQMVQAMR
```

```
Consenso   #kMntqfTav gKef#k$err mE#lnkkv#d gfxdiwtyna #llv$l#neR
           451                                                 500
       75  TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT
        9  TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMESVKNGT
       48  TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL KNNAKEIGNG CFEFYHKCND ECMESVKNGT
       49  TLDFHDSNVK NLYEKVKSQL KNNAKEIGNG CFEFYHKCND ECMESVKNGT
       76  TIGTHPSSSA GLKNDLLENL QAYQKRMGVQ MQRFK..... ..........
Consenso   TldfHdSnvk nLy#kvks#L knnaKeiGng cfeFyhkcnx ecmesvkngt
           501                                                 550
       75  YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
        9  YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
       48  YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
       49  YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI
       76  .......... .......... .......... .......... ..........
Consenso   ydypkysees klnrekidgv klesmgvyqi laiystvass lvllvslgai
           551           566
       75  SFWMCSNGSL QCRICI
        9  SFWMCSNGSL QCRICI
       48  SFWMCSNGSL QCRICI
       49  SFWMCSNGSL QCRICI
       76  .......... ......
Consenso   sfwmcsngsl qcrici
```

[00233] A sequência consenso indica em letras maiúsculas aminoácidos comuns a todas as sequências em uma posição designada; letras minúsculas indicam aminoácidos comuns a, ao menos, metade, ou a maior parte das sequências; o símbolo ! é qualquer um de I ou V; o símbolo $ é qualquer um de L ou M; o símbolo % é qualquer um de F ou Y; o símbolo # é qualquer um de N, D, Q, E, B ou Z; o símbolo "." é nenhum aminoácido (por exemplo, uma deleção); X na posição 3 é qualquer um de A ou V; X na posição 52 é qualquer um de E ou N; X na posição 90 é K ou R; X na posição 99 é T ou K; X na posição 111 é qualquer um de Y ou H; X na posição 145 é qualquer um de V ou T; X na posição 157 é K ou E; X na posição 162 é R ou K; X na posição 182 é V ou A; X na posição 203 é N ou D; X na posição 205 é R ou K; X na posição 210 é T ou K; X na posição 225 é K ou Y; X na posição 333 é H ou uma deleção; X na posição 433 é I ou L; X na

posição 49 é N ou D.

[00234] Como outro exemplo de tal variação, um alinhamento de sequência e sequência consenso para HA de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (SEQ ID NO: 55), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) e A/Indonésia/5/2006 (H5N1) (SEQ ID NO: 10) são mostrados abaixo na Tabela 4.

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

4	SEQ ID NO.	Sequência
		1 50
	10	MEKIVLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
	56	MEKIVLLFAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
	55	MEKIVLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
	Consenso	MEKIVLLlAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE
		51 100
	10	KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
	56	KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
	55	KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
	Consenso	KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIVEKAN
		101 150
	10	PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
	56	PVNDLCYPGD FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSS HEASLGVSSA
	55	PANDLCYPGN FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA
	Consenso	PxNDLCYPGx FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSd HEASsGVSSA
		151 200
	10	CPYLGSPSFF RNVVWLIKKN STYPTIKKSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
	56	CPYQGKSSFF RNVVWLIKKN STYPTIKRSY NNTNQEDLLV LWGIHHPNDA
	55	CPYQGTPSFF RNVVWLIKKN NTYPTIKRSY NNTNQEDLLI LWGIHHSNDA
	Consenso	CPYqGxpSFF RNVVWLIKKN sTYPTIKrSY NNTNQEDLL! LWGIHHpNDA
		201 250
	10	AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
	56	AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPRIA TRSKVNGQSG RMEFFWTILK
	55	AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RMDFFWTILK
	Consenso	AEQTkLYQNP TTYIS!GTST LNQRLVPkIA TRSKVNGQSG RM#FFWTILK
		251 300
	10	PNDAINFESN GNFIAPEYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
	56	PNDAINFESN GNFIAPEYAY KIVKKGDSTI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA
	55	PNDAINFESN GNFIAPEYAY KIVKKGDSAI VKSEVEYGNC NTKCQTPIGA
	Consenso	PNDAINFESN GNFIAPEYAY KIVKKGDSaI mKSElEYGNC NTKCQTPmGA

```
           301                                                 350
       10  INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNRLVLA TGLRNSPQRE SRRKKRGLFG
       56  INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNRLVLA TGLRNSPQRE RRRKKRGLFG
       55  INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNKLVLA TGLRNSPLRE RRRK.RGLFG
Consenso   INSSMPFHNI HPLTIGECPK YVKSNrLVLA TGLRNSPqRE rRRKkRGLFG
           351                                                 400
       10  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
       56  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
       55  AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
Consenso   AIAGFIEGGW QGMVDGWYGY HHSNEQGSGY AADKESTQKA IDGVTNKVNS
           401                                                 450
       10  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
       56  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
       55  IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
Consenso   IIDKMNTQFE AVGREFNNLE RRIENLNKKM EDGFLDVWTY NAELLVLMEN
           451                                                 500
       10  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDNAKELG NGCFEFYHKC DNECMESIRN
       56  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDNAKELG NGCFEFYHKC DNECMESVRN
       55  ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDNAKELG NGCFEFYHKC DNECMESVRN
Consenso   ERTLDFHDSN VKNLYDKVRL QLRDNAKELG NGCFEFYHKC DNECMES!RN
           501                                                 550
       10  GTYNYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMMA
       56  GTYDYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGIY QILSIYSTVA SSLALAIMVA
       55  GTYDYPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGTY QILSIYSTVA SSLALAIMVA
Consenso   GTY#YPQYSE EARLKREEIS GVKLESIGtY QILSIYSTVA SSLALAIMvA
           551            568
       10  GLSLWMCSNG SLQCRICI
       56  GLSLWMCSNG SLQCRICI
       55  GLSLWMCSNG SLQCRICI
Consenso   GLSLWMCSNG SLQCRICI
```

[00235] A sequência consenso indica em letras maiúsculas aminoácidos comuns a todas as sequências em uma posição designada; letras minúsculas indicam aminoácidos comuns a ao menos metade ou a maior parte das sequências; o símbolo ! é qualquer um de I ou V; o símbolo $ é qualquer um de L ou M; o símbolo % é qualquer um de F ou Y; o símbolo # é qualquer um de N, D, Q, E, B ou Z; X na posição 102 é qualquer um de T, V ou A; X na posição 110 é qualquer um de S, D ou N; X na posição 156 é qualquer um de S, K ou T.

[00236] Os alinhamentos e sequências consenso descritos e ilustrados acima são exemplos não limitantes de variantes em sequências de aminoácido de hemaglutinina que podem ser usadas em várias modalidades da invenção para a produção de VLPs em uma planta.

[00237] Um ácido nucleico codificando uma sequência de aminoácido pode ser facilmente determinado, à medida que os códons para cada aminoácido são conhecidos na técnica. O fornecimento de uma sequência de aminoácido, então, ensinam as sequências de ácido nucleico degeneradas que a codificam. A presente invenção, então, fornece uma sequência de ácido nucleico codificando a hemaglutinina daquelas cepas e subtipos descritos aqui (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova Iorque/1995, A/gaivota argêntea/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/marreco canadense/MN/33/00, A/pato/Xangai/1/2000, A/marreca-arrebio/TX/828189/02, A/peru/Ontário/6118/68 (H8N4), A/marreca/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949 (H10N7), A/pato/Inglaterra/56 (H11N6), A/pato/Alberta/60/76 (H12N5), A/gaivota/Maryland/704/77 (H13N6), A/marreco canadense/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99 (H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)), bem como as sequências degeneradas que codificam as hemaglutininas acima.

[00238] Ademais, uma sequência de aminoácido codificada por um ácido nucleico pode ser facilmente determinada, à medida que o códon

ou códons para cada aminoácido são conhecidos. O fornecimento de um ácido nucleico, então, ensina uma sequência de aminoácido codificada por ele. A invenção, então, fornece sequências de aminoácido da hemaglutinina daquelas cepas e subtipos de influenza descritos aqui (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova Iorque/1995, A/gaivota argêntea/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/marreco canadense/MN/33/00, A/pato/Xangai/1/2000, A/marreca-arrebio/TX/828189/02, A/peru/Ontário/6118/68 (H8N4), A/marreca/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949 (H10N7), A/pato/Inglaterra/56 (H11N6), A/pato/Alberta/60/76 (H12N5), A/gaivota/Maryland/704/77 (H13N6), A/marreco canadense/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99 (H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)).

[00239] Em plantas, as VLPs de influenza germinam da membrana plasmática (ver Exemplo 5, e figura 19), então a composição lipídica das VLPs reflete sua origem. As VLPs produzidas de acordo com a presente invenção compreendem HA de um ou mais tipos ou subtipos de influenza, complexados com lipídios derivados de planta. Os lipídios de planta podem estimular células imunes específicas e melhoram a resposta imune induzida. As membranas de planta são feitas de lipídios, fosfatidil colina (PC) e fosfatidil etanolamina (PE), e também contém glicosfingo lipídios, saponinas, e fitosteróis. Adicionalmente, as balsas lipídicas são também encontradas em membranas plasmáticas de

plantas – esses microdomínios são enriquecidos em esfingolipídios e esteróis. Em plantas, uma variedade de fitosteróis ocorre, incluindo estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol e colesterol (Mongrand e outros, 2004).

[00240] PC e PE, bem como glicoesfingolipídios podem se ligar a moléculas CD1 expressas por células imunes de mamíferos tal como células apresentando antígeno (APCs) como células dendríticas e macrófagos e outras células incluindo linfócitos Be T no timo e fígado (Tsuji M., 2006). As moléculas CD1 são estruturalmente similares às moléculas de classe I do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e sua função é apresentar antígenos de glicolipídios a células NKT (células T exterminadoras naturais). Mediante ativação, as células NKT ativam células imunes tal como células NK e células dendríticas e também ativam as células imunes adaptativas como as células B produzindo anticorpo e as células T.

[00241] Uma variedade de fitosteróis pode ser encontrada em uma membrana plasmática – o complemento específico pode variar dependendo da espécie, condições de crescimento, recursos de nutriente ou estado do patógeno, para citar alguns fatores. Geralmente, o beta-sitosterol é o fitosterol mais abundante.

[00242] Os fitosteróis presentes em uma VLP de influenza complexada com uma bicamada de lipídio, tal como um envelope derivado da membrana plasmática, podem fornecer uma composição de vacina vantajosa. Sem querer estar limitado pela teoria, as VLPs produzidas em plantas complexadas com uma bicamada de lipídio, tal como um envelope derivado de membrana plasmática, podem induzir uma reação imune mais forte do que as VLPs produzidas em outros sistemas de expressão, e podem ser similares à reação imune induzida por vacinas de vírus vivo ou atenuado.

[00243] Então, em algumas modalidades, a invenção fornece uma

VLP complexada com uma bicamada de lipídio derivada de planta. Em algumas modalidades, a bicamada de lipídio derivada de planta pode compreender o envelope da VLP.

[00244] O produto VLP dentro de uma planta pode incluir uma HA compreendendo N-glicanos específicos de planta. Então, esta invenção também fornece uma VLP compreendendo HA tendo N-glicanos específicos de planta.

[00245] Ademais, a modificação de N-glicano em plantas é conhecida (ver, por exemplo, US 60/944.344, que é incorporada aqui a título de referência) e HA tendo N-glicanos modificados pode ser produzida. HA compreendendo um padrão de glicosilação modificado, por exemplo, com N-glicanos fucosilados, xilosilados, ou ambos, fucosilados e xilosilados podem ser obtidos, ou HA tendo um padrão de glicosilação modificado pode ser obtida, em que a proteína carece de fucosilação, xilosilação ou ambos, e compreende galactosilação aumentada. Ademais, a modulação de modificações pós-traducionais, por exemplo, a adição de galactose terminal pode resultar em uma redução de fucosilação e xilosilação da HA expressa quando comparada a uma planta de ocorrência natural expressando HA.

[00246] Por exemplo, o que não é para ser considerado limitante, a síntese de HA tendo um padrão de glicosilação modificado pode ser alcançada coexpressando a proteína de interesse junto com uma sequência de nucleotídeo codificando beta-1,4-galactosil transferase (GalT), por exemplo, mas não limitado a GalT de mamífero, ou GalT humano, entretanto, GalT de outras fontes pode também ser usado. O domínio catalítico de GalT pode também ser fundido a um domínio CTS (isto é, a cauda citoplásmica, domínio transmembrana, região de haste) de N-acetilglucosaminil transferase (GNT1), para produzir uma enzima híbrida GNT1-GalT, e a enzima híbrida pode ser coexpressa com HA. A HA pode ser também coexpressa junto com uma sequência de

nucleotídeo codificando N-acetilglucosaminil transferase III (GnT-III), por exemplo, mas não limitado a GnT-III de mamífero ou GnT-III humano, GnT-III de outras fontes pode também ser usado. Adicionalmente, uma enzima híbrida GNT1-GnT-III, compreendendo o CTS de GNT1 fundido a GnT-III, pode também ser usada.

[00247] Então, a presente invenção também inclui VLPs compreendendo HA tendo N-glicanos modificados.

[00248] Sem querer ser limitada pela teoria, a presença de N-glicanos de planta em HA pode estimular a resposta imune promovendo a ligação de HA por células apresentando antígeno. O estímulo da resposta imune usando N-glicano de planta foi proposto por Saint-Jore-Dupas e outros (2007). Ademais, a conformação da VLP pode ser vantajosa para a apresentação do antígeno, e melhora o efeito adjuvante da VLP quando complexada com uma camada de lipídio derivada de planta.

[00249] Por "região reguladora", "elemento regulador" ou "promotor" entende-se uma parte de ácido nucleico tipicamente, mas nem sempre, a montante da região de codificação de proteína de um gene, que pode ser compreendida ou de DNA ou RNA, ou ambos DNA e RNA. Quando uma região reguladora está ativa, e em associação funcional, ou ligada de maneira funcional, com um gene de interesse, isso pode resultar em expressão do gene de interesse. Um elemento regulador pode ser capaz de mediar especificidade de órgão, ou controlar a ativação do desenvolvimento de gene ou ativação temporal de gene. Uma "região reguladora" inclui elementos promotores, elementos promotores de núcleo exibindo uma atividade promotora basal, elementos que são induzidos em resposta a um estímulo externo, elementos que mediam a atividade promotora tal como elementos reguladores negativos ou acentuadores transcricionais. A "região reguladora", como usada aqui, também inclui elementos que são ativos seguindo a transcrição, por

exemplo, elementos reguladores que modulam a expressão gênica tal como acentuadores traducionais e transcricionais, repressores traducionais e transcricionais, sequências de ativação a montante, e determinantes de instabilidade de mRNA. Vários desses últimos elementos podem estar localizados proximais à região de codificação.

[00250] No contexto desta descrição, o termo "elemento regulador" ou "região reguladora" tipicamente se refere a uma sequência de DNA, usualmente, mas nem sempre, a montante (5') à sequência de codificação de um gene estrutural, que controla a expressão da região de codificação fornecendo o reconhecimento para RNA polimerase e/ou outros fatores exigidos para a transcrição para iniciar em um sítio particular. Entretanto, entende-se que outras sequências de nucleotídeo, localizadas dentro de íntrons, ou a 3' da sequência pode também contribuir para a regulação de expressão de uma região de codificação de interesse. Um exemplo de um elemento regulador que fornece reconhecimento para RNA polimerase ou outros fatores transcricionais para assegurar a iniciação em um sítio particular é um elemento promotor. A maior parte, mas nem todos, dos elementos promotores eucarióticos contêm uma caixa TATA, uma sequência de ácido nucleico conservada compreendida de pares base de nucleotídeos adenosina e timidina usualmente situados aproximadamente 25 pares base a montante de um sítio de partida transcricional. Um elemento promotor compreende um elemento promotor basal, responsável pela iniciação da transcrição, bem como outros elementos reguladores (como listado acima) que modificam a expressão gênica.

[00251] Há vários tipos de regiões reguladoras, incluindo aquelas que têm o desenvolvimento regulado, induzido ou constitutivo. Uma região reguladora que tem o desenvolvimento regulado, ou controla a expressão diferencial de um gene sob seu controle, é ativada dentro de

certos órgãos ou tecidos de um órgão em tempos específicos durante o desenvolvimento desse órgão ou tecido. Entretanto, algumas regiões reguladoras que têm o desenvolvimento regulado podem preferencialmente ser ativas dentro de certos órgãos ou tecidos em estágios de desenvolvimento específicos, elas também podem ser ativas de uma maneira com desenvolvimento regulado, ou em um nível basal em outros órgãos ou tecidos dentro da planta também. Os exemplos de regiões reguladoras específicas de tecido, uma região reguladora específica de semente, por exemplo, incluem o promotor de napin, e o promotor de cruciferina (Rask e outros, 1998, J. Plant Physiol. 152: 595 a 599; Bilodeau e outros, 1994, Plant Cell 14: 125 a 130). Um exemplo de um promotor específico de folha inclui o promotor de plastocianina (figura 1b ou SEQ ID NO: 23; US 7.125.978, que é incorporada aqui a título de referência).

[00252] Uma região reguladora induzida é uma que é capaz de direta ou indiretamente ativar a transcrição de uma ou mais sequências de DNA ou genes em resposta a um indutor. Na ausência de um indutor, as sequências de DNA ou genes não serão transcritos. Tipicamente, o fator de proteína que se liga especificamente a uma região reguladora induzida para ativar a transcrição pode estar presente em uma forma inativa, que é então direta ou indiretamente convertido na forma ativa pelo indutor. Entretanto, o fator de proteína pode também estar ausente. O indutor pode ser um agente químico tal como uma proteína, metabólito, regulador de crescimento, herbicida ou composto fenólico ou um estresse fisiológico imposto diretamente por calor, frio, sal, ou elementos tóxicos ou indiretamente através da ação de um patógeno ou agente de doença tal como um vírus. Uma célula de planta contendo uma região reguladora induzida pode ser exposta a um indutor, aplicando-o externamente à célula ou planta tal como por aspersão, irrigação, aquecimento ou métodos similares. Os elementos

reguladores induzidos podem ser derivados ou de genes de planta ou de não planta (por exemplo, Gatz, C. e Lenk, I.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352 a 358; que é incorporado aqui a título de referência). Os exemplos de promotores induzidos potenciais incluem, mas não estão limitados a promotor induzido por tetraciclina (Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89 a 108; que é incorporado aqui a título de referência), promotor induzido por esteroide (Aoyama, T. e Chua, N.H.,1997, Plant J. 2, 397 a 404; que é incorporado aqui a título de referência) e promotor induzido por etanol (Salter, M.G., e outros, 1998, Plant Journal 16, 127 a 132; Caddick, M.X., e outros, 1998, Nature Biotech. 16, 177 a 180, que são incorporados aqui a título de referência), genes IB6 e CKI1 induzidos por citocinina (Brandstatter, I. e Kieber, J.J., 1998, Plant Cell 10, 1009 a 1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982 a 985; que são incorporados aqui a título de referência) e o elemento induzido por auxina, DR5 (Ulmasov, T., e outros, 1997, Plant Cell 9, 1963 a 1971; que é incorporado aqui a título de referência).

[00253] Uma região reguladora constitutiva dirige a expressão de um gene por todas as várias partes de uma planta e continuamente por todo o desenvolvimento da planta. Os exemplos de elementos reguladores constitutivos conhecidos incluem promotores associados com o transcrito CaMV 35S. (Odell e outros, 1985, Nature, 313: 810 a 812), a actina 1 do arroz (Zhang e outros, 1991, Plant Cell, 3: 1155 a 1165), actina 2 (An *e outros*, 1996, *Plant J*., 10: 107 a 121), ou tms 2 (U.S. 5.428.147, que é incorporado aqui a título de referência), e genes da triose fosfato isomerase 1 (Xu e outros, 1994, Plant Physiol. 106: 459 a 467), o gen da ubiquitina 1 do milho (Cornejo e outros, 1993, Plant Mol. Biol. 29: 637 a 646), os genes da ubiquitina 1 e 6 da *Arabidopsis* (Holtorf e outros, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 637 a 646), e o gene 4A do fator de iniciação traducional do tabaco (Mandel e outros, 1995 Plant Mol. Biol. 29: 995 a 1004). O termo "constitutivo", como usado aqui, não

necessariamente indica que um gene sob controle da região reguladora constitutiva é expresso no mesmo nível em todos os tipos de células, mas que o gene é expresso em uma ampla faixa de tipos de células mesmo que a variação em abundância seja frequentemente observada. Os elementos reguladores constitutivos podem ser acoplados com outras sequências para ainda acentuar a transcrição e/ou tradução da sequência de nucleotídeo ao qual eles estão ligados de maneira funcional. Por exemplo, o sistema CMPV-HT (Sainsbury e outros, 2008, Plant Physiology 148: 1212 a 1218) é derivado das regiões não traduzidas do vírus do mosaico do feijão de corda (COMV) e demonstra tradução acentuada da sequência de codificação associada.

[00254] Por "nativo" entende-se que a sequência de ácido nucleico ou de aminoácido está naturalmente ocorrendo, ou é de "ocorrência natural".

[00255] Por "ligadas de maneira funcional" entende-se que as sequências particulares, por exemplo, um elemento regulador e uma região de codificação de interesse, interagem ou direta ou indiretamente para executar uma função pretendida, tal como mediação ou modulação de expressão gênica. A interação de sequências ligadas de maneira funcional pode, por exemplo, ser mediada por proteínas que interagem com as sequências ligadas de maneira funcional.

[00256] Uma ou mais sequências de nucleotídeo da presente invenção podem ser expressas em qualquer hospedeiro de planta adequado que é transformado pela sequência de nucleotídeo, ou construtos, ou vetores da presente invenção. Os exemplos de hospedeiros adequados incluem, mas não estão limitados a colheitas agrícolas incluindo alfafa, canola, *Brassica spp.*, milho, *Nicotiana spp.*, alfafa, batata, ginseng, ervilha, aveia, arroz, soja, trigo, cevada, girassol, algodão e seus similares.

[00257] Um ou mais construtos genéticos quiméricos da presente

invenção podem ainda compreender uma região não traduzida 3'. Uma região não traduzida 3' refere-se àquela parte de um gene compreendendo um segmento de DNA que contém um sinal de poliadenilação e quaisquer outros sinais reguladores capazes de efetuar processamento de mRNA ou expressão gênica. O sinal de poliadenilação é usualmente caracterizado por efetuar a adição de rastros de ácido poliadenílico na extremidade 3' do precursor de mRNA. Os sinais de poliadenilação são geralmente reconhecidos pela presença de homologia à forma canônica 5' AATAAA-3', embora variações não sejam incomuns. Um ou mais dos construtos genéticos quiméricos da presente invenção podem também incluir ainda acentuadores, ou acentuadores de tradução ou de transcrição, como pode ser exigido. Essas regiões acentuadoras são bem conhecidas pelos versados na técnica, e podem incluir o códon de iniciação de ATG e sequências adjacentes. O códon de iniciação precisa estar em fase com a fase de leitura da sequência de codificação para assegurar a tradução da sequência inteira.

[00258] Os exemplos não limitantes de regiões 3' adequadas são as regiões não traduzidas transcritas 3' contendo um sinal de poliadenilação de genes de plasmídeo induzindo tumor de *Agrobacterium* (Ti), tal como a sintase de nopalina (gene Nos) e genes de plantas tal como os genes de proteína de armazenamento de soja, a pequena subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (ssRUBISCO; US 4.962.028; que é incorporada aqui a título de referência), o promotor usado na regulação da expressão de plastocianina (Pwee e Gray, 1993; que é incorporado aqui a título de referência). Um exemplo de um promotor de plastocianina é descrito em US 7.125.978 (que é incorporada aqui a título de referência).

[00259] Como descrito aqui, os promotores compreendendo sequências acentuadoras com eficácia demonstrada na expressão de

folha, revelaram-se eficazes em expressão transiente. Sem querer estar limitado pela teoria, o acoplamento de elementos reguladores a montante de um gene fotossintético por acoplamento à matriz nuclear pode mediar forte expressão. Por exemplo, até -784 a partir do sítio de início da tradução do gene de plastocianina de ervilha que pode ser usado mediam forte expressão gênica de repórter.

[00260] Para ajudar na identificação de células de plantas transformadas, os construtos desta invenção podem ser ainda manipulados para incluir marcadores selecionáveis de plantas. Os marcadores selecionáveis úteis incluem enzimas que fornecem resistência para produtos químicos tais como antibióticos, por exemplo, gentamicina, higromicina, canamicina, ou herbicidas tal como fosfinotricina, glifosato, clorosulfuron e seus similares. Similarmente, as enzimas fornecendo a produção de um composto identificável por mudança de cor tal como GUS (beta-glucuronidase), ou luminescência, tal como luciferase ou GFP, podem ser usados.

[00261] Também consideradas parte desta invenção são as plantas transgênicas, células de plantas ou sementes contendo o construto de gene quimérico da presente invenção. Os métodos de regenerar plantas integrais a partir de células de plantas são também conhecidos na técnica. Em geral, as células de plantas transformadas são cultivadas em um meio apropriado, que pode conter agentes seletivos tal como antibióticos, em que os marcadores selecionáveis são usados para facilitar a identificação de células de plantas transformadas. Uma vez que as formas de calos, a formação da parte aérea pode ser encorajada empregando-se os hormônios de plantas apropriados de acordo com métodos conhecidos e os ramos transferidos ao meio de enraizamento para regeneração de plantas. As plantas podem então ser usadas para estabelecer gerações repetitivas, ou a partir de sementes ou usando técnicas de propagação vegetativa. As plantas transgênicas podem

também ser geradas sem usar culturas de tecidos.

[00262] Também consideradas parte desta invenção são células de plantas transgênicas, árvores, leveduras, bactérias, fungos, inseto e animais contendo o construto de gene quimérico compreendendo um ácido nucleico codificando HA0 recombinante para produção de VLP, de acordo com a presente invenção.

[00263] Os elementos reguladores da presente invenção podem também ser combinados com a região de codificação de interesse para expressão dentro de uma faixa de organismos hospedeiros que são receptivos à transformação, ou expressão transitória. Tais organismos incluem, mas não estão limitados a plantas, ambas monocotiledôneas e dicotiledôneas, por exemplo, mas não limitadas a milho, cereais, trigo, cevada, aveia, *Nicotiana spp., Brassica spp.*, soja, feijão, ervilha, alfafa, batata, tomate, ginseng e *Arabidopsis*.

[00264] Os métodos para transformação estável, e regeneração desses organismos são estabelecidos na técnica e conhecidos pelos versados na técnica. O método para obter plantas transformadas e regeneradas não é crucial para a presente invenção.

[00265] Por "transformação" entende-se a transferência interespecífica estável de informação genética (sequência de nucleotídeo) que é manifestada genotipicamente, fenotipicamente ou ambos. A transferência interespecífica de formação genética de um construto quimérico para um hospedeiro pode ser herdada e a transferência de informação genética considerada estável, ou a transferência pode ser transitória e a transferência de informação genética não é hereditária.

[00266] Pelo termo "matéria de planta" entende-se qualquer material derivado de uma planta. A matéria de planta pode compreender uma planta inteira, tecido, células ou qualquer fração desses. Ademais, a matéria de planta pode compreender componentes de planta

intracelulares, componentes de planta extracelulares, extratos líquidos ou sólidos de plantas, ou uma combinação desses. Ademais, a matéria de planta pode compreender plantas, células de plantas, tecido, um extrato líquido ou uma combinação desses, a partir de folhas, caules, frutos, raízes de plantas ou uma combinação desses. A matéria de planta pode compreender uma planta ou parte dessa que não foi submetida a quaisquer etapas de processamento. Uma parte de uma planta pode compreender matéria de planta. Entretanto, observa-se também que o material de planta pode ser submetido a etapas de processamento mínimo como definido abaixo, ou processamento mais rigoroso, incluindo purificação de proteína parcial ou substancial usando técnicas geralmente conhecidas dentro da técnica incluindo, mas não limitadas a cromatografia, eletroforese e seus similares.

[00267] Pelo termo "processamento mínimo" entende-se matéria de planta, por exemplo, uma planta ou parte dessa compreendendo uma proteína de interesse que é parcialmente purificada para produzir um extrato de planta, homogenado, fração de homogenado de planta ou seus similares (isto é, minimamente processado). A purificação parcial pode compreender, mas não está limitada a romper as estruturas celulares da planta criando desse modo uma composição compreendendo componentes de planta solúveis, e componentes de planta insolúveis que podem ser separados, por exemplo, mas não limitado a, por centrifugação, filtração ou uma combinação desses. Nesse aspecto, as proteínas secretadas dentro do espaço extracelular da folha ou outros tecidos poderiam ser prontamente obtidas usando extração a vácuo ou centrífuga, ou os tecidos poderiam ser extraídos sob pressão por passagem através de cilindros ou moagem ou seu similar para comprimir ou liberar a proteína livre de dentro do espaço extracelular. O processamento mínimo poderia também envolver a preparação de extratos brutos de proteínas solúveis, desde que essas

preparações tenham contaminação desprezível de produtos de planta secundários. Ademais, o processamento mínimo pode envolver extração aquosa de proteína solúvel das folhas, seguida por precipitação com qualquer sal adequado. Outros métodos podem incluir maceração em grande escala e extração de suco de modo a permitir o uso direto do extrato.

[00268] A matéria de planta, na forma de material de planta ou tecido pode ser oralmente fornecido a um sujeito. A matéria de planta pode ser administrada como parte de um suplemento dietético, junto com outros alimentos, ou encapsulada. A matéria de planta ou tecido pode também ser concentrada para aprimorar ou aumentar a palatabilidade, ou fornecida junto com outros materiais, ingredientes, ou excipientes farmacêuticos, como exigido.

[00269] Os exemplos de um sujeito ou organismo-alvo a quem as VLPs da presente invenção podem ser administradas incluem, mas não estão limitados a seres humanos, primatas, pássaros, aves aquáticas, pássaros migratórios, codornas, patos, gansos, galinhas, camelos, caninos, cachorros, felinos, gatos, tigres, leopardos, algálias, martas, fuinhas, animais domésticos, animais de fazenda, camundongos, ratos, focas, baleias e seus similares. Tais organismos-alvo são exemplificados, e não são considerados limitantes às aplicações e usos da presente invenção.

[00270] Observa-se que uma planta compreendendo a proteína de interesse, ou expressando a VLP compreendendo a proteína de interesse, pode ser administrada a um sujeito ou organismo-alvo, em uma variedade de formas dependendo da necessidade e da situação. Por exemplo, a proteína de interesse obtida da planta pode ser extraída antes de seu uso ou em uma forma bruta, parcialmente purificada, ou purificada. Se a proteína é purificada, então ela pode ser produzida ou a partir de plantas comestíveis ou não comestíveis. Ademais, se a

proteína é oralmente administrada, o tecido da planta pode ser colhido e diretamente fornecido ao sujeito, ou o tecido colhido pode ser seco antes de fornecê-lo, ou um animal pode ser permitido a pastar na planta sem acontecer colheita anterior. Considera-se também dentro do escopo desta invenção que os tecidos de planta colhidos sejam fornecidos como um suplemento alimentar dentro da alimentação do animal. Se o tecido de planta está sendo fornecido a um animal com pouco ou nenhum processamento adicional, é preferível que o tecido de planta sendo administrado seja comestível.

[00271] O silenciamento de gene pós-transcricional (PTGS) pode estar envolvido na expressão limitante de transgenes em plantas, e a coexpressão de um supressor de silenciamento do vírus Y da batata (HcPro) pode ser usada para neutralizar a degradação específica de mRNAs de transgene (Brigneti e outros, 1998). Os supressores alternativos de silenciamento são bem conhecidos na técnica e podem ser usados como descrito aqui (Chiba e outros, 2006, Virology 346: 7 a 14; que é incorporado aqui a título de referência), por exemplo, mas não limitados a TEV-p1/HC-Pro (vírus etch do tabaco-p1/HC-Pro), BYV - p21, p19 do vírus do enfezamento vermelho do tomate (TBSV p19), proteína capsidial do vírus do encrespamento do Tomate (TCV -CP), 2b do vírus mosaico do pepino; CMV-2b), p25 do vírus X da batata (PVX-p25), p11 do vírus M da batata (PVM-p11), p11 do vírus S da batata (PVS-p11), p16 do vírus scorch do Mirtilo, (BScV –p16), p23 do vírus da tristeza dos citros (CTV-p23), p24 do vírus-2 associado ao enrolamento da folha da videira, (GLRaV-2 p24), p10 do vírus A da videira, (GVA-p10), p14 do vírus B da videira (GVB-p14), p10 do vírus latente de Heracleum (HLV-p10), ou p16 do vírus latente comum do alho (GCLV-p16). Então, um supressor de silenciamento, por exemplo, mas não 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 ou GVA-p10, pode ser coexpresso junto com a sequência de ácido nucleico codificando a proteína de interesse para ainda assegurar altos níveis de produção de proteína dentro de uma planta.

[00272] Ademais, as VLPs podem ser produzidas, as quais compreendem uma combinação de subtipos de HA. Por exemplo, as VLPs podem compreender uma ou mais HAs a partir do subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, tipo B ou uma cominação desses. A seleção da combinação de HAs pode ser determinada pelo uso pretendido da vacina preparada a partir da VLP. Por exemplo, uma vacina para uso em inocular pássaros pode compreender qualquer combinação de subtipos de HA, enquanto as VLPs úteis para inocular humanos podem compreender um ou mais dos subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 ou B. Entretanto, outras combinações de subtipo de HA podem ser preparadas dependendo do uso da VLP. De modo a produzir VLPs compreendendo combinações de subtipos de HA, o subtipo de HA desejado pode ser coexpresso dentro da mesma célula, por exemplo, uma célula de planta.

[00273] Ademais, as VLPs produzidas como descrito aqui não compreendem neuraminidase (NA). Entretanto, a NA pode ser coexpressa com HA e as VLPs compreendendo HA e NA podem ser desejadas.

[00274] Então, a presente invenção ainda inclui um vetor adequado compreendendo o construto quimérico adequado para uso com ou sistemas de expressão estáveis ou transitórios. A informação genética pode ser também fornecida dentro de um ou mais construtos. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeo codificando uma proteína de interesse pode ser introduzida em um construto, e uma segunda sequência de nucleotídeo codificando uma proteína que modifica a glicosilação da proteína de interesse pode ser introduzida usando um

construto separado. Essas sequências de nucleotídeo podem então ser coexpressas dentro de uma planta. Entretanto, um construto compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando ambas a proteína de interesse e a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse pode ser também usado. Nesse caso, a sequência de nucleotídeo compreenderia uma primeira sequência compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico codificando a proteína de interesse ligada de maneira funcional a uma região promotora ou reguladora, e uma segunda sequência compreendendo uma segunda sequência de ácido nucleico codificando a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse, a segunda sequência ligada de maneira funcional a uma região promotora ou reguladora.

[00275] Por "coexpresso" entende-se que duas ou mais sequências de nucleotídeo são expressas aproximadamente ao mesmo tempo dentro da planta, e dentro do mesmo tecido da planta. Entretanto, as sequências de nucleotídeo não precisam ser expressas exatamente ao mesmo tempo. De preferência, duas ou mais sequências de nucleotídeo são expressas de uma maneira tal que os produtos codificados têm uma chance de interagir. Por exemplo, a proteína que modifica a glicosilação da proteína de interesse pode ser expressa, ou antes, ou durante o período quando a proteína de interesse é expressa, tal que a modificação da glicosilação da proteína de interesse acontece. Duas ou mais sequências de nucleotídeo podem ser coexpressas usando um sistema de expressão transitória, em que as duas ou mais sequências são introduzidas dentro da planta aproximadamente ao mesmo tempo sob condições em que ambas as sequências são expressas. Alternativamente, uma planta de plataforma compreendendo uma das sequências de nucleotídeo, por exemplo, a sequência codificando a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse,

pode ser transformada, ou transitoriamente ou de uma maneira estável, com uma sequência adicional codificando a proteína de interesse. Nesse caso, a sequência codificando a proteína que modifica o perfil de glicosilação da proteína de interesse pode ser expressa dentro de um tecido desejado, durante um estágio desejado de desenvolvimento, ou sua expressão pode ser induzida usando um promotor induzido, e a sequência adicional codificando a proteína de interesse pode ser expressa sob condições similares e no mesmo tecido, para assegurar que as sequências de nucleotídeo são coexpressas.

[00276] Os construtos da presente invenção podem ser introduzidos em células de plantas usando plasmídeos Ti, plasmídeos Ri, vetores virais de plantas, transformação direta de DNA, microinjeção, eletroporação, infiltração e seus similares. Para revisões de tais técnicas, ver, por exemplo, Weissbach e Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pág. 421 a 463 (1988); Geierson e Corey, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed. (1988); e Miki e Iyer, Fundamentals of Gene Transfer in Plants. In *Plant Metabolism*, 2ª Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebrve, DB Layzell (eds), Addison-Wesley, Langmans Ltd. Londres, pág. 561 a 579 (1997). Outros métodos incluem absorção de DNA direta, o uso de lipossomos, eletroporação, por exemplo, usando protoplastos, microinjeção, microprojéteis ou cristais, e infiltração a vácuo. Ver, por exemplo, Bilang, e outros (Gene 100: 247 a 250 (1991), Scheid e outros (Mol. Gen. Genet. 228: 104 a 112, 1991), Guerche e outros (Plant Science 52: 111 a 116, 1987), Neuhause e outros (Theor. Appl Genet. 75: 30 a 36, 1987), Klein e outros, Nature 327: 70 a 73 (1987); Howell e outros (Science 208: 1265, 1980), Horsch e outros (Science 227: 1229 a 1231, 1985), DeBlock e outros, Plant Physiology 91: 694 a 701, 1989), Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach e Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), Methods in Plant Molecular Biology (Schuler e

Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu e Lomonossoff (J. Virol Meth, 105: 343 a 348, 2002,), Pat. U.S. Nos. 4.945.050, 5.036.006, 5.100.792, 6.403.865, 5.625.136, (todos as quais são aqui incorporados a título de referência).

[00277] Os métodos de expressão transitória podem ser usados para expressar os construtos da presente invenção (ver Liu e Lomonossoff, 2002, Journal of Virological Methods, 105: 343 a 348; que é aqui incorporado a título de referência). Alternativamente, um método de expressão transitória baseado em vácuo, como descrito por Kapila e outros, 1997 (incorporado aqui a título de referência) pode ser usado. Esses métodos podem incluir, por exemplo, mas não limitados a um método de Agroinoculação ou Agroinfiltração, entretanto, outros métodos transitórios podem também ser usados como notado acima. Ou com Agroinoculação ou com Agroinfiltração, uma mistura de Agrobactéria compreendendo o ácido nucleico desejado entra nos espaços intercelulares de um tecido, por exemplo, as folhas, parte aérea da planta (incluindo caule, folhas e flores), outra parte da planta (caule, raíz, flores) ou a planta toda. Após cruzar a epiderme, a Agrobactéria infecta e transfere cópias de t-DNA para as células. O t-DNA é transcrito de forma episssomal e o mRNA traduzido, levando à produção da proteína de interesse em células infectadas, entretanto, a passagem de t-DNA dentro do núcleo é transitória.

[00278] Se a sequência de nucleotídeo de interesse codifica um produto que é direta ou indiretamente tóxico à planta, então usando o método da presente invenção, tal toxicidade pode ser reduzida por toda a planta expressando seletivamente a sequência de nucleotídeo de interesse dentro de um tecido desejado ou em um estágio desejado de desenvolvimento da planta. Em adição, o período limitado de expressão resultando de expressão transitória pode reduzir o efeito quando produzindo um produto tóxico na planta. Um promotor induzido, um

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

[00279] As VLPs de HA recombinante da presente invenção podem ser usadas em conjunto com vacinas de influenza existentes, para suplementar as vacinas, torná-las mais eficazes, e para reduzir as dosagens de administração necessárias. Como seria conhecido por uma pessoa versada na técnica, a vacina pode ser direcionada contra um ou mais vírus de influenza. Os exemplos de vacinas adequadas incluem, mas não estão limitadas às comercialmente disponíveis a partir de Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial, Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi-Aventis, Serono, Shire Pharmaceuticals e seus similares.

[00280] Se desejado, as VLPs da presente invenção podem ser misturadas com um adjuvante adequado como seria conhecido por um versado na técnica. Ademais, a VLP pode ser usada em uma composição de vacina compreendendo uma dose eficaz da VLP para o tratamento de um organismo-alvo, como definido acima. Ademais, a VLP produzida de acordo com a presente invenção pode ser combinada com VLPs obtidas usando diferentes proteínas de influenza, por exemplo, neuraminidase (NA).

[00281] Então, a presente invenção fornece um método para induzir a imunidade à infecção de vírus de influenza em um animal ou organismo-alvo compreendendo administrar uma dose eficaz de uma vacina compreendendo uma ou mais VLPs. A vacina pode ser administrada de forma oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea.

[00282] A administração das VLPs produzidas de acordo com a presente invenção é descrita no Exemplo 6. A administração da VP com H5 produzida a partir de uma planta resultou em uma resposta

significativamente maior quando comparada à administração de HA solúvel (ver figuras. 21A e 21B).

[00283] Como mostrado nas figuras. 26A e 26B, a um sujeito administrado com VLPs de H5 de influenza A/Indonésia/5/05 é fornecida proteção cruzada a uma provocação com influenza A/Peru/582/06 (H5N1; "H5N1 de Peru"). A administração de VLPs de H5 Indonésia antes da provocação não resultou em qualquer perda de massa corporal. Entretanto, em sujeito não administrado com VLPs de H5, mas provocado com H5N1 de Peru, exibiu perda significativa de massa corporal, e vários sujeitos morreram.

[00284] Esses dados, então, demonstram que as VLPs de influenza produzidas em planta compreendendo a proteína viral de hemaglutinina H5 induzem uma resposta imune específica para cepas de influenza patogênicas, e que as partículas semelhantes a vírus podem germinar de uma membrana plasmática de planta.

[00285] Portanto, a presente invenção fornece uma composição compreendendo uma dose eficaz de uma VLP compreendendo uma proteína HA de vírus de influenza, um ou mais lipídios de planta, e um veículo farmaceuticamente aceitável. A proteína HA de vírus de influenza pode ser H5 Indonésia/5/2006, A/Brisbane/50/2007, A/Ilhas Salomão/3/2006, A/Brisbane/10/2007, A/Wisconsin/67/2005, B/Malásia/2506/2005, B/Flórida/4/2006, A/Cingapura/1/57, A/Anhui/1/2005, A/Vietnã/1194/2004, A/Marreco/HongKong/W312/97, A/Equino/Praga/56 ou A/ Hong Kong/1073/99. É também fornecido um método para induzir imunidade a uma injeção de vírus de influenza em um sujeito. O método compreende administrar a partícula semelhante a vírus compreendendo uma proteína HA de vírus de influenza, um ou mais lipídios de planta, e um veículo farmaceuticamente aceitável. A partícula semelhante a vírus pode ser administrada a um sujeito de forma oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal,

intravenosa, ou subcutânea.

[00286] As composições de acordo com várias modalidades da invenção podem compreender VLPs de uma ou mais cepas ou subtipos de influenza. "Duas ou mais" refere-se a duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10 ou mais cepas ou subtipos. As cepas ou subtipos representados podem ser de um único subtipo (por exemplo, todos H1N1, ou todos H5N1), ou podem ser uma combinação de subtipos. Os subtipos e cepas exemplificados incluem, mas não estão limitados aos descritos aqui (por exemplo, A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1), A/Indonésia/5/2006 (H5N1), A/galinha/Nova Iorque/1995, A/gaivota argêntea/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/marreco canadense/MN/33/00, A/pato/Xangai/1/2000, A/marreca-arrebio/TX/828189/02, A/peru/Ontário/6118/68 (H8N4), A/marreca/Irã/G54/03, A/galinha/Alemanha/N/1949 (H10N7), A/pato/Inglaterra/56 (H11N6), A/pato/Alberta/60/76 (H12N5), A/gaivota/Maryland/704/77 (H13N6), A/marreco canadense/Gurjev/263/82, A/pato/Austrália/341/83 (H15N8), A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99 (H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburg/66, A/Porto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Ilhas Salomão 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006, A/Cingapura/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnã/1194/2004 (H5N1), A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)).

[00287] A escolha da combinação de cepas e subtipos pode depender da área geográfica dos sujeitos provavelmente expostos a influenza, da proximidade das espécies animais a uma população humana a ser imunizada (por exemplo, espécie de ave aquática, animais agrícolas tal como suínos, etc.) e as cepas que eles carregam, são expostas ou são provavelmente expostas a predições de desvio antigênico dentro de subtipos ou cepas, ou combinações desses

fatores. Os exemplos de combinações usadas nos anos anteriores estão disponíveis (ver URL: who.int/csr/dieease/influenza/vaccine recommendations1/en). Algumas ou todas essas cepas podem ser empregadas nas combinações mostradas, ou em outras combinações, na produção de uma composição de vacina.

[00288] Mais particularmente, as combinações exemplificadas podem incluir VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos selecionados a partir do grupo que compreende: A/Brisbane/59/2007 (H1N1), um vírus semelhante a A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), um vírus semelhante a A/Brisbane/10/2007 (H3N2), B/Flórida/4/2006 ou um vírus semelhante a B/Flórida/4/2006.

[00289] Outra combinação exemplificada pode incluir VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos selecionados a partir do grupo que compreende um vírus semelhante a A/Indonésia/5/2005, A/Vietnã/1194/2004, um vírus semelhante a A/Vietnã/1194/2004, A/Anhui/1/05, um vírus semelhante a A/Anhui/1/05, A/ganso/Guiyang/337/2006, um vírus semelhante a A/ganso/Guiyang/337/2006, A/galinha/Shanxi/2/2006, ou um vírus semelhante a A/galinha/Shanxi/2/2006.

[00290] Outra combinação exemplificada pode incluir VLPs de cepas de influenza A/galinha/Itália/13474/99 (tipo H7) ou A/galinha/Colômbia Britânica/04 (H7N3).

[00291] Outra combinação exemplificada pode incluir VLPs de A/galinha/Hong Kong/G9/97 ou A/Hong Kong/1073/99. Outra combinação exemplificada pode incluir VLPs de A/Ilhas Salomão/3/2006. Outra combinação exemplificada pode compreender VLPs de A/Brisbane/10/2007. Outra combinação exemplificada pode compreender VLPs de A/Wisconsin/67/2005. Outra combinação exemplificada pode compreender VLPs das cepas e subtipos B/Malásia/2506/2004, B/Flórida/4/2006 ou B/Brisbane/3/2007.

[00292] Duas ou mais VLPs podem ser expressas individualmente, e as VLPs purificadas ou semipurificadas subsequentemente combinadas. Alternativamente, as VLPs podem ser coexpressas no mesmo hospedeiro, por exemplo, uma planta. As VLPs podem ser combinadas ou produzidas em uma relação desejada, por exemplo, relações aproximadamente equivalentes, ou podem ser combinadas de tal maneira que um subtipo ou cepa compreenda a maioria das VLPs na composição.

[00293] Então, a invenção fornece composições compreendendo VLPs de duas ou mais cepas ou subtipos.

[00294] As VLPs de vírus envelopados geralmente adquirem seu envelope a partir da membrana através da qual elas germinam. As membranas plasmáticas de plantas têm um complemento de fitosterol que pode ter efeitos imunoestimuladores. Para investigar essa possibilidade, VLPs de H5 produzidas em planta foram administradas a animais na presença ou ausência de um adjuvante, e a HAI (resposta de anticorpo à inibição de hemaglutinação) determinada (figuras. 22A, 22B). Na ausência de um adjuvante adicionado, as VLPs de H5 produzidas em planta demonstram uma HAI significativa, indicativa de uma resposta imune sistêmica à administração do antígeno. Ademais, os perfis de isotipo de anticorpo de VLPs administradas na presença ou ausência de adjuvante são similares (figura 23A).

[00295] A Tabela 5 lista sequências fornecidas em várias modalidades da invenção.

Tabela 5: Descrição de sequência para identificadores de sequência.

SEQ ID No	**Descrição de Sequência**	**Em Exposição**
1	fragmento de H1 N terminal	figura 4a
2	fragmento de H1 C terminal	figura 4b
3	Sequência de codificação de H5	figura 6
4	iniciador Plato-443c	figura 7a

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
5	iniciador SpHA(Ind)-Plasto.r	figura 7b
6	iniciador Plasto-SpHA(Ind).c	figura 7c
7	iniciador HA(Ind)-Sac.r	figura 7d
8	Sequência do cassete de expressão baseado em plastocianina da alfafa usado para a expressão de H1	figura 1
9	Sequência de peptídeo HA1 (A/Nova Caledônia/20/99)	figura 8a
10	Sequência de peptídeo HA5 (A/Indonésia/5/2006)	figura 8b
11	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H7 (A/galinha/Nova Iorque/1995)	figura 9
12	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H2 (A/gaivota argêntea/DE/677/88 (H2N8))	figura 10a
13	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H3 (A/Texas/32/2003)	figura 10b
14	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H4 (A/marreco canadense/MN/33/00)	figura 10c
15	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H5 (A/pato/Xangai/1/2000)	figura 10d
16	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H6 (A/marreca-arrebio/TX/828189/02)	figura 10e
17	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H8 (A/Peru/Ontário/6118/68(H8N4))	figura 10f
18	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H9 (A/marreca/Irã/G54/03)	figura 10g

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
19	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H10 (A/galinha/Alemanha/N/1949 (H10N7))	figura 10h
20	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H11 (A/pato/Inglaterra/56 (H11N6))	figura 10i
21	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H12 (A/pato/Alberta/60/76 (H12N5))	figura 10j
22	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H13 (A/Gaivota/Maryland/704/77 (H13N6))	figura 10k
23	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H14 (A/Marreco canadense/Gurjev/263/82)	figura 10l
24	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H15 (A/pato/Austrália/341/83 (H15N8))	figura 10m
25	Sequência de codificação de Influenza A Subtipo H16 (A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/99 (H16N3))	figura 10n
26	Sequência de codificação de HA de Influenza B (B/Lee/40)	figura 10o
27	Sequência de codificação de HA de Influenza C (C/Johannesburg/66)	figura 10p
28	Sequência de H1 HAO completa	figura 5
29	Iniciador XmaI-pPlas.c	figura 10q
30	Iniciador SacI-ATG-pPlas.r	figura 10r
31	Iniciador SacI-PlasTer.c	figura 10s
32	Iniciador EcoRI-PlasTer.r	figura 10t
33	A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) No. Acesso ao GenBank AY289929	figura 16

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
34	proteína dissulfeto isomerase de *M. Sativa* No. Acesso ao GenBank Z11499	figura 17
35	A/.Porto Rico/8/34 (H1N1) No. Acesso ao GenBank NC_002016.1	figura 18
36	Clone 774: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	figura 28
37	Clone 775: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)	figura 29
38	Clone 776: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Brisbane 10/2007 (H3N2)	figura 30
39	Clone 777: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	figura 31
40	Clone 778: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de B/Malásia/2506/2004	figura 32

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
41	Clone 779: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006	figura 33
42	Clone 780: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Cingapura/1/57 (H2N2)	figura 34
43	Clone 781: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Anhui/1/2005 (H5N1)	figura 35
44	Clone 782: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	figura 36
45	Clone 783: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1)	figura 37
46	Clone 784: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Equino/Praga/56 (H7N7)	figura 38

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
47	Clone 785: DNA de DraIII a Sac1 compreendendo a região reguladora de plastocianina ligada de maneira funcional à sequência de codificação de HA de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	figura 39
48	Sequência de aminoácido de HA de Clone 774 de A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	figura 40A
49	Sequência de aminoácido de HA de Clone 775 de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)	figura 40B
50	Sequência de aminoácido de HA de Clone 776 de A/Brisbane 10/2007 (H3N2)	figura 41A
51	Sequência de aminoácido de HA de Clone 777 de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	figura 41B
52	Sequência de aminoácido de HA de Clone 778 de B/Malásia/2506/2004	figura 42A
53	Sequência de aminoácido de HA de Clone 779 de B/Florida/4/2006	figura 42B
54	Sequência de aminoácido de HA de Clone 780 de A/Cingapura/1/57 (H2N2)	figura 43A
55	Sequência de aminoácido de HA de Clone 781 de A/Anhui/1/2005 (H5N1)	figura 43B
56	Sequência de aminoácido de HA de Clone 782 de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	figura 44A
57	Sequência de aminoácido de HA de Clone 783 de A/marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1)	figura 44B
58	Sequência de aminoácido de HA de Clone 784 de A/Equino/Praga/56 (H7N7)	figura 45A
59	Sequência de aminoácido de HA de Clone 785 de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	figura 45B

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
60	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H5 de A/Indonésia/5/2005 (Construto # 660)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 51
61	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H1 de A/Nova Caledônia/20/1999 (Construto # 540)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 52
62	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H1 de A/Brisbane/59/2007 (construto #774)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 53
63	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H1 de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (construto #775)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 54

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
64	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H2 de A/Cingapura/1/57 (H2N2) (construto # 780),** 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 55
65	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H5 de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (Construto # 781)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 56
66	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H5 de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (Construto # 782)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 57
67	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H6 de A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (Construto # 783)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 58

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
68	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H9 de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Construto # 785)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 59
69	Cassete de expressão de HA compreendendo o promoter de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H3 de A/Brisbane/10/2007 (H3N2)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 60
70	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H3 de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras	figura 61
71	Cassete de expressão de HA compreendendo o promoter de plastocianina de alfafa e 5’ UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **H7 de A/Equino/Praga/56 (H7N7)**, 3’ UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 62

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
72	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **HA de B/Malásia/2506/2004**, 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 63
73	Cassete de expressão de HA compreendendo o promotor de plastocianina de alfafa e 5' UTR, sequência de codificação de hemaglutinina de **HA de B/Flórida/4/2006**, 3' UTR de plastocianina de alfafa e sequências terminadoras.	figura 64
74	Sequência de aminoácido consenso de SEQ ID NO: 49, 48, 33 e 9	figura 65
75	Sequência de aminoácido de H1 de Nova Caledônia (AAP34324.1) codificado por SEQ ID NO: 33	figura 66
76	Sequência de aminoácido de H1 de Porto Rico (NC_0409878.1) codificado por SEQ ID NO: 35	figura 67
77	pBinPlus.2613c	AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG
78	Mut-ATG115.r	GTGCCGAAGCACGATCTGACAACGTTGAAGATCGCT**CA**C**C**GCAAGAAAGACAAGAGA

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
79	Mut-ATG161.c	GTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGA
80	LC-C5-1.110r	TCTCCTGGAGTCACAGACAGGGTGG
81	Cassete de expressão número 828, de PacI (a montante do promotor) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 68
82	SpPDI-HA(Ind).c	GTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCA
83	Construto número 663, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de Plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de Plastocianina).	figura 69
84	SpPDI-H1B.c	TTCTCAGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCTAACAAC
85	SacI-H1B.r	CTTAGAGCTCTTAGATGCATATTCTACACTGTAAAGACCCATTGGAA

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
86	Construto número 787, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de Plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de plastocianina)	figura 70
87	H3B-SpPDI.r	TGTCATTTCCGGGAAGTTTTTG**AGCGAAGATCTGAGAAGGAACCA**
88	SpPDI-H3B.c	**TCTCAGATCTTCGCT**CAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACG
89	H3(A-Bri).982r	TTGCTTAACATATCTGGGACAGG
90	Construto número 790, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de Plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de plastocianina)	figura 7
91	HBF-SpPDI.r	GTTATTCCAGTGCAGATTCGATCAGCGAAGATCTGAGAAGGAACCAACAC
92	SpPDI-HBF.c	CAGATCTTCGCTGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACTCACC

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
93	Plaster80r	CAAATAGTATTTCATAACAACAACGATT
94	Construto número 798, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor de Plastocianina) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador de plastocianina)	figura 72
95	ApaI-SpPDI.c	TTGTC**GGGCCC**ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGT
96	StuI-H1(A-NC).r	AAAAT**AGGCCT**TTAGATGCATATTCTACACTGCAAAGACCCA
97	Construto número 580, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 73
98	ApaI-H5 (A-Indo).1c	TGTC**GGGCCC**ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAAT
99	H5 (A-Indo)-StuI.1707r	AAAT**AGGCCT**TTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGA
100	Construto número 685, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 74

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
101	Construto número 686, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 75
102	ApaI-H1B.c	TGTC**GGGCCC**A TGAAAGTAAAAC TACTGGTCCTGT TATGCACATT
103	StuI-H2B.r	AAAT**AGGCCT**TT AGATGCATATTC TACACTGTAAAG ACCCATTGGA
104	Construto número 732, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 76
105	Construto número 733, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 77
106	ApaI-H3B.c	TTGTC**GGGCCC** ATGAAGACTATC ATTGCTTTGAGC TACATTCTATGT C
107	StuI-H3B.r	AAAAT**AGGCCT**T CAAATGCAAATG TTGCACCTAATG TTGCCTTT
108	Construto número 735, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 78

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
109	Construto número 736, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 79
110	ApI-HBF.c	TTGTC**GGGCCC** ATGAAGGCAATA ATTGTACTACTC ATGGTAGTAAC
111	StuI-HBF.r	AAAAT**AGGCCT**T TATAGACAGATG GAGCATGAAAC GTTGTCTCTGG
112	Construto número 738, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 80
113	Construto número 739, de PacI (a montante do promotor 35S) a AscI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 81
114	Sequência de codificação de Msj1 de *M. sativa*	figura 82
115	Hsp-40Luz.1c	ATGTTTGGGCG CGGACCAAC
116	Hsp40Luz-SacI.1272r	AGCT***GAGCTC***C TACTGTTGAGCG CATTGCAC
117	Hsp40Luz-Plasto.r	GTTGGTCCGCG CCCAAACATTTT CTCTCAAGATGA T
118	Hsp70Ara.1c	ATGTCGGGTAAA GGAGAAGGA

SEQ ID No	Descrição de Sequência	Em Exposição
119	Hsp70Ara-SacI.1956r	AGCT***GAGCTC***TT AGTCGACCTCCT CGATCTTAG
120	Hsp70Ara-Plasto.r	TCCTTCTCCTTT ACCCGACATTTT CTCTCAAGATGA T
121	Construto número R850, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 83
122	Construto número R860, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 84
123	Construto número R870, de HindIII (no sítio de múltipla clonagem, a montante do promotor) a EcoRI (imediatamente a jusante do terminador NOS).	figura 85
124	supP19-plasto.r	CCTTGTATAGCT CGTTCCATTTTC TCTCAAGATG
125	supP19-1c	ATGGAACGAGC TATACAAGG
126	SupP19-SacI.r	AGTCGAGCTCTT ACTCGCTTTCTT TTTCGAAG

[00296] A invenção será agora descrita em detalhes a título de referência somente aos seguintes exemplos não limitantes.

Método e Materiais

1. Montagem de cassetes de expressão baseados em plastocianina

para HA nativa

[00297] Todas as manipulações foram feitas usando os protocolos de biologia molecular gerais de Sambrook e Russell (2001, que é incorporado aqui a título de referência). A primeira etapa de clonagem consistiu em montar um plasmídeo receptor contendo elementos reguladores a montante e a jusante do gene de plastocianina de alfafa. As sequências do promotor de plastocianina e 5' UTR foram amplificadas a partir do DNA genômico de alfafa usando iniciadores de oligonucleotídeo XmaI-pPlas.c (SEQ ID NO: 29; figura 10Q) e SacI-ATG-pPlas.r (SEQ ID NO: 30; figura 10R). O produto de amplificação resultante foi digerido com XmaI e SacI e ligado em PCAMBIA2300 (Cambia, Canberra, Austrália), anteriormente digerido com as mesmas enzimas, para criar pCAMBIApromo Plato. Similarmente, as sequências 3' UTR e o terminador do gene da plastocianina foram amplificados a partir do DNA genômico da alfafa usando os seguintes iniciadores: SacI-PlasTer.c (SEQ ID NO: 31; figura 10S) e EcoRI-PlasTer.r (SEQ ID NO: 32; figura 10T), e o produto foi digerido com SacI e EcoRI antes de ser inserido nos mesmos sítios de pCAMBIApromoPlasto para criar pCAMBIAPlasto.

[00298] Um fragmento codificando hemaglutinina de cepa de influenza A/Indonésia/5/05 (H5N1; Acc. No. LANL ISDN125873) foi sintetizado por Epoch Biolabs (Sugar Land, TX, USA). O fragmento produzido, contendo a região de codificação de H5 completa incluindo o peptídeo sinal nativo flanqueado por um sítio HindIII imediatamente a montante da ATG inicial, e um sítio SacI imediatamente a jusante do códon de parada (TAA), está presente na SEQ ID NO: 3 (figura 6). A região de codificação de H5 foi clonada em um cassete de expressão baseado em plastocianina pelo método de ligação baseado em PCR apresentado por Darceau e outros (1995). Em resumo, uma primeira amplificação de PCR foi obtida usando os iniciadores Plato-443c (SEQ

ID NO: 4; figura 7A) e SpHA(Ind)-Plasto.r (SEQ ID NO: 5; figura 7B) e pCAMBIA promoPlasto como modelo. Em paralelo, uma segunda amplificação foi executada com os iniciadores Plasto-SpHA(Ind).c (SEQ ID NO: 6; figura 7C) e HA(Ind)-Sac.r (SEQ ID NO: 7; figura 7D) com o fragmento de codificação de H5 como modelo. As amplificações obtidas a partir de ambas as reações foram misturadas e a mistura serviu como modelo para uma terceira reação (reação de montagem) usando Plato-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e HA(Ind)-Sac.r (SEQ ID NO: 7; figura 7D) como iniciadores. O fragmento resultante foi digerido com BamHI (no promotor de plastocianina) e SacI (na extremidade 3' do fragmento) e clonado em pCAMBIAPlasto anteriormente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, chamado 660, é apresentado na figura 2B (também ver figura 11).

[00299] Os cassetes de expressão de hemaglutinina números 774 e 785 foram montados como segue. Um fragmento sintético foi sintetizado compreendendo a sequência de codificação de hemaglutinina completa (de ATG à parada) flanqueada em 3' pelas sequências de gene de plastocianina de alfafa correspondentes aos primeiros 84 nucleotídeos a montante da ATG de plastocianina e terminando com um sítio de restrição DraIII. Os fragmentos sintéticos também compreenderam um sítio SacI imediatamente após o códon de parada.

[00300] Os fragmentos de hemaglutinina sintéticos foram sintetizados por Top Gene Technologies (Montreal, QC, Canadá) e Epoch Biolabs (Sugar Land, TX, USA). Os fragmentos sintetizados são apresentados nas figuras. 28 a 39 e correspondem a SEQ ID NO: 36 a SEQ ID NO: 47. Para a montagem dos cassetes de expressão completos, os fragmentos sintéticos foram digeridos com DraIII e SacI e clonados em pCAMBIAPlasto anteriormente digerido com as mesmas enzimas. A Tabela 6 apresenta os cassetes produzidos com a HA correspondente e outras referências no texto.

Tabela 6: Cassetes de expressão de hemaglutinina montados a partir de fragmentos sintéticos DraIII-SacI.

Cassete número	HA Correspondente	Fragmento sintético		Cassete completo	
		figura	Fragmento Sintético SEQ ID NO	figura	Cassete Final SEQ ID NO
774	HA de A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	28	36	53	62
775	HA de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)	29	37	54	63
776	HA de A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	30	38	60	69
777	HA de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	31	39	61	70
778	HA de B/Malásia/2506/2004	32	40	63	72
779	HA de B/Flórida/4/2006	33	41	64	73
780	HA de A/Cingapura/1/57 (H2N2)	34	42	55	64
781	HA de A/Anhui/1/2005 (H5N1)	35	43	56	65
782	HA de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	36	44	57	66
783	HA de A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1)	37	45	58	67
784	HA de A/Equino/Praga/56 (H7N7)	38	46	62	71
785	HA de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	39	47	59	68

Montagem de cassetes de expressão de fusão PDISP/HA baseado

em plastocianina

H1 de A/Nova Caledônia/20/99 (construto número 540)

[00301] A fase aberta de leitura do gene de H1 da cepa de influenza A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) foi sintetizada em dois fragmentos (Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canadá). Um primeiro fragmento sintetizado corresponde à sequência de codificação de H1 de ocorrência natural (No. Acesso ao GenBank AY289929; SEQ ID NO: 33; figura 16) com ausência da sequência de codificação do peptídeo sinal na extremidade 5' e a sequência de codificação de domínio transmembrana na extremidade 3'. Um sítio de restrição Bg1II foi adicionado na extremidade 5' da sequência de codificação e um sítio duplo SacI/StuI foi adicionado a jusante do códon de parada na extremidade terminal 3'do fragmento, para produzir SEQ ID NO: 1 (figura 5A). Um segundo fragmento codificando a extremidade C-terminal da proteína H1 (compreendendo um domínio transmembrana e cauda citoplásmica) do sítio KpnI ao códon de parada, e flanqueado em 3' pelos sítios de restrição SacI e StuI foi também sintetizado (SE ID NO: 2, figura 5B).

[00302] O primeiro fragmento de H1 foi digerido com Bg1II e SacI e clonado nos mesmos sítios de um vetor binário (pCAMBIAPlasto) contendo o promotor de plastocianina e 5' UTR fundido ao peptídeo sinal do gene da proteína dissulfeto isomerase (PDI) da alfafa (nucleotídeos 32 a 103; No. Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17) resultando em um gene quimérico PDI-H1 a jusante dos elementos reguladores de plastocianina. A sequência do cassete baseado em plastocianina contendo o peptídeo sinal de PDI é apresentada na figura 1 (SEQ ID NO: 8). O plasmídeo resultante continha a região de codificação de H1 fundida ao peptídeo sinal de PDI e flanqueada por elementos reguladores de plastocianina. A adição da região de codificação de extremidade C-terminal (codificando o domínio transmembrana e a cauda citoplásmica)

foi obtida inserindo-se o fragmento sintetizado (SEQ ID NO: 2; figura 5B) anteriormente digerido com KpnI e SacI, no plasmídeo de expressão de H1. O plasmídeo resultante, chamado 540, é apresentado na figura 11 (ver também figura 2A).

H5 de A/Indonésia/5/2005 (construto número 663)

[00303] O peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase de alfafa (PDISP) (nucleotídeos 32 a 103; No. Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17) foi ligado à sequência de codificação de HA0 de H5 a partir de A/Indonésia/5/2005 como segue. A sequência de codificação de H5 foi amplificada com os iniciadores SpPDI-HA(Ind).c (SEQ ID NO: 82) e HA(Ind)-**SacI**.r (SEQ ID NO: 7; figura 7D) usando o construto número 660 (SEQ ID NO: 60; figura 51) como modelo. O fragmento resultante consistiu na sequência de codificação de H5 flanqueada, em 5', pelos últimos nucleotídeos codificando PDISP (incluindo um sítio de restrição Bg1II) e, em 3', por um sítio de restrição SacI. O fragmento foi digerido com Bg1II e SacI e clonado no construto número 540 (SEQ ID NO: 61, figura 51) anteriormente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O cassete final, chamado construto número 663 (SEQ ID NO: 83), é apresentado na figura 69.

H1 de A/Brisbane/59/2007 (Construto 787)

[00304] O peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase da alfafa (PDISP) (nucleotídeos 32 a 103; No. Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17) foi ligado à sequência de codificação de HA0 de H1 a partir de A/Brisbane/59/2007 como segue. A sequência de codificação de H1 foi amplificada com os iniciadores SpPDI-H1B.c (SEQ ID NO: 84) e **SacI**-H1B.r (SEQ ID NO: 85) usando o construto 774 (SEQ ID NO: 62; figura 53) como modelo. O fragmento resultante consistiu na sequência de codificação de H1 flanqueada, em 5', pelos últimos nucleotídeos codificando PDISP (incluindo um sítio de restrição Bg1II) e, em 3', por um sítio de restrição SacI. O fragmento foi digerido com Bg1II e SacI e

clonado no construto número 540 (SEQ ID NO: 61, figura 52) anteriormente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O cassete final, chamado construto número 787 (SEQ ID NO: 86), é apresentado na figura 70.

H3 de A/Brisbane/10/2007 (construto número 790)

[00305] O peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase da alfafa (PDISP) (nucleotídeos 32 a 103; No. Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17) foi ligado à sequência de codificação de HA0 de H3 a partir de A/Brisbane/10/2007 como segue. PDISP foi ligada à sequência de codificação de H3 pelo método de ligação baseado em PCR apresentado por Darveau e outros (Methods in Neuroscience 26: 77 a 85 (1995)). Em uma primeira etapa de PCR, um segmento do promotor de plastocianina fundido a PDISP foi amplificado usando os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e H3B-**SpPDI**.r (SEQ ID NO: 87) com o construto 540 (SEQ ID NO: 61; figura 52) como modelo. Os produtos de amplificação foram então misturados e usados como modelo para uma segunda etapa de amplificação (reação de montagem) com os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e H3(A-Bri).982r (SEQ ID NO: 89). O fragmento resultante foi digerido com BamHI (no promotor de plastocianina) e SpeI (na sequência de codificação de H3) e clonado no construto número 776 (SEQ ID NO: 69, figura 60) anteriormente digerido com as mesmas enzimas de restrição para obter o construto número 790 (SEQ ID NO: 90). O construto é apresentado na figura 71.

HA de B/Flórida/4/2006 (construto número 798)

[00306] O peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase da alfafa (PDISP) (nucleotídeos 32 a 103; No. Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17) foi ligado à sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006 pelo método de ligação baseado em PCR apresentado por Darveau e outros (Methods in Neuroscience 26: 77 a 85 (1995)). Em

uma primeira etapa de amplificação, uma parte do promotor de plastocianina fundido a PDISP foi amplificada usando os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e HBF-SpPDI.r (SEQ ID NO: 91) com o construto 540 (SEQ ID NO: 61; figura 52) como modelo. Em paralelo, outro fragmento contendo uma parte da sequência de codificação de HB B/Flo fundido ao terminador de plastocianina foi amplificado com iniciadores SpPDI-HBF.c (SEQ ID NO: 92) e Plaster80r (SEQ ID NO: 93) usando o construto número 779 (SEQ ID NO: 73; figura 64) como modelo. Os produtos de PCR foram então misturados e usados como modelo para uma segunda etapa de amplificação (reação de montagem) com os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e Plaster80r (SEQ ID NO: 93). O fragmento resultante foi digerido com BamHI (no promotor de plastocianina) e AflII (na sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006) e clonado no construto número 779 (SEQ ID NO: 73, figura 64) anteriormente digerido com as mesmas enzimas de restrição para obter o construto número 798 (SEQ ID NO: 94). O cassete de expressão resultante é apresentado na figura 72.

Montagem dos cassetes de expressão baseados em CPMV-HT

[00307] Os cassetes de expressão CPMV-HT usam o promotor 35S para controlar a expressão de um mRNA compreendendo uma sequência de codificação de interesse flanqueada, em 5’ pelos nucleotídeos 1 a 512 a partir do RNA2 do vírus do mosaico do feijão de corda (CPMV) com ATG mutado nas posições 115 e 161 e em 3’, pelos nucleotídeos 3330 a 3481 a partir do RNA2 de CPMV (correspondente a 3’ UTR) seguido pelo terminador NOS. O plasmídeo pBD-C5-1LC, (Sainsbury e outros, 2008; Plant Biotechnology Journal 6: 82 a 92 e Publicação PCT WO 2007/135480), foi usado para a montagem de cassetes de expressão de hemaglutinina baseados em CPMV-HT. A mutação de ATGs na posição 115 e 161 do RNA2 de CPMV foi realizada usando um método de ligação baseado em PCR apresentado por

Darveau e outros (Methods in Neuroscience 26: 77 a 85 (1995)). Duas PCRs separadas foram executadas usando pBD-C5-1LC como modelo. Os iniciadores para a primeira amplificação são pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 77) e Mut-**ATG115**.r (SEQ ID NO: 78). Os iniciadores para a segunda amplificação foram Mut-**ATG161**.c (SEQ ID NO: 79) e LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 80). Os dois fragmentos obtidos são então misturados e usados como modelo para uma terceira amplificação usando pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 77) e LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 80) como iniciadores. O fragmento resultante é digerido com PacI e ApaI e clonado em pBD-C5-1LC digerido com a mesma enzima. A sequência do cassete de expressão gerado, chamado 828, é apresentada na figura 68 (SEQ ID NO: 81).

Montagem de SpPDI-H1 de A/Nova Caledônia/20/99 no cassete de expressão CPMV-HT (construto número 580).

[00308] Uma sequência codificando peptídeo sinal de PDI de alfafa fundido a HA0 a partir de H1 de A/Nova Caledônia/20/99 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG inicial) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação de hemaglutinina executando uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-SpPDI.c (SEQ ID NO: 95) e **StuI**-H1(A-NC).r (SEQ ID NO: 96) usando o construto número 540 (SEQ ID NO: 61; figura 52) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 580 (SEQ ID NO: 97).

Montagem de H5 de A/Indonésia/5/2005 no cassete de expressão CPMV-HT (construto número 685).

[00309] A sequência de codificação de H5 de A/Indonésia/5/2005 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI

(imediatamente a montagem de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação de hemaglutinina executando uma amplificação de PCR com iniciadores **ApaI**-H5 (A-Indo).1c (SEQ ID NO: 98) e H5 (A-Indo)-**StuI**.1707r (SEQ ID NO: 99) usando o construto número 660 (SEQ ID NO: 60; figura 51) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 685 (SEQ ID NO: 100).

Montagem de SpPDI-H5 de A/Indonésia/5/2005 em cassete de expressão CPMV-HT (construto número 686).

[00310] Uma sequência codificando o peptídeo sinal de PDI de alfafa fundido a HA0 de H5 de A/Indonésia/5/2005 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-SpPDI.c (SEQ ID NO: 95) e H5 (A-Indo)-**StuI**.1707r (SEQ ID NO: 99) usando o construto número 663 (SEQ ID NO: 83) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 686 (SEQ ID NO: 101).

Montagem de H1 de A/Brisbane/59/2007 em cassete de expressão CPMV-HT (construto número 732).

[00311] A sequência de codificação de HA de A/Brisbane/59/2007 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os

iniciadores **ApaI**-H1B.c (SEQ ID NO: 102) e **StuI**-H1B.r (SEQ ID NO: 103) usando o construto número 774 (SEQ ID NO: 62; figura 53) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 732 (SEQ ID NO: 104).

Montagem de SpPDI-H1 de A/Brisbane/59/2007 no cassete de expressão CPMV-HT (construto número 733).

[00312] A sequência de codificação de HA de A/Brisbane/59/2007 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-SpPDI.c (SEQ ID NO: 95) e **StuI**-H1B.r (SEQ ID NO: 103) usando o construto número 787 (SEQ ID NO: 86) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 733 (SEQ ID NO: 105).

Montagem de H3 de A/Brisbane/10/2007 no cassete de expressão CPMV-HT (construto número 735).

[00313] A sequência de codificação de HA de H3 de A/Brisbane/10/2007 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-H3B.c (SEQ ID NO: 106) e **StuI**-H3B.r (SEQ ID NO: 107) usando o construto número 776 (SEQ ID NO: 69) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828

(SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 735 (SEQ ID NO: 108).

Montagem de SpPDI-H3 de A/Brisbane/10/2007 no cassete de expressão de CPMV-HT (construto número 736).

[00314] Uma sequência codificando o peptídeo sinal de PDI de alfafa fundido a HA0 de H3 de A/Brisbane/10/2007 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-SpPDI.c (SEQ ID NO:95) e **StuI**-H3B.r (SEQ ID NO: 107) usando o construto número 790 (SEQ ID NO: 90) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 736 (SEQ ID NO: 109).

Montagem de HA de B/Flórida/4/2006 no cassete de expressão de CPMV-HT (construto número 738).

[00315] A sequência de codificação de HA de B/Flórida/4/2006 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-HBF.c (SEQ ID NO: 110) e **StuI**-HBF.r (SEQ ID NO: 111) usando o construto número 779 (SEQ ID NO: 73, figura 64) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 738 (SEQ ID NO: 112).

Montagem de SpPDI-HA de B/Flórida/4/2006 no cassete de expressão de CPMV-HT (construto número 739).

[00316] Uma sequência codificando o peptídeo sinal de PDI de alfafa fundido a HA0 de B/Flórida/4/2006 foi clonada em CPMV-HT como segue. Os sítios de restrição ApaI (imediatamente a montante de ATG) e StuI (imediatamente a jusante do códon de parada) foram adicionados à sequência de codificação da hemaglutinina executando-se uma amplificação de PCR com os iniciadores **ApaI**-SpPDI.c (SEQ ID NO: 95) e **StuI**-HBF.r (SEQ ID NO: 111) usando o construto número 798 (SEQ ID NO: 94) como modelo. O fragmento resultante foi digerido com as enzimas de restrição ApaI e StuI e clonado no construto número 828 (SEQ ID NO: 81) digerido com as mesmas enzimas. O cassete resultante foi chamado construto número 739 (SEQ ID NO: 113).

Montagem de cassetes de expressão de chaperona

[00317] Dois cassetes de expressão de proteína de choque térmico (Hsp) foram montados. Em um primeiro cassete, a expressão da HSP70 citosólico de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) (Athsp70-1 em Lin e outros, (2001) Cell Stress and Chaperones 6: 201 a 208) é controlada por um promotor quimérico combinando elementos da Nitrito redutase (Nir) da alfafa e promotores da Plastocianina da alfafa (Nir/Plasto). Um segundo cassete compreendendo a região de codificação da HSP40 citosólico da alfafa (MsJ1; Frugis e outros, (1999) Plant Molecular Biology 40: 397 a 408) sob o controle do promotor quimérico Nir/Plasto foi também montado.

[00318] Um plasmídeo aceptor contendo o promotor Nitrito redutase da alfafa (Nir), o gene repórter GUS e o terminador NOS no vetor binário da planta foi primeiramente montado. O plasmídeo pNir3K51 (anteriormente descrito na Patente US No. 6.420.548) foi digerido com HindIII e EcoRI. O fragmento resultante foi clonado em pCAMBIA2300 (Cambia, Canberra, Austrália) digerido pela mesma enzima de restrição para obter pCAMBIA-Nir3K51.

[00319] As sequências de codificação para Hsp70 e Hsp40 foram

clonadas separadamente no plasmídeo aceptor pCAMBIANir3K51 pelo método de ligação baseado em PCR apresentado por Darveau e outros, (Methods in Neuroscience 26: 77 a 85 (1995)).

[00320] Para Hsp40, a sequência de codificação de Msj1 (SEQ ID NO: 114) foi amplificada por RT-PCR a partir de RNA total de folha de alfafa (ecotipo Rangelander) usando os iniciadores Hsp40Luz.1c (SEQ ID NO: 115) e Hsp40Luz-SacI.1272r (SEQ ID NO: 116). Uma segunda amplificação foi executada com os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e Hsp40Luz-Plasto.r (SEQ ID NO: 117) com o construto 660 (SEQ ID NO: 60; figura 51) como modelo. Os produtos PCR foram então misturados e usados como modelo para uma terceira amplificação (reação de montagem) com os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e Hsp40Luz-SacI.1272r (SEQ ID NO: 116). O fragmento resultante foi digerido com HpaI (no promotor de plastocianina) e clonado em PCAMBIANir3K51, anteriormente digerido com HpaI (no promotor Nir) e SacI, e polido com T4 DNA polimerase para gerar extremidades cegas. Os clones obtidos foram verificados quanto à orientação correta e sequenciados para integridade de sequência. O plasmídeo resultante, chamado R850, é apresentado na figura 83 (SEQ ID NO: 121). A região de codificação do Athsp70-1 foi amplificada por RT-PCR a partir do RNA da folha de Arabidopsis usando os iniciadores Hsp70Ara.1c (SEQ ID NO: 118) e Hsp70Ara-SacI.1956r (SEQ ID NO: 119). Uma segunda amplificação foi executada com os iniciadores Plato-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e Hsp70Ara-Plasto.r (SEQ ID NO: 120) com o construto 660 (SEQ ID NO: 60, figura 51) como modelo. Os produtos de PCR foram então misturados e usados como modelo para uma terceira amplificação (reação de montagem) com os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e Hsp70ARA-SacI.1956r (SEQ ID NO: 119). O fragmento resultante foi digerido com HpaI (no promotor de plastocianina) e clonado em pCAMBIANir3K51 digerido com HpaI

(no promotor Nir) e SacI e polido com T4 DNA polimerase para gerar extremidades cegas. Os clones obtidos foram verificados quanto à orientação correta e sequenciados para integridade de sequência. O plasmídeo resultante, chamado R860, é apresentado na figura 84 (SEQ ID NO: 122).

[00321] Um plasmídeo de expressão Hsp duplo foi montado como segue. R860 foi digerido com BsrBI (a jusante do terminador NOS), tratado com T4 DNA polimerase para gerar uma extremidade cega, e digerido com SbfI (a montante do promotor NIR/Plasto quimérico). O fragmento resultante (promotor Nir/Plasto quimérico – sequência de codificação de Hsp70 – terminador NOS) foi clonado em R850 anteriormente digerido com SbfI e SmaI (ambos localizados no sítio de múltipla clonagem a montante do promotor Nir/Plasto quimérico). O plasmídeo resultante, chamado R870, é apresentado na figura 85 (SEQ ID NO: 123).

Montagem de outros cassetes de expressão

Cassete de expressão de H1 solúvel

[00322] O cassete codificando a forma solúvel de H1 foi preparado substituindo-se a região codificando para o domínio transmembrana e a cauda citoplásmica em 540 por um fragmento codificando a variante pII do zíper de leucina GCN4 (Harbury e outros, 1993, Science 1993; 262: 1401 a 1407). Esse fragmento foi sintetizado com os sítios flanqueantes KpnI e SacI para facilitar a clonagem. O plasmídeo resultante da substituição foi chamado 544 e o cassete de expressão é ilustrado na figura 11.

Cassete de expressão de M1 de A/Porto Rico/8/34

[00323] Uma fusão entre o vírus etch do tabaco (TEV) 5’ UTR e a fase aberta de leitura do gene M1 de influenza A/PR/8/34 (No. Acesso NC_002016) foi sintetizada com um sítio SacI de flanqueamento adicionado a jusante do códon de parada. O fragmento foi digerido com

SwaI (no TEV 5’ UTR) e SacI, e clonado em um cassete de expressão baseado em 2X35S/TEV em um plasmídeo binário pCAMBIA. O plasmídeo resultante fura a região de codificação M1 sob o controle de um promotor 2X35S/TEV e 5’ UTR e o terminador NOS (construto 750; figura 11).

Cassete de expressão de HcPro

[00324] Um construto HcPro (35HcPro) foi preparado como descrito por Hamilton e outros (2002). Todos os clones foram sequenciados para confirmar a integridade dos construtos. Os plasmídeos foram usados para transformar *Agrobacteium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA) por eletroporação (Mattanovich e outros, 1989). A integridade de todas as cepas de *A. tumefaciens* foi confirmada por mapeamento de restrição.

Cassete de expressão de P19

[00325] A sequência de codificação da proteína p19 do vírus do enfezamento vermelho do tomate (TBSV) foi ligada ao cassete de expressão de plastocianina da alfafa pelo método de ligação baseado em PCR apresentado por Darveau e outros (Methods in Neuroscience 26: 77 a 85 (1995)). Em uma primeira etapa de PCR, um segmento do promotor de plastocianina foi amplificado usando os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e supP19-plasto.r (SEQ ID NO: 124) com o construto 660 (SEQ ID NO: 60; figura 51) como modelo. Em paralelo, outro segmento contendo a sequência de codificação de p19 foi amplificado com os iniciadores supP19-1c (SEQ ID NO: 125) e SupP19-SacI.r (SEQ ID NO: 126) usando o construto 35S:p19 como descrito por Voinnet e outros (The Plant Journal 33: 949 a 956 (2003)) como modelo. Os produtos de amplificação foram então misturados e usados como modelo para uma segunda etapa de amplificação (reação de montagem) com os iniciadores Plasto-443c (SEQ ID NO: 4; figura 7A) e SupP19-SacI.r (SEQ ID NO: 126). O fragmento resultante foi

digerido com BamHI (no promotor de plastocianina) e SacI (na extremidade da sequência de codificação de p19) e clonado no construto número 660 (SEQ ID NO:60; figura 51), anteriormente digerido com as mesmas enzimas de restrição para obter o construto número R472. O plasmídeo R472 é apresentado na figura 86.

3. Preparação de biomassa de planta, inóculo, agroinfiltração e colheita.

[00326] As plantas *Nicotiana benthamiana* ou *Nicotiana tabacum* foram cultivadas a partir de sementes em bandejas preenchidas com um substrato de turfeira comercial. As plantas foram deixadas crescendo na estufa sob um fotoperíodo 16/8 e um regime de temperatura de 25º C dia/20º C noite. Três semanas após a semeadura, mudas individuais foram obtidas, transplantadas em potes e deixadas crescendo na estufa por mais três semanas sob as mesmas condições ambientais. Antes da transformação, gemas apicais e axilares foram removidas em vários momentos como indicado abaixo, ou removendo as gemas da planta, ou tratando quimicamente a planta.

[00327] As agrobactérias transfectadas com cada construto foram cultivadas em um meio YEB suplementado com 10 mM de ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico (MES), 20 µM de acetossiringona, 50 µg/ml de canamicina e 25 µg/ml de carbenicilina pH 5,6 até que elas alcancem um OF_{600} entre 0,6 e 1,6. As suspensões de Agrobactéria foram centrifugadas antes do uso e resupensas em meio de infiltração (10 mM de $MgCl_2$ e 10 mM MED pH 5,6). A infiltração com seringa foi executada como descrito por Liu e Lomonossoff (2002, Journal *of Virological Methods*, 105: 343 a 348). Para infiltração a vácuo, suspensões de *A. tumefaciens* foram centrifugadas, ressuspensas no meio de infiltração e armazenadas de um dia para o outro a 4º C. No dia da infiltração, lotes de culturas foram diluídos em 2,5 volumes de cultura e deixados aquecendo antes do uso. As plantas integrais de *N. benthamiana* ou *N.*

Tabacum foram localizadas de cabeça para baixo na suspensão bacteriana em tanque de aço inoxidável impermeável a ar sob um vácuo de 2,66 a 5,33 Kpa (20 a 40 Torr) por 2 minutos. Seguindo a infiltração por seringa ou a vácuo, as plantas foram retornadas para a estufa por um período de incubação de 4 a 5 dias até a colheita. A menos que de outra forma especificado, todas as infiltrações foram executadas como coinfiltração com AGL1/35S-HcPro em uma relação 1:1, exceto para cepas produzidas com cassete CPMV-HT que foram coinfiltradas com cepa AGL1/R472 em uma relação 1:1.

4. Amostragem de folhas e extração de proteína total

[00328] Seguindo incubação, a parte aérea de plantas foi colhida, congelada a -80º C, picada em partes. As proteínas solúveis totais foram extraídas homogeneizando (Polytron) cada amostra de material de planta congelado-picado em 3 volumes de 50 mM de Tris frio pH 7,4, 0,15 M de NaCl, e 1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonila. Após a homogeneização, as pastas fluidas foram centrifugadas em 20.000 g por 20 minutos a 4º C e esses extratos brutos clarificados (sobrenadante) mantidos para análise. O teor de proteína total de extratos brutos clarificados foi determinado pelo ensaio Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albumina de soro bovino como o padrão de referência.

5. Cromatografia por exclusão de tamanho de extrato de proteína.

[00329] As colunas de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) de 32 ml de cápsulas de alta resolução Sephacryl® S-500 (S-500 HR : GE Healthcare, Uppsala, Suécia, Cat. No. 17-0613-10) foram empacotadas e equilibradas com tampão de equilíbrio/eluição (50 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl). Um e meio mililitro de extrato de proteína bruta foram carregados na coluna seguida por uma etapa de eluição com 45 ml de tampão de equilíbrio/eluição. A eluição foi coletada em frações de 1,5 ml, o teor de proteína relativo de frações de eluição

foi monitorado misturando-se 10 µl da fração com 200 µl de reagente de corante de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). A coluna foi lavada com 2 volumes de coluna de 0,2N de NaOH seguido por 10 volumes de coluna de 50 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl, 20% etanol. Cada separação foi seguida por uma calibração da coluna com Azul de dextrana 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). Os perfis de eluição de azul de dextrana 2000 e proteínas solúveis hospedeiras foram comparados entre cada separação para assegurar a uniformidade dos perfis de eluição entre as colunas usadas.

6. Análise de proteína e 'Immunoblotting'

[00330] As concentrações de proteína foram determinadas pelo ensaio de proteína BCA (Pierce Biochemicals, Rockport IL). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE sob condições de redução e coloridas com azul de coomassie. Os géis coloridos foram triados e a análise de densitometria executada usando o software ImageJ (NIH).

[00331] As proteínas de fração de eluição de SEC foram precipitadas com acetona (Bollag e outros, 1996), ressuspensas em 1/5 volume em tampão de equilíbrio/eluição e separadas por SDS-PAGE sob condições de redução e eletrotransferidas para membranas de difluoreto de polivinileno (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) para imunodetecção. Antes de immunoblotting, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado e 0,1% de Tween-20 em solução salina tamponada com Tris (TBS-T) por 16 a 18 horas a 4º C.

[00332] O 'immunoblotting' foi executado por incubação com um anticorpo adequado (Tabela 6), em 2 µg/ml em 2% de leite desnatado em TBS-Tween 20 a 0,1%. Os anticorpos secundários usados para detecção de quimioluminescência foram indicados na Tabela 4, diluídos como indicado em 2% de leite desnatado em TBS-Tween 20 a 0,1%. Os complexos imunorreativos foram detectados por quimioluminescência

usando luminol como o substrato (Roche Diagnostics Corporation). A conjugação da enzima peroxidase do rábano silvestre do anticorpo IgG humano foi executada usando-se o kit de conjugação de Peroxidase Ativada EZ-Link Plus® (Pierce, Rockford, IL). O vírus inativo integral (WIV), usado como controles para detecção de subtipos H1, H3 e B, foram adquiridos a partir do National Institute para Biological Standards and Control (NIBSC).

Tabela 6: Condições de eletroforese, anticorpos, e diluições para 'immunoblotting' de proteínas expressas.

Subtipo de HA	Cepa de Influenza	Condição de Eletroforese	Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
H1	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	Redução	FII 10-I50	4 µg/ml	Cabra anticamundongo (JIR 115-035-146)	1:10.000
H1	A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)	Redução	NIBSC 07/104	1:2000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H1	A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)	Redução	FII 10-I50	4 µg/ml	Cabra anticamundongo (JIR 115-035-146)	1:10.000
H2	A/Cingapura/1/57 (H2N2)	Não redução	NIBSC 00/440	1:1000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H3	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	Não redução	TGA AS393	1:4000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H3	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	Não redução	NIBSC 08/136	1:1000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H3	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	Não redução	NIBSC 05/236	1:1000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000

Subtipo de HA	Cepa de Influenza	Condição de Eletroforese	Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
H5	A/Indonésia/5/2005 (H5N1)	Redução	ITC IT-003-005V	1:4000	Cabra anticoelho (JIR 111-035-144)	1:10.000
H5	A/Anhui/1/2005 (H5N1)	Redução	NIBSC 07/338	1:750	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H5	A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)	Não Redução	ITC IT-003-005	1:2000	Cabra anticoelho (JIR 111-035-144)	1:10.000
H6	A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1)	Não Redução	BEI NR 663	1:500	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H7	A/Equino/Praga/56 (H7N7)	Não Redução	NIBSC 02/294	1:1000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
H9	A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	Redução	NIBSC 07/146	1:1000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
B	B/Malásia/2506/2004	Não Redução	NIBSC 07/184	1:2000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000
B	B/Flórida/4/2006	Não Redução	NIBSC 07/356	1:2000	Coelho antiovelha (JIR 313-035-045)	1:10.000

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

NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control;

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

BEI NR: Biodefense and emerging infections research resources repository;

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

1 TGA: Therapeutic Goods Administration, Austrália.

[00333] O ensaio de hemaglutinação para H5 foi baseado em um método descrito por Nayak e Reichl (2004). Em resumo, diluições duplas seriais das amostras de teste (100 µl) foram produzidas em placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo em V contendo 100 µl de PBS, deixando 100 µl de amostra diluída por cavidade. Cem microlitros de uma suspensão de células vermelhas de sangue de peru a 0,25% (Bio Link Inc., Syracuse, NY) foram adicionados a cada cavidade, e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. A recíproca da maior diluição mostrando a hemaglutinação completa foi registrada como atividade de HA. Em paralelo, uma HA recombinate padrão (A/Vietnã/1203/2004 (H5N1)) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) foi diluída em PBS e usada como um controle em cada placa.

7. Ultracentrifugação em gradiente de sacarose

[00334] Um mililitro de frações 9, 10 e 11 eluídas a partir da cromatografia de filtração em gel em biomassa contendo H5 foi agrupado, carregado em um gradiente de densidade de sacarose descontínuo a 20 – 60% (peso em volume), e centrifugado 17,5 horas a 125.000 g (4º C). O gradiente foi fracionado em frações de 19,3 ml começando do topo, e dialisado para remover sacarose antes da análise imunológica e ensaios de hemaglutinação.

8. Microscopia de Elétrons

[00335] Cem microlitros das amostras a serem examinadas foram localizados em um tubo de ultracentrifugação Airfuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Uma grade foi localizada no fundo do tubo que foi então centrifugado 5 minutos a 120.000 g. A grade foi removida, gentilmente seca, e localizada em uma gota de ácido fosfotunguístico a 3% em pH 6 para coloração. As grades foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Hitachi 7100 (TEM) (para imagens nas figuras. 14B, 15B e 15C).

[00336] Para imagens na figura 19, blocos de folhas de aproximadamente 1 mm3 foram fixados em PBS contendo 2,5% de glutaraldeído e lavados em PBS contendo 3% sacarose antes de uma etapa de pós-fixação em 1,33% de tetróxido de ósmio. As amostras fixas foram embebidas em resina Spurr e camadas ultrafinas foram colocadas em uma grade. As amostras foram positivamente coloridas com 5% de acetato de uranila e 0,2% de citrato de chumbo antes da observação. As grades foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) Hitachi 7100.

9. Análise de lipídio de membrana plasmática

[00337] As membranas plasmáticas (PM) foram obtidas a partir de folhas de tabaco e células BY2 cultivadas após o fracionamento celular de acordo com Mongrand e outros particionando em um sistema de duas fases de polímero aquoso com polietileno glicol 3350/dextrana T-500 (6,6% cada). Todas as etapas foram executadas a 4º C.

[00338] Os lipídios foram extraídos e purificados a partir de diferentes frações de acordo com Bligh e Dyer. Os lipídios polares e neutros foram separados por HP-TLC monodimensional usando os sistemas solventes descritos por Lefebvre e outros. Os lipídios de frações de PM foram detectados após coloração com acetato de cobre como descrito por Macala e outros. Os lipídios foram identificados por comparação de seus tempos de migração com aqueles de padrões (todos os padrões foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, exceto para SG which que foi obtido a partir de Matreya, Pleasant Gap, PA, USA).

10. Purificação de VP com H5 (A/Indonésia/5/2005).

[00339] As folhas infiltradas com 660 congeladas de *N. benthamiana* foram homogeneizadas em 1,5 volume de 50 mM de Tris pH 8, NaCL a 150 mM e 0,04% de meta-bissulfeto de sódio usando um misturador comercial. O extrato resultante foi suplementado com 1 mM de PMSF e ajustado para pH 6 com 1 M de ácido acético antes de ser aquecido a

42º C por 5 minutos. Terra diatomácea (DE) foi adicionada ao extrato termicamente tratado para absorver os contaminantes precipitados pelo deslocamento de pH e tratamento térmico, e a pasta fluida foi filtrada através de um filtro de papel Whatman. O extrato clarificado resultante foi centrifugado em 10.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente para remover DE residual, passado através de 0,8/0,2 µm de filtros Acropack 20 e carregados em uma coluna de afinidade de fetuína-agarose (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Seguindo uma etapa de lavagem em 400 mM de NaCl, 25 mM de Tris pH 6, proteínas de ligação foram eluídas com 1,5 M de NaCl, 50 mM de MES pH 6. As VLPs eluídas foram suplementadas com Tween-80 até uma concentração final de 0,0005% em volume. As VLPs foram concentradas em uma membrana MWCO Amicon de 100 kDa, centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos a 4º C e ressuspensas em PBS pH 7,4 com 0,01% de Tween-80 e 0,01% de timerosal. As VLPs suspensas foram esterilizadas em filtro antes do uso.

11. Estudos em animais

Camundongos

[00340] Os estudos da resposta imune à administração de VLP de influenza foram executados com camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade (Charles River Laboratories). Setenta camundongos foram randomicamente divididos em quatorze grupos de cinco animais. Oito grupos foram usados para imunização intramuscular e seis grupos foram usados para testar a via de administração intranasal. Todos os grupos foram imunizados em um regime de duas doses, a imunização de reforço sendo feita 3 semanas seguindo a primeira imunização.

[00341] Para administração intramuscular nas pernas traseiras, camundongos não anestesiados foram imunizados ou com vacina (0,1, 1,5 ou 12 µg) de VP com H5 produzida a partir de uma planta

(A/Indonésia/5/2005 (H5N1)), ou com um antígeno de hemaglutinina de controle (H5). O H5 de controle compreendeu hemaglutinina solúvel recombinante produzida com base na cepa A/Indonésia/5/05 H5N1 e purificado a partir da cultura de célula 293 (Immune Technology Corp., Nova Iorque, USA) (usado em 5 µg por injeção a menos que de outra forma indicado). O tampão de controle foi PBS. Esse antígeno consiste e aminoácidos 18 a 530 da proteína HA, e tem um His-tag e um sítio de clivagem modificado. A microscopia de elétrons confirmou que esse produto comercial não está na forma de VLPs.

[00342] Para medir o efeito de adjuvante, dois grupos de animais foram imunizados com 5 µg de vacina de H5 de VLP produzido em planta mais um volume de Alhydrogel 2% (alume, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US) ou com 5 µg de hemaglutinina recombinante purificada a partir de cultura de células 293 mais 1 volume de alume. Setenta camundongos foram randomicamente divididos em quatorze grupos e cinco animais. Oito grupos foram usados para imunização intramuscular e seis grupos foram usados para testar a via de administração intranasal. Todos os grupos foram imunizados de acordo com um regime de imunização/reforço, a imunização de reforço foi executada 3 semanas após a primeira imunização.

[00343] Para administração intramuscular nas pernas traseiras, os camundongos não anestesiados foram imunizados com VP com H5 produzido em planta (0,1, 1,5 ou 12 µg), ou com antígeno de hemaglutinina de controle (HA) (5 µg) ou PBS. Todas as preparações de antígenos foram misturadas com Alhydrogel 1% (alume, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US) emu ma relação de volume 1:1 antes das imunizações. Para medir o efeito de adjuvante, dois grupos de animais foram imunizados com ou 5 µg de vacina de H5 de VLP produzido em planta ou com 5 µg de antígeno de HA de controle sem qualquer adjuvante.

[00344] Para administração intranasal, os camundongos foram brevemente anestesiados por inalação de isoflurano usando uma câmara de indução automatizada. Eles foram então imunizados pela adição de 4 µl de gota/nostril com a vacina de VLP produzida a partir de uma planta (0,1 a 1 µg), ou com antígeno de HA de controle (1 µg) ou com PBS. Todas as preparações de antígeno foram misturadas com glutamato de quitosana a 1% (Protosan, Novamatrix/ FMC BioPolymer, Norway) antes das imunizações. Os camundongos então respiraram nas soluções. Para verificar o efeito de adjuvante com a via de administração intranasal, dois grupos de animais foram imunizados com 1 µg de vacina de H5 de VLP produzida a partir de uma planta ou com 1 µg de antígeno de HA de controle.

[00345] Dez grupos de 5 furões (machos, 18 a 24 semanas de idade, massa de aproximadamente 1 kg) foram usados. O tratamento para cada grupo é como descrito na Tabela 7. O adjuvante usado foi Alhidrogel (alume) (Superfos Biosector, Dinamarca) 2% (final = 1%). A composição da vacina foi VLPs de A/Indonésia/5/05 (H5N1) associadas à membrana produzidas como descrito. O controle de vacina (controle positivo) foi um H5 recombinante ligado à membrana completamente glicosilado de cepa Indonésia produzida usando adenovírus em cultura de célula 293 por Immune Technology Corporation (ITC).

Tabela 7 – Grupos de Tratamento

Grupo	**n**	**Produto injetado nos animais**	**Via de administração**	**Adjuvante**
1	5	PBS (controle negativo)	intramuscular*	-
2	5	Vacina-planta, 1 µg	intramuscular	-
3	5	Vacina-planta, 1 µg	intramuscular	Alume
4	5	Vacina-planta, 5 µg	intramuscular	-
5	5	Vacina-planta, 5 µg	intramuscular	Alume
6	5	Vacina-planta, 7.5 µg	intramuscular	-

Grupo	n	Produto injetado nos animais	Via de administração	Adjuvante
7	5	Vacina-planta, 15 µg	intramuscular	-
8	5	Vacina-planta, 15 µg	intramuscular	Alume
9	5	Vacina-planta, 30 µg	intramuscular	-
10	5	Vacina-controle, 5 µg	intramuscular	-

* intramuscular: intramuscular

[00346] Os furões foram avaliados quanto à saúde geral e aparência (peso corporal, temperatura retal, postura, pelo, padrões de movimento, respiração, excremento) regularmente durante o estudo. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular (0,5 a 1,0 de volume total) nos quadríceps no dia 0, 14 e 28; quanto aos protocolos incorporando adjuvante, a composição da vacina foi combinada com Alhidrogel imediatamente antes da imunização em uma relação de volume 1:1. As amostras de soro foram obtidas no dia 0 antes da imunização, e no dia 21 e 35. Os animais foram sacrificados (exsanguinação/punção cardíaca) nos dias 40-45, e, os baços foram coletados e a necropsia executada.

[00347] As titulações de anticorpos anti-influenza podem ser quantificadas em ensaios ELISA usando vírus H5N1 inativos homólogos ou heterólogos.

[00348] As titulações de anticorpo inibidor de hemaglutinação de amostras de soro (pré-imune, dia 21 e dia 35) foram avaliadas por HAI de microtitulação como descrito (Aymard e outros, 1973). Em resumo, os soros foram pré-tratados com enzima de destruição de receptor, inativados por calor e misturado com uma suspensão de eritrócitos (células vermelhas de sangue (CVS) lavadas). As CVS lavadas de cavalo (10%) de Lampire são recomendadas e considera-se que o ensaio possa variar dependendo da fonte da CVS (dependente de cavalo), CVS lavadas de 10 cavalos foram testadas para selecionar o lote mais sensível. Alternativamente, as CVS de peru podem ser

usadas. A titulação de anticorpo foi expressa como o recíproco da maior diluição que inibe completamente a hemaglutinação.

[00349] Titulações de HAI reativas cruzadas: As titulações de HAI de furões que foram imunizados com uma vacina para A/Indonésia/5/05 (clado 2.1) foram medidas usando cepas de influenza H5N1 inativas de outro subclado ou clado tal como as cepas Vietnã clado 1 de A/Vietnã/1203/2004 e A/Vietnã/1194/2004 ou A/Anhui/01/2005 (subclado 2.3) ou A/peru/Turquia/1/05 (subclado 2.2). Todas as análises foram executadas em amostras individuais.

[00350] Análise de dados: As análises estatísticas (ANOVA) foram executadas em todos os dados para estabelecer se as diferenças entre os grupos são estatisticamente significativas.

[00351] Projeto experimental para provocação letal (camundongos)

[00352] Cento e vinte e oito camundongos foram randomicamente divididos em dezesseis grupos de oito animais, um grupo sendo não imunizado e não provocado (controle negativo). Todos os grupos foram imunizados via administração intramuscular em um regime de duas doses, a segunda imunização sendo feita 2 semanas após a primeira imunização.

[00353] Para administração intramuscular nas pernas traseiras, os camundongos não anestesiados foram imunizados com a VP com H5 produzida a partir de uma planta (1, 5 ou 15 µg), ou 15 µg do antígeno de HA de controle ou PBS. Todas as preparações de antígeno foram misturadas com um volume de Alhydrogel 1% antes das imunizações (alume, Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US).

[00354] Durante o período de imunização, os camundongos foram pesados uma vez por semana e a observados e monitorados quanto às reações locais no sítio de injeção.

[00355] Vinte e dois dias após a segunda imunização, camundongos anestesiados foram provocados intranasalmente (i.n.) em um

laboratório de retenção BL4 (P4-Jean Mérieux-INSERM, Lyon, França) com 50% da dose infectiva em cultura de 4,09 x 10^6 células (CCID50) de vírus de influenza A/Turquia/582/06 (gentilmente fornecida por Dr. Bruno Lina, Lyon University, Lyon, França). Após a provocação, os camundongos foram observados quanto aos sintomas clínicos e pesados diariamente, ao longo de um período de quatorze dias. Os camundongos com sintomas de infecção severa e perda de peso $\geq$ 25% foram eutanizados após a anestesia.

Coleta de sangue, lavagens do pulmão e nariz e coleta de baço

[00356] A coleta de sangue da veia safena lateral foi executada quatorze dias após a primeira imunização e quatorze dias após a segunda imunização ou animal não anestesiado. O soro foi coletado por centrifugação em 8000 g por 10 minutos.

[00357] Quatro semanas após a segunda imunização, os camundongos foram anestesiados com gás CO_2 e imediatamente mediante o término, a punção cardíaca foi usada para coletar sangue.

[00358] Após o sangramento final, um cateter foi inserido na traqueia em direção aos pulmões e um ml de solução de coquetel de inibidor de PBS-protease fria foi colocado em uma seringa de 1 cc acoplada ao cateter e injetada nos pulmões e então removida para análise. Esse procedimento de lavagem foi executado duas vezes. As lavagens no pulmão foram centrifugadas para remover detritos celulares. Para lavagens nasais, um cateter foi inserido em direção à área nasal e 0,5 ml da solução de coquetel de inibidor de PBS-protease foi empurrado através do cateter nas passagens nasais e então coletado. As lavagens nasais foram centrifugadas para remover os detritos celulares. A coleta de baço foi executada em camundongos imunizados de forma intramuscular com 5 µg de vacina produzida a partir de uma planta adjuvantada ou 5 µg de antígeno de H5 recombinante adjuvantado, bem como em camundongos imunizados intranasalmente com 1 µg de

vacina produzida a partir de uma planta adjuvantada ou 1 µg de antígeno de H5 recombinante adjuvantado. Os baços coletados foram localizados em RPMI suplementado com gentamicina e esmagados em um tubo cônico de 50 ml com o êmbolo de uma seringa de 10 ml. Os baços esmagados foram enxaguados 2 vezes e centrifugados em 2000 rpm por 5 minutos e ressuspensos em tampão de lise ACK por 5 minutos em temperatura ambiente. Os esplenócitos foram lavados em PBS-gentamicina, ressuspensos em 5% RPMI e contados. Os esplenócitos foram usados para ensaio de proliferação.

Titulações de Anticorpo

[00359] As titulações de anticorpo anti-influenza de soro foram medidas em 14 dias após a primeira imunização, bem como 14 e 28 dias após a segunda imunização. As titulações foram determinadas por ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) usando o vírus inativo de A/Indonésia/5/05 como o antígeno de revestimento. As titulações finais foram expressas como o valor recíproco da maior diluição que alcançou um valor OD de ao menos 0,1 maior do que a das amostras de controle negativo.

[00360] Para a determinação de classe de anticorpo (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM), as titulações foram avaliadas por ELISA como anteriormente descrito.

Titulações de Inibição de Hemaglutinação (HI)

[00361] As titulações de inibição de hemaglutinação (HI) de soro foram medidas nos dias 14 e 28 após a segunda imunização como anteriormente descrito (WHO 2002; Kendal 1982). As preparações de vírus inativo de cepas de A/Indonésia/5/05 ou A/Vietnã/1203/2004 foram usadas para testar amostras de soro de camundongo quanto à atividade de HI. Os soros foram pré-tratados com enzima II de destruição de receptor (RDE II) (Denka Seiken Co., Tóquio, Japão) preparado a partir de *Vibrio cholerae* (Kendal 1982). Os ensaios de HI foram executados

com 0,5% de células vermelhas do sangue de peru. As titulações de anticorpo de HI foram definidas como a recíproca da maior diluição causando inibição completa de aglutinação.

Exemplos

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

[00362] A capacidade do sistema de expressão transitória produzir hemaglutinina de influenza foi determinada através da expressão do subtipo H5 da cepa A/Indonésia/5/05 (H5N1). Como apresentado na figura 11, a sequência do gene de codificação de hemaglutinina (No. Acesso ao GenBank EF541394), com seu peptídeo sinal nativo e domínio transmembrana, foi primeiramente montada no cassete de expressão – promotor de plastocianina, 5' UTR, 3' UTR e sequências de terminação de transcrição a partir do gene de plastocianina da alfafa – e o cassete montado (660) foi inserido em um plasmídeo binário pCAMBIA. Esse plasmídeo foi então transfectado em Agrobactéria (AGL1), criando a cepa recombinante AGL1/660, que foi usada para expressão transitória.

[00363] As plantas *N. benthamiana* foram infiltradas com AGL1/660, e as folhas foram colhidas após um período de incubação de seis dias. Para determinar se H5 acumulou nas folhas agroinfiltradas, as proteínas foram primeiro extraídas do tecido da folha infiltrado e analisadas por Western blotting usando os anticorpos policlonais anti-H5 (Vietnã). Uma banda exclusiva de aproximadamente 72 kDa foi detectada nos extratos (figura 12), correspondendo em tamanho à forma HA0 não clivada de hemaglutinina de influenza. O H5 comercial usado como controle positivo (A/Vietnam/1203/2004; Protein Science Corp., Meriden, CT, USA) foi detectado como duas bandas de aproximadamente 48 e 28 kDa, correspondendo ao peso molecular dos fragmentos HA1 e HA2,

respectivamente. Isso demonstrou que a expressão de H5 em folhas infiltradas resultou no acúmulo de produto de tradução não clivado.

[00364] A formação de trímeros de HA ativos foi demonstrada pela capacidade dos extratos de proteína bruta de folhas transformadas com AGL1/660 aglutinarem células vermelhas do sangue de peru (dados não mostrados).

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

[00365] A montagem de hemaglutinina de influenza produzida a partir de planta em estruturas de alto peso molecular foi avaliada por filtração em gel. Os extratos de proteína brutos de plantas infiltradas com AGL1/660 (1,5 ml) foram fracionados por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) em colunas Sephacryl® S-500 HR (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). As frações de eluição foram avaliadas quanto a seu teor de proteína total e quanto à abundância de HA usando imunodetecção com anticorpos anti-HA (figura 13A). Como mostrado na figura 13A, a eluição com azul de dextrana (2 MDa) chegou ao ponto máximo cedo na fração 10, enquanto o volume de proteínas hospedeiras foi retido na coluna e eluído entre as frações 14 e 22. Quando as proteínas de 200 µl de cada fração de eluição SEC foram concentradas (5 vezes) por precipitação em acetona e analisadas por Western blotting (figura 15A, H5), a hemaglutinação (H5) foi principalmente encontrada nas frações 9 a 14 (figura 13B). Sem querer ser limitado à teoria, isso sugere que a proteína HA foi ou montada em uma grande superestrutura ou ela foi acoplada a uma estrutura de alto peso molecular.

[00366] Um segundo cassete de expressão foi montado com a sequência de ácido nucleico de H1 de A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1) (SEQ ID NO: 33; figura 16; No. Acesso ao GenBank AY289929) para

produzir o construto 540 (figura 11). Um construto de gene quimérico foi projetado para produzir uma forma trimérica solúvel de H1 na qual o peptídeo sinal originado de um gene de proteína dissulfeto isomerase da planta, e o domínio transmembrana de H1 foi substituído pela variante pII do zíper de leucina GCN4, um peptídeo mostrado por se automontar em trímeros (Harbury e outros, 1993) (cassete 544, figura 11). Embora ausente do domínio transmembrana, essa forma trimérica solúvel foi capaz de hemaglutinação (dados não mostrados).

[00367] Os extratos de proteína a partir de plantas infiltradas com AGL1/540 ou AGL1/544 foram fracionados por SEC e a presença de frações eluídas de H1 foi examinadas por Western blotting com anticorpos anti-influenza A (Fitzgerald, Concord, MA, USA). Em folhas infiltradas com AGL1/540, H1 se acumulou principalmente como uma estrutura de peso molecular muito alto, com o pico inclinado em direção às estruturas de menor tamanho (H1, figura 13C). Em folhas infiltradas com AGL1/544, a forma solúvel de H1 se acumulou como trímeros isolados como demonstrado pelo padrão de eluição da filtração em gel que é paralelo ao perdil de eluição da proteína hospedeira (H1 solúvel, figura 13D). Em comparação, as rosetas de H1 (Protein Science Corp., Meriden, CT, USA), consistindo em micelas de 5 a 6 trímeros de hemaglutinação eluídas nas frações 12 a 16 (figura 13E), antes da forma solúvel de H1 (figura 13D) e após o H1 nativo (figura 13C).

[00368] Para avaliar o impacto da coexpressão de M1 na montagem de hemaglutinina na estrutura, um cassete de expressão de M1 foi montado usando o ácido nucleico correspondente à sequência de codificação do M1 de A/PR/8/34 (H1N1) (SEQ ID NO: 35; figura 18; No. Acesso ao GenBank NC_002016). O construto foi chamado 750 e é apresentado na figura 11. Para a coexpressão de M1 e H1, as suspensões de AGL1/540 e AGL1/750 foram misturadas em igual volume antes da infiltração. A coinfiltração de múltiplas suspensões de

Agrobactéria permite a coexpressão de múltiplos transgenes. A análise de Western blot de frações de eluição por SEC mostra que a coexpressão de M1 não modificou o perfil de eluição das estruturas de H1, mas resultou em uma redução no acúmulo de H1 nas folhas agroinfiltradas (ver figura 13F).

Exemplo 3: Isolamento de estruturas de H5 por centrifugação em gradiente de sacarose e observação sob microscópio eletrônico.

[00369] A observação da estrutura de hemaglutinação sob microscópio eletrônico (EM) exigiu uma maior concentração e nível de pureza do que o obtido a partir de SEC em extratos de proteína da folha brutos. Para permitir a observação por EM das estruturas de H5, um extrato de proteína de folha bruto foi primeiramente concentrado por precipitação de PEG (20% PEG) seguida por resuspensão em 1/10 volumes de tampão de extração. O extrato de proteína concentrado foi fracionado por filtração em gel S-500 HR e as frações de eluição 9, 10 e 11 (correspondentes ao volume vazio da coluna) foram agrupadas e ainda isoladas das proteínas hospedeiras por ultracentrifugação em um gradiente de densidade de sacarose de 20 a 60%. O gradiente de sacarose foi fracionado começando no topo e as frações foram dialisadas e concentradas em uma unidade de filtro centrífuga 100 NMWL antes da análise. Como mostrado nos resultados dos Western blots e de hemaglutinação (figura 14A), H5 acumulou principalmente nas frações 16 a 19 que continham ≈ 60% sacarose, sendo que a maior parte das proteínas hospedeiras tiveram pico na fração 13. As frações 17, 18 e 19 foram agrupadas, negativamente colorida, e observada sob EM. O exame da amostra demonstrou claramente a presença de estruturas esféricas reforçadas de tamanho na faixa de 80 a 300 nm, que alcançaram as características morfológicas das VLPs de influenza (figura 14B).

Exemplo 4: Purificação das VLPs de H5 de influenza a partir da

biomassa de planta

[00370] Em adição a um teor abundante de proteínas solúveis, os extratos de folha de planta contêm uma mistura complexa de açúcares solúveis, ácidos nucleicos e lipídios. O extrato bruto foi clarificado por um deslocamento de pH e tratamento térmico seguido por filtração em terra diatomácea (ver a seção Materiais e Métodos para uma descrição detalhada do método de clarificação). A figura 15A (faixas 1 a 4) apresenta um gel colorido com azul de coomassie comparando o teor de proteína nas várias etapas de clarificação. Uma comparação do teor de proteína no extrato bruto (faixa 1) e no extrato clarificado (faixa 4) revela a capacidade das etapas de clarificação para reduzir o teor de proteína global e remover o contaminante principal visível em 50 kDa em extratos de folha brutos. A banda de 50 kDa corresponde à grande subunidade de RuBisCO, representando até 30% das proteínas de folha totais.

[00371] As VLPs de H5 de influenza foram purificadas a partir desses extratos clarificados por cromatografia de afinidade em uma coluna de fetuína. Uma comparação da fração de carga (figura 15A, faixa 5) com escoamento (figura 15A, faixa 6) e as VLPs eluídas (figura 15A, faixa 7) demonstra a especificidade da coluna de afinidade de fetuína para as VLPs de H5 de influenza em extrato clarificado de planta.

[00372] O procedimento de purificação resultou em mais de 75% de pureza em H5, como determinado por densitometria no gel SDS-PAGE colorido com azul de coomassie (figura 15A, faixa 7). De modo a avaliar a qualidade estrutural do produto purificado, a H5 purificada foi concentrada em uma unidade de filtro centrífuga 100 NMWL (limite nominal de peso molecular) e examinada sob EM após a coloração negativa. A figura 15B mostra um setor representativo que mostra a presença de VLPs abundantes. Um exame mais próximo confirmou a presença de picos nas VLPs (figura 15C).

[00373] Como mostrado na figura 15D, as VLPs de H5 foram purificadas para aproximadamente 89% de pureza a partir do extrato de folha clarificado por cromatografia de afinidade em uma coluna de fetuína, baseada na densidade da hemaglutinina H5 colorida com azul de coomassie e em uma determinação do teor de proteína total pelo método BCA.

[00374] A bioatividade das VLPs da HA foi confirmada pela sua capacidade de aglutinar células vermelhas de sangue de peru (dados não mostrados).

[00375] A figura 15D também confirma a identidade da VLP purificada visualizada por Western blotting e imunodetecção com um soro policlonal anti-H5 (A/Vietnã/1203/2004). Uma banda exclusiva de aproximadamente 72 kDa é detectada e corresponde em tamanho à forma HA0 não clivada de hemaglutinina de influenza. A figura 15C mostra a estrutura de VLP da vacina com os picos de hemaglutinina cobrindo sua estrutura.

[00376] As VLPs foram formuladas para imunização de camundongos por filtração através de um filtro de 0,22 µm; o teor de endotoxina foi medido usando o kit de detecção de LAL (Lisato de Amebócito do Limulus) de endotoxina (Lonza, Walkserville, MS, USA). A vacina filtrada continha 105,8 ±11,6% EU/ml (unidades de endotoxina/ml).

Exemplo 5: Localização de VLPs de influenza em plantas

[00377] Para localizar as VLPs e confirmar sua origem na membrana plasmática, finas seções de folha de plantas produzindo H5 foram fixadas e examinadas sob TEM após coloração positiva. A observação das células das folhas indicou a presença de VLPs nas cavidades extracelulares formadas pela invaginação da membrana plasmática (figura 19). A forma e a posição das VLPs observadas demonstraram que a apesar da aposição de suas membranas plasmáticas na parede

celular, as células de plantas têm uma plasticidade exigida para produzir VLPs de influenza derivadas de suas membranas plasmáticas e acumulam-nas no espaço apoplástico.

Exemplo 6: Análise de Lipídio de Membrana Plasmática

[00378] A confirmação adicional da composição e origem das VLPs de influenza a partir de plantas foi obtida a partir de análises do teor de lipídio. Os lipídios foram extraídos de VLPs purificadas e sua composição foi comparada a de membranas plasmáticas de tabaco altamente purificadas por cromatografia de camada fina de alto desempenho (HP-TLC). Os padrões de migração de lipídios polares e neutros de VLPs e membranas plasmáticas de controle foram similares. As VLPs purificadas continham os principais fosfolipídios (fosfatidil colina e fosfatidil etanolamina) e esfingolipídios (glicosil-ceramida) encontrados na membrana plasmática (figura 27A), e ambos continham esteróis livres como os únicos lipídios neutros (figura 27B). Entretanto, a imunodetecção de um marcador de proteína na membrana plasmática (ATPase) em extratos de VLP purificada mostrou que a bicamada de lipídio de VLP não contém uma das principais proteínas associadas com as membranas plasmáticas de plantas, sugerindo que as proteínas hospedeiras podem ter sido excluídas das membranas durante o processo das VLPs germinando a partir das células de plantas (figura 27C).

Exemplo 7: Imunogenicidade das VLPs de H5 e efeito da via de administração

[00379] Aos camundongos foram administradas VLPs de H5 produzidas a partir de plantas por injeção intramuscular, ou intranasal (inalação). 0,1 a 12 ug de VLPs foram injetados de forma intramuscular em camundongos, com alume como adjuvante, de acordo com os métodos descritos. As titulações de anticorpo de pico foram observadas com a menor quantidade de antígeno, em uma magnitude similar a de

5 ug de hemaglutinina solúvel recombinante (H5) (figura 20A).

[00380] 0,1 a 1 ug de VLPs de H5 produzidas a partir de plantas foi administrado de forma intranasal com um adjuvante quitosana fornecido para uma reposta de anticorpo maior do que a do H5 solúvel recombinante com um adjuvante alume (figura 20B).

[00381] Para ambas as vias de administração, e ao longo de uma gama de quantidades de antígeno, a soroconversão foi observada em todos os camundongos testados. O antígeno solúvel de H5 recombinante conferiu titulações de HI baixas (< 1/40) ou desprezíveis (1 < 1/10 para o H5 recombinante não adjuvantado).

Exemplo 8: VP com H5 de titulação de anticorpo de inibição (HAI) de hemaglutinina

[00382] As figuras. 21 A, B ilustram a resposta de anticorpo de inibição (HAI) de hemaglutinação 14 dias após um "estímulo" com VP com H5 produzida a partir de planta, ou H5 solúvel recombinante. A menor dose de antígeno (0,1 ug) quando administrado de forma intramuscular produziu uma resposta a HAI superior a uma administração maior que 10 vezes (5 ug) de H5 solúvel recombinante. As doses crescentes de VP com H5 forneceram um modesto aumento na HAI sobre a menor dose.

[00383] A resposta a HAI após a administração intranasal foi significativamente aumentada em camundongos administrados com VLPs de H5 produzidas a partir de plantas (1,0 ou 0,1 ug) comparado aos administrados com 1 ug de H5 solúvel recombinante, que foi similar ao controle negativo. Todos os camundongos imunizados por injeção intramuscular de VLPs de H5 (de 0,1 a 12 µg) tiveram titulações de HAI maiores do que os camundongos imunizados com o antígeno de H5 de controle (figura 21A). Para a mesma dose de 5 µg, as VLPs induziram titulações de HAI 20 vezes maiores do que a dose correspondente do antígeno de H5 de controle. As VLPs também induziram titulações de

HAI significativamente maiores do que o antígeno de HA de controle quando liberado através da via intranasal (figura 21B). Para uma dada dose de VP com H5, os níveis das titulações de HAI foram menores em camundongos imunizados de forma intranasal do que para camundongos imunizados de forma intramuscular; 1 µg de VLP induziu uma titulação de HAI média de 210 quando administrada intramuscular enquanto a mesma dose induziu uma titulação de HAI média de 34 administrada i.n.

[00384] Quando administradas de forma intramuscular, todas as doses de VLPs induziram alto nível de anticorpos capazes de ligação homóloga a vírus inativos integrais (figuras. 20A e 24). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a vacina de VLP produzida a partir de planta e o antígeno de H5 de controle (exceto o grupo administrado com 12 µg de VLP 14 dias após o estímulo), como ambas as preparações de antígeno induzem altas titulações de anticorpo de ligação contra a cepa homologa. Entretanto, quando administradas de forma intranasal, as VLPs induziram titulações de anticorpo de ligação mais altas do que o antígeno de H5 de controle (figura 20B). Quando misturada com quitosana, a imunização com um micrograma de VLP induziu uma titulação Ab média recíproca de 5.500, 8,6 vezes mais alta do que o nível encontrado em camundongos imunizados com 1 µg de antígeno de HA de controle (titulação Ab média recíproca de 920).

[00385] A imunogenicidade das VLPs de influenza derivadas de planta foi então investigada através de um estudo de faixa de dose em camundongos. Os grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados de forma intramuscular duas vezes em intervalos de 3 semanas com 0,1 µg a 12 µg de VLPs contendo HA de influenza A/Indonésia/5/05 (H5N1) formulada em alume (relação 1:1). As titulações de inibição de hemaglutinação (HI ou HAI), usando antígeno de vírus inativo integral (A/Indonésia/5/05 (H5N1)), foram medidas em

soro coletado 14 dias após a segunda imunização. A imunização com doses de VLP caindo a 0,1 µg induziu a produção de anticorpos que inibiram os vírus de aglutinar eritrócitos em altas diluições (figura 21A). A imunização paralela de camundongos com 5 µg de antígeno de H5 de controle adjuvantado com alume não VLP (também de A/Indonésia/5/05) induz uma resposta de HI que foi 2-3 logs menor do que a alcançada com a menor dose de VLP.

[00386] Para ambas as vias de administração, e ao longo de uma faixa de quantidades de antígeno, a resposta a HAI é superior em camundongos administrados com VLPs.

Exemplo 9: Efeito de adjuvante em imunogenicidade de VLPs de H5

[00387] As VLPs de H5 produzidas a partir de plantas têm uma origem na membrana plasmática (figura 19, Exemplo 5). Sem querer estar limitado pela teoria, os vírus envelopados ou VLPs de vírus envelopados geralmente adquirem seu envelope da membrana através da qual elas germinaram. As membranas plasmáticas das plantas têm um complemento de fitosterol que é raramente encontrado, se já encontrado em células animais, e vários desses esteróis demonstraram exibir efeits imunoestimuladores.

[00388] As VLPs de H5 produzidas a partir de plantas foram administradas de forma intramuscular (figura 22ª) ou de forma intranasal (figura 22B) a camundongos na presença ou ausência de um adjuvante, e a HAI (resposta de anticorpo por inibição da hemaglutinação) determinada. As VLPs, na presença ou ausência de um adjuvante adicionado (alume ou quitosana, como nesses exemplos) ou no sistema de administração, demonstraram uma inibição de hemaglutinina HAI significativamente maior do que a H5 solúvel recombinante. Mesmo na ausência de um adjuvante adicionado (isto é, alume ou quitosana), VLPs de H5 produzidas a partir de planta demonstram uma HAI

significativa, indicativa de uma resposta imune sistêmica à administração do antígeno.

[00389] O alume aprimorou o nível médio das titulações de HAI por um fator de 5 para a administração intramuscular de VLP (figura 22A) e por um fator de 3,7 para o antígeno de H5 de controle. Quando administradas intramuscular, 5 μg de VLPs induziram uma titulação de HAI média 12 vezes maior do que a dose correspondente de antígeno de H5 de controle. A quitosana não estimulou o nível de HAI médio do antígeno de H5 de controle (figura 22B), enquanto aumentou o nível de HAI médio de camundongos imunizados com 1 μg de VLP administrada i.n. por um fator de 5 vezes.

Exemplo 10: Isotipos de anticorpo

[00390] Os camundongos administrados com VLPs de H5 produzidas a partir de plantas ou H5 solúvel recombinante na presença ou ausência de alume como um adjuvante adicionado demonstram uma variedade de isotipos de imunoglobulina (figura 23A).

[00391] Na presença de um adjuvante adicionado, os perfis de isotipo de anticorpo de VLPs e do H5 recombinante são similares, com IgG1 sendo o isotipo dominante. Quando as VLPs ou H5 recombinante são administrados sem um adjuvante adicionado, a resposta de IgG1 é reduzida, mas permanece a resposta de isotipo dominante a VLPs, com IgM, IgG2a, IgG2B e IgG3 mantendo as titulações similares como na presença de um adjuvante adicionado. As titulações de IgG1, IgG2a, e IgG2b são acentuadamente reduzidas quando H5 recombinante é administrado sem um adjuvante adicionado (figura 23A).

[00392] Esses dados, portanto, demonstram que as VLPs produzidas a partir de plantas não exigem um adjuvante adicionado para produzir uma resposta de anticorpo em um hospedeiro.

[00393] As titulações de anticorpo contra as cepas de vírus de influenza inativos integrais (A/Indonésia/5/05; A/Vietnã/1203/04) em

camundongos administrados com VLPs produzidas a partir de plantas ou HA recombinante solúvel de forma intramuscular na presença de um antígeno adicionado são ilustradas na figura 23B. Nenhuma diferença significativa é observada nas titulações de anticorpo para essas cepas de influenza em camundongos administrados com 1 ug ou 5 ug de VLPs ou 5 ug de HA solúvel.

Exemplo 11: Reatividade Cruzada de anticorpos séricos induzida pela vacina de VP com H5.

[00394] A reatividade cruzada de anticorpos séricos induzida pela VP com H5 foi avaliada contra os vírus de influenza inativos integrais de diferentes cepas. Todas as doses de VLP (de 0,1 a 12 μg), bem como 5 μg de antígeno de HA de controle induziram altas titulações de anticorpo de ligação contra uma cepa de clado 1 (A/Vietnã/1194/04), a cepa homóloga A/Indonésia/5/05 de clado 2.1, e uma cepa de clado 2.2 A/peru/Turquia/1/05 (figura 25A).

[00395] Entretanto, somente a VLP produzida a partir de planta induziu titulação de HAI contra a cepa A/peru/Turquia/1/05 (figura 25B). As titulações de HAI para A/Indonésia/5/05 foram altas para as VLPs.

Exemplo 12: Proteção cruzada conferida pela imunização com VP com H5 produzida a partir de planta

[00396] Os camundongos que foram anteriormente administrados com um regime de duas doses de VLPs de H5 de A/Indonésia/5/05, foram subsequentemente provocados de forma intranasal com vírus infeccioso de influenza A/Peru/582/06 (H5N1) ("H5N1 de peru"), e observados. A dose administrada, por animal, foi 10 LD_{50} (4,09 x 10^5 $CCID_{50}$).

[00397] Sete dias após a provocação, somente 37,5% dos camundongos administrados com o controle de vacina de PBS sobreviveram a H5N1 de peru (figura 26A). 100% dos animais administrados com o antígeno de controle (HA) ou 1, 5 ou 15 ug de VLPs de H5 de Indonésia sobreviveram até 17 dias pós-provocação,

quando o experimento foi terminado.

[00398] A massa corporal dos camundongos foi também monitorada durante o experimento, e a massa média dos camundongos sobreviventes plotada (figura 26B). Os camundongos administrados com 1, 5, ou 15 ug das VLPs de H5 de Indonésia antes da provocação não perderem qualquer massa apreciável durante o curso do experimento, e em particular, os camundongos administrados com 5 ug das VLPs parecem ter ganhado massa significativa. Os camundongos de controle negativo (nenhuma provocação com H5N1 de peru) não ganharam ou perderam apreciadamente massa corporal. Os camundongos de controle positivo (não administrados com VLPs, mas provocados com H5N1 de peru) exibiram perda significativa de massa corporal durante o curso do experimento, e três desses camundongos morreram. Como a massa corporal é uma média de todos os camundongos no grupo, a remoção dos camundongos 'mais doentes' (os 3 que morreram) pode levar a um aumento geral aparente em massa, entretanto, nota-se que a massa corporal média do grupo de controle positivo está ainda significativamente abaixo da dos grupos negativos ou tratados com VLP.

[00399] Esses dados, entretanto, demonstram que as VLPs de influenza produzidas a partir de plantas compreendendo a proteína viral hemaglutinina H5 induzem uma resposta imune específica para cepas de influenza patogênicas, e essas partículas semelhantes a vírus podem germinar a partir de uma membrana plasmática de planta.

[00400] Esses dados, então, demonstram que as plantas são capazes de produzir partículas semelhantes a vírus de influenza pela primeira vez, que as partículas semelhantes a vírus podem germinar a partir de uma membrana plasmática de planta.

[00401] Ademais, usando a tecnologia de expressão transitória atual, um primeiro lote de antígeno foi produzido somente 16 dias após a sequência da HA-alvo foi obtido. Sob os rendimentos atuais para VPLs com H5, em uma dose exemplificada de 5 µg por sujeito, cad kg de folha infiltrada pode produzir ~ 20.000 doses de vacina. Essa combinação exclusiva de simplicidade de plataforma, a capacidade de surto e a imunogenicidade poderosa fornece, entre outras modalidades, uma nova resposta de método no contexto de uma pandemia.

Exemplo 13: Caracterização de estruturas contendo hemaglutinina (H1, H2, H3 H5, H6 e H9) em extratos de plantas usando cromatografia por exclusão de tamanho.

[00402] A montagem de hemaglutinina de influenza produzida a partir de plantas de diferentes subtipos em estruturas de alto peso molecular foi avaliada por filtração em gel. Os extratos de proteína brutos ou concentrados de plantas infiltradas com AGL1/660-, AGL1/540-, AGL1/783-, AGL1/780-, AGL1/785- e AGL1/790 (1,5 ml) foram fracionados por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) em colunas Sephacryl® S-500 HR (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA). Como mostrado na figura 46, a eluição com azul de dextrana (2 MDa) chegou ao ponto máximo cedo na fração 10. Quando as proteínas de 200 µl de cada fração de eluição SEC foram concentradas (5 vezes) por precipitação em acetona e analisadas por Western blotting (figura 46), a hemaglutininas foram principalmente encontrada nas frações 7 a 14,indicando a incorporação de HA nas VLPs. Sem querer ser limitado à teoria, isso sugere que a proteína HA foi ou montada em uma grande superestrutura ou ela foi acoplada a uma estrutura de alto peso molecular, desprezando o subtipo produzido. Na figura 46, H1 da cepa A/Nova Caledônia/20/1999 e H3 da cepa A/Brisbane/10/2008

foram produzidas usando cassetes contendo peptídeo sinal de PDI. Os resultados obtidos indicam que a substituição do peptídeo sinal nativo por essa PDI de alfafa não afeta a capacidade da HA se montar em partículas.

Exemplo 14: Expressão transitória de hemaglutinina de vírus de influenza sazonal por agroinfiltração em plantas *N. benthamiana* usando a sequência de nucleotídeo de ocorrência natural.

[00403] A capacidade do sistema de expressão transitória produzir hemaglutininas de influenza sazonal foi determinada através da expressão do subtipo H1 de cepas A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (plasmídeo # 774), A/Nova Caledônia/20/1999 (H1N1) (plasmídeo # 540) e A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (plasmídeo # 775), do subtipo H3 das cepas A/Brisbane/10/2007 (plasmídeo # 776) e A/Wisconsin/67/2005 (plasmídeo # 777) e do tipo B das cepas B/Malásia/2506/2004 (linhagem Victoria) (plasmídeo # 778) e B/Flórida/4/2006 (linhagem Yamagata) (plasmídeo # 779). As sequências de codificação do gene da hemaglutinina foram primeiro montadas no cassete de expressão de plastocianina, 5' UTR, 3' UTR e sequências de terminação de transcrição do gene da plastocianina da alfafa – e os cassetes montados foram inseridos em um plasmídeo binário pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados para Agrobactéria (AGL1), produzindo cepas de Agrobactéria AGL1/774, AGL1/540, AGL1/775, AGL1/776, AGL1/777, AGL1/778 e AGL1/779, respectivamente.

[00404] As plantas *N. benthamiana* foram infiltradas com AGL1/774, AGL1/540, AGL1/775, AGL1/776, AGL1/777, AGL1/778 e AGL1/779, e as folhas foram colhidas após um período de incubação de seis dias. Para determinar se H1 acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída do tecido da folha infiltrada e analisada por Western blotting usando anticorpos anti-HA

(ver Tabela 6 para os anticorpos e condições usadas para a detecção de cada subtipo de HA). Para a HA de cepas H1, uma faixa exclusiva de aproximadamente 72 kDa foi detectada nos extratos (figura 47), correspondendo em tamanho à forma HA0 não clivada de hemaglutinina de influenza. Isso demonstrou que a expressão de diferentes cepas epidêmicas anuais de hemaglutinina em folhas infiltradas resulta no acúmulo do produto de tradução não clivado. Usando essas estratégias de expressão e imunodetecção, a expressão de HA de influenza do subtipo H3 ou tipo B não foi detectada nos extratos de proteína brutos (figura 47).

Exemplo 15: Expressão transitória de hemaglutinina de vírus de influenza pandêmica potencial por agroinfiltração em plantas *N. benthamiana* usando a sequência de nucleotídeo de ocorrência natural.

[00405] A capacidade do sistema de expressão transitória produzir hemaglutininas de influenza potencial foi determinada através da expressão do subtipo H5 de cepas A/Anhui/1/2005 (H5N1) (plasmídeo # 781), A/Indonésia/5/2005 (H5N1) (plasmídeo # 660) e A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (plasmídeo # 782), o subtipo H2 da cepa A/Cingapura/1/1957 (H2N2) (plasmídeo # 780), do subtipo H6 da cepa A/Marreco/Hong Kong/W312/1997 (H6N1) (plasmídeo # 783), o subtipo H7 da cepa A/Equino/Praga/1956 (H7N7) (plasmídeo # 784) e finalmente o subtipo H9 da cepa A/Hong Kong/1073/1999 (H9N2) (plasmídeo # 785). As sequências de codificação do gene da hemaglutinina foram primeiro montadas no cassete de expressão – promotor de plastocianina, 5’ UTR, 3’ UTR e sequências de terminação de transcrição do gene da plastocianina da alfafa – e os cassetes montados foram inseridos em um plasmídeo binário pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados para Agrobactéria (AGL1), produzindo cepas de Agrobactéria AGL1/781,

AGL1/660, AGL1/782, AGL1/780, AGL1/783, AGL1/784 e AGL1/785, respectivamente.

[00406] As plantas *N. benthamiana* foram infiltradas com AGL1/781, AGL1/660, AGL1/782, AGL1/780, AGL1/783, AGL1/784 e AGL1/785, e as folhas foram colhidas após um período de incubação de seis dias. Para determinar se H5 acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída do tecido da folha infiltrada e analisada por Western blotting usando anticorpos anti-HA apropriados (ver Tabela 6 para os anticorpos e condições usadas para a detecção de cada subtipo de HA). Uma faixa exclusiva de aproximadamente 72 kDa foi detectada nos extratos de plantas transformadas com os construtos de expressão H5 e H2 (figura 48A e B), correspondendo em tamanho à forma HA0 não clivada de hemaglutinina de influenza. Isso demonstrou que a expressão de diferentes cepas pandêmicas potenciais de hemaglutinina em folhas infiltradas resulta no acúmulo do produto de tradução não clivado. Usando essas estratégias de expressão e imunodetecção, a expressão de HA de influenza do subtipo H7 e H9 não foi detectada nos extratos de proteína brutos (figura 48B).

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

[00407] A capacidade do sistema de expressão transitória produzir hemaglutininas de influenza em folhas de *Nicotiana tabacum* foi analisada através da expressão do subtipo H5 da cepa A/Indonésia/5/2005 (H5N1) (plasmídeo # 660). As sequências de codificação do gene da hemaglutinina foram primeiro montadas no cassete de expressão – promotor de plastocianina, 5’ UTR, 3’ UTR e sequências de terminação de transcrição do gene da plastocianina da alfafa – e os cassetes montados foram inseridos em um plasmídeo binário pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados para

Agrobactéria (AGL1), produzindo a cepa AGL1/660.

[00408] As plantas *N. tabacum* foram infiltradas com AGL1/660 e as folhas foram colhidas após um período de incubação de seis dias. Para determinar se H5 acumulou nas folhas agroinfiltradas, a proteína foi primeiro extraída das folhas infiltradas e analisada por Western blot usando anticorpos anti-H5. Uma faixa exclusiva de aproximadamente 72 kDa foi detectada nos extratos (figura 49), correspondendo em tamanho à forma HA0 não clivada de hemaglutinina de influenza. Isso demonstrou que a expressão de hemaglutinina em folhas infiltradas de N. tabacum resulta no acúmulo do precursor HA0 não clivado.

Exemplo 17: Imunogenicidade de vacina de VLP de H5N1 produzida a partir de planta de A/Indonésia/5/05 (H5N1) em furões.

[00409] Um estudo de escalação de dose em furões foi executado para avaliar a imunogenicidade de VLPs derivadas de plantas. Na reatividade cruzada *in vitro* de anticorpo sérico induzida pela vacina de VLP com H5 em 3 doses (1, 5 e 15 ug) foi avaliada por inibição de hemaglutinação de três outras cepas de H5N1 – A/peru/Turquia/1/05 (clado 2.2), A/Vietnã/1194/04 (clado 1) e A/Anhui/5/05 (todos vírus inativos integrais), usando soro obtido 14 dias após a primeira dose de vacina (figura 50ª), e 14 dias após a 2ª dose (figura 50B). Para todas as 3 concentrações de dose, a reatividade cruzada é observada.

Exemplo 18: Análise dos resultados da imunogenicidade de acordo com os critérios CHMP.

[00410] O Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) da EMEA (http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/CHMP/CHMP.html) apresentou três critérios (aplicados após a segunda dose) para a eficácia da vacina: 1 – Número de

soroconversão ou aumento significativo nas titulações de H1 (4 vezes) > 40%; 2 – Aumento médio geométrico de ao menos 2,5; 3 – proporção de sujeitos alcançando uma titulação de HI de 1/40 deveria ser ao menos 70%. A análise desses critérios no modelo de furão é mostrada nas Tabelas 8 a 11. (*) é indicativo de que alcançou ou excedeu os critérios CHMP. Um resumo de análise de imunogenicidade cruzada em relação aos critérios CHMP para licenciamento é mostrado na Tabela 12.

[00411] Os animais foram avaliados diariamente quanto ao peso corporal, temperatura e condição geral. Nenhum sinal de doença ou desconforto foi registrado durante o estudo. A vacina foi segura e tolerada pelos animais.

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

Dia	Critérios	Grupo de Estudo								
		1 µg	1 µg adjuvantado	5 µg	5 µg adjuvantado	7,5 µg	15 µg	15 µg adjuvantado	30 µg	5 µg ITC
14 (pós 1ª inj.)	% aumento 4 vezes na titulação de HI	0%	100%	0%	**100% ***	20%	20%	**80% ***	0%	0%
	Aumento geométrico médio	0%	7,6	0%	**15,6 ***	1,3	1,2	**11,2 ***	0%	0%
	% de titulação de HI de 1/40	0%	60%	0%	**100% ***	20%	0%	**80% ***	0%	0%
	Titulação de HI média		*38*		*78*			*56*		
35 (14 dias pós estímulo)	% aumento 4 vezes na titulação de HI	0%	**100% ***	0%	**60% ***	0%	0%	**40% ***	0%	0%
	Aumento geométrico médio	0%	**10,8 ***	0%	**5,9 ***	0,7	0%	**4 ***	0%	0%
	% de titulação de HI de 1/40	0%	**100% ***	0%	**100% ***	0%	0%	**100 % ***	0%	0%
	Titulação de HI média		*411*		*465*			*217*		

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

Dia	Critérios	Grupo de Estudo								
		1 µg	1 µg adjuvantado	5 µg	5 µg adjuvantado	7,5 µg	15 µg	15 µg adjuvantado	30 µg	5 µg ITC
14 (pós 1ª inj.)	% aumento 4 vezes na titulação de HI		0%		0%			0%		
	Aumento geométrico médio		1,2		1,2			1,3		
	% de titulação de HI de 1/40		0%		0%			0%		
35 (pós-estímulo)	% aumento 4 vezes na titulação de HI		60%		**80% ***			60%		
	Aumento geométrico médio		2,3		**5,1 ***			1,78		
	% de titulação de HI de 1/40		0%		**80% ***			20%		

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

Dia	Critérios	Grupo de Estudo								
		1 µg	1 µg adjuvantado	5 µg	5 µg adjuvantado	7,5 µg	15 µg	15 µg adjuvantado	30 µg	5 µg ITC
14 (pós 1ª inj.)	% aumento 4 vezes na titulação de HI		40%		20%			60%		
	Aumento geométrico médio		1,9		1,7			2,8		
	% de titulação de HI de 1/40		40%		20%			40%		
35 (pós-estímulo)	% aumento 4 vezes na titulação de HI		**80% ***		**100% ***			**80% ***		
	Aumento geométrico médio		**10,6 ***		**20,8 ***			**7,7 ***		
	% de titulação de HI de 1/40		**100% ***		**100% ***			**100% ***		

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

Dia	**Critérios**	**Grupo de Estudo**								
		1 µg	1 µg adjuvanted	5 µg	5 µg adjuvanted	7.5 µg	15 µg	15 µg adjuvanted	30 µg	5 µg ITC
14 (pós 1ª inj.)	% aumento 4 vezes na titulação de HI		40%		20%			**80% ***		
	Aumento geométrico médio		1,8		1,3			**6,4 ***		
	% de titulação de HI de 1/40		20%		20%			**80% ***		
35 (pós-estímulo)	% aumento 4 vezes na titulação de HI		**100% ***		**100% ***			**60% ***		
	Aumento geométrico médio		**11,8 ***		**14,4 ***			**3 ***		
	% de titulação de HI de 1/40		**100% ***		**80% ***			**80% ***		

Tabela 12: Resumo da análise de imunogenicidade cruzada em relação aos critérios CHMP para licenciamento.

Cepa	**Critérios**	**Grupo de Estudo**		
		1 µg adjuvantado	5 µg adjuvantado	15 µg adjuvantado
A/peru/ Turquia/1/05 (clado 2.2)	% aumento 4 vezes na titulação de HI	**80% ***	**100% ***	**80% ***
	Aumento geométrico médio	**10,6 ***	**20,8 ***	**7,7 ***
	% de titulação de HI de 1/40	**100% ***	**100% ***	**100% ***
A/Anhui/1/ 05 (clado 2.3)	% aumento 4 vezes na titulação de HI	**100% ***	**100% ***	**60% ***
	Aumento geométrico médio	**11,8 ***	**14,4 ***	**3 ***
	% de titulação de HI de 1/40	**100% ***	**80% ***	**80% ***
A/Vietnã/ 1194/04 (clado 1)	% aumento 4 vezes na titulação de HI	60%	**80% ***	60%
	Aumento geométrico médio	2,3	**7,1 ***	1.78
	% de titulação de HI de 1/40	0%	**80% ***	20%

Exemplo 19: Seleção de sequências de nucleotídeo de hemaglutinação

[00412] As sequências de nucleotídeo da HA foram restauradas a partir de um banco de dados de sequência de influenza (ver URL: flu.lanl.gov), ou o recurso de vírus de influenza NCBI (Bao e outros, 2008. J. Virology 82(2): 596 a 601; ver URL: ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html). Para várias das sequências de ácido nucleico de HA, múltiplas entradas são listadas nos bancos de dados (Tabela 13). Alguma variação está associada principalmente com o sistema de cultura (Origem – MDCK, ovo, desconhecido, RNA viral/isolado clínico); por exemplo, o sítio de glicosilação na posição 194 (numeração de proteína madura) da HA está ausente quando o vírus de influenza tipo B é expresso em fluido alantoico de ovos (ver também Chen e outros, 2008). Para algumas sequências, os domínios podem estar faltando (por exemplo, clones incompletos, artefatos de sequenciamento, etc.). Os domínios e subdomínios de hemaglutinina de influenza são discutidos geralmente na Descrição. Os domínios ou subdomínios de uma primeira sequência podem ser combinados com um domínio de uma segunda sequência existente, por exemplo, o peptídeo sinal de uma primeira sequência de cepa pode ser combinado com o equilíbrio da sequência de codificação de hemaglutinina de uma segunda cepa para fornecer uma sequência de codificação completa.

Tabela 13: Variação de subtipos de Influenza para sequências de codificação de ha

	Cepa	**No. Referência de Banco de dados de sequência**	**Origem**	**SP**	**HA1**	**HA2**	**DTm**	**Divergência**
H1	A/Ilhas Salomão/3/2006	ISDN231558 (Vacina rec.)	MDCK	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	ISDN238190	Ovo	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	EU100724	?	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	ISDN220951	MDCK	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	ISDN220953	Ovo	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	EU124137	Ovo	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	EU124135	MDCK	Y	Y	N	N	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)
	A/Ilhas Salomão/3/2006	EU124177	MDCK	Y	Y	Y	Y	189: R ou G, 220: K (MDCK) T(Ovo), 249: Q (MDCK) R(Ovo), 550: L (MDCK) R (Ovo)

H1	A/Brisbane/59/2007	ISDN282676	MDCK	Y	Y	Y		203: **D**/I/N D é mais abundante perto de H1
	A/Brisbane/59/2007	ISDN285101	Ovo	Y	Y	N	N	203: **D**/I/N D é mais abundante perto de H1
	A/Brisbane/59/2007	ISDN285777	Ovo	Y	Y	Y	Y	203: **D**/I/N D é mais abundante perto de H1
	A/Brisbane/59/2007	ISDN282677	Ovo	Y	Y	Y	Y	203: **D**/I/N D é mais abundante perto de H1

H3	A/Brisbane/10/2007	ISDN274893	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	ISDN257648	MDCK	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	ISDN256751	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	ISDN273757	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	ISDN273759	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	EU199248	Ovo	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	EU199366	Ovo	Y	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	ISDN257043	Ovo	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	EU199250	MDCK	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I
	A/Brisbane/10/2007	ISDN275357	Ovo	N	Y	N	N	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I

	A/Brisbane/10/2007	ISDN260430	Ovo	N	Y	Y	Y	202: V/G, 210:L/P, 215: de Ala, 242: S/I

H3	A/Wisconsin/67/2005	ISDN131464 (vacina rec.)	?	N	Y	Y	N	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	DQ865947	?	N	Y	parcial	N	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	EF473424	?	N	Y	Y	N	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	ISDN138723	Ovo	N	Y	Y	Y	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	EF473455	Ovo	N	Y	Y	Y	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y
	A/Wisconsin/67/2005	ISDN138724	?	N	Y	Y	Y	138: A/S 156: H/Q 186: G/V 196: H/Y

B	B/Malásia/2506/2004	ISDN126672 (vacina rec.)	Ovo	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	EF566433	Ovo	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	ISDN231265	Ovo	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	ISDN231557	MDCK	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	EF566394	MDCK	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	EU124274	Ovo	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	EU124275	MDCK	Y	Y	Y	Y	120 K/N 210 T/A
	B/Malásia/2506/2004	ISDN124776	MDCK	Y	Y	N	N	120 K/N 210 T/A

B	B/Flórida/4/2006	ISDN261649	Ovo	Y	Y	Y	N	Ausência de sítio de glicosilação na posição 211; 10 aminoácidos de DTm/cauda citoplásmica
	B/Flórida/4/2006	EU100604	MDCK	N	Y	N	N	
	B/Flórida/4/2006	ISDN218061	MDCK	N	Y	N	N	
	B/Flórida/4/2006	ISDN285778	Ovo	Y	Y	Y	Y	Inclui cauda citoplásmica

B	B/Brisbane/3/2007	ISDN256628	Ovo	N	Y	N	N	Ausência de sítio de glicosilação na posição 211
	B/Brisbane/3/2007	ISDN263782	Ovo	Y	Y	Y	Y	Ausência de sítio de glicosilação na posição 211
	B/Brisbane/3/2007	ISDN263783	MDCK	Y	Y	Y	Y	

H5	A/Vietnã/1194/2004	ISDN38686 (Vacina rec.)	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Vietnã/1194/2004	AY651333	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Vietnã/1194/2004	EF541402	?	Y	Y	Y	Y	

H5	A/Anhui1/1/2005	DQ37928 (vacina rec.)	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Anhui1/1/2005	ISDN131465	Ovo	Y	Y	Y	Y	

H7	A/Galinha/Itália/13474/1999	AJ91720	ARN gen	Y	Y	Y	Y	

H7	A/Equino/Praga/56	AB298277 (Lab reassortant)	?	Y	Y	Y	Y	152 (R/G) 169 (T/I) 208 (N/D) (sítio de glicosilação abolido)
	A/Equino/Praga/56	X62552	?	Y	Y	Y	Y	

H9	A/Hong Kong/1073/1999	AJ404626	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Hong Kong/1073/1999	AB080226	?	N	Y	N	N	

H2	A/Cingapura/1/1957	AB296074	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Cingapura/1/1957	L20410	RNA	Y	Y	Y	Y	
	A/Cingapura/1/1957	L11142	?	Y	Y	Y	Y	

H2	A/Japão/305/1957	L20406	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	L20407	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	CY014976	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	AY209953	?	Y	Y	N	N	
	A/Japão/305/1957	J02127	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	DQ508841	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	AY643086	?	Y	Y	Y	N	
	A/Japão/305/1957	AB289337	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	AY643085	?	Y	Y	Y	Y	
	A/Japão/305/1957	AY643087	Resistência ao fármaco	Y	Y	Y	N	

H6	A/marreco/Hong Kong/W312/1997 (H6N1)	AF250479	Ovo	Y	Y	Y	Y	

Y, N – Sim, Não, respectivamente.

SP – presença de sequência de peptídeo sinal Y/N

HA1 – domínio HA1 completo Y/N

HA2 – domínio HA2 completo Y/N

DTm – domínio transmembrana completo Y/N

Cepa: H1 de A/Ilhas Salomão/3/2006

[00413] Oito sequências de aminoácido foram comparadas, e as variações identificadas (Tabela 14). A posição 171 exibiu uma variação de glicina (G) ou arginina (R) em algumas sequências.

Tabela 14: Variação de aminoácido de A/Ilhas Salomão/3/2006.

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

* numeração a partir do M de início

Cepa: H1 de A/Brisbane/59/2007

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

Cepa: H3 de A/Brisbane/10/2007

[00414] As variações de sequência foram observadas em 5 posições (Tabela 15). Na posição 215, uma deleção é observada em duas sequências amostradas.

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

	Origem	202, 210, 215, 235 242*
ISDN274893	Ovo	V L - Y I
ISDN273759	Ovo	G P A S I
EU199248	Ovo	G P A S I
EU199366	Ovo	G P A S I
ISDN273757	Ovo	V L - S S
ISDN257043	Ovo	G P A S I
EU199250	MDCK	G L A S I

	Origem	202, 210, 215, 235 242*
ISDN375357	Ovo	G P A S I
ISDN260430	Ovo	G P A S I
ISDN256751	Ovo	G P A S I
ISDN257648	MDCK	G L A S I

* numeração a partir do M de início

Cepa: H3 de A/Wisconsin/67/2005

[00415] As variações de sequência nessa cepa foram observadas em 4 posições (Tabela 16).

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

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

* numeração a partir da proteína madura

Cepa: B de B/Malásia/2506/2004

[00416] A variação em duas posições é observada (Tabela 17). A posição 120 não é um sítio de glicosilação; a posição 120 está envolvida na glicosilação; essa glicosilação é abolida após a cultura em ovos.

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

Aminoácido#*	MDCK	Ovo
120	K	N
210	T	A

* numeração a partir do meio de SP

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

[00417] As variações observadas incluem a variação na sequência de aminoácido na posição 211, dependendo do sistema de cultura. A

asparatina (N) é encontrada em sequências isoladas das células MDCK, enquanto o ácido glutâmico (D) é encontrado em sequência isolado de ovos. A posição 211 é um sítio de glicosilação, e é abolido após a cultura em ovos.

Cepa: H2 de A/Cingapura/1/1957

[00418] As variações de sequência foram observadas em 6 posições (Tabela 18).

Tabela 18: H2 de variação de aminoácido de A/Cingapura/1/1957.

	Origem	No. Aminoácido 166 168 199\ 236 238 358
L20410	RNA Viral	K E T L S V
L11142	Desconhecida	E G K L S I
AB296074	Desconhecida	K G T Q G V
Consenso A/Japão/305/1957		K G T Q/L G V

* Numeração a partir da proteína madura

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

[00419] Não houve variações observadas na sequência de aminoácido mediante o alinhamento das sequências primárias de qualquer dessas cepas de H5.

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

[00420] Somente uma entrada disponível para a cepa (AF250179).

Cepa: H7 de A/Equino/Praga/56

[00421] Um total de 2 entradas de sequência foi encontrado nos bancos de dados. A entrada AB298877 foi excluída como é uma recombinante de laboratório.

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

[00422] Um total de 2 entradas de sequência foi encontrado nos bancos de dados. Somente uma estava completa.

Exemplo 20: Expressão transitória de hemaglutinina de vírus de

influenza fundida a um peptídeo sinal de uma proteína secretada por planta.

[00423] O efeito da modificação do peptídeo sinal no nível de acúmulo de HA para outra hemaglutininas foi também investigado através da expressão das HAs subtipo A de cepas A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (plasmídeo # 787), A/Nova Caledônia/20/1999 (H1N1) (plasmídeo # 540), de cepas A/Brisbane/10/2007 (H3N2) (plasmídeo # 790) e A/Indonésia/5/2005 (H5N1) (plasmídeo # 663) e do tipo B de cepas B/Flórida/4/2006 (plasmídeo # 798) fundidos ao peptídeo sinal (SP; nucleotídeos 32 a 103) de uma proteína dissulfeto isomerase da alfafa (PDI; No. Acesso Z11499; SEQ ID NO: 34; figura 17). As fusões do gene de hemaglutinina –SP da PDI foram montadas no cassete de expressão-promotor de plastocianina, 5' UTR, 3' UTR, e sequências de terminação de transcrição do gene de plastocianina da alfafa – e os cassetes montados foram inseridos em um plasmídeo binário pCAMBIA. Os plasmídeos foram então transfectados em Agrobactéria (AGL1), produzindo cepas de Agrobactéria AGL1/787, AGL1/540, AGL1/790, AGL1/663 e AGL1/798, respectivamente.

[00424] As plantas *N. benthamiana* foram infiltradas com AGL1/787, AGL1/540, AGL1/790, AGL1/663 e AGL1/798. Em paralelo, uma série de plantas foi infiltrada com AGL1/774, AGL776, AGL1/660 e AGL1/779 para propósitos de comparação. As folhas foram colhidas após um período de incubação de seis dias e as proteínas foram extraídas de folhas infiltradas e analisadas por Western blot usando os anticorpos anti-HA apropriados. As expressões de HA de H1/Brisbane e H3/Brisbane foram consideravelmente aprimoradas usando o SP de PDI comparada às expressões observadas para as mesmas HAs com seu peptídeo sinal nativo (figura 87B e C, respectivamente). A expressão de uma terceira

HA do subtipo H1 (cepa A/Nova Caledônia/20/1999) foi confirmada usando essa estratégia de substituição de SP (figura 87A). A modificação do peptídeo sinal não levou a aumento substancial no acúmulo de HA para H5 (A/Indonésia/5/2005) (figura 87D), e nenhum sinal foi detectado para HA da cepa B/Flórida/4/2006, apesar do peptídeo sinal usado para expressão (figura 87E). Para todas as condições onde a expressão de HA foi detectada, uma faixa imunorreativa exclusiva foi observada em um peso molecular de aproximadamente 72 kDa (figura 87A a D), correspondendo em tamanho ao precursor HA0 não clivado.

Exemplo 21: A expressão de HA sob o controle do cassete de expressão CPMV-HT.

[00425] Um cassete de expressão CPMV-HT (Sainsbury e outros, 2008 Plant Physiology 148: 1212 a 1218; ver também WO 2007/135480) compreendendo sequências não traduzidas do RNA2 do vírus do mosaico do Feijão de corda (CPMV) foi usado para expressão de algumas hemaglutininas em plantas transgênicas. A HA de A/Nova Caledônia/20/1999 (H1), A/Brisbane/59/2007 (H1), A/Brisbane/10/2007 (H3), A/Indonésia/5/2005 (H5) e B/Flórida/4/2006 (B) foram expressas sob o controle de CPMV-HT em plantas *N. benthamiana*, agroinfiltradas como descrito. Após incubação, as folhas foram colhidas, extraídas e os teores de HA em extratos de proteínas foram comparados por Western blot. Como mostrado na figura 88, o cassete de expressão de CPMV-HT levou a um nível de expressão de HA mais alto do que o cassete de plastocianina, apesar do peptídeo sinal usado. Ademais, para a cepa B de B/Flórida/4/2006, o uso do cassete de expressão CPMV-HT permitiu a detecção de acúmulo de HA que permaneceu não detectável sob essas condições de imunodetecção quando expressa sob o cassete de plastocianina.

Tabela 19: Cassete de expressão usado para expressão de

hemaglutininas de influenza com peptídeos sinal nativos ou de PDI.

1 Agrocepa	1 HA 2 expressa	1 Peptídeo Sinal	1 Cassete de Expressão
2 AGL1/540	3 H1 (A/Nova Caledônia/20/99)	2 PDI	2 Plastocianina
3 AGL1/580	4 H1 (A/Nova Caledônia/20/99)	3 PDI	3 CPMV-HT
4 AGL1/774	5 H1 (A/Brisbane/59/2007)	4 nativo	4 Plastocianina
5 AGL1/787	6 H1 (A/Brisbane/59/2007)	5 PDI	5 Plastocianina
6 AGL1/732	7 H1 (A/Brisbane/59/2007)	6 nativo	6 CPMV-HT
7 AGL1/776	8 H3 (A/Brisbane/10/2007)	7 nativo	7 Plastocianina
8 AGL1/790	9 H3 (A/Brisbane/10/2007)	8 PDI	8 Plastocianina
9 AGL1/735	10 H3 (A/Brisbane/10/2007)	9 nativo	9 CPMV-HT
10 AGL1/736	11 H3 (A/Brisbane/10/2007)	10 PDI	10 CPMV-HT
11 AGL1/660	12 H5 (A/Indonésia/5/2005)	11 nativo	11 Plastocianina
12 AGL1/685	13 H5 (A/Indonésia/5/2005)	12 nativo	12 CPMV-HT
13 AGL1/779	14 B (B/Florida/4/2006)	13 nativo	13 Plastocianina
14 AGL1/798	15 B (B/Flórida/4/2006)	14 PDI	14 Plastocianina
15 AGL1/738	16 B (B/Flórida/4/2006)	15 nativo	15 CPMV-HT
16 AGL1/739	17 B (B/Flórida/4/2006)	16 PDI	16 CPMV-HT

Exemplo 22: Coexpressão com Hsp70 e Hsp40 em combinação com modificação do peptídeo sinal.

[00426] Hsp70 e Hsp40 citosólico (construto número R870) de

origem vegetal foram coexpressas com H1 Nova Caledônia (Construto número 540) ou H3 de Brisbane (construto número 790), ambos produzindo um peptídeo sinal de origem vegetal (peptídeo sinal de PDI de alfafa). A coexpressão foi executada por agroinfiltração de plantas *N. benthamiana* com uma suspensão bacteriana contendo uma mistura (relação 1:1:1) de AGL1/540, AGL1/R870, AGL1/35SHcPro (para H1) ou AGL1/790, AGL1/R870 e AGL1/35SHcPro (para H3). As plantas de controle foram agroinfiltradas com uma mistura (relação 1:2) de AGL1/540, AGL1/35SHcPro (para H1) ou AGL1/790, AGL1/35SHcPro (para H3). Após incubação, as folhas foram colhidas, extraídas e os teores de HA em extratos de proteína foram comparados por Western blot (figura 89). Nas condições testadas, os resultados obtidos indicam que a coexpressão de Hsp70 e Hsp40 não aumentou o nível de acúmulo de hemaglutinina para H1 de Nova Caledônia. Entretanto, para H3 de Brisbane, o Western Blot indicou claramente que a coexpressão de Hsp70 e Hsp 40 citosólicos resultou em um aumento significativo no nível de acúmulo de hemaglutinina.

[00427] Todas as citações são aqui incorporadas a título de referência.

[00428] A presente invenção foi descrita com relação a uma ou mais modalidades. Entretanto, estará claro para os versados na técnica que um número de variações e modificações podem ser feitas sem abandonar o escopo da invenção como definido nas reivindicações.

LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

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

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., e Edelstein, S.J. (1996) *Protein methods (2ª edição)*. Wiley-Liss, Nova Iorque, USA.

Bligh, E.G., & Dyer, W.J. *Can. J. Med. Sci.* **37**, 911 a 917

(1959).

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

Chen Z, Aspelund A, Jin H. 2008 Stabilizing the glycosylation pattern of influenza B hemagglutinin following adaptation to growth in eggs.Vaccine vol 26 p 361 a 371.

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

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

Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. Methods 2006; 40: 60 a 65.

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

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

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

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

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

Agrobacterium transformation. *Nucleic Acid Res.* 16, 9877 (1988).

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

Horimoto T., Kawaoka Y. Strategies for developing vaccines against h5N1 influenza a viruses. Trends in Mol. Med. 2006; 12(11): 506 a 514.

Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. Vaccine. 7 de março de 2005; 23(15):1851 a 1858.

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

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

Lefebvre, B. *e outros, Plant Physiol.* **144**, 402 a 418 (2007).

Leutwiler LS e outros, 1986. Nucleic Acid Sresearch 14910): 4051 a 4064.

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

Macala, L.J., Yo, R.K. & Ando, S. *J Lipid Res.* **24**, 1243 a 1250 (1983).

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

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

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA e outros. Lipid rafts in higher plant cells. The Journal of Biological Chemistry 2004; 279(35): 36277 a 36286.

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

Nayak DP, Reichl U. (2004) Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. J Virol Methods 122(1):9 a 15.

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

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

Rowe, T. e outros, 1999. Detection of antibody to avian influenza a (h5N1) virus in human serum by using a cmbiation of serologic assays. J. Clin Microbiol 37(4):937 a 943.

Saint-Jore-Dupas C e outros, 2007. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. Trends in Biotechnology 25(7) :317 a 323.

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

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

Stockhaus J e outros, 1989. Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1. Plant Cell. 1(8):805 a 813.

Suzuki, Y. (2005) Sialobiology of influenza. Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol. Pharm. Bull 28, 399 a 408.

Tsuji M., Cell. Mol. Life Sci., 63 (2006); 1889 a 1898.

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

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

WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Department of communicable disease surveillance and response. World Health Organisation Global Influenza Program. 2002.

Skehel JJ e Wildy DC Ann Rev Biochem 2000 69:531 a 569.

Vaccaro L e outros, 2005. Biophysical J. 88: 25 a 36.

Gamblin, S.J., Haire, L.F., Russell, R.J., Stevens, ., D.J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, NSteinhauer, D.A., Daniels, R.S., Elliot, A., Wiley, D.C., Skehel, J.J. (2004) The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science 303: 1838 a 1842.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos codificando uma hemaglutinina do vírus de influenza (HA) e uma região regulatória do Vírus do Mosaico do feijão de corda (CPMV) que é operativa em uma planta, em que a sequência nucleotídica que codifica a hemaglutinina de influenza (HA) consiste na sequência nucleotídica como definida na SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 127, nucleotídeos 85 a 1782 de SEQ ID NO: 36, nucleotídeos 85 a 1782 de SEQ ID NO: 37, nucleotídeos 85 a 1785 de SEQ ID NO: 38, nucleotídeos 85 a 1785 de SEQ ID NO: 39, nucleotídeos 85 a 1742 de SEQ ID NO: 40, nucleotídeos 85 a 1739 de SEQ ID NO: 41, nucleotídeos 85 a 1773 de SEQ ID NO: 42, nucleotídeos 85 a 1788 de SEQ ID NO: 43, nucleotídeos 85 a 1791 de SEQ ID. NO: 44, nucleotídeos 85 a 1785 de SEQ ID NO: 45, nucleotídeos 85 a 1797 de SEQ ID NO: 46 ou nucleotídeos 85 a 1767 de SEQ ID NO: 47.

2. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o HA compreende um peptídeo sinal nativo ou não nativo.

3. Ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo sinal não nativo é um peptídeo sinal da proteína dissulfeto isomerase.

4. Ácido nucleico, de acordo qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a HA é uma influenza tipo A, uma influenza tipo B, ou é um subtipo de influenza tipo A selecionado a partir do grupo que consiste em H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9,

H10, H11, H12, H13, H14, H15 e H16, preferencialmente H1, H2, H3, H5, H6, H7 e H9.

5. Método para produzir partículas semelhantes a vírus (VLPs) em uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) introduzir o ácido nucleico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, na planta, ou parte da planta, ou

(b) fornecer uma planta, ou uma parte de uma planta, compreendendo o ácido nucleico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e

(c) incubar a planta ou parte da planta sob condições que permitam a expressão do ácido nucleico, produzindo desse modo as VLPs e opcionalmente

(d) colher a planta e purificar as VLPs.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que na etapa (a), o ácido nucleico é:

(a) transientemente expresso na planta; ou

(b) estavelmente expresso na planta.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que na etapa (a), um segundo ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando uma ou mais proteínas chaperonas é introduzido na planta, preferencialmente a uma ou mais proteínas chaperonas são selecionadas a partir do grupo que consiste em Hsp40 e Hsp70.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que a VLP varia em tamanho de 80 a 300 nm.

9. Partícula semelhante a vírus (VLP), caracterizada pelo fato de que é produzida pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, em que a referida VLP compreende uma proteína hemaglutinina (HA) do vírus influenza, cuja VLP varia em

tamanho de 80 a 300 nm e

(a) um ou mais de um lipídeo derivado de uma planta; ou

(b) N-glicanos específicos de plantas ou N-glicanos modificados.

10. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma dose eficaz da VLP, como definida na reivindicação 9, para induzir a imunidade a um vírus influenza em um indivíduo e um veículo farmaceuticamente aceitável.

11. Uso de uma partícula semelhante a vírus (VLP), como definida na reivindicação 9, ou composição, como definida na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de um medicamento para induzir a imunidade a uma infecção por vírus influenza.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o medicamento é preparado para administração por via oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea.

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAA
AAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTA
CTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGA
GTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCT
CTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAA
AACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTG
TACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGT
AAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAG
TCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAA
ACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATT
AGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATA
GAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATAT
TAATCCCTCCAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGG
AGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAA
TCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATC
TAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTT
ATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAA
*ACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA*ATGGC
GAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCT
CAGATCT

GAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTT
AATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGT
ATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAA
TGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATAT
TTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGC
TCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTC
ATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAAT
GATAGTACA

Fig. 1A

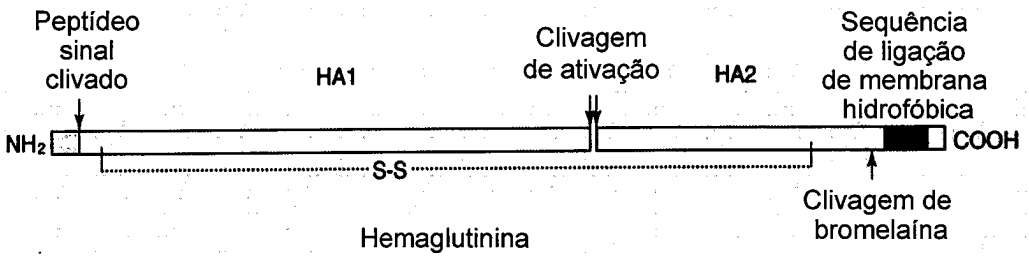

Peptídeo sinal clivado
HA1
Clivagem de ativação
HA2
Sequência de ligação de membrana hidrofóbica
NH2
COOH
S-S
Clivagem de bromelaína
Hemaglutinina

Fig. 1B

Fig. 2A

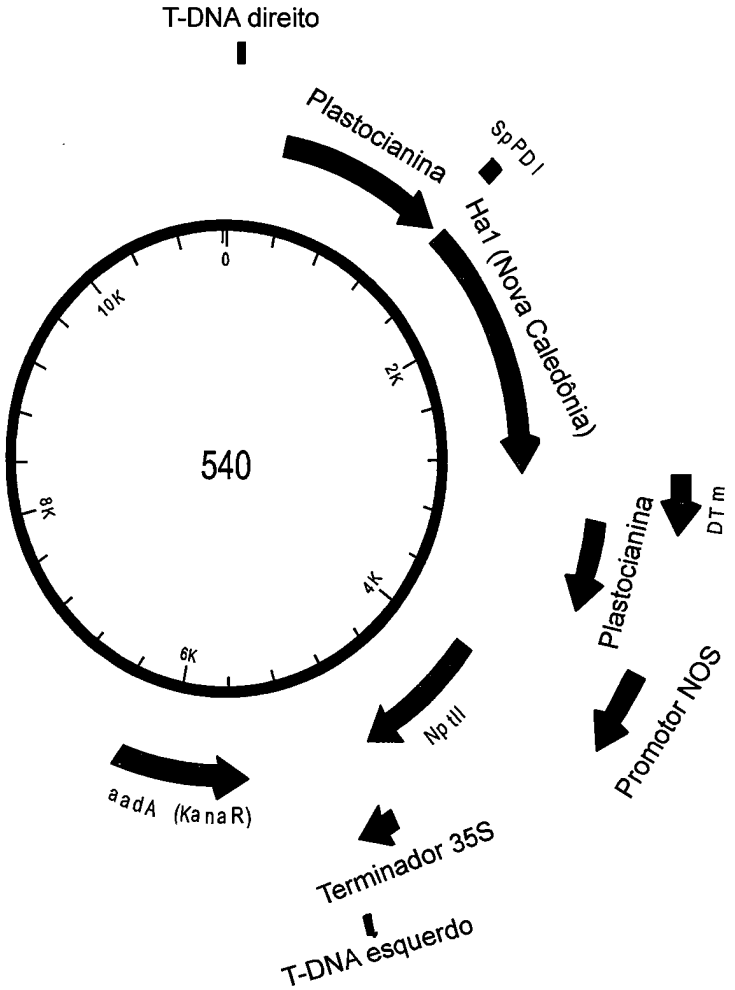

T-DNA direito
Plastocianina
SpPDI
Ha1 (Nova Caledônia)
0
2K
4K
6K
8K
10K
540
Plastocianina
DTm
Promotor NOS
NptII
aadA (KanaR)
Terminador 35S
T-DNA esquerdo

Fig. 2B

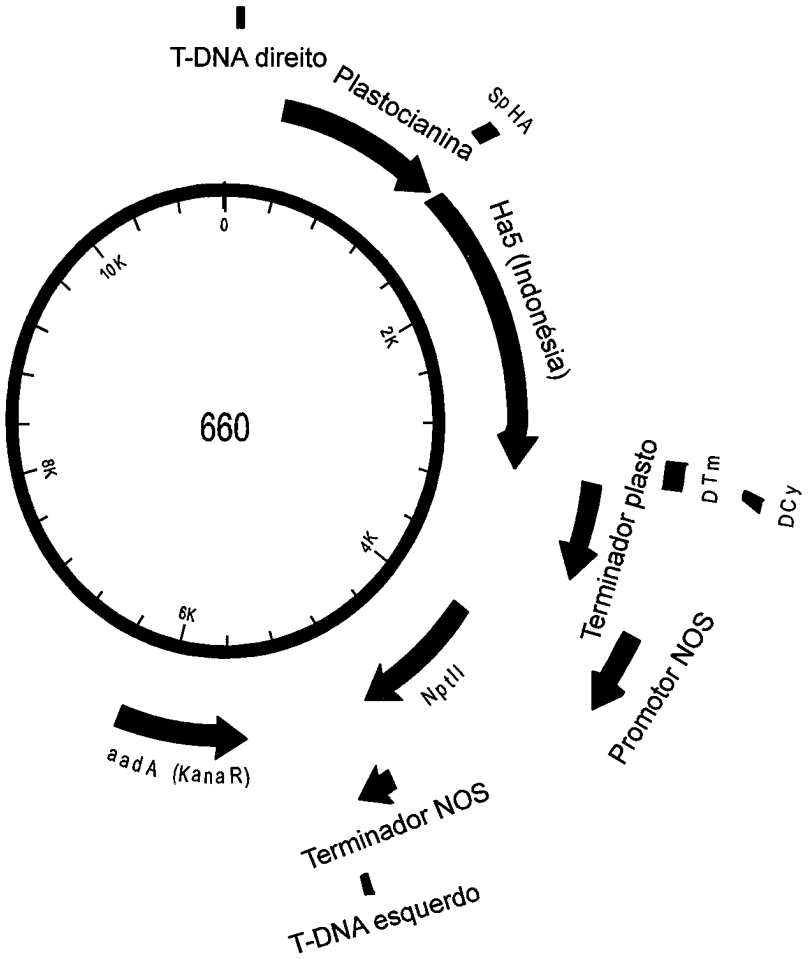

T-DNA direito
Plastocianina
Sp HA
Ha5 (Indonésia)
Terminador plasto
DTm
DCy
Promotor NOS
NptII
aadA (KanaR)
Terminador NOS
T-DNA esquerdo
660
0
2K
4K
6K
8K
10K

Fig. 3A

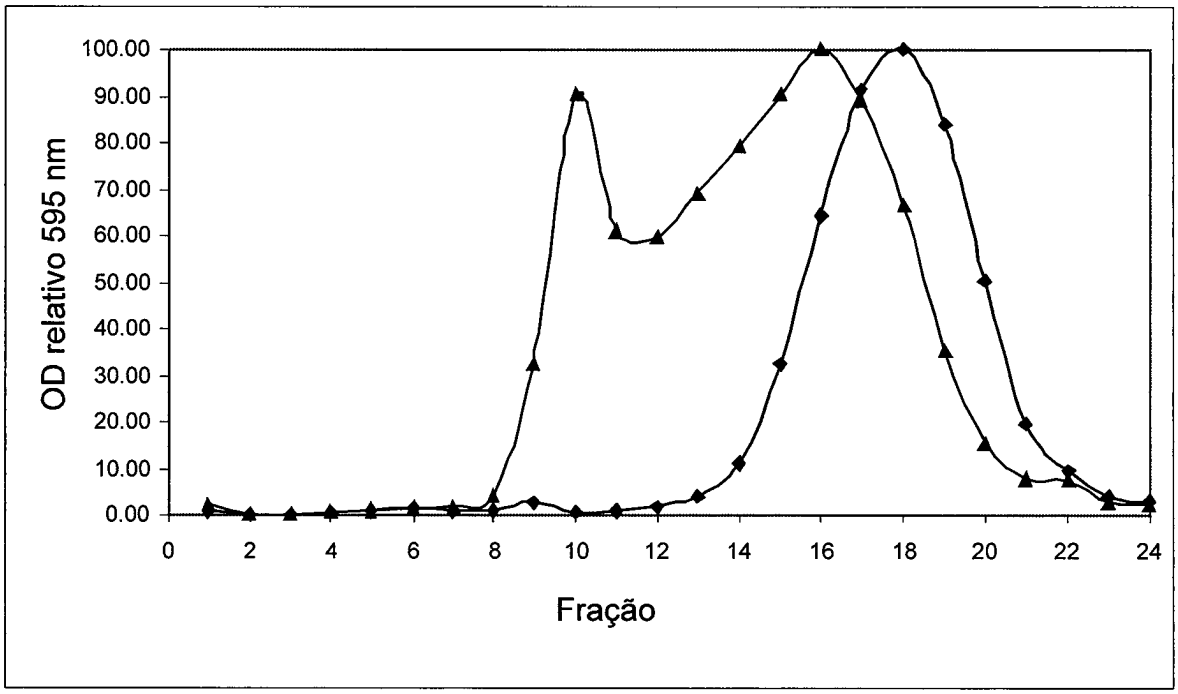

OD relativo 595 nm
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Fração

Fig. 3B

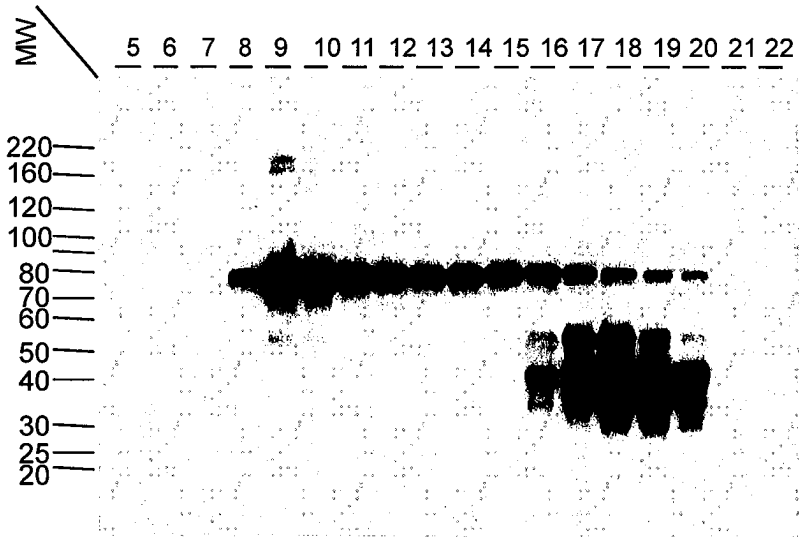

MW
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
220
160
120
100
80
70
60
50
40
30
25
20

Fig. 3C

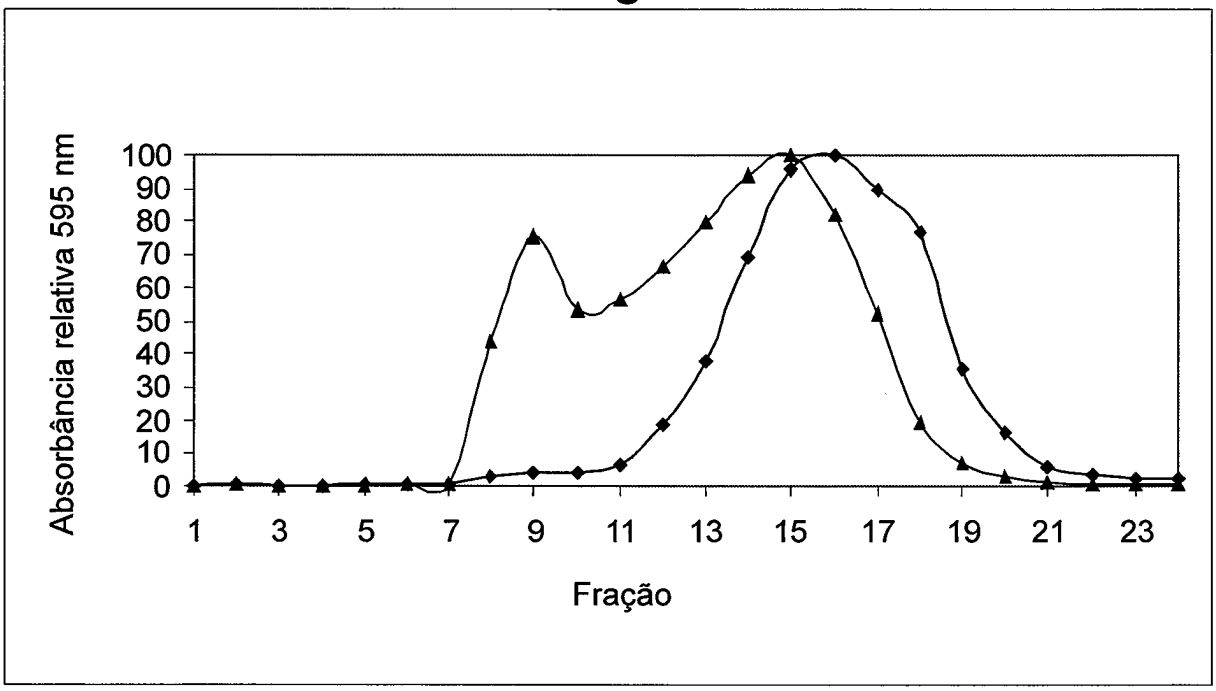

Absorbância relativa 595 nm
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
Fração

Fig. 3D

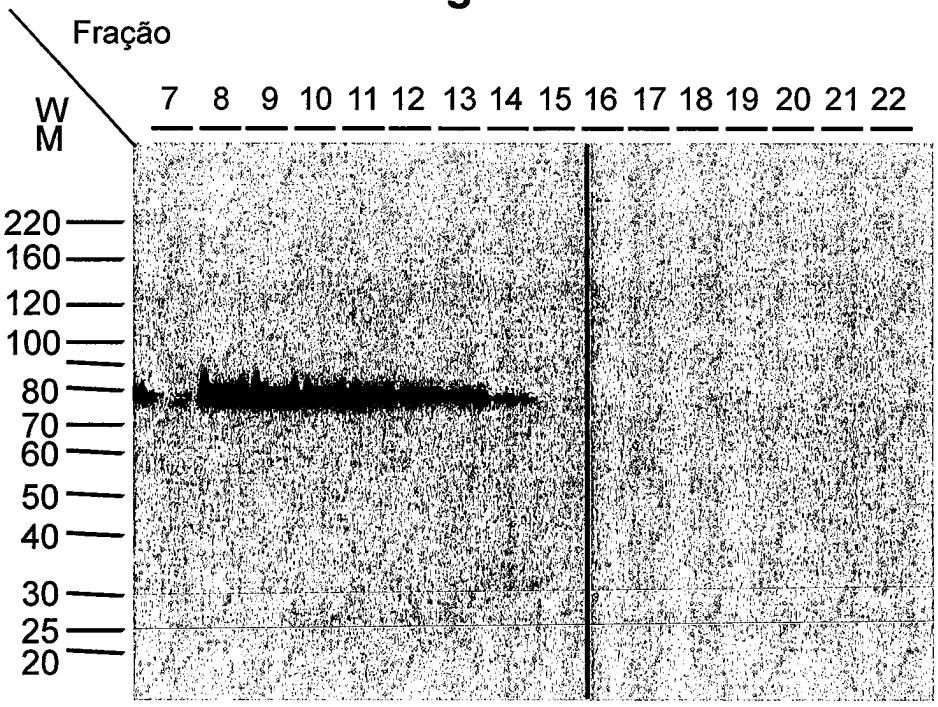

Fração
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
W
M
220
160
120
100
80
70
60
50
40
30
25
20

Fig. 4A

SEQ ID NO.1

AGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAGTAC
TTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATGGAAAACTATGTCT
ACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGA
ATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAATCCTGAGAATGGAACA
TGTTACCCAGGGTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAG
AGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGC
TCCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCA
AACCTGAGCAAGTCCTATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCG
CCTAACATAGGGAACCAAAGGGCACTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATT
ATAGCAGAAGATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACT
ACTACTGGACTCTGCTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCAT
GGTATGCTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACCAATGGATGAAT
GTGATGCGAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAATGTACACCCAG
TCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACA
TCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAA
TGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAA
GTACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATT
CACAGCTGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTAAATAAAAAAGTTGATGAT
GGGTTTCTAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATT
TCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAAT
AGGAAACGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGTAC
CTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAA
TCAATGGGAGTATAC**TAA**GAGCTCAGGCCT

Fig. 4B

SEQ ID NO. 2

GGTACCTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAAT
TGGAATCAATGGGAGTATACCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCCTGGTTCTTTTGGT
CTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATC**TAA**GA
GCTCAGGCCT

Fig. 5

Ha0 de H1 **(SEQ ID NO:28)**

AGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACA
CAGTACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATG
GAAAACTATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGAT
GGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAG
AAACACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGA
GGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCAT
GGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTT
ACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATG
TAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTAACATAGGGA
ACCAAAGGGCACTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAG
AAGATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTA
CTACTGGACTCTGCTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGC
GCCATGGTATGCTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACC
AATGGATGAATGTGATGCGAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTT
CCAGAATGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAG
GATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGC
CGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGA
ATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAACGGGATTA
CAAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAAGAGT
TCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACAT
TTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGAC
TCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAATAG
GAAACGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATG
GTACCTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAG
TGAAATTGGAATCAATGGGAGTATAC CAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCC
TGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGT
GTAGAATATGCATC **TAA**GAGCTCAGGCCT

Fig. 6

SEQ ID NO. 3

AAGCTTATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGG
TTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCC
CAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTA
AGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAA
TGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTAT
GAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTG
GTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGA
AATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCA
AGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCA
AAACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACT
AGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAA
TCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTC
AGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATA
AACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAA
ACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGAC
TATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACC
ACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGA
GTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTA
ATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTA
TAATGCCGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAAC
CTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTC
TATCACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACTATCCGCAGTATTCAG
AAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACT
GTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATG
TGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA GAGCTC

Fig. 7A

SEQ ID NO. 4

5'-GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTC -3'

Fig. 7B

SEQ ID NO. 5

5'-GCAAGAAGAAGCACTATTTTCTCCAT TTTCTCTCAAGATGATTA -3'

Fig. 7C

SEQ ID NO. 6

5'-TTAATCATCTTGAGAGAAA ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC -3'

Fig. 7D

SEQ ID NO. 7

5'-ACTTT**GAGCTC**TTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGA -3'

Fig. 8A

Sequência de peptídeo de HA1

MKAKLLVLLCTFTATYA DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDSHNGKLCLLKGIAPLQ
LGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPK
ESSWPNHTVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPPNI
GNQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWY
AFALSRGFGSGIITSNAPMDECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNI
PSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMN
TQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLK
NNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVA
SSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

Fig. 8B

Sequência de peptídeo de HA5

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLILR
DCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSS
WSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQ
TRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKI
VKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQR
ESRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDK
MNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRL
QLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYST
VASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI*

Fig. 9

Subtipo H7(SEQ ID NO:11)
>BHB940420|gb:AF071776| Símbolo: HA | Nome: hemaglutinina

Precursor | Organismo: vírus da Influenza A/galinha/Nova Iorque/1995 | Cromossomo: 4 | Subtipo: H7 | Hospedeiro: aviário

GACAAAATATGTCTTGGGCACCATGCTGTGGCAAATGGAACAAAAGTGAACACATTAACAGAGAGGGGGA
TTGAAGTAGTGAACGCCACAGAGACGGTGGAAACTGCGAATATCAAGAAAATATGTATTCAAGGGAAAAG
GCCAACAGATCTGGGACAATGTGGACTTCTAGGAACCCTAATAGGACCTCCCCAATGTGATCAATTCCTG
GAGTTTTACTCTGATTTGATAATTGAGCGAAGAGAAGGAACCGATGTGTGCTATCCCGGTAAATTCACAA
ATGAAGAATCACTGAGGCAGATCCTTCGAGGGTCAGGAGGAATTGATAAGGAGTCAATGGGTTTCACCTA
TAGTGGAATAAGAACCAATGGAGCGACAAGTGCCTGCAAAAGATCAGGTTCTTCTTTCTATGCAGAGATG
AAGTGGTTGCTGTCGAATTCAGACAATGCGGCATTCCCTCAAATGACAAAGTCGTATAGAAATCCCAGAA
ACAAACCAGCTCTGATAATTTGGGGAGTTCATCACTCTGGATCGGTTAGCGAGCAGACCAAACTCTATGG
AAGTGGAAACAAGTTGATAACAGTAGGAAGCTCAAAATACCAGCAATCATTCACCCCAAGTCCGGGAGCA
CGGCCACAAGTGAATGGACAATCAGGGAGAATCGATTTTCACTGGCTACTCCTTGATCCCAATGACACAG
TGACCTTCACTTTCAATGGGGCATTCATAGCCCCTGACAGGGCAAGTTTCTTTAGAGGAGAATCACTAGG
AGTCCAGAGTGATGTTCCTCTGGATTCTAGTTGTGGAGGGGATTGCTTTCACAGTGGGGGTACGATAGTC
AGTTCCCTGCCATTCCAAAACATCAACCCTAGAACTGTGGGGAGATGCCCTCGGTATGTCAAACAGACAA
GCCTCCTTTTGGCTACAGGAATGAGAAATGTTCCAGAGAATCCAAAGCCCAGAGGCCTTTTTGGAGCAAT
TGCTGGATTCATAGAGAATGGATGGGAGGGTCTCATCGATGGATGGTATGGTTTCAGACATCAAAATGCA
CAAGGGGAAGGAACTGCAGCTGACTACAAAAGCACCCAATCTGCAATAGATCAGATCACAGGCAAATTGA
ATCGTCTGATTGACAAAACAAATCAGCAGTTTGAGCTGATAGACAATGAGTTCAATGAGATAGAACAACA
AATAGGAAATGTCATTAATTGGACACGAGACGCAATGACTGAGGTATGGTCGTATAATGCTGAGCTGTTG
GTGGCAATGGAAAATCAGCATACAATAGATCTTGCGGACTCAGAAATGAACAAACTTTATGAGCGTGTCA
GAAAACAACTAAGGGAGAATGCTGAAGAAGATGGAACTGGATGTTTTGAGATATTCCATAAGTGTGATGA
TCAGTGCATGGAGAGCATAAGGAACAACACTTATGACCATACTCAATACAGAACAGAGTCATTGCAGAAT
AGAATACAGATAGACCCAGTGAAATTGAGTAGTGGATACAAAGACATAATCTTATGGTTTAGCTTCGGGG
CATCATGTTTTCTTCTTCTAGCCGTTGTAATGGGATTGGTTTTCATTTGCATAAAGAATGGAAACATGCG
GTGCACCATTTGTATATAA

Fig. 10A

Subtipo H2 (SEQ ID NO :12)

>gi|408516|gb|L11132.1|FLADE88HA Vírus da Influenza A tipo A (A/gaivota argêntea/ DE/677/88(H2N8)) gene de hemaglutinina (HA), cds completos

AGCAAAAGCAGGGGTTATACCATAGACAACCAAAGGCAAGACAATGGCCATCATTTATCTAATTCTTCTG
TTCACAGCAGTGAGAGGGGACCAAATATGCATTGGATACCATTCCAACAATTCCACAGAAAAGGTTGACA
CAATCCTAGAGAGAAATGTCACTGTGACTCACGCTGAGGACATTCTTGAGAAGACTCACAATGGGAAGTT
ATGCAAACTAAATGGAATCCCTCCACTTGAATTAAGGGATTGCAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGGAAT
CCAGAATGTGATATACTTCTAACTGTGCCAGAATGGTCATACATAATAGAAAAAGAAAATCCAAGGAACG
GCTTGTGCTACCCAGGCAGTTTCAATGATTATGAAGAATTGAAGCATCTTATCAGCAGCGTGACACATTT
TGAGAAAGTAAAGATTCTGCCCAGAAATGAATGGACACAGCATACAACAACTGGAGGTTCACAGGCTTGC
GCAGACTATGGTGGTCCGTCATTCTTCCGGAACATGGTCTGGTTGACAAAGAAAGGGTCGAATTATCCAA
TTGCCAAAAGATCTTACAACAATACAAGTGGGGAACAAATGCTGATCATTTGGGGGATACATCACCCCAA
TGATGAAAGTGAACAAAGAGCATTGTATCAGAATGTGGGGACCTATGTGTCAGTAGGAACATCAACACTG
AACAAAAGATCATCCCCAGAAATAGCAACAAGACCTAAAGTGAATGGACAAGGAGGCAGAATGGAATTCT
CGTGGACTATCTTAGATATATGGGACACAATAAATTTTGAGAGTACTGGCAATCTAATTGCACCAGAATA
TGGTTTCAAAATATCCAAACGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAGAAGGAAAACTTGAAAACTGCGAG
ACCAAGTGCCAAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTACCCTTTCACAATATCCACCCACTGACCA
TTGGTGAGTGCCCCAAATATGTAAAATCGGAAAGATTAGTCTTAGCAACAGGACTAAGAAACGTCCCTCA
GATTGAGTCAAGGGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAGGGTGGATGGCAAGGAATGGTTGAT
GGTTGGTATGGGTATCATCACAGCAATGACCAGGGATCTGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAA
AGGCAATTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATTCTGTGATCGAAAAGATGAACACCCAATTCGGAGCTGT
TGGAAAAGAATTCAGTAACTTGGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAATAAAAAGATGGAGGACGGATTTCTA
GATGTGTGGACATACAATGCCGAGCTCCTAGTTCTAATGGAAAATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATT
CTAATGTCAAGAATCTATATGATAAAGTCAGAATGCAACTGAGAGACAATGCAAAAGAACTAGGGAATGG
ATGTTTTGAATTTTATCACAAATGTGATGATGAATGCATGAACAGTGTGAAGAATGGGACATATGATTAT
TCCAAGTATGAAGAGGAGTCTAAACTAAACAGGACTGAAATCAAAGGGGTTAAATTGAGCAATATGGGGG
TTTATCAAATCCTTGCCATCTATGCTACAGTAGCAGGTTCCCTGTCACTGGCAATCATGATAGCTGGGAT
TTCTATATGGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAATGCAGAATCTGCATATGATCATCAGTCATTTTGTAA
TTAAAAACACCCTTGTTTCTACT

Fig. 10B

Subtipo H3(SEQ ID NO:13)

>BHB2107299|gb:EF473574| Símbolo: HA | Nome: hemaglutinina | Organismo: Vírus da Influenza tipo A de A/Texas/32/2003 | Segmento: 4 | Subtipo: H3 | Hospedeiro: Humano

CAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAA

CGATAGTGAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTACAGAGTTCCTC

AACAGGTGGAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTA

TTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCT

ACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCAC

ACTGGAGTTTAACAATGAAAGCTTCGATTGGACTGGAGTCACTCAGAATGGAACAAGCTCTGCTTGCAAA

AGGAGATCTAATAAAAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATACAAATACCCAGCAT

TGAACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCACCACCCGGGTAC

GGACAGTGACCAAATCAGCCTATATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAGAAGCCAA

CAAACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGGGTAAGGGATGTCTCCAGCCGAATAAGCATCTATT

GGACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTCGGGGTTA

CTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCCGAA

TGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCAAAATGTAAACAGGATCACATATGGGG

CCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACA

AACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGACGGTTGG

TACGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGGCACAGGA

Fig. 10C

Subtipo H4 (SEQ ID NO :14)

>BHB1050162|gb:DQ021859| Nome: hemaglutinina | Organismo: Vírus da Influenza A tipo A/mallard/MN/33/00 | Segmento: 4 | Subtipo: H3 | Hospedeiro: Aviário

ATGCTATCAATCACGATTCTGTTTCTGCTCATAGCAGAGGGTTCCTCTCAGAATTACACAGGGAATCCCG
TGATATGCCTGGGACATCATGCCGTATCCAATGGGACAATGGTGAAAACCCTGACTGATGACCAAGTAGA
AGTTGTCACTGCCCAAGAATTAGTGGAATCGCAACATCTACCGGAGTTGTGTCCTAGCCCTTTAAGATTA
GTAGATGGACAAACTTGTGACATCGTCAATGGTGCCTTGGGGAGTCCAGGCTGTGATCACTTGAATGGTG
CAGAATGGGATGTCTTCATAGAACGACCCACTGCTGTGGACACTTGTTATCCATTTGATGTGCCGGATTA
CCAGAGCCTACGGAGTATCCTAGCAAACAATGGGAAATTTGAGTTCATTGCTGAGGAATTCCAATGGAAC
ACAGTCAAACAAAATGGGAAATCCGGAGCATGCAAAAGAGCAAATGTGAATGACTTTTTCAACAGATTGA
ACTGGCTGACCAAATCTGATGGGAATGCATACCCACTTCAAAACCTGACAAAGGTTAACAACGGGGACTA
TGCAAGACTTTACATATGGGGAGTTCATCATCCTTCAACTGACACAGAACAAACCAACTTGTATAAGAAC
AACCCTGGGAGAGTAACTGTTTCCACCAAAACCAGTCAAACAAGTGTGGTACCAAACATTGGCAGTAGAC
CATGGGTAAGAGGCCAAAGCGGCAGGATTAGCTTCTATTGGACAATTGTGGAGCCAGGAGACCTCATAGT
CTTCAACACCATAGGGAATTTAATTGCTCCGAGAGGTCATTACAAGCTTAACAGTCAAAAGAAGAGCACA
ATTCTGAATACTGCAATTCCCATAGGATCTTGTGTTAGTAAATGTCACACAGATAGGGGTTCAATCTCTA
CAACCAAACCCTTTCAGAACATCTCAAGAATATCAATTGGGGACTGTCCCAAGTATGTCAAACAGGGATC
CTTGAAACTAGCTACAGGAATGAGGAATATCCCTGAGAAAGCAACCAGAGGCCTGTTTGGTGCAATTG

Fig. 10D

Subtipo H5 (SEQ ID NO :15)

>BHB950029|gb:AF501235| Símbolo: HA | Nome: hemaglutinina | Organismo: Vírus da Influenza tipo A de A/pato/Shanghai/1/2000 | Segmento: 4 | Subtipo: H5 | Hospedeiro: Aviário

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACC
ATGCAAACAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGA
CATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAACTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGAT
TGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCTATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTT
ACATAGTGGAGAAGGCCAGTCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAACGACTATGAAGAACT
GAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCACTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAAT
CATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCGCAGCATGTCCATACCATGGGAAGCCCTCCTTTTTCAGAAATGTGG
TATGGCTTATCAAAAAGAACAGTGCATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA
TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCA
ACCACCTATATTTCCGTTGGAACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTCCCAAAAATAGCTACTAGATCCA
AAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGAATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATGCCATAAATTT
CGAGAGTAATGGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATT
ATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCTA
GTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACAATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATT
AGTCCTTGCGACTGGACTCAGAAATACCCCTCAAAGAGATAGAAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGA
GCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAAGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCA
ATGAGCAGGGGAGTGGATACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAA
GGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAA
AGGAGGATAGAAAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAAC
TTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGATTCAAATGTCAAGAACCTTTACAACAA
GGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAATGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGT
GATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAAAAACGGGACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGAC
TAAACAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATGGGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTC
AACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGG
TCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

Fig. 10E

Subtipo H6 (SEQ ID NO :16)

>BHB1049778|gb:DQ021667| Símbolo: HA | Nome: hemaglutinina | Organismo: Vírus da Influenza tipo A de A /marreca-arrebio/TX/828189/02 | Segmento: 4 | Subtipo: H6 | Hospedeiro: Aviário

ATGATTGCAATCATTGTAATAGCGATACTGGCAGCAGCCGGAAAGTCAGACAAGATCTGCATTGGGTATC
ATGCCAACAATTCAACAACACAGGTGGATACGATACTTGAGAAGAATGTAACCGTCACACACTCAGTTGA
ATTGCTGGAGAATCAGAAGGAAGAAAGATTCTGCAAGATCTTGAACAAGGCCCCTCTCGACCTAAAGGGA
TGCACCATAGAGGGTTGGATCTTGGGGAATCCCCAATGCGATCTGTTGCTTGGTGACCAAAGCTGGTCAT
ATATAGTGGAAAGACCTACTGCCCAAAATGGGATATGCTACCCAGGAGCTTTGAATGAGGTAGAAGAACT
GAAAGCATTTATCGGATCAGGAGAAAGGGTAGAGAGATTTGAGATGTTTCCCAAAAGCACATGGGCAGGG
GTAGACACCAGCAGTGGGGTAACAAAAGCTTGTCCTTATAATAGTGGTTCATCTTTCTACAGAAACCTCC
TATGGATAATAAAGACCAAGTCAGCAGCGTATCCAGTAATTAAGGGAACTTACAGCAACACTGGAAACCA
GCCAATCCTCTATTTCTGGGGTGTGCACCATCCTCCTGACACCAATGAGCAAAATACTCTGTATGGCTCT
GGCGATCGGTATGTTAGGATGGGAACTGAGAGCATGAATTTTGCCAAGAGCCCAGAAATTGCGGCAAGAC
CCGCTGTGAATGGCCAAAGAGGTCGAATTGATTATTACTGGTCTGTTTTAAAACCAGGAGAAACCTTGAA
TGTGGAATCTAATGGAAATCTAATCGCTCCTTGGTATGCATACAAATTTGTCAACACAAATAATAAGGGA
GCCGTCTTCAAGTCAAATTTACCAATCGAGAATTGCGATGCCACATGCCAGACTATTGCAGGAGTCCTAA
GGACCAATAAAACATTTCAGAATGTGAGCCCTCTGTGGATAGGAGAATGCCCCAAGTATGTGAAAAGTGA
AAGTCTAAGGCTTGCTACTGGACTAAGAAATGTTCCACAGATTGAAACCAGAGGGCTTTTCGGAGCTATC

Fig. 10F

Subtipo H8 (SEQ ID NO:17)

>gi|221317|dbj|D90304.1|FLAHAH8N4 Vírus da Influenza A
(A/peru/Ontário/6118/68 (H8N4)) gene para precursor de hemaglutinina, cds completos

ATGGAAAAATTCATCGCAATAGCAACCTTGGCGAGCACAAATGCATACGATAGGATATGCATTGGGTACC
AATCAAACAACTCCACAGACACAGTGAACACTCTCATAGAACAGAATGTACCAGTCACCCAAACAATGGA
GCTCGTGGAAACAGAGAAACATCCCGCTTATTGTAACACTGATTTAGGTGCCCCATTGGAACTGCGAGAC
TGCAAGATTGAGGCAGTAATCTATGGGAACCCCAAGTGTGACATCCATCTGAAGGATCAAGGTTGGTCAT
ACATAGTGGAGAGGCCCAGCGCACCAGAAGGGATGTGTTACCCTGGATCTGTGGAAAATCTAGAAGAACT
GAGGTTTGTCTTCTCCAGTGCTGCATCTTACAAGAGAATAAGACTATTTGACTATTCCAGGTGGAATGTG
ACTAGATCTGGAACGAGTAAAGCATGCAATGCATCAACAGGTGGCCAATCCTTCTATAGGAGCATCAATT
GGTTGACCAAAAAGGAACCAGACACTTATGACTTCAATGAAGGAGCTTATGTTAATAATGAAGATGGAGA
CATCATTTTCTTATGGGGGATCCATCATCCGCCGGACACAAAAGAGCAGACAACACTATATAAAAATGCA
AACACTTTGAGTAGTGTTACTACTAACACTATAAACAGAAGCTTTCAACCAAATATTGGTCCCAGACCAT
TAGTAAGAGGACAGCAAGGGAGGATGGATTACTATTGGGGCATTCTGAAAAGAGGGGAGACTCTGAAGAT
CAGGACCAACGGAAATTTAATCGCACCTGAATTTGGCTATCTGCTCAAAGGTGAAAGCTACGGCAGAATA
ATTCAAAATGAGGATATACCCATCGGGAACTGTAACACAAAATGTCAAACATATGCGGGAGCAATCAATA
GCAGCAAACCCTTTCAGAATGCAAGTAGGCATTACATGGGAGAATGTCCCAAATATGTGAAGAAGGCAAG
CTTGCGACTTGCAGTTGGGCTTAGGAATACGCCTTCTGTTGAACCCAGAGGACTGTTTGGAGCCATTGCT
GGTTTCATTGAAGGAGGATGGTCTGGAATGATTGATGGGTGGTATGGATTTCATCACAGCAATTCAGAGG
GAACAGGAATGGCAGCTGACCAGAAATCAACACAAGAAGCCATCGATAAGATCACCAATAAAGTCAACAA
TATAGTTGACAAGATGAACAGGGAGTTTGAAGTTGTGAATCATGAGTTCTCTGAAGTTGAAAAAAGAATA
AACATGATAAACGATAAAATAGATGACCAAATTGAAGATCTTTGGGCTTACAATGCAGAGCTCCTTGTGC
TCTTAGAGAACCAGAAAACGCTAGACGAACATGATTCCAATGTCAAAAACCTTTTTGATGAAGTGAAAAG
GAGACTGTCAGCCAATGCAATAGATGCTGGGAACGGTTGCTTTGACATACTTCACAAATGCGACAATGAG
TGTATGGAAACTATAAAGAACGGAACTTACGATCATAAGGAATATGAAGAGGAGGCTAAACTAGAAAGGA
GCAAGATAAATGGAGTAAAACTAGAAGAGAACACCACTTACAAAATTCTTAGCATTTACAGTACAGTGGC
GGCCAGTCTTTGCTTGGCAATCCTGATTGCTGGAGGTTTAATCCTGGGCATGCAAAATGGATCTTGTAGA
TGCATGTTCTGTATTTGA

Fig. 10G

Subtipo H9 (SEQ ID NO:18)

>BHB954830|gb:AM087218| Símbolo: HA | Nome: hemaglutinina | Organismo: Vírus da Influenza tipo A de A/marreca/Irã/G54/03 | Segmento: 4 | Subtipo: H9 | Hospedeiro: Aviário

ATGGAAACAGTATCACTAATGACTATACTACTAGTAGCAACAGCAAGCAATGCAGACAAAATCTGCATCG
GCCACCAGTCAACAAACTCCACAGAAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGTTCCTGTGACACATGC
CAAAGAATTGCTCCACACAGAGCACAATGGAATGCTGTGTGCAACAAATCTGGGACATCCCCTAATCTTA
GACACGTGCACTATTGAAGGACTGATCTATGGTAACCCTTCTTGTGACTTGCTGTTGGGAGGAAGAGAAT
GGTCCTACATCGTCGAAAGGTCATCAGCTGTAAATGGAACGTGTTACCCTGGGAATGTAGAGAACCTAGA
GGAACTCAGGACACTTTTTAGTTCCGCTAGTTCCTACCGAAGAATCCAAATCTTCCCAGACACAATCTGG
AATGTGACTTACACTGGAACAAGCAAAGCATGTTCAGATTCATTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTC
AAAAAAGCGGGTCTTACCCTGTTCAAGACGCTCAATACACAAATAATATGGGAAAGAGCATTCTTTTCGT
GTGGGGCATACATCACCCACCCACTGAAGCTGCACAGACAAATTTGTACACAAGAACCGACACAACAACA
AGCGTGACAACAGAAGACTTAAATAGGATCTTCAAACCGATGGTAGGGCCAAGGCCCCTTGTCAATGGTC
TGCAGGGAAGAATTAATTATTATTGGTCGGTACTAAAACCAGGCCAGACACTGCGAGTAAGATCCAATGG
GAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACATTCTTTCGGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGAT
TTAAAAAGTAGTAATTGCGTAGTGCAATGTCAGACTGAAAAAGGCGGCTTAAACAGTACATTGCCGTTCC
ACAATATCAGTAAATATGCATTTGGAAACTGTCCCAAATATGTTAGAGTTAAAAGTCTCAAACTGGCAGT
AGGGTTGAGGAACGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTCGGAGCCATAGCTGGATTCATAGAAGGA
GGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGTTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATTGCGG
CAGATAGGGATTCAACTCAAAAGGCAATTGATAGAATAACAACCAAGGTGAATAATATAGTCGACAAAAT
GAACAAACAATATGAAATAATTGATCATGAATTCAGTGAGGTTGAAACTAGGCTCAACATGATCAATAAT
AAGATTGATGACCAAATACAAGACATATGGGCATATAATGCAGAGTTGCTAGTACTACTTGAAAACCAGA
AAACACTCGATGAGCATGACGCAAATGTGAAGA

Fig. 10H

Subtipo H10 (SEQ ID NO :19)

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

AGCAAAAGCAGGGGTCACAATGTACAAAGTAGTAGTAATAATTGCGCTCCTTGGAGCAGTGAAAGGTCTT
GACAGAATCTGCCTAGGACACCATGCGGTTGCCAATGGAACCATTGTGAAGACCCTTACAAATGAACAAG
AGGAAGTGACCAATGCTACTGAGACGGTAGAGAGCACAAATTTGAATAAATTGTGTATGAAAGGAAGAAG
CTACAAGGACTTGGGCAATTGTCACCCGGTAGGAATGTTGATAGGAACACCTGTTTGTGATCCGCACTTG
ACCGGGACCTGGGACACTCTCATTGAGCGAGAGAATGCCATTGCCCACTGTTATCCAGGGGCAACCATAA
ATGAAGAAGCATTGAGGCAGAAAATAATGGAAAGTGGAGGAATCAGCAAGATGAGCACTGGCTTCACTTA
TGGGTCTTCCATCACCTCAGCTGGGACCACTAAGGCATGCATGAGAAATGGAGGAGATAGTTTCTATGCA
GAGCTCAAATGGCTAGTGTCAAAGACAAAGGGACAAAATTTCCCTCAGACAACAAACACCTATCGGAATA
CGGACACAGCAGAACATCTCATAATATGGGGAATTCATCACCCTTCCAGCACACAGGAAAAGAATGACTT
ATACGGAACTCAGTCACTATCTATATCAGTTGAGAGTTCTACATATCAGAACAACTTTGTTCCAGTTGTT
GGGGCAAGACCTCAGGTCAATGGACAAAGTGGGCGAATTGACTTTCACTGGACACTAGTACAGCCGGGTG
ACAACATAACCTTCTCAGACAATGGAGGTCTAATAGCACCAAGTCGAGTTAGCAAATTAACTGGAAGGGA
TTTGGGAATCCAATCAGAAGCGTTGATAGACAACAGTTGTGAATCCAAATGCTTTTGGAGAGGGGGTTCT
ATAAATACAAAGCTCCCTTTTCAAAATCTGTCACCCAGAACAGTAGGTCAATGCCCCAAATACGTAAATC
AGAGGAGTTTACTGCTTGCAACAGGGATGAGGAATGTGCCAGAAGTGGTGCAGGGAAGGGGTCTGTTTGG
TGCAATAGCAGGGTTCATAGAAAACGGATGGGAAGGAATGGTAGACGGCTGGTATGGTTTCAGACACCAA
AATGCCCAGGGCACAGGCCAAGCTGCTGATTACAAGAGTACTCAAGCAGCTATTGACCAAATCACAGGGA
AACTGAACAGGTTGATTGAGAAGACCAACACTGAGTTTGAGTCAATAGAATCTGAATTCAGTGAGACTGA
GCATCAAATTGGTAACGTCATTAATTGGACCAAAGATTCAATAACCGACATTTGGACTTACAACGCAGAG
CTATTAGTGGCAATGGAGAATCAGCACACAATTGACATGGCTGATTCAGAGATGCTAAATCTGTATGAAA
GGGTAAGAAAGCAACTCAGACAGAATGCAGAAGAAGACGGAAAGGGATGTTTTGAGATATATCATACTTG
TGATGATTCGTGCATGGAGAGTATAAGGAACAATACTTATGACCATTCACAATACAGAGAGGAGGCTCTT
CTGAATAGACTGAACATCAACCCAGTGAAACTTTCTTCGGGGTACAAAGACATCATACTTTGGTTTAGCT
TCGGGGAATCATGCTTTGTTCTTCTAGCCGTTGTTATGGGTCTTGTTTTCTTCTGCCTGAAAAATGGAAA
CATGCGATGCACAATCTGTATTTAGTTAAAAACACCTTGTTTCTACT

Fig. 10I

Subtipo H11(SEQ ID NO:20)

>gi|221307|dbj|D90306.1|FLAHAH11N Vírus da influenza A (A/pato/Inglaterra/56(H11N6)) gene para precursor de hemaglutinina, cds completos

ATGGAGAAAACACTGCTATTTGCAGCTATTTTCCTTTGTGTGAAAGCAGATGAGATCTGTATCGGGTATT
TAAGCAACAACTCGACAGACAAAGTTGACACAATAATTGAGAACAATGTCACGGTCACTAGCTCAGTGGA
ACTGGTTGAGACAGAACACACTGGATCATTCTGTTCAATCAATGGAAAACAACCAATAAGCCTTGGAGAT
TGTTCATTTGCTGGATGGATATTAGGAAACCCTATGTGTGATGAACTAATTGGAAAGACTTCATGGTCTT
ACATTGTGGAAAAACCCAATCCAACAAATGGAATCTGTTACCCAGGAACTTTAGAGAGTGAAGAAGAACT
AAGACTGAAATTCAGTGGAGTTTTAGAATTTAACAAATTCGAAGTATTCACATCAAATGGATGGGGTGCT
GTAAATTCAGGAGTAGGAGTAACCGCTGCATGCAAATTCGGGGGTTCTAATTCTTTCTTTCGAAACATGG
TATGGCTGATACACCAATCAGGAACATATCCTGTAATAAAGAGAACCTTTAACAACACCAAAGGGAGAGA
TGTACTGATTGTTTGGGGAATTCATCATCCTGCTACACTGACAGAACATCAAGATCTGTATAAAAAGGAC
AGCTCCTATGTAGCAGTGGGTTCAGAGACCTACAACAGAAGATTCACTCCAGAAATCAACACTAGGCCCA
GAGTCAATGGACAGGCCGGACGGATGACATTCTACTGGAAGATAGTCAAACCAGGAGAATCAATAACATT
CGAATCTAATGGGGCGTTCCTAGCTCCTAGATATGCTTTTGAGATTGTCTCTGTTGGAAATGGGAAACTG
TTCAGGAGCGAACTGAACATTGAATCATGCTCTACCAAATGTCAAACAGAAATAGGAGGAATTAATACGA
ACAAAAGCTTCCACAATGTTCACAGAAACACTATCGGGGATTGCCCCAAGTATGTGAATGTCAAATCCTT
AAAGCTTGCAACAGGACCTAGAAATGTCCCAGCAATAGCATCGAGAGGCTTGTTTGGAGCAATAGCTGGA
TTCATAGAAGGGGGATGGCCTGGACTGATCAATGGATGGTATGGGTTCCAACACAGGGACGAAGAAGGAA
CAGGCATTGCAGCAGACAAGGAGTCAACTCAAAAGGCAATAGACCAGATAACATCCAAGGTAAATAACAT
CGTTGACAGGATGAATACAAACTTTGAGTCTGTGCAACACGAATTCAGTGAAATAGAGGAAAGAATAAAT
CAATTATCAAAACACGTAGATGATTCTGTGGTTGACATCTGGTCATATAATGCACAGCTTCTCGTTTTAC
TTGAAAATGAGAAGACACTGGACCTCCATGACTCAAATGTCAGGAACCTCCATGAGAAAGTCAGAAGAAT
GCTAAAGGACAATGCCAAAGATGAGGGGAACGGATGCTTCACCTTTTACCATAAGTGTGACAATAAATGC
ATTGAACGAGTTAGAAACGGAACATATGATCATAAAGAATTCGAGGAGGAATCAAAAATCAATCGCCAGG
AGATTGAAGGGGTGAAACTAGATTCTAGTGGGAATGTGTATAAAATACTGTCAATTTACAGCTGCATTGC
AAGCAGTCTTGTATTGGCAGCACTCATCATGGGGTTCATGTTTTGGGCATGCAGTAATGGATCATGTAGA
TGTACCATTTGCATTTAG

Fig. 10J

Subtipo H12 (SEQ ID NO:21)

>gi|221309|dbj|D90307.1|FLAHAH12N Vírus da influenza A (A/pato/Alberta/60/76(H12N5)) gene para precursor de hemaglutinina, cds completos

ATGGAAAAATTCATCATTTTGAGTACTGTCTTGGCAGCAAGCTTTGCATATGACAAAATTTGCATTGGAT
ACCAAACAAACAACTCGACTGAAACGGTAAACACACTAAGTGAACAAAACGTTCCGGTGACGCAGGTGGA
AGAACTTGTACATCGTGGGATTGATCCGATCCTGTGTGGAACGGAACTAGGATCACCACTAGTGCTTGAT
GACTGTTCATTAGAGGGTCTAATCCTAGGCAATCCCAAATGTGATCTTTATTTGAATGGCAGGGAATGGT
CATACATAGTAGAGAGGCCCAAAGAGATGGAAGGAGTTTGCTATCCAGGGTCAATTGAAAACCAGGAAGA
GCTAAGATCTCTGTTTTCTTCCATCAAAAAATATGAAAGAGTGAAGATGTTTGATTTCACCAAATGGAAT
GTCACATACACTGGGACCAGCAAGGCCTGCAATAATACATCAAACCAAGGCTCATTCTATAGGAGCATGA
GATGGTTGACCTTAAAATCAGGACAATTTCCAGTCCAAACAGATGAGTACAAGAACACCAGAGATTCAGA
CATTGTATTCACCTGGGCCATTCACCACCCACCAACATCTGATGAACAAGTAAAATTATACAAAAATCCT
GATACTCTCTCTTCAGTCACCACCGTAGAAATCAATAGGAGCTTCAAGCCTAATATAGGGCCAAGACCAC
TCGTGAGAGGACAACAAGGGAGAATGGATTACTACTGGGCTGTTCTTAAACCTGGACAAACAGTCAAAAT
ACAAACCAATGGTAATCTTATTGCACCTGAATATGGTCACTTAATCACAGGGAAATCACATGGCAGGATA
CTCAAGAATAATTTGCCCATGGGACAGTGTGTGACTGAATGTCAATTGAACGAGGGTGTAATGAACACAA
GCAAACCTTTCCAGAACACTAGTAAGCACTATATTGGGAAATGCCCCAAATACATACCATCAGGGAGTTT
AAAATTGGCAATAGGGCTCAGGAATGTCCCACAAGTTCAAGATCGGGGGCTCTTTGGAGCAATTGCAGGT
TTCATAGAAGGCGGATGGCCAGGGCTAGTGGCTGGTTGGTACGGATTTCAGCATCAAAATGCGGAGGGGA
CAGGCATAGCTGCAGACAGAGACAGCACCCAAAGGGCAATAGACAATATGCAAAACAAACTCAACAATGT
CATCGACAAAATGAATAAACAATTTGAAGTGGTGAATCATGAGTTTTCAGAAGTGGAAAGCAGAATAAAC
ATGATTAATTCCAAAATTGATGATCAGATAACTGACATATGGGCATACAATGCTGAATTGCTTGTCCTAT
TGGAAAATCAGAAGACATTAGATGAGCATGACGCTAATGTAAGGAATCTACATGATCGGGTCAGAAGAGT
CCTGAGGGAAAATGCAATTGACACAGGAGACGGCTGCTTTGAGATTTTACATAAATGTGACAACAATTGT
ATGGACACGATTAGAAACGGGACATACAATCACAAAGAGTATGAGGAAGAAAGCAAAATCGAACGACAGA
AAGTCAATGGTGTGAAACTTGAGGAGAATTCTACATATAAAATTCTGAGCATCTACAGCAGTGTTGCCTC
AAGCTTAGTTCTACTGCTCATGATTATTGGGGGTTTCATTTTCGGGTGTCAAAATGGAAATGTTCGTTGT
ACTTTCTGTATTTAA

Fig. 10K

Subtipo H13(SEQ ID NO:22)

>gi|221311|dbj|D90308.1|FLAHAH13N Vírus da Influenza A (A/gaivota/Maryland/704/77 (H13N6)) gene para precursor de hemaglutinina, cds completos

ATGGCTCTAAATGTCATTGCAACTTTGACACTTATAAGTGTATGTGTACATGCAGACAGAATATGCGTGG
GGTATCTGAGCACCAATTCATCAGAAAGGGTCGACACGCTCCTTGAAAATGGGGTCCCAGTCACCAGCTC
CATTGATCTGATTGAGACAAACCACACAGGAACATACTGTTCTCTAAATGGAGTCAGTCCAGTGCATTTG
GGAGATTGCAGCTTTGAAGGATGGATTGTAGGAAACCCAGCCTGCACCAGCAACTTTGGGATCAGAGAGT
GGTCATACCTGATTGAGGACCCCGCGGCCCCTCATGGGCTTTGCTACCCTGGAGAATTAAACAACAATGG
TGAACTCAGACACTTGTTCAGTGGAATCAGGTCATTCAGTAGAACGGAATTGATCCCACCTACCTCCTGG
GGGGAAGTACTTGACGGTACAACATCTGCTTGCAGAGATAACACGGGAACCAACAGCTTCTATCGAAATT
TAGTTTGGTTTATAAAGAAGAATACTAGATATCCAGTTATCAGTAAGACCTACAACAATACAACGGGAAG
GGATGTTTTAGTTTTATGGGGAATACATCACCCAGTGTCTGTGGATGAGACAAAGACTCTGTATGTCAAT
AGTGATCCATACACACTGGTTTCCACCAAGTCTTGGAGCGAGAAATATAAACTAGAAACGGGAGTCCGAC
CTGGCTATAATGGACAGAGGAGCTGGATGAAAATTTATTGGTCTTTGATACATCCAGGGGAGATGATTAC
TTTCGAGAGTAATGGTGGATTTTTAGCCCCAAGATATGGGTACATAATTGAAGAATATGGAAAAGGAAGG
ATTTTCCAGAGTCGCATCAGAATGTCTAGGTGCAACACCAAGTGCCAGACTTCGGTTGGAGGGATAAACA
CAAACAGAACGTTCCAAAACATCGATAAGAATGCTCTTGGTGACTGTCCCAAATACATAAAGTCTGGCCA
ACTCAAGCTAGCCACTGGACTCAGAAATGTGCCAGCTATATCGAATAGAGGATTGTTCGGAGCAATTGCA
GGGTTCATAGAAGGAGGCTGGCCAGGTTTAATCAATGGTTGGTACGGTTTTCAGCATCAAAATGAACAGG
GAACAGGAATAGCTGCAGACAAAGAATCAACACAGAAAGCTATAGACCAGATAACAACCAAAATAAATAA
CATTATTGATAAAATGAATGGGAACTATGATTCAATTAGGGGTGAATTCAATCAAGTTGAGAAGCGTATA
AACATGCTTGCAGACAGAATAGATGATGCCGTGACGGACATTTGGTCATACAATGCCAAACTTCTTGTAT
TGCTGGAAAATGATAAAACTTTAGATATGCATGATGCTAATGTAAAGAATTTACATGAGCAAGTACGAAG
AGAATTGAAGGACAATGCAATTGACGAAGGAAATGGCTGTTTTGAACTCCTTCATAAATGCAATGACTCC
TGCATGGAAACTATAAGAAATGGAACGTATGACCACACTGAGTATGCAGAGGAGTCAAAGTTAAAGAGGC
AAGAAATCGATGGGATCAAACTCAAATCAGAAGACAACGTTTACAAAGCATTATCAATATACAGTTGCAT
TGCAAGTAGTGTTGTACTAGTAGGACTCATACTCTCTTTCATCATGTGGGCCTGTAGTAGTGGGAATTGC
CGATTCAATGTTTGTATATAA

Fig. 10L

Subtipo H14(SEQ ID NO:23)

>gi|324045|gb|M35997.1|FLAH1424 Influenza A /marreco canadense/Gurjev/263/82 gene de hemaglutinina subtipo H14

AGCAAAAGCAGGGGAAAATGATTGCACTCATATTGGTTGCACTGGCTCTGAGCCACACTGCTTATTCTCA
GATCACAAATGGGACAACAGGAAACCCCATTATATGCTTGGGGCATCATGCAGTGGAAAACGGCACATCT
GTTAAAACACTAACAGACAATCACGTAGAAGTTGTGTCAGCTAAAGAATTAGTTGAGACGAACCACACTG
ATGAACTGTGCCCAAGCCCCTTGAAGCTTGTCGACGGGCAAGACTGCCACCTCATCAATGGTGCATTGGG
GAGTCCAGGCTGTGACCGTTTGCAGGACACCACTTGGGATGTCTTCATTGAAAGGCCCACTGCAGTAGAC
ACATGTTATCCATTCGACGTCCCAGATTACCAGAGTCTCAGAAGCATCCTAGCAAGCAGTGGGAGTTTGG
AGTTCATCGCCGAACAATTCACCTGGAATGGTGTCAAAGTTGACGGATCAAGCAGTGCTTGTTTGAGGGG
CGGTCGCAACAGCTTCTTCTCCCGACTAAACTGGCTAACCAAAGCAACAAATGGAAACTATGGACCTATT
AACGTCACTAAAGAAAATACGGGCTCTTATGTCAGGCTCTATCTCTGGGGAGTGCATCACCCATCAAGCG
ATAATGAGCAAACGGATCTCTACAAGGTGGCAACAGGGAGAGTAACAGTATCTACCCGCTCGGACCAAAT
CAGTATTGTTCCCAATATAGGAAGTAGACCGAGGGTAAGGAATCAGAGCGGCAGGATAAGCATCTACTGG
ACCCTAGTAAACCCAGGGGACTCCATCATTTTCAACAGTATTGGGAATTTGATTGCACCAAGAGGCCACT
ACAAAATAAGCAAATCTACTAAGAGCACAGTGCTTAAAAGTGACAAAAGGATTGGGTCATGCACAAGCCC
TTGCTTAACTGATAAAGGTTCGATCCAAAGTGACAAACCTTTTCAGAATGTATCAAGGATTGCTATAGGA
AACTGCCCGAAATATGTAAAGCAAGGGTCCCTGATGTTAGCAACTGGAATGCGCAACATCCCTGGCAAAC
AGGCAAAGGGCTTATTTGGGGCAATTGCTGGATTCATTGAAAATGGTTGGCAAGGCCTGATTGATGGGTG
GTATGGATTCAGGCACCAAAATGCTGAAGGAACAGGAACTGCTGCAGACCTGAAGTCAACTCAGGCAGCC
ATTGATCAGATAAATGGCAAGCTGAACAGATTGATAGAGAAGACAAATGAAAAATATCACCAAATAGAAA
AGGAATTCGAACAGGTGGAAGGAAGAATACAAGACCTTGAGAAGTACGTTGAGGACACTAAGATTGATTT
GTGGTCATACAATGCTGAATTGCTAGTAGCACTAGAGAATCAGCACACAATAGATGTCACAGACTCCGAA
ATGAACAAGCTTTTTGAAAGAGTAAGAAGGCAATTAAGAGAGAATGCAGAAGATCAAGGCAACGGTTGTT
TCGAGATATTCCATCAGTGTGACAACAATTGTATAGAAAGCATTAGAAACGGAACTTATGACCACAACAT
CTACAGGGATGAAGCCATCAACAATCGAATCAAAATAAATCCTGTCACTTTGACGATGGGGTACAAGGAC
ATAATCCTGTGGATTTCTTTCTCCATGTCATGCTTTGTCTTCGTGGCACTGATTCTGGGATTTGTTCTAT
GGGCTTGTCAAAACGGGAATATCCGATGCCAAATCTGTATATAAAGAAAAAACACCCTTGTTTCTACTC

Fig. 10M

Subtipo H15 (SEQ ID NO:24)

>gi|1226068|gb|L43916.1|FLAHEMAC Influenza A/pato/Austrália/341/83 (H15N8) mRNA de hemaglutinina, cds completos

AGCAAAAGCAGGGGATACAAAATGAACACTCAAATCATCGTCATTCTAGTCCTCGGACTGTCGATGGTGA
GATCTGACAAGATTTGTCTCGGGCACCATGCCGTAGCAAATGGGACAAAAGTCAACACACTAACTGAGAA
AGGAGTGGAAGTGGTCAATGCCACGGAGACAGTGGAGATTACAGGAATAAATAAAGTGTGCACAAAAGGG
AAGAAAGCGGTGGACTTGGGATCTTGTGGAATACTGGGAACTATCATTGGGCCTCCACAATGTGACTCTC
ATCTTAAATTCAAAGCTGATCTGATAATAGAAAGAAGAAATTCAAGTGACATCTGTTACCCAGGGAAATT
CACTAATGAGGAAGCACTGAGACAAATAATCAGAGAATCTGGTGGAATTGACAAAGAGCCAATGGGATTT
AGATATTCAGGAATAAAAACAGACGGGGCAACCAGTGCGTGTAAGAGAACAGTGTCCTCTTTCTACTCAG
AAATGAAATGGCTTTTATCCAGCAAGGCTAACCAGGTGTTCCCACAACTGAATCAGACATACAGGAACAA
CAGAAAAGAACCAGCCCTAATTGTTTGGGGAGTACATCATTCAAGTTCCTTGGATGAGCAAAATAAGCTA
TATGGAGCTGGGAACAAGCTGATAACAGTAGGAAGCTCAAAATACCAACAATCGTTTTCACCAAGTCCAG
GGGACAGGCCCAAAGTGAATGGTCAGGCCGGGAGGATCGACTTTCATTGGATGCTATTGGACCCAGGGGA
TACAGTCACTTTTACCTTCAATGGTGCATTCATAGCCCCAGATAGAGCCACCTTTCTCCGCTCTAATGCC
CCATCGGGAGTTGAGTACAATGGGAAGTCACTGGGAATACAGAGTGATGCACAAATTGATGAATCATGTG
AAGGGGAATGCTTCTACAGTGGAGGGACAATAAACAGCCCTTTGCCATTTCAAAACATCGATAGTTGGGC
TGTCGGAAGGTGCCCCAGATATGTAAAGCAATCAAGCCTGCCGCTGGCCTTAGGAATGAAAAATGTACCA
GAGAAAATACATACTAGGGGACTGTTCGGTGCAATTGCAGGATTCATCGAGAATGGATGGGAAGGACTCA
TTGATGGATGGTATGGATTTAGGCATCAAAATGCACAGGGGCAGGGAACAGCTGCTGACTACAAGAGTAC
TCAGGCTGCAATTGACCAGATAACAGGGAAACTTAATAGATTAATTGAAAAAACCAACACACAGTTTGAA
CTCATAGACAATGAGTTCACTGAAGTGGAGCAGCAGATAGGCAATGTAATAAACTGGACAAGGGACTCCT
TGACTGAGATCTGGTCATACAATGCTGAACTTCTAGTAGCAATGGAAAATCAGCATACAATTGACCTTGC
AGATTCTGAAATGAACAAACTCTATGAGAGAGTGAGAAGACAGCTAAGGGAGAATGCCGAGGAGGATGGA
ACTGGATGTTTTGAGATTTTCCACCGATGTGACGATCAATGTATGGAGAGCATACGAAATAATACTTACA
ATCACACTGAATATCGACAGGAAGCCTTACAGAATAGGATAATGATCAATCCGGTAAAGCTTAGTGGTGG
GTACAAAGATGTGATACTATGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGTGTAATGCTTCTAGCCATTGCTATGGGT
CTTATTTTCATGTGTGTGAAAAACGGGAATCTGCGGTGCACTATCTGTATATAATTATTTGAAAAACACC
CTTGTTTCTACT

Fig. 10N

Subtipo H16(SEQ ID NO:25)

>gi|56425020|gb|AY684891.1| Vírus da Influenza A (A/gaivota de cabeça preta/Suécia/5/ 99 (H16N3)) gene de hemaglutinina (HA), cds completos

AGCAAAAGCAGGGGATATTGTCAAAACAACAGAATGGTGATCAAAGTGCTCTACTTTCTCATCGTATTGT
TAAGTAGGTATTCGAAAGCAGACAAAATATGCATAGGATATCTAAGCAACAACGCCACAGACACAGTAGA
CACACTGACAGAGAACGGAGTTCCAGTGACCAGCTCAGTTGATCTCGTTGAAACAAACCACACAGGAACA
TACTGCTCACTGAATGGAATCAGCCCAATTCATCTTGGTGACTGCAGCTTTGAGGGATGGATCGTAGGAA
ACCCTTCCTGTGCCACCAACATCAACATCAGAGAGTGGTCGTATCTAATTGAGGACCCCAATGCCCCCAA
CAAACTCTGCTTCCCAGGAGAGTTAGATAATAATGGAGAATTACGACATCTCTTCAGCGGAGTGAACTCT
TTTAGCAGAACAGAATTAATAAGTCCCAACAAATGGGGAGACATTCTGGATGGAGTCACCGCTTCTTGCC
GCGATAATGGGGCAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGGTCTGGATAGTGAAGAATAAAAATGGAAAATACCC
TGTCATAAAGGGGGATTACAATAACACAACAGGCAGAGATGTTCTAGTACTCTGGGGCATTCACCATCCG
GATACAGAAACAACAGCCATAAACTTGTACGCAAGCAAAAACCCCTACACATTAGTATCAACAAAGGAAT
GGAGCAAAAGATATGAACTAGAAATTGGCACCAGAATAGGTGATGGACAGAGAAGTTGGATGAAACTATA
TTGGCACCTCATGCGCCCTGGAGAGAGGATAATGTTTGAAAGCAACGGGGGCCTTATAGCGCCCAGATAC
GGATACATCATTGAGAAGTACGGTACAGGACGAATTTTCCAAAGTGGAGTGAGAATGGCCAAATGCAACA
CAAAGTGTCAAACATCATTAGGTGGGATAAACACCAACAAAACTTTCCAAAACATAGAGAGAAATGCTCT
TGGAGATTGCCCAAAGTACATAAAGTCTGGACAGCTGAAGCTTGCAACTGGGCTGAGAAATGTCCCATCC
GTTGGTGAAAGAGGTTTGTTTGGTGCAATTGCAGGCTTCATAGAAGGAGGGTGGCCTGGGCTAATTAATG
GATGGTATGGTTTCCAGCATCAGAATGAACAGGGGACTGGCATTGCTGCAGACAAAGCCTCCACTCAGAA
AGCGATAGATGAAATAACAACAAAAATTAACAATATAATAGAGAAGATGAACGGAAACTATGATTCAATA
AGAGGGGAATTCAATCAAGTAGAAAAGAGGATCAACATGCTCGCTGATCGAGTTGATGATGCAGTAACTG
ACATATGGTCGTACAATGCTAAACTTCTTGTACTGCTTGAAAATGGGAGAACATTGGACTTACACGACGC
AAATGTCAGGAACTTACACGATCAGGTCAAGAGAATATTGAAAAGTAATGCTATTGATGAAGGAGATGGT
TGCTTCAATCTTCTTCACAAATGTAATGACTCATGCATGGAAACTATTAGAAATGGGACCTACAATCATG
AAGATTACAGGGAAGAATCACAACTGAAAAGGCAGGAAATTGAGGGAATAAAATTGAAGTCTGAAGACAA
TGTGTATAAAGTACTGTCGATTTATAGCTGCATTGCAAGCAGTATTGTGCTGGTAGGTCTCATACTTGCG
TTCATAATGTGGGCATGCAGCAATGGAAATTGCCGGTTTAATGTTTGTATATAGTCGGAAAAAATACCCT
TGTTTCTACT

Fig. 10O

Influenza B (SEQ ID NO:26)

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

AGCAGAAGCGTTGCATTTTCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACAT
CCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACTCACCTCATGTGGTTAAAACTGCCACTCA
AGGGGAAGTCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAACAACACCTACCAAATCTCATTTTGCAAATCTC
AAAGGAACACAGACCAGAGGAAAACTATGCCCAAACTGTTTTAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCCTAG
GCAGACCAAAATGCATGGGGAACACACCCTCCGCAAAAGTCTCAATACTCCATGAAGTCAAACCTGCTAC
ATCTGGATGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGACAACTACCTAATCTTCTCAGAGGATAT
GAAAACATCAGGTTATCAACCAGTAATGTTATCAATACAGAGACGGCACCAGGAGGACCCTACAAGGTGG
GGACCTCAGGATCTTGCCCTAACGTTGCTAATGGGAACGGCTTCTTCAACACAATGGCTTGGGTTATCCC
AAAAGACAACAACAAGACAGCAATAAATCCAGTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTTCAGAAGGGGAA
GACCAAATTACTGTTTGGGGGTTCCACTCTGATGACAAAACCCAAATGGAAAGACTCTATGGAGACTCAA
ATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCCAATGGAGTAACCACACATTATGTTTCTCAGATTGGTGGCTTCCC
AAATCAAACAGAAGACGAAGGGCTAAAACAAAGCGGCAGAATTGTTGTTGATTACATGGTACAAAAACCT
GGAAAAACAGGAACAATTGTTTATCAAAGAGGCATTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGGTGCGCAAGTGGCA
GGAGCAAGGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAGTACGGTGG
ATTAAATAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAGCATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTG
AAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCGCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGAGGTT
TCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTGGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACAC
ATCTCATGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAACAAGATA
ACAAAAAAATCTCAACTATTTAAGTGAGCTAGAAGTAAAAAACCTTCAAAGACTAAGCGGAGCAATGAATG
AGCTTCACGACGAAATACTCGAGCTAGACGAAAAAGTGGATGATCTAAGAGCTGATACAATAAGCTCACA
AATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGGATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTCTTGGCACTT
GAAAGAAAACTGAAGAAAATGCTTGGCCCCTCTGCTGTAGAAATAGGGAATGGGTGCTTTGAAACCAAAC
ACAAATGCAACCAGACTTGCCTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGATTTTTCTCTTCC
CACTTTTGATTCATTAAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGCTTGGATAATCATACTATACTG
CTCTACTACTCAACTGCTGCTTCTAGCTTGGCTGTAACATTAATGATAGCTATCTTCATTGTCTACATGG
TCTCCAGAGACAATGTTTCTTGTTCCATCTGTCTGTGAGGGAGATTAAGCCCTGTGTTTTCCTTTACTGT
AGTGCTCATTTGCTTGTCACCATTACAAAGAAACGTTATTGAAAAATGCTCTTGTTACTACT

Fig. 10P

Influenza C (SEQ ID NO :27)

>gi|325317|gb|M17868.1|FLCHAJO Influenza C /Johannesburg/66 RNA esterase de hemaglutinina (seg 4), cds completos

AGCAGAAGCAGGGGGTTAATAATGTTTTTCTCATTACTCTTGGTGTTGGGCCTCACAGAGGCTGAAAAAA
TAAAGATATGCCTTCAAAAGCAAGTGAACAGTAGCTTCAGCCTACACAATGGCTTCGGAGGAAATTTGTA
TGCCACAGAAGAAAAAAGAATGTTTGAGCTTGTTAAGCCCAAAGCTGGAGCCTCTGTCTTGAATCAAAGT
ACATGGATTGGCTTTGGAGATTCAAGGACTGACAAAAGCAATTCAGCTTTTCCTAGGTCTGCTGATGTTT
CAGCAAAAACTGCTGATAAGTTTCGTTTTTTGTCTGGTGGATCCTTAATGTTGAGTATGTTTGGCCCACC
TGGGAAGGTAGACTACCTTTACCAAGGATGTGGAAAACATAAAGTTTTTTATGAAGGAGTTAACTGGAGT
CCACATGCTGCTATAAATTGTTACAGAAAAAATTGGACTGATATCAAACTGAATTTCCAGAAAAACATTT
ATGAATTGGCTTCACAATCACATTGCATGAGCTTGGTGAATGCCTTGGACAAAACTATTCCTTTACAAGT
GACTGCTGGGACTGCAGGAAATTGCAACAACAGCTTCTTAAAAAATCCAGCATTGTACACACAAGAAGTC
AAGCCTTCAGAAAACAAATGTGGGAAAGAAAATCTTGCTTTCTTCACACTTCCAACCCAATTTGGAACCT
ATGAGTGCAAACTGCATCTTGTGGCTTCTTGCTATTTCATCTATGATAGTAAAGAAGTGTACAATAAAAG
AGGATGTGACAACTACTTTCAAGTGATCTATGATTCATTTGGAAAAGTCGTTGGAGGACTAGATAACAGG
GTATCACCTTACACAGGGAATTCTGGAGACACCCCAACAATGCAATGTGACATGCTCCAGCTGAAACCTG
GAAGATATTCAGTAAGAAGCTCTCCAAGATTCCTTTTAATGCCTGAAAGAAGTTATTGCTTTGACATGAA
AGAAAAAGGACCAGTCACTGCTGTCCAATCCATTTGGGGAAAAGGCAGAGAATCTGACTATGCAGTGGAT
CAAGCTTGCTTGAGCACTCCAGGGTGCATGTTGATCCAAAAGCAAAAGCCATACATTGGAGAAGCTGATG
ATCACCATGGAGATCAAGAAATGAGGGAGTTGCTGTCAGGACTGGACTATGAAGCTAGATGCATATCACA
ATCAGGGTGGGTGAATGAAACCAGTCCTTTTACGGAGAAATACCTCCTTCCTCCCAAATTTGGAAGATGC
CCTTTGGCTGCAAAGGAAGAATCCATTCCAAAAATCCCAGATGGCCTTCTAATTCCCACCAGTGGAACCG
ATACCACTGTAACCAAACCTAAGAGCAGAATTTTTGGAATCGATGACCTCATTATTGGTGTGCTCTTTGT
TGCAATCGTTGAAACAGGAATTGGAGGCTATCTGCTTGGAAGTAGAAAAGAATCAGGAGGAGGTGTGACA
AAAGAATCAGCTGAAAAAGGGTTTGAGAAAATTGGAAATGACATACAAATTTTAAAATCTTCTATAAATA
TCGCAATAGAAAAACTAAATGACAGAATTTCTCATGATGAGCAAGCCATCAGAGATCTAACTTTAGAAAT
TGAAAATGCAAGATCTGAAGCTTTATTGGGAGAATTGGGAATAATAAGAGCCTTATTGGTAGGAAATATA
AGCATAGGATTACAGGAATCTTTATGGGAACTAGCTTCAGAAATAACAAATAGAGCAGGAGATCTAGCAG
TTGAAGTCTCCCCAGGTTGCTGGATAATTGACAATAACATTTGTGATCAAAGCTGTCAAAATTTTATTTT
CAAGTTCAACGAAACTGCACCTGTTCCAACCATTCCCCCTCTTGACACAAAAATTGATCTGCAATCAGAT
CCTTTTTACTGGGGAAGCAGCTTGGGCTTAGCAATAACTGCTACTATTTCATTGGCAGCTTTGGTGATCT
CTGGGATCGCCATCTGCAGAACTAAATGATTGAGACAATTTTGAAAAATGGATAATGTGTTGGTCAATAT
TTTGTACAGTTTTATAAAAAACAAAAATCCCCTTGCTACTGCT

Fig. 10Q

SEQ ID NO: 29

5'-AGTTC**CCCGGG**CTGGTATATTTATATGTTGTC-3'

Fig. 10 R

SEQ ID NO: 30

5'-AATA**GAGCTC**CATTTTCTCTCAAGATGATTAATTAATTAATTAGTC-3

Fig. 10S

SEQ ID NO: 31

5'-AATA**GAGCTC**GTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGG-3'

Fig. 10T

SEQ ID NO: 32

5'-TTAC**GAATTC**TCCTTCCTAATTGGTGTACTATCATTTATCAAAGGGGA-3'

Fig. 11

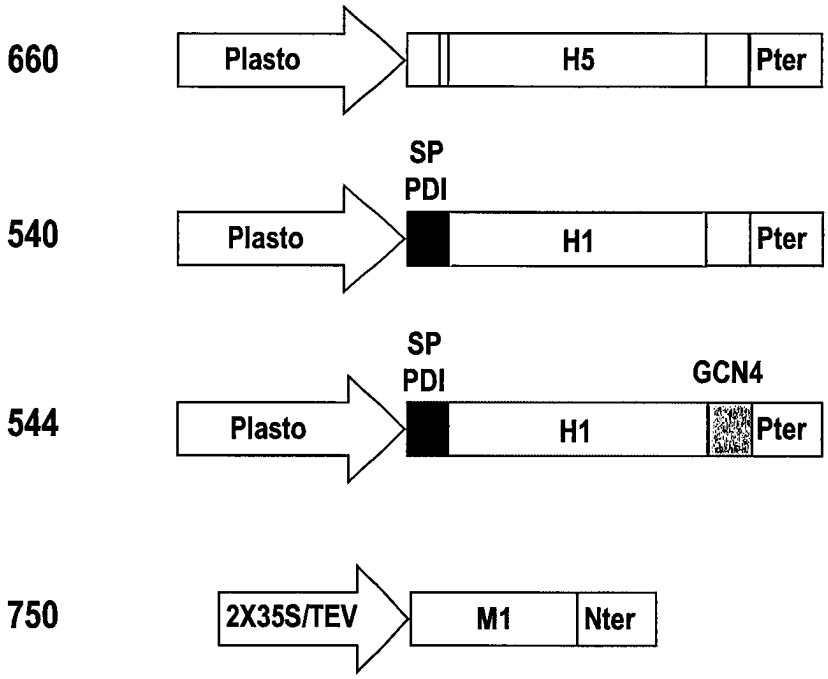
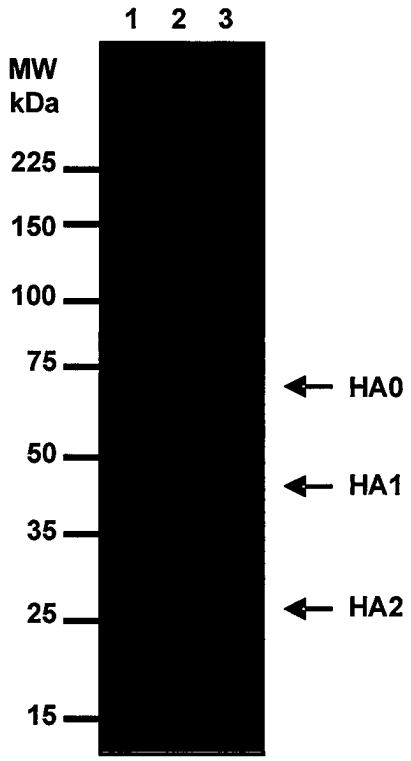

660
Plasto
H5
Pter
SP
PDI
540
Plasto
H1
Pter
SP
PDI
GCN4
544
Plasto
H1
Pter
750
2X35S/TEV
M1
Nter

Fig. 12



1 – H5 comercial (A/Vietnã/1203/2004) (750 ng)

2 – extrato de proteína de folha de mock (37,5 µg)

3 – extrato de proteína de folha de planta infiltrada com R660 (37,5 µg)

Fig. 13A

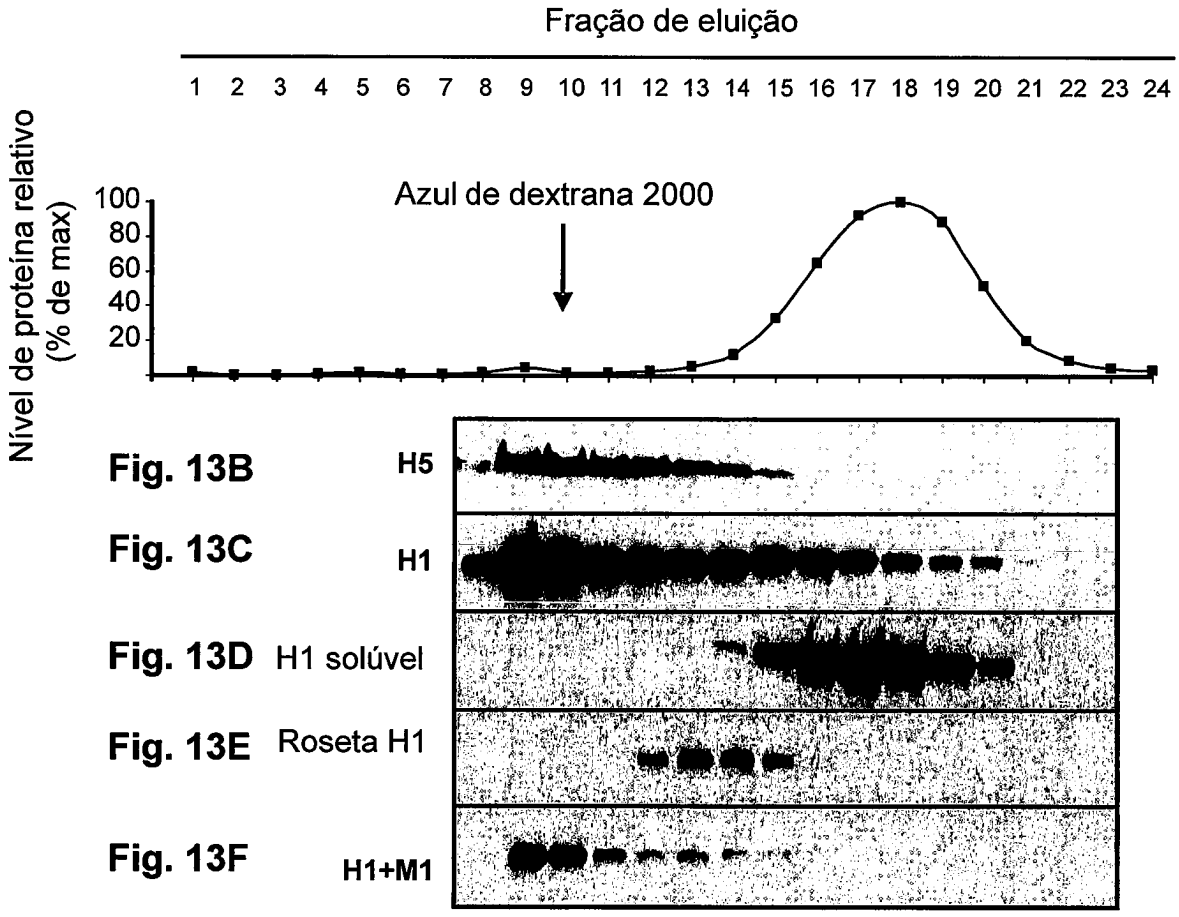


Fig. 13B

Fig. 13C

Fig. 13D

Fig. 13E

Fig. 13F

Fig.14A

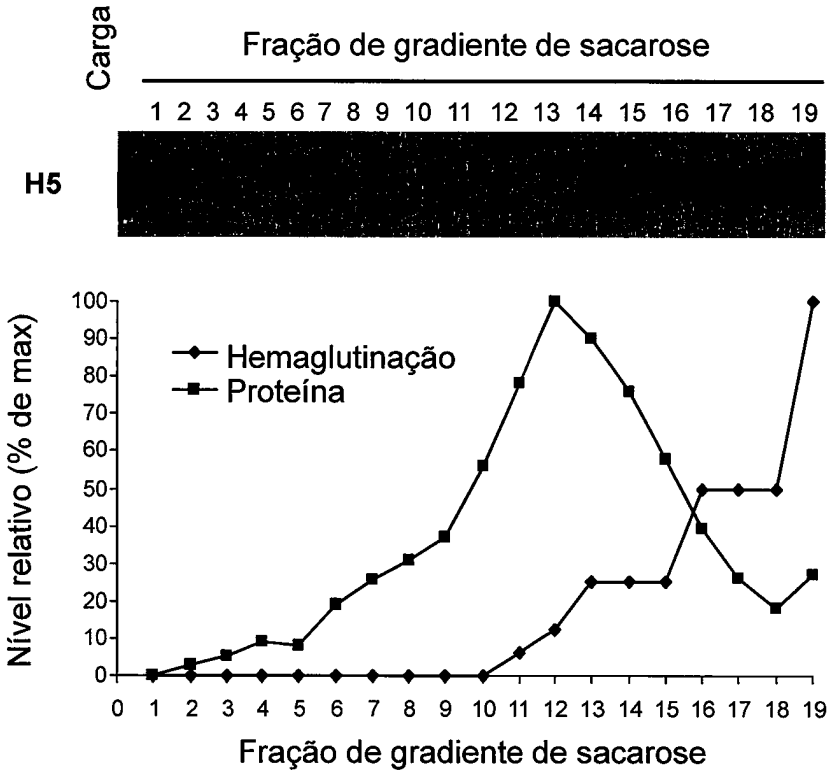


Fig. 14B

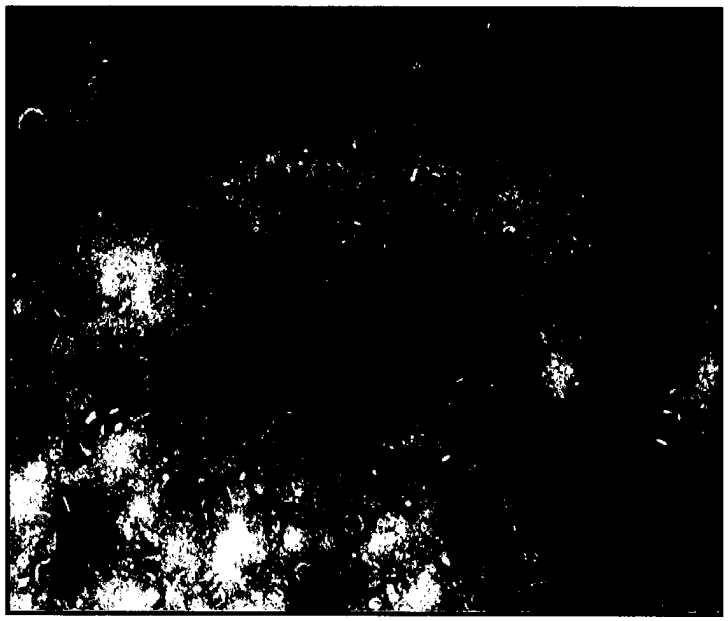


Fig. 15A

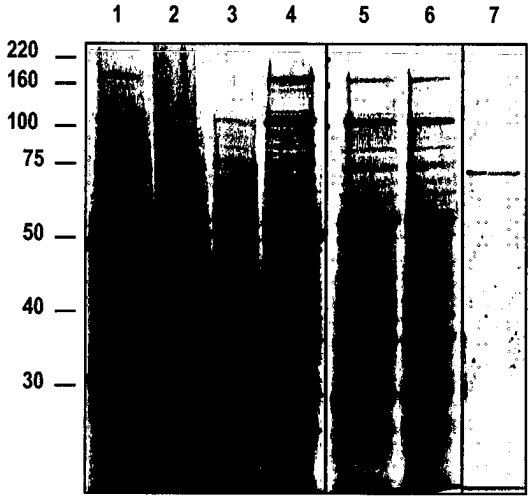


Fig. 15B

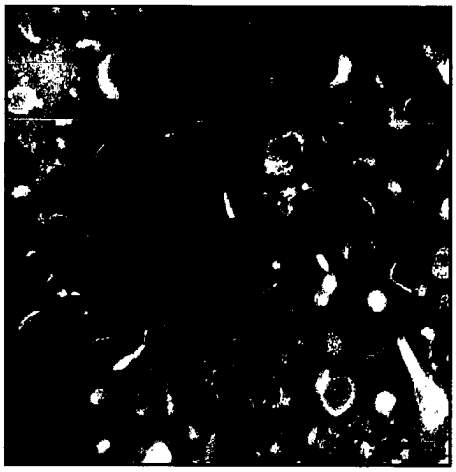


Fig. 15C

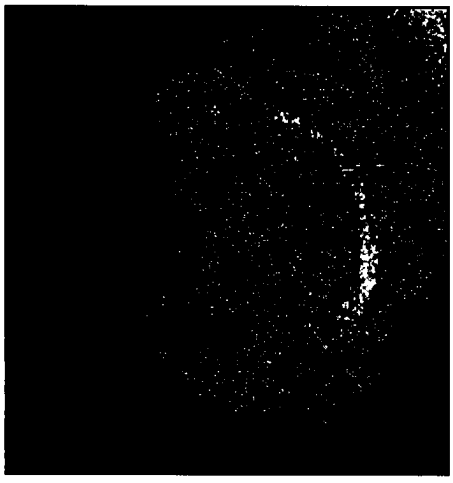


Fig. 15D

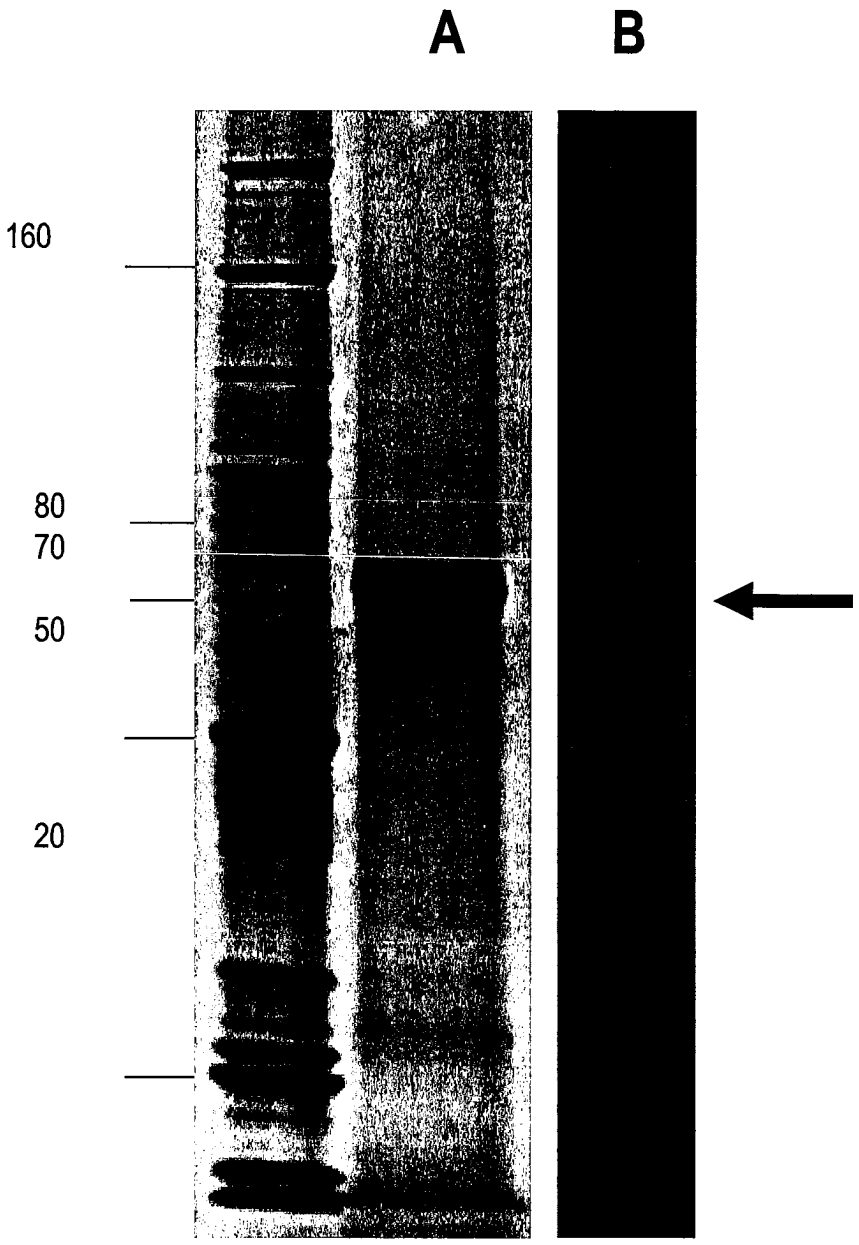


Fig. 16

SEQ ID NO: 33

ATGAAAGCAAAACTACTGGTCCTGTTATGTACATTTACAGCTACATATGCAGA
CACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAG
TACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGT
CACAATGGAAAACTATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAA
TTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTT
CCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAATCCTGAGAATGGAACA
TGTTACCCAGGGTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTC
AGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCA
ACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGAAAAGCAGT
TTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCT
GAGCAAGTCCTATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTG
TTCATCACCCGCCTAACATAGGGAACCAAAGGGCCCTCTATCATACAGAAAAT
GCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAGATTCACCCCAGAAAT
AGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTACTGGA
CTCTGCTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATA
GCGCCATGGTATGCTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAC
CTCAAATGCACCAATGGATGAATGTGATGCGAAGTGTCAAACACCTCAGGGAG
CTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAATGTACACCCAGTCACAATAGGAGAG
TGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAA
CATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTG
AAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAAT
GAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAA
CGGGATTACAAACAAGGTGAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCA
CAGCTGTGGGCAAAGAATTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTAAAT
AAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTT
GGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGA
ATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGA
AACGGGTGTTTTGAATTCTATCACAAGTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGT
GAAAAATGGAACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACA
GGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTG
GCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGC
AATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCT
GAGACCAGAATTTCA

Fig. 17

SEQ ID NO: 34

CCAAATCCTTAACATTCTTTCAACACCAACAATGGCGAAAAACGTTGCGATT
TTCGGTTTATTGTTTTCTCTTCTTCTGTTGGTTCCTTCTC**AGATCT**TCGCTG
AGGAATCATCAACTGACGCTAAGGAATTTGTTCTTACATTGGATAACACTAA
TTTCCATGACACTGTTAAGAAGCACGATTTCATCGTCGTTGAATTCTACGCA
CCTTGGTGTGGACACTGTAAGAAGCTAGCCCCAGAGTATGAGAAGGCTGCTT
CTATCTTGAGCACTCACGAGCCACCAGTTGTTTTGGCTAAAGTTGATGCCAA
TGAGGAGCACAACAAAGACCTCGCATCGGAAAATGATGTTAAGGGATTCCCA
ACCATTAAGATTTTTAGGAATGGTGGAAAGAACATTCAAGAATACAAAGGTC
CCCGTGAAGCTGAAGGTATTGTTGAGTATTTGAAAAAACAAAGTGGCCCTGC
ATCCACAGAAATTAAATCTGCTGATGATGCGACCGCTTTTGTTGGTGACAAC
AAAGTTGTTATTGTCGGAGTTTTCCCTAAATTTTCTGGTGAGGAGTACGATA
ACTTCATTGCATTAGCAGAGAAGTTGCGTTCTGACTATGACTTTGCTCACAC
TTTGAATGCCAAACACCTTCCAAAGGGAGACTCATCAGTGTCTGGGCCTGTG
GTTAGGTTATTTAAGCCATTTGACGAGCTCTTTGTTGACTCAAAGGATTTCA
ATGTAGAAGCTCTAGAGAAATTCATTGAAGAATCCAGTACCCCAATTGTGAC
TGTCTTCAACAATGAGCCTAGCAATCACCCTTTTGTTGTCAAATTCTTTAAC
TCTCCCAACGCAAAGGCTATGTTGTTCATCAACTTTACTACCGAAGGTGCTG
AATCTTTCAAAACAAAATACCATGAAGTGGCTGAGCAATACAAACAACAGGG
AGTTAGCTTTCTTGTTGGAGATGTTGAGTCTAGTCAAGGTGCCTTCCAGTAT
TTTGGACTGAAGGAAGAACAAGTACCTCTAATTATTATTCAGCATAATGATG
GCAAGAAGTTTTTCAAACCCAATTTGGAACTTGATCAACTCCCAACTTGGTT
GAAGGCATACAAGGATGGCAAGGTTGAACCATTTGTCAAGTCTGAACCTATT
CCTGAAACTAACAACGAGCCTGTTAAAGTGGTGGTTGGGCAAACTCTTGAGG
ACGTTGTTTTCAAGTCTGGGAAGAATGTTTTGATAGAGTTTTATGCTCCTTG
GTGTGGTCACTGCAAGCAGTTGGCTCCAATCTTGGATGAAGTTGCTGTCTCA
TTCCAAAGCGATGCTGATGTTGTTATTGCAAAACTGGATGCAACTGCCAACG
ATATCCCAACCGACACCTTTGATGTCCAAGGCTATCCAACCTTGTACTTCAG
GTCAGCAAGTGGAAAACTATCACAATACGACGGTGGTAGGACAAAGGAAGAC
ATCATAGAATTCATTGAAAAGAACAAGGATAAAACTGGTGCTGCTCATCAAG
AAGTAGAACAACCAAAAGCTGCTGCTCAGCCAGAAGCAGAACAACCAAAAGA
TGAGCTTTGAAAAGTTCCGCTTGGAGGATATCGGCACACAGTCATCTGCGGG
CTTTACAACTCTTTTGTATCTCAGAATCAGAAGTTAGGAAATCTTAGTGCCA
ATCTATCTATTTTTGCGTTTCATTTTATCTTTTTGGTTTACTCTAATGTATT
ACTGAATAATGTGAGTTTTGGCGGAGTTTAGTACTGGAACTTTTGTTTCTGT
AAAAAAAAAAAAA

Fig. 18

SEQ ID NO: 35

AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTAC
GTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTG
AAGATGTCTTTGCAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAA
GACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTCACG
CTCACCGTGCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCC
TTAATGGGAACGGGGATCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAA
GCTCAAGAGGGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCT
GCTGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGA
CCACTGAAGTGGCATTTGGCCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTC
CCAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAACCCACTAATCAGACAT
GAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTG
GATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAAT
GGTGCAAGCGATGAGAACCATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAA
AATGATCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGC
AACGGTTCAAGTGATCCTCTCGCTATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACT
TGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTTACCGTCGCTTTAA
ATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTATGAGGGAA
GAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTCA
GCATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTTTCTACT

Fig. 19

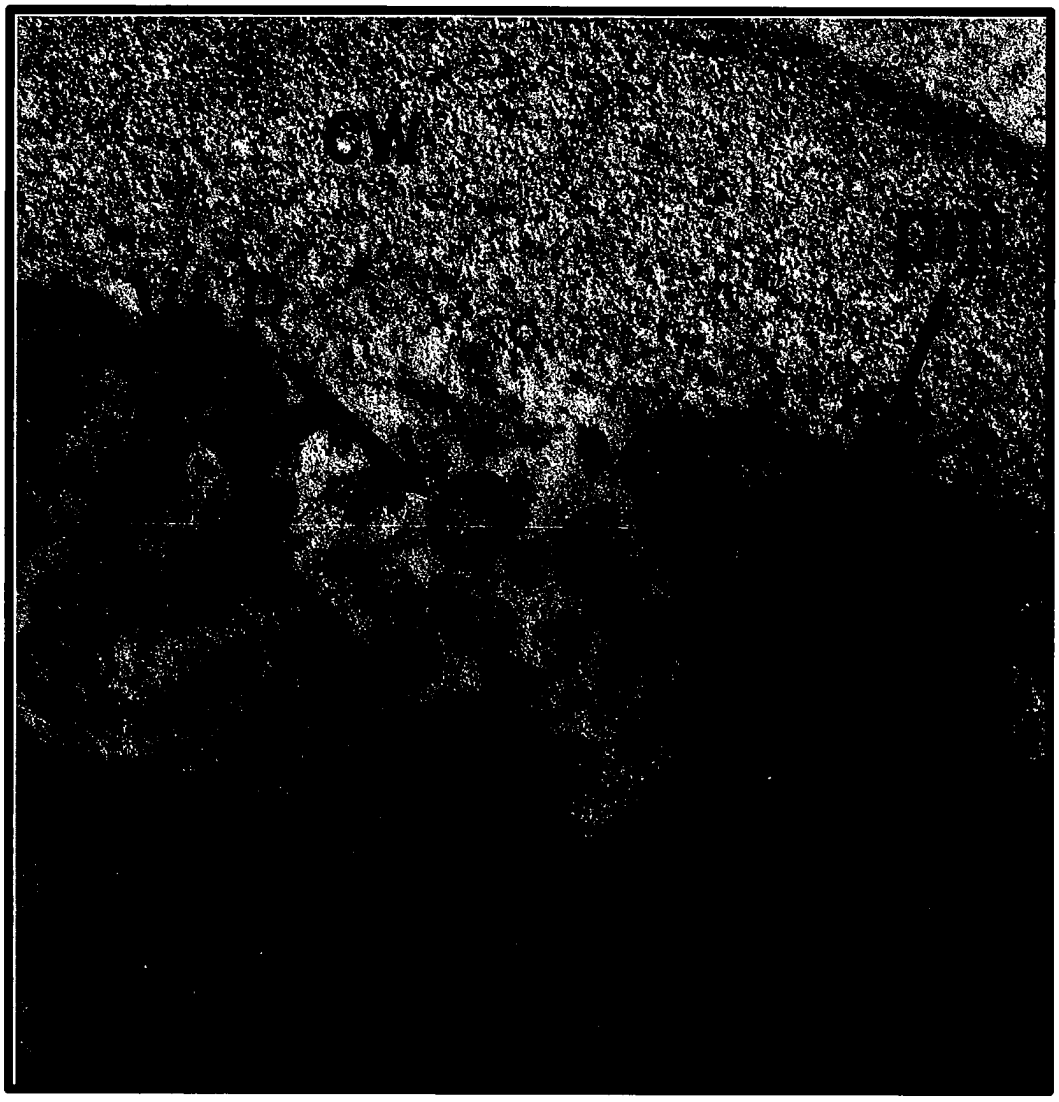


Fig. 20A

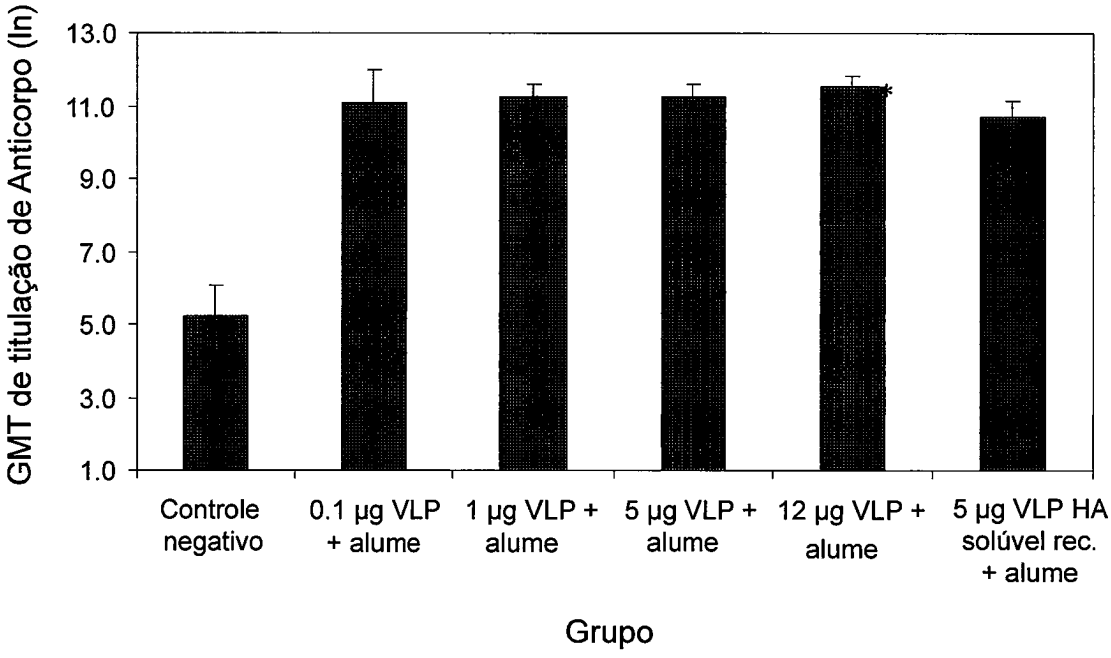


Fig. 20B

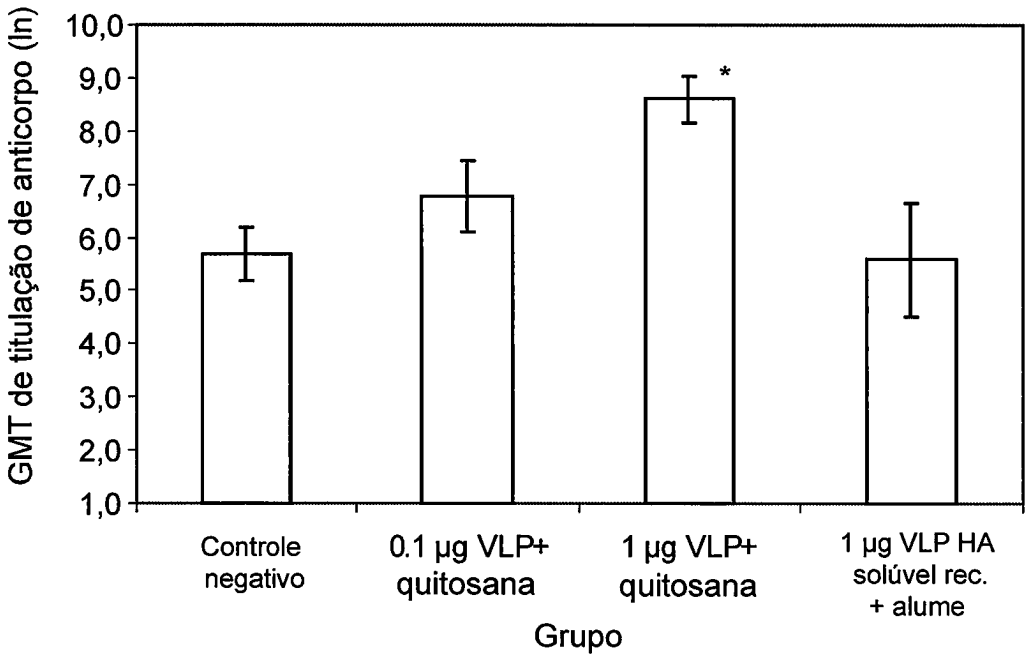


Fig. 21A

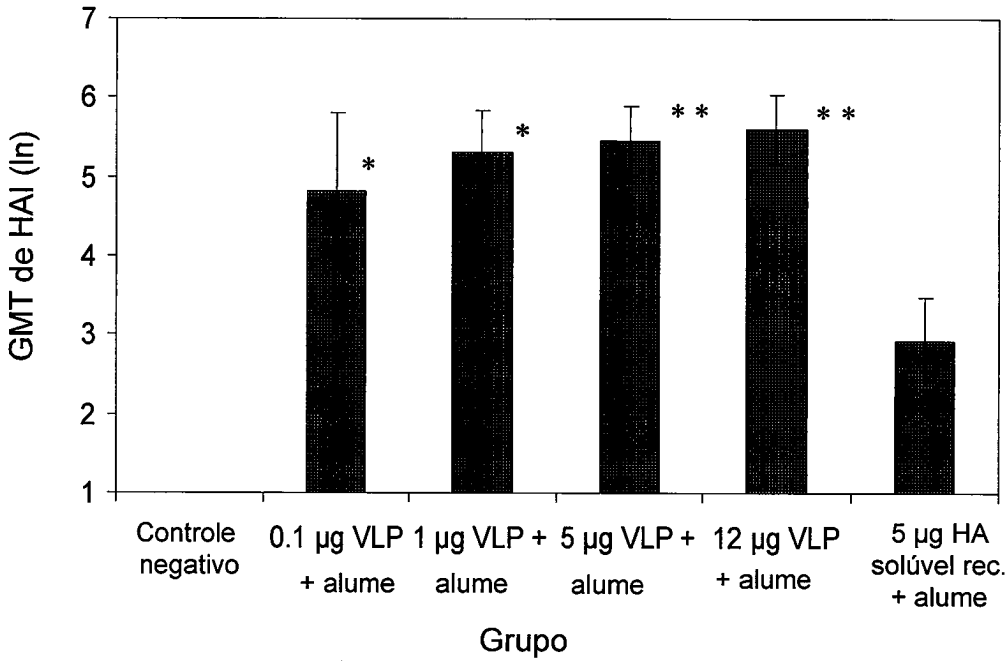


Fig. 21B

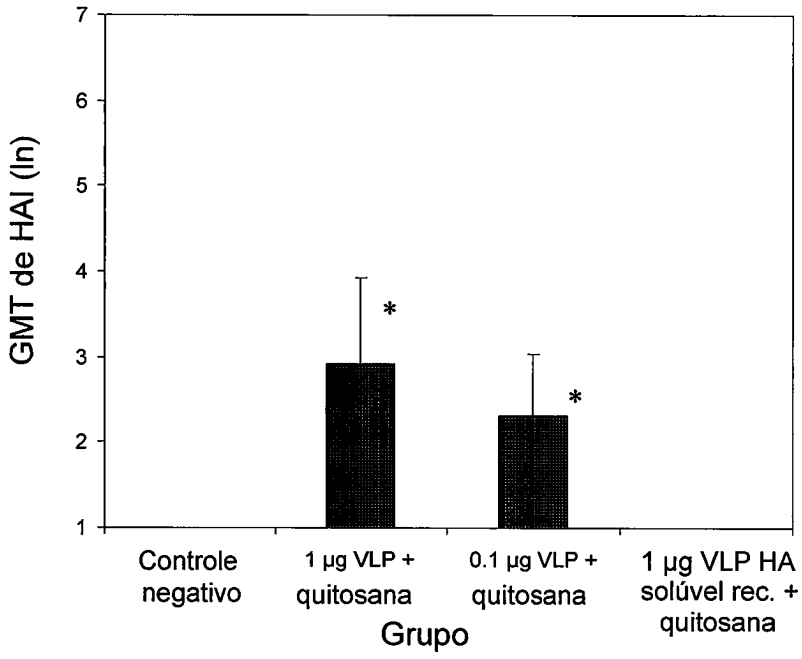


Fig. 22A

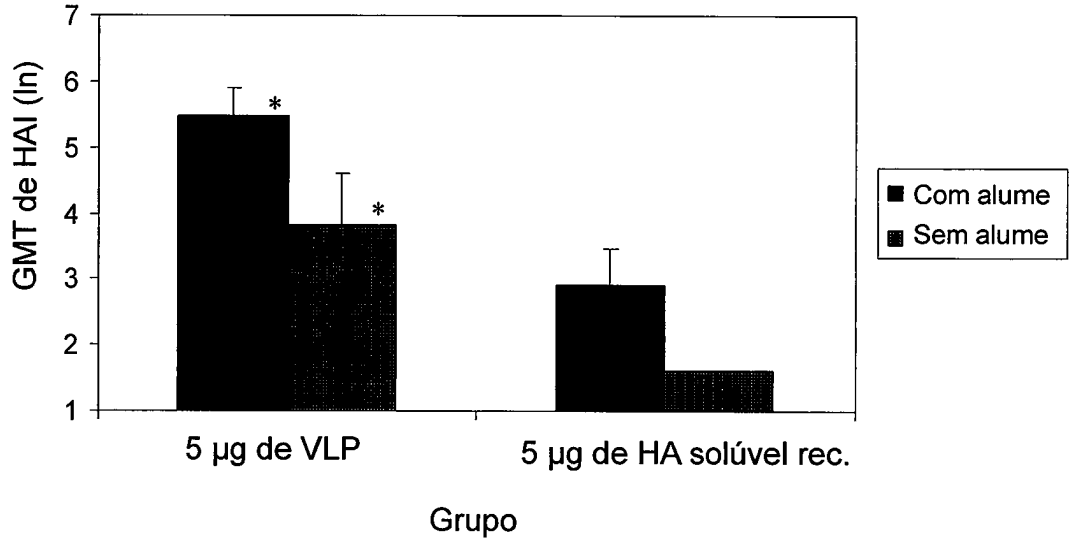


Fig. 22B

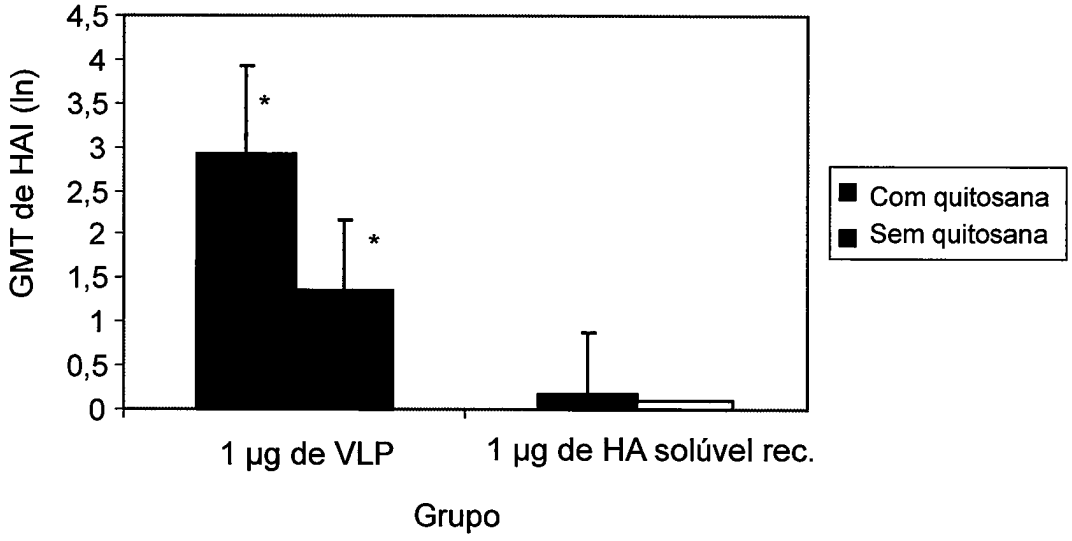


Fig. 23A

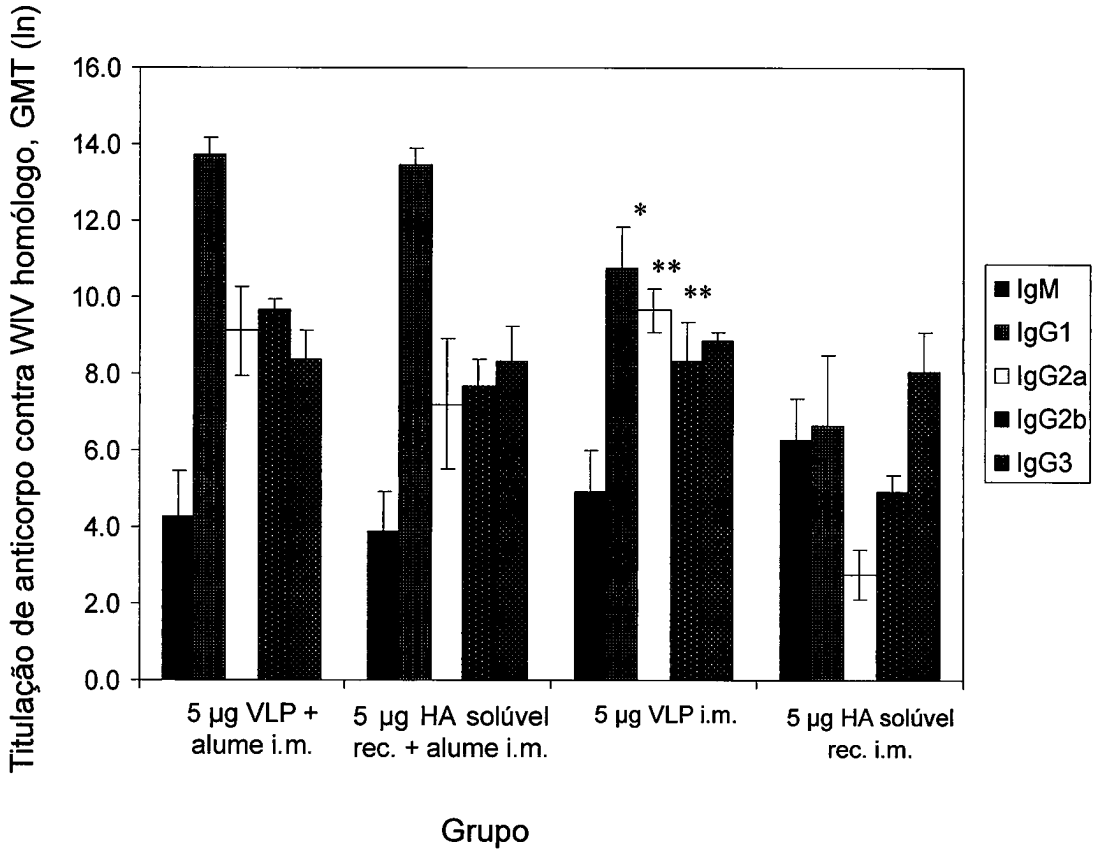


Fig. 23B

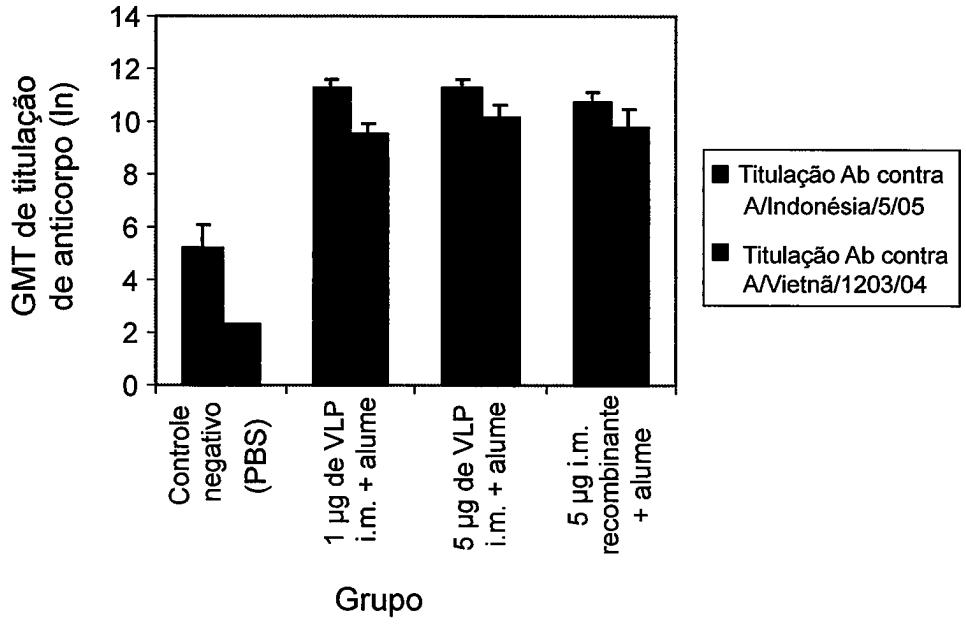


Fig. 24

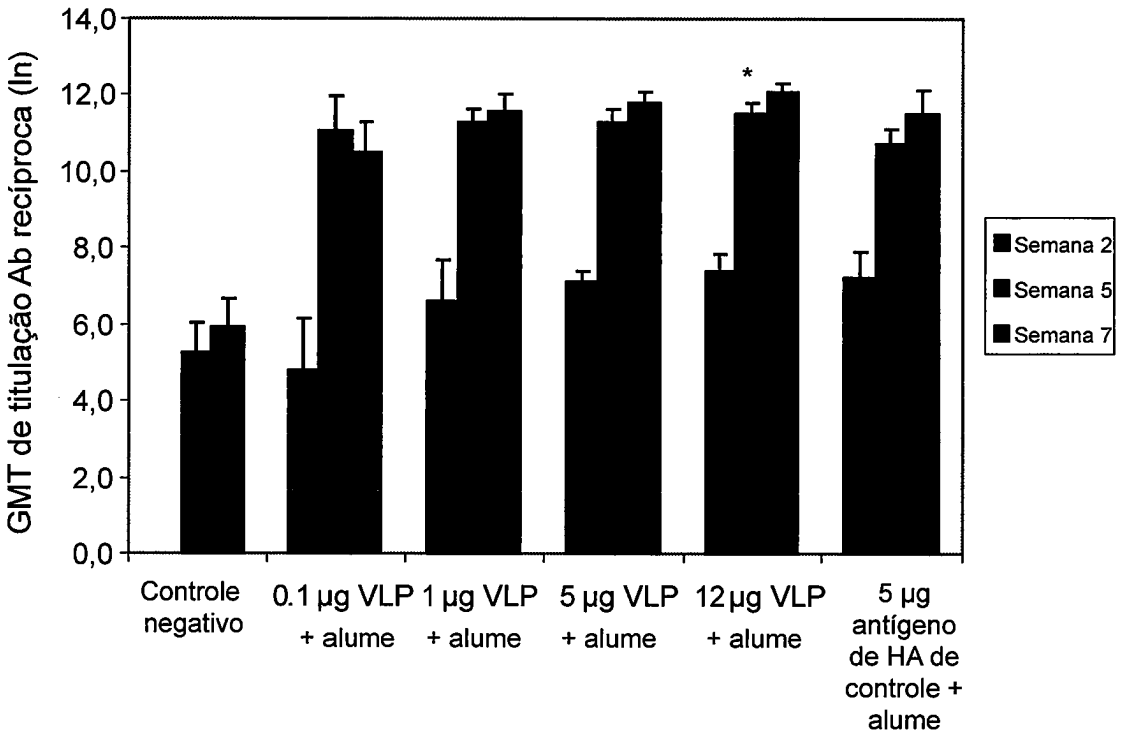

GMT de titulação Ab recíproca (ln)
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
*
Semana 2
Semana 5
Semana 7
Controle negativo
0.1 µg VLP + alume
1 µg VLP + alume
5 µg VLP + alume
12 µg VLP + alume
5 µg antígeno de HA de controle + alume

Fig. 25A

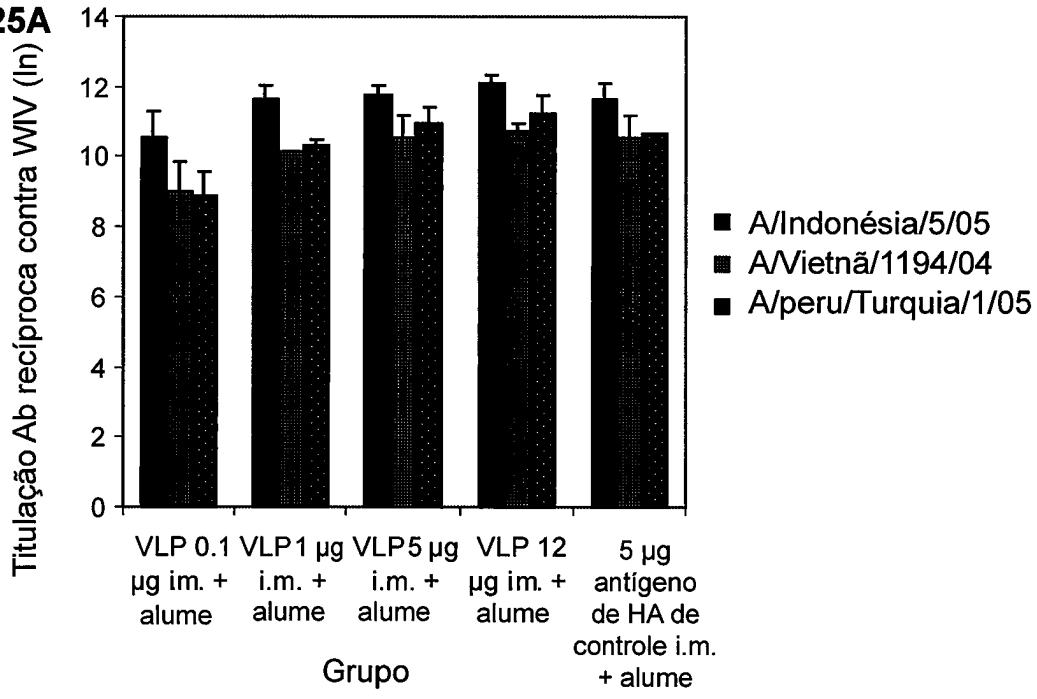


Fig. 25B

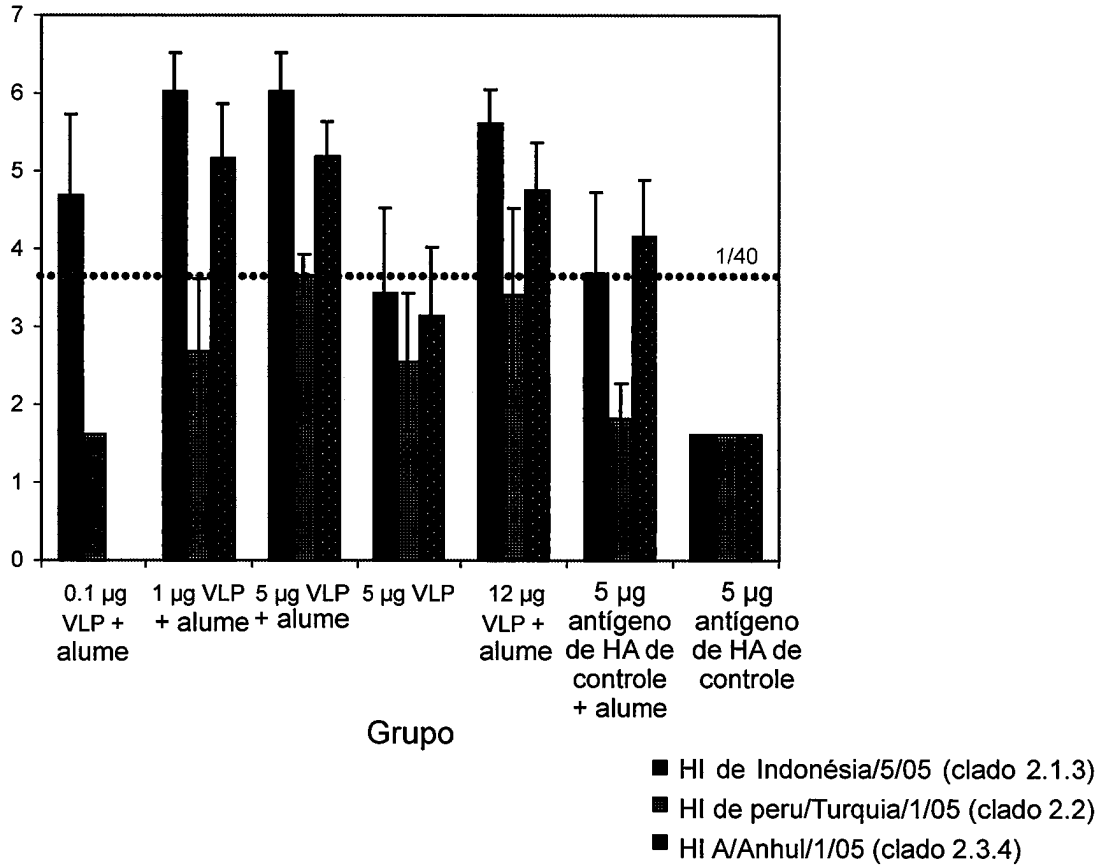


Fig. 26A

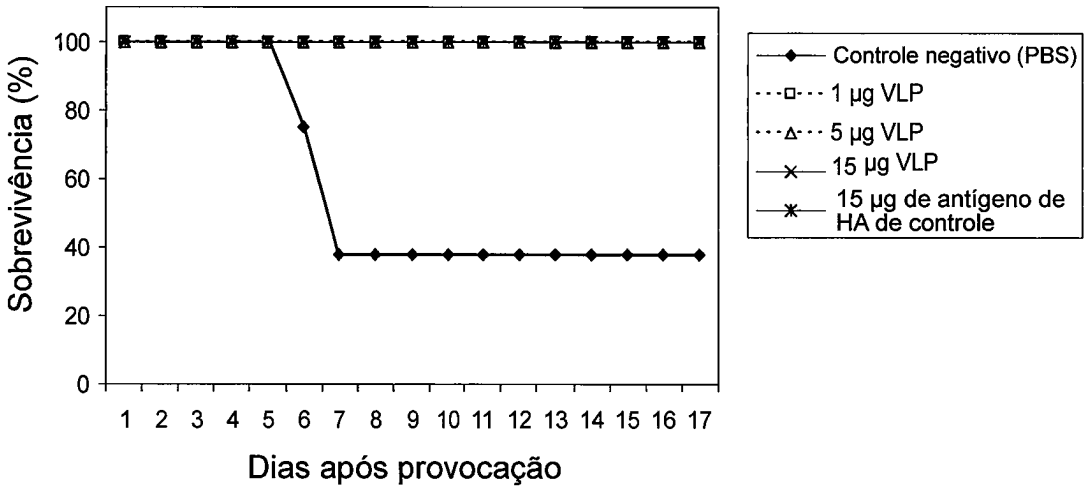


Fig. 26B

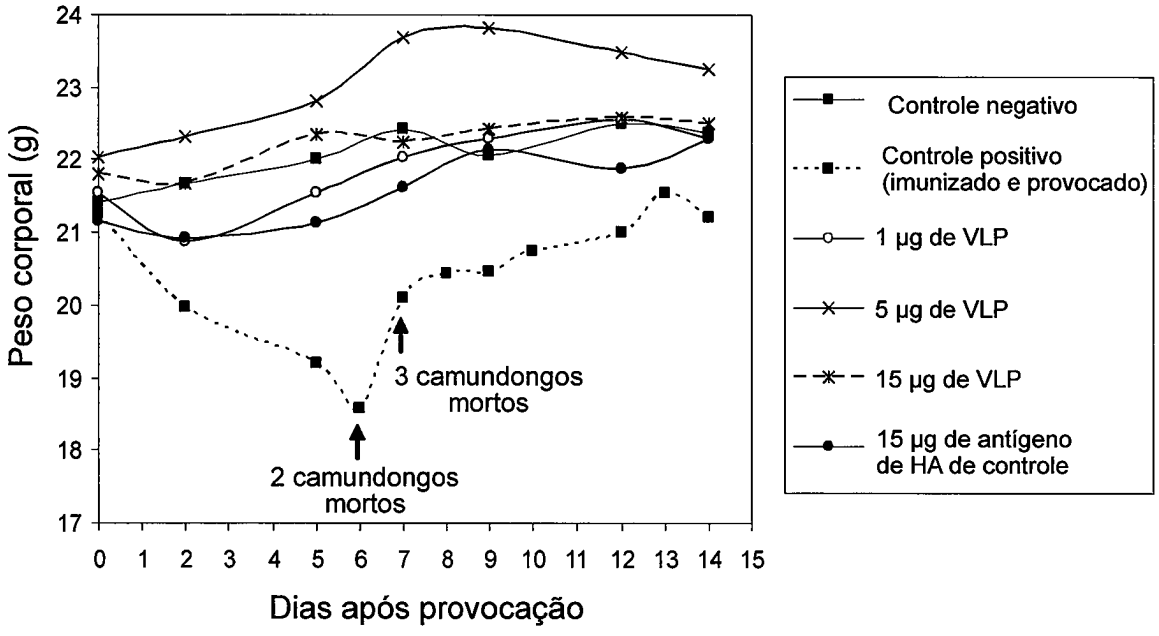


Fig. 27A

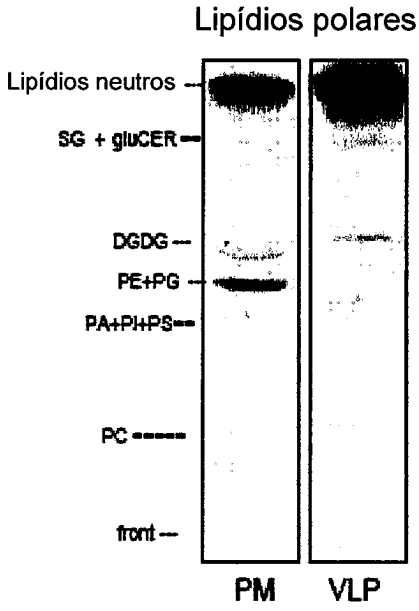


Fig. 27B

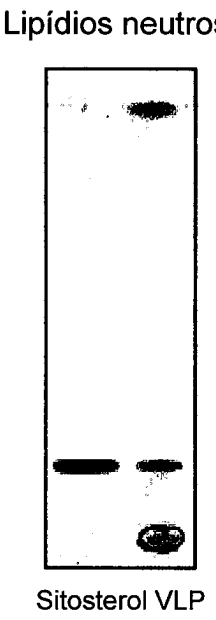


Fig. 27C

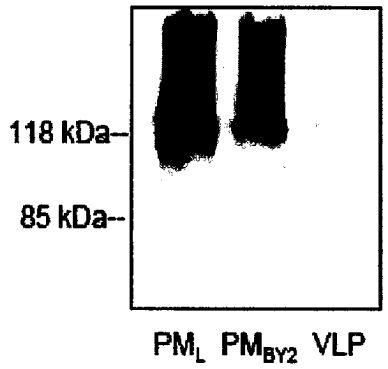


Fig. 28

SEQ ID NO: 36

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGA
CTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**AAAGTAAAACTACTGGTCCTG
TTATGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCTA
ACAACTCGACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAAAAGAATGTGACAGTGAC
ACACTCTGTCAACCTGCTTGAGAACAGTCACAATGGAAAACTATGTCTATTAA
AAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGGTGGATCTT
AGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAGTCATGGTCCTACATTG
TAGAAAAACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCTGAC
TATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTCGA
AATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTGTCA
GCATCATGCTCCCATAATGGGGAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCT
GACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATGCAAACAAC
AAAGAAAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAAACATAG
GTGACCAAAAGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCT
TCACATTATAGCAGAAAATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAG
AGATCAAGAAGGAAGAATCAATTACTACTGGACTCTGCTTGAACCCGGGGAT
ACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCAAGATATGCTTTCGCA
CTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCACCAATGGATAA
ATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCT
TTCCAGAACGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGA
GTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCC
AGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGA
ATGGTAGATGGTTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTA
TGCTGCAGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACAAGG
TCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCAGTGGGCAAAGAG
TTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTGAATAAAAAAGTTGATGATGG
GTTTATAGACATTTGGACATATAATGCAGAACTGTTGGTTCTACTGGAAAATGA
AAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAA
AAAGCCAGTTAAAGAATAATGCTAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTTC
TATCACAAGTGTAACGATGAATGCATGGAGAGTGTAAAGAATGGAACTTATGA
CTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAG
TGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTC
GCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGT
GTTCCAATGGGTCTTTACAGTGTAGAATATGCATCTAAGAGCTC

Fig. 29

SEQ ID NO: 37

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTA
ATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**AAAGTAAAACTACTGGTCCTGTTATG
CACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTC
AACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTC
AACCTGCTTGAGGACAGTCACAATGGAAAATTATGTCTATTAAAAGGAATAGCCCC
ACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAATGC
GAATTACTGATTTCCAGGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAAAACCAAATCCTGA
GAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCA
ATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCAT
GGCCCAACCACACCACAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGGAAA
GCAGTTTTTACAAAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAA
CCTGAGCAAGTCCTATGCAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGT
GTTCATCACCCGCCTAACATAGGTGACCAAAGGGCTCTCTATCATAAAGAAAATGC
TTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAAATTCACCCCAGAAATAGCCAA
AAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCAACTACTACTGGACTCTACTT
GAACCCGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCAAGATA
TGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCACCA
ATGGATGAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTC
TTCCTTTCCAGAATGTACACCCTGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAG
GAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCA
GAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGG
TAGATGGTTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCA
GATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACAAGGTCAATTCTGT
AATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTG
GAAAGAAGGATGGAAAACTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAGACATTTG
GACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCC
ATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAAT
GCCAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTATCATAAGTGTAACGATGAATG
CATGGAGAGTGTAAAAAATGGAACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAA
AGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCA
GATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTG
GGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCA
TCTGAGAGCTC

Fig. 30

SEQ ID NO: 38

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGA
CTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**AAGACTATCATTGCTTTGAGC
TACATTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACG
GCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAA
CAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTT
CCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAAC
TGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAAT
AAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCC
TTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCA
CACTGGAGTTTAACAATGAAAGTTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGA
ACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATT
GGTTGACCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACA
ATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCACCACCCGGGTACGGAC
AATGACCAAATCTTCCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACC
AAAAGAAGCCAACAAACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAG
GAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAAACCGGGAGACAT
ACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAAT
ACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCA
ATTCTGAATGCATCACTCCAAACGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAA
ATGTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACT
CTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCAT
ATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGAT
GGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGGAATAGGACAAGCAGCAGA
TCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAGCTGAATAGGT
TGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAA
GTCGAAGGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACCAAAATAGA
TCTCTGGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAA
TTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAAACTGTTTGAAAAAACAAAGAAGCAA
CTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAA
TGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATGACCACGATGTA
TACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGA
AGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTT
GCTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAAGGCAAC
ATTAGGTGCAACATTTGCATTTGAGAGCTC

Fig. 31

SEQ ID NO: 39

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**AAGACTATCATTGCTTTGA
GCTACATTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAG
CACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGT
GAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTT
CAGAGTTCCTCAACAGGTGGAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATG
GAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGG
CTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGC
AACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTG
CCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACGATGAAAGTTTCAATTGGACTGGAG
TCACTCAAAATGGAACAAGCTCTGCTTGCAAAAGGAGATCTAATAACAGTTT
CTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCATTGA
ACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGT
TCACCACCCGGGTACGGACAATGACCAAATCTTCCTGCATGCTCAAGCATC
AGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAGAAGCCAACAAACTGTAATCCCGAAT
ATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTG
GACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTA
ATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGA
GATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGG
AAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCAAAATGTAAACAGGATCACATATGGGG
CCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCG
AAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTC
ATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCAT
CAAAATTCTGAGGGAATAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCA
GCAATCAATCAAATCAATGGGAAGCTGAATAGGTTGATCGGGAAAACCAACG
AGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAGTAGAAGGGAGAATCCA
GGACCTCGAGAAATATGTTGAGGACACTAAAATAGATCTCTGGTCATACAAC
GCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACT
CAGAAATGAACAAACTGTTTGAAAGAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATG
CTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGC
CTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATGACCATGATGTATACAGAGATG
AAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAAGGCGTTGAGCTGAAGTCAGGAT
ACAAAGATTGGATACTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTG
TTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAAGGCAACATTAGGT
GCAACATTTGCATTTGAGAGCTC

Fig. 32

SEQ ID NO: 40

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGGCAATAATTGTACT
ACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATC
GTCAAACTCACCACATGTTGTCAAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGT
GACTGGTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAAT
CTCAAAGGAACAGAAACCAGAGGGAAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTG
CACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAACATAC
CCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGT
GCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAAACTTCT
CAGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACTCATAACGTTATCAATGCAGAA
AATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAA
CGTTACCAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAA
AAACGACAACAACAAAACAGCAACAAATTCATTAACAATAGAAGTACCATAC
ATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGGTTCCACTCTGAT
AACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTT
CACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGG
CTTCCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGTAGAATTG
TTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCA
AAGAGGTATTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCA
AGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACG
AAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATG
CAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTG
GCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGGGGT
TTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATT
GCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGG
CAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATC
TCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTG
CCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGACGAGAAAGTGGATG
ATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTC
CAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTCTTGGCGCTTGAAAG
AAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGAT
GCTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCT
GCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCACTG
AATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACT
GCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACATTGATGATAGCT
ATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCT
ATAAGAGCTC

Fig. 33

SEQ ID NO: 41

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAG
AGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGGCAATAATTGT
ACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGAATAA
CATCTTCAAACTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGG
TCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTAT
TTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAAACTATGCCCAGAC
TGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGT
GTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAA
CCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCA
GGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACC
CAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTACAGACTT
GGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCG
CAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGA
ACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCA
AATCACTGTTTGGGGGTTCCATTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAAC
CTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGT
AACCACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGATCAAACAGAA
GACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATG
CAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTACCAAAGAGGTGTTTTGT
TGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAG
GGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGG
TGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCC
ATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATG
GAACCAAATATAGACCTCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTC
GGAGCTATTGCTGGTTTCCTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCA
GGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGC
GGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAGATAACAAAAAAT
CTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTG
GTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAG
TGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCAAATAGAACTTGCAGT
CTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGG
CACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGAT
AGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGCTTA
GACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCA
CTTTTGATTCACTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTG
GATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCT
GTAACATTGATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAAC
GTTTCATGCTCCATCTGTCTATAAGAGCTC

Fig. 34

SEQ ID NO: 42

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAA
GAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**GCCATCATTTATC
TAATTCTCCTGTTCACAGCAGTGAGAGGGGACCAAATATGCATTGGATA
CCATGCCAATAATTCCACAGAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCGGAA
CGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGACCCATAACGG
AAAGTTATGCAAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAACTAGGGGACTGT
AGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAA
GTGTGCCAGAATGGTCCTATATAATGGAGAAAGAAAACCCGAGAGACG
GTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAACATCTC
CTCAGCAGCGTGAAACATTTCGAGAAAGTAAAGATTCTGCCCAAAGATA
GATGGACACAGCATACAACAACTGGAGGTTCACGGGCCTGCGCGGTG
TCTGGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAG
AATCAAATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAGA
ACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGCACCATCCCAATGATGAGACAGAA
CAAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCACAT
CAACATTGAACAAAAGGTCAACCCCAGACATAGCAACAAGGCCTAAAG
TGAATGGACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCCTATTGGATAT
GTGGGACACCATAAATTTTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAGAG
TATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAACAG
AAGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAAACTCCTTTGGGAG
CAATAAATACAACATTGCCTTTTCACAATGTCCACCCACTGACAATAGGT
GAGTGCCCCAAATATGTAAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGA
CTAAGGAATGTTCCCCAGATTGAATCAAGAGGATTGTTTGGGGCAATAG
CTGGTTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGTTGGTATG
GATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAG
AATCCACTCAAAAGGCATTTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATTCTGT
GATTGAAAAGATGAACACCCAATTTGAAGCTGTTGGGAAAGAGTTCAGT
AACTTAGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAACAAAAAGATGGAAGACGGG
TTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAAA
ATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGAT
AAAGTCAGAATGCAGCTGAGAGACAACGTCAAAGAACTAGGAAATGGA
TGTTTTGAATTTTATCACAAATGTGATGATGAATGCATGAATAGTGTGAA
AAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAAACTAAATA
GAAATGAAATCAAAGGGGTAAAATTGAGCAGCATGGGGGTTTATCAAAT
CCTTGCCATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATG
ATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGC
AGGATCTGCATATGAGAGCTC

Fig. 35

SEQ ID NO: 43

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTC
TTCTTGCAATAGTCAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACC
ATGCAAACAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTT
ACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCT
CTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTGATTTTAAGAGATTGTAGTGTAG
CTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCC
GGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAACCCAGCCAATGACCTCTGTT
ACCCAGGGAATTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGA
ATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGAT
CATGAAGCCTCATCAGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAACGC
CCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCC
AACAATAAAGAGAAGCTACAATAATACCAACCAGGAAGATCTTTTGATACT
GTGGGGGATTCATCATTCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATC
AAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGAT
TGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGG
ATGGATTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAG
AGTAATGGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAG
GGGACTCAGCAATTGTTAAAAGTGAAGTGGAATATGGTAACTGCAATACAA
AGTGTCAAACTCCAATAGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACA
TACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAAAT
TAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCTAAGAGAAAGAAGAAGA
AAAAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGGTTTATAGAGGGAGGATGGCA
GGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGG
AGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGT
CACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGG
CCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACA
AGAAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTC
TGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTCCATGATTCAAATGTCA
AGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAG
CTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATGTATG
GAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGC
AAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAAC
TTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTTGCGAGTTCTCTAGCACTGGC
AATCATGGTGGCTGGTCTATCTTTGTGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTAC
AATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTC

Fig. 36

SEQ ID NO: 44

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**GAGAAAATAGTGCTTCTT
TTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATG
CAAACAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTG
TTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAATGGGAAGCTCTGCG
ATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGAT
GGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCCGGAATGG
TCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGG
GATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTT
TGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTC
ATTGGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAAGTCCTCCTTTTTCAG
AAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGG
AGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCAC
CATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACC
TATATTTCCGTTGGGACATCTACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAG
CTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGA
CAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCATT
GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGA
AAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAATACCAAGTGTCAAACTCCAATGG
GGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATCG
GGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGC
TCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAAGAGAGGATTATTTG
GAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTT
GGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGA
CAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTC
GATTATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAA
CAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTT
CCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTAGTTCTCATGGAAAACGAG
AGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTC
CGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGA
GTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAACGGAACG
TATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGACTAAAAAGAGAGGAAATA
AGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATATTGTCAATTTATTC
TACAGTGGCCAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTT
ATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTC

Fig. 37

SEQ ID NO: 45

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**ATTGCAATCATTGTAATA
GCAATACTGGCAGCAGCCGGAAAGTCAGACAAGATCTGCATTGGGTATCA
TGCCAACAATTCAACAACACAGGTAGATACGATACTTGAGAAGAATGTGAC
TGTCACACACTCAATTGAATTGCTGGAAAATCAGAAGGAAGAAAGATTCTG
CAAGATATTGAACAAGGCCCCTCTCGACTTAAGGGAATGTACCATAGAGGG
TTGGATCTTGGGGAATCCCCAATGCGACCTATTGCTTGGTGATCAAAGCTG
GTCATACATTGTGGAAAGACCTACTGCTCAAAACGGGATCTGCTACCCAG
GAACCTTAAATGAGGTAGAAGAACTGAGGGCACTTATTGGATCAGGAGAA
AGGGTAGAGAGATTTGAGATGTTTCCCCAAAGCACCTGGCAAGGAGTTGA
CACCAACAGTGGAACAACAAGATCCTGCCCTTATTCTACTGGTGCGTCTTT
CTACAGAAACCTCCTATGGATAATAAAAACCAAGACAGCAGAATATCCAGTA
ATTAAGGGAATTTACAACAACACTGGAACCCAGCCAATCCTCTATTTCTGG
GGTGTGCATCATCCTCCTAACACCGACGAGCAAGATACTCTGTATGGCTCT
GGTGATCGATACGTTAGAATGGGAACTGAAAGCATGAATTTTGCCAAGAGT
CCGGAAATTGCGGCAAGGCCTGCTGTGAATGGACAAAGAGGCAGAATTG
ATTATTATTGGTCGGTTTTAAAACCAGGGGAAACCTTGAATGTGGAATCTAA
TGGAAATCTAATCGCCCCTTGGTATGCATACAAATTTGTCAACACAAATAGT
AAAGGAGCCGTCTTCAGGTCAGATTTACCAATCGAGAACTGCGATGCCAC
ATGCCAGACTATTGCAGGGGTTCTAAGGACCAATAAAACATTTCAGAATGT
GAGTCCCCTGTGGATAGGAGAATGTCCCAAATACGTGAAAAGTGAAAGTC
TGAGGCTTGCAACTGGACTAAGAAATGTTCCACAGATTGAAACTAGAGGA
CTCTTCGGAGCTATTGCAGGGTTTATTGAAGGAGGATGGACTGGGATGAT
AGATGGGTGGTATGGCTATCACCATGAAAATTCTCAAGGGTCAGGATATGC
AGCAGACAGAGAAAGCACTCAAAAGGCTGTAAACAGAATTACAAATAAGGT
CAATTCCATCATCAACAAAATGAACACACAATTTGAAGCTGTCGATCACGAA
TTTTCAAATCTGGAGAGGAGAATTGACAATCTGAACAAAAGAATGCAAGAT
GGATTTCTGGATGTTTGGACATACAATGCTGAACTGTTGGTTCTTCTTGAA
AACGAAAGAACACTAGACATGCATGACGCAAATGTGAAGAACCTACATGAA
AAGGTCAAATCACAACTAAGGGACAATGCTACGATCTTAGGGAATGGTTGC
TTTGAATTTTGGCATAAGTGTGACAATGAATGCATAGAGTCTGTCAAAAATG
GTACATATGACTATCCCAAATACCAGACTGAAAGCAAATTAAACAGGCTAAA
AATAGAATCAGTAAAGCTAGAGAACCTTGGTGTGTATCAAATTCTTGCCATT
TATAGTACGGTATCGAGCAGCCTAGTGTTGGTAGGGCTGATCATGGCAATG
GGTCTTTGGATGTGTTCAAATGGTTCAATGCAGTGCAGGATATGTATATAAG
AGCTC

Fig. 38

SEQ ID NO: 46

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGA
GACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA**ATG**AACACTCAAATTCTAAT
ATTAGCCACTTCGGCATTCTTCTATGTACGTGCAGATAAAATCTGCCTAGGA
CATCATGCTGTGTCTAATGGAACCAAAGTAGACACCCTTACTGAAAAAGGA
ATAGAAGTTGTCAATGCAACAGAAACAGTTGAACAAACAAACATCCCTAAG
ATCTGCTCAAAAGGAAAACAGACTGTTGACCTTGGTCAATGTGGATTACTA
GGGACCGTTATTGGTCCTCCCCAATGTGACCAATTTCTTGAGTTCTCTGCT
AATTTAATAGTTGAAAGAAGGGAAGGTAATGACATTTGTTATCCAGGCAAAT
TTGACAATGAAGAAACATTGAGAAAAATACTCAGAAAATCCGGAGGAATTA
AAAAGGAGAATATGGGATTCACATATACCGGAGTGAGAACCAATGGAGAGA
CTAGCGCATGTAGAAGGTCAAGATCTTCCTTTTATGCAGAGATGAAATGGC
TTCTATCCAGCACAGACAATGGGACATTTCCACAAATGACAAAGTCCTACA
AGAACACTAAGAAGGTACCAGCTCTGATAATCTGGGGAATCCACCACTCA
GGATCAACTACTGAACAGACTAGATTATATGGAAGTGGGAATAAATTGATAA
CAGTTTGGAGTTCCAAATACCAACAATCTTTTGTCCCAAATCCTGGACCAA
GACCGCAAATGAATGGTCAATCAGGAAGAATTGACTTTCACTGGCTGATG
CTAGATCCCAATGATACTGTCACTTTCAGTTTTAATGGGGCCTTTATAGCAC
CTGACCGCGCCAGTTTTCTAAGAGGTAAATCTCTAGGAATCCAAAGTGATG
CACAACTTGACAATAATTGTGAAGGTGAATGCTATCATATTGGAGGTACTAT
AATTAGCAACTTGCCCTTTCAAAACATTAATAGTAGGGCAATCGGAAAATGC
CCCAGATACGTGAAGCAGAAGAGCTTAATGCTAGCAACAGGAATGAAAAAT
GTTCCTGAAGCTCCTGCACATAAACAACTAACTCATCACATGCGCAAAAAA
AGAGGTTTATTTGGTGCAATAGCAGGATTCATTGAAAATGGGTGGGAAGGA
TTAATAGACGGATGGTATGGATATAAGCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGG
ACTGCTGCAGACTACAAAAGTACACAATCTGCTATCAACCAAATAACCGGA
AAATTGAACAGACTAATAGAAAAAACCAACCAGCAATTCGAACTAATAGATA
ATGAGTTCAATGAAATAGAAAAACAAATTGGCAATGTTATTAACTGGACTAG
AGATTCTATCATCGAAGTATGGTCATATAATGCAGAGTTCCTCGTAGCAGTG
GAGAATCAACACACTATTGATTTAACTGACTCAGAAATGAACAAACTATATG
AAAAGGTAAGAAGACAACTGAGAGAAAATGCTGAGGAAGATGGTAATGGC
TGTTTTGAAATATTCCACCAATGTGACAATGATTGCATGGCCAGCATTAGAA
ACAACACATATGACCATAAAAAATACAGAAAAGAGGCAATACAAAACAGAAT
CCAGATTGACGCAGTAAAGTTGAGCAGTGGTTACAAAGATATAATACTTTG
GTTTAGCTTCGGGGCATCATGTTTCTTATTTCTTGCCATTGCAATGGGTCTT
GTTTTCATATGTATAAAAAATGGAAACATGCGGTGCACTATTTGTATATAAGA
GCTC

Fig. 39

SEQ ID NO: 47

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAAACAATATCACTAATAA
CTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAATCTGCATCGGCCA
CCAGTCAACAAACTCCACAGAAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGT
TCCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCT
GTGTGCAACAAGCCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGA
AGGACTAGTCTATGGCAACCCTTCTTGTGACCTGCTGTTGGGAGGAAGAG
AATGGTCCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTGTAAATGGAACGTGTTACC
CTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGTTCCGCTA
GTTCCTACCAAAGAATCCAAATCTTCCCAGACACAACCTGGAATGTGACTT
ACACTGGAACAAGCAGAGCATGTTCAGGTTCATTCTACAGGAGTATGAGAT
GGCTGACTCAAAAGAGCGGTTTTTACCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAA
ATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTTCGTGTGGGGCATACATCACCCACCCA
CCTATACCGAGCAAACAAATTTGTACATAAGAAACGACACAACAACAAGCG
TGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAGTGATAGGGCCAAGGC
CCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCGGTACTAAA
ACCAGGCCAAACATTGCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATG
GTATGGACACGTTCTTTCAGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTG
ATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAATGTCAGACTGAAAAAGGTGGCT
TAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCATTTGGAACCTGC
CCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACTGGCAGTCGGTCTGAGGAAC
GTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTCATA
GAAGGAGGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTTCCAGCATTC
AAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGCAGATAGGGATTCAACTCAAAAGGC
AATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATATAGTCGACAAGATGAACAAGC
AATATGAAATAATTGATCATGAATTTAGTGAGGTTGAAACTAGACTCAATATG
ATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACAAGACGTATGGGCATATAATGCAGA
ATTGCTAGTACTACTTGAAAATCAAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAAC
GTGAACAATCTATATAACAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATG
GAAGATGGGAAAGGCTGTTTCGAGCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGC
ATGGAAACAATTCGGAACGGGACCTATAATAGGAGAAAGTATAGAGAGGAA
TCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGAATCTGAGGG
AACTTACAAAATCCTCACCATTTATTCGACTGTCGCCTCATCTCTTGTGCTT
GCAATGGGGTTTGCTGCCTTCCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTG
CAGATGCAACATTTGTATATAAGAGCTC

Fig. 40A

SEQ ID NO: 48

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLENSHN
GKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYP
GHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASCSHNGESSFY
RNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPPNIGDQKALYHTENAY
VSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRY
AFALSRGFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKY
VRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQG
SGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKV
DDGFIDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCF
EFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYS
TVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

Fig. 40B

SEQ ID NO: 49

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDSHN
GKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISRESWSYIVEKPNPENGTCYP
GHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTTTGVSASCSHNGESSFYK
NLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPPNIGDQRALYHKENAYV
SVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYA
FALSRGFGSGIINSNAPMDECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYV
RSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGS
GYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVD
DGFIDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFE
FYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYST
VASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

Fig. 41A

SEQ ID NO: 50

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTN
ATELVQSSSTGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVE
RSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWTGVTQNGTSSACI
RRSNNSFFSRLNWLTHLKFKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTDND
QIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRVRNIPSRISIYWTIVKPGDILLI
NSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNV
NRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMV
DGWYGFRHQNSEGIGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKE
FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFEK
TKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRF
QIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Fig. 41B

SEQ ID NO: 51

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTN
ATELVQSSSTGGICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVE
RSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNDESFNWTGVTQNGTSSAC
KRRSNNSFFSRLNWLTHLKFKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTDN
DQIFLHAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRIRNIPSRISIYWTIVKPGDILL
INSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNV
NRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMV
DGWYGFRHQNSEGIGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKE
FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFER
TKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRF
QIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Fig. 42A

SEQ ID NO: 52

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTTPTKS
HFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLDVALGRPKCTGNIPSARVSILHEVRPVTS
GCFPIMHDRTKIRQLPKLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPN
VTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDN
ETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVV
DYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSLPLIGEADCLHEKY
GGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGA
IAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSE
LEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRADTISSQIELAVLLSNEGIINSE
DEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSLNITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFVVYMVSRDNVS
CSICL

Fig. 42B

SEQ ID NO: 53

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTTPTKS
YFANLKGTRTRGKLCPDCLNCTDLDVALGRPMCVGTTPSAKASILHEVKPVT
SGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGTSGSC
PNATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSD
NKTQMKNLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGSFPDQTEDGGLPQSGRIV
VDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSLPLIGEADCLHE
KYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFF
GAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSL
SELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRADTISSQIELAVLLSNEGIIN
SEDEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGE
FSLPTFDSLNITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMLAIFIVYMVSRDN
VSCSICL

Fig. 43A

SEQ ID NO: 54

MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDTILERNVTVTHAKDILEKTHNGKLC
KLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSF
NDYEELKHLLSSVKHFEKVKILPKDRWTQHTTTGGSRACAVSGNPSFFRNMVW
LTKKESNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTYVSVGT
STLNKRSTPDIATRPKVNGLGSRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKIS
KRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTPLGAINTTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLV
LATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSGYAADK
ESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKMEDGFLDV
WTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHK
CDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNRNEIKGVKLSSMGVYQILAIYATVAGSL
SLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

Fig. 43B

SEQ ID NO: 55

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGK
LCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPANDLCYPGN
FNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGTPSFFRNVV
WLIKKNNTYPTIKRSYNNTNQEDLLILWGIHHSNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTS
TLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMDFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVK
KGDSAIVKSEVEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNKLVL
ATGLRNSPLRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYA
ADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFL
DVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYH
KCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSL
ALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

Fig. 44A

SEQ ID NO: 56

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKL
CDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDF
NDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLI
KKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLN
QRLVPRIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDS
TIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGL
RNSPQRERRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADK
ESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWT
YNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNE
CMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVA
GLSLWMCSNGSLQCRICI

Fig. 44B

SEQ ID NO: 57

MIAIIVIAILAAAGKSDKICIGYHANNSTTQVDTILEKNVTVTHSIELLENQKEERFCK
ILNKAPLDLRECTIEGWILGNPQCDLLLGDQSWSYIVERPTAQNGICYPGTLNEV
EELRALIGSGERVERFEMFPQSTWQGVDTNSGTTRSCPYSTGASFYRNLLWIIK
TKTAEYPVIKGIYNNTGTQPILYFWGVHHPPNTDEQDTLYGSGDRYVRMGTESM
NFAKSPEIAARPAVNGQRGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKFVNTN
SKGAVFRSDLPIENCDATCQTIAGVLRTNKTFQNVSPLWIGECPKYVKSESLRLAT
GLRNVPQIETRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHENSQGSGYAADRESTQ
KAVNRITNKVNSIINKMNTQFEAVDHEFSNLERRIDNLNKRMQDGFLDVWTYNAE
LLVLLENERTLDMHDANVKNLHEKVKSQLRDNATILGNGCFEFWHKCDNECIESV
KNGTYDYPKYQTESKLNRLKIESVKLENLGVYQILAIYSTVSSSLVLVGLIMAMGL
WMCSNGSMQCRICI

Fig. 45A

SEQ ID NO: 58

MNTQILILATSAFFYVRADKICLGHHAVSNGTKVDTLTEKGIEVVNATETVEQTN
IPKICSKGKQTVDLGQCGLLGTVIGPPQCDQFLEFSANLIVERREGNDICYPGK
FDNEETLRKILRKSGGIKKENMGFTYTGVRTNGETSACRRSRSSFYAEMKWL
LSSTDNGTFPQMTKSYKNTKKVPALIIWGIHHSGSTTEQTRLYGSGNKLITVW
SSKYQQSFVPNPGPRPQMNGQSGRIDFHWLMLDPNDTVTFSFNGAFIAPDR
ASFLRGKSLGIQSDAQLDNNCEGECYHIGGTIISNLPFQNINSRAIGKCPRYVK
QKSLMLATGMKNVPEAPAHKQLTHHMRKKRGLFGAIAGFIENGWEGLIDGWY
GYKHQNAQGEGTAADYKSTQSAINQITGKLNRLIEKTNQQFELIDNEFNEIEKQ
IGNVINWTRDSIIEVWSYNAEFLVAVENQHTIDLTDSEMNKLYEKVRRQLRENA
EEDGNGCFEIFHQCDNDCMASIRNNTYDHKKYRKEAIQNRIQIDAVKLSSGYK
DIILWFSFGASCFLFLAIAMGLVFICIKNGNMRCTICI

Fig. 45B

SEQ ID NO: 59

METISLITILLVVTASNADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHN
GMLCATSLGHPLILDTCTIEGLVYGNPSCDLLLGGREWSYIVERSSAVNGTCY
PGNVENLEELRTLFSSASSYQRIQIFPDTTWNVTYTGTSRACSGSFYRSMRW
LTQKSGFYPVQDAQYTNNRGKSILFVWGIHHPPTYTEQTNLYIRNDTTTSVTT
EDLNRTFKPVIGPRPLVNGLQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRSNGNLIAPWYGH
VLSGGSHGRILKTDLKGGNCVVQCQTEKGGLNSTLPFHNISKYAFGTCPKYV
RVNSLKLAVGLRNVPARSSRGLFGAIAGFIEGGWPGLVAGWYGFQHSNDQG
VGMAADRDSTQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKID
DQIQDVWAYNAELLVLLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAMEDGKGC
FELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYS
TVASSLVLAMGFAAFLFWAMSNGSCRCNICI

Fig.46

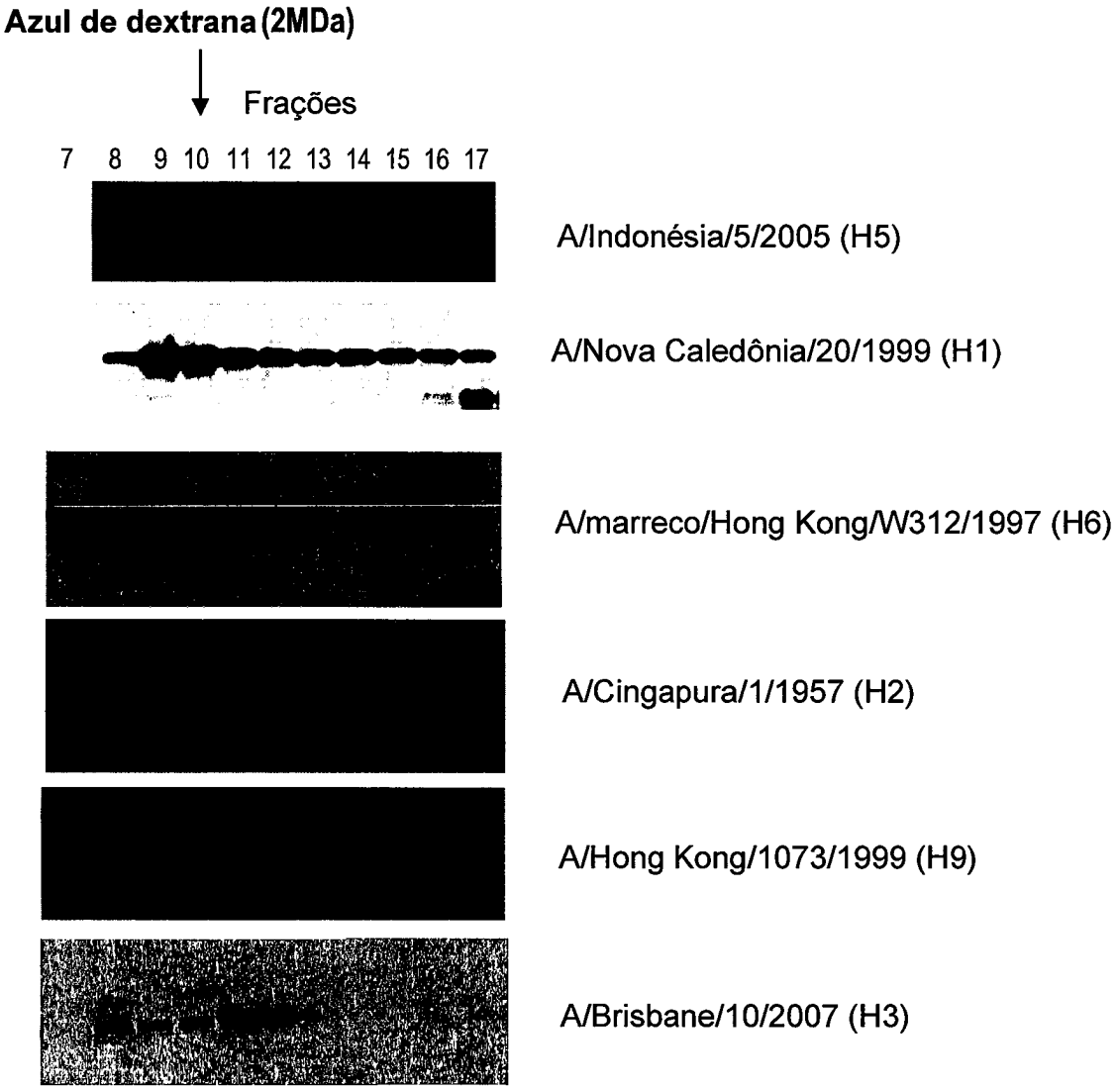

Azul de dextrana (2MDa)
Frações
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
A/Indonésia/5/2005 (H5)
A/Nova Caledônia/20/1999 (H1)
A/marreco/Hong Kong/W312/1997 (H6)
A/Cingapura/1/1957 (H2)
A/Hong Kong/1073/1999 (H9)
A/Brisbane/10/2007 (H3)

Fig. 47

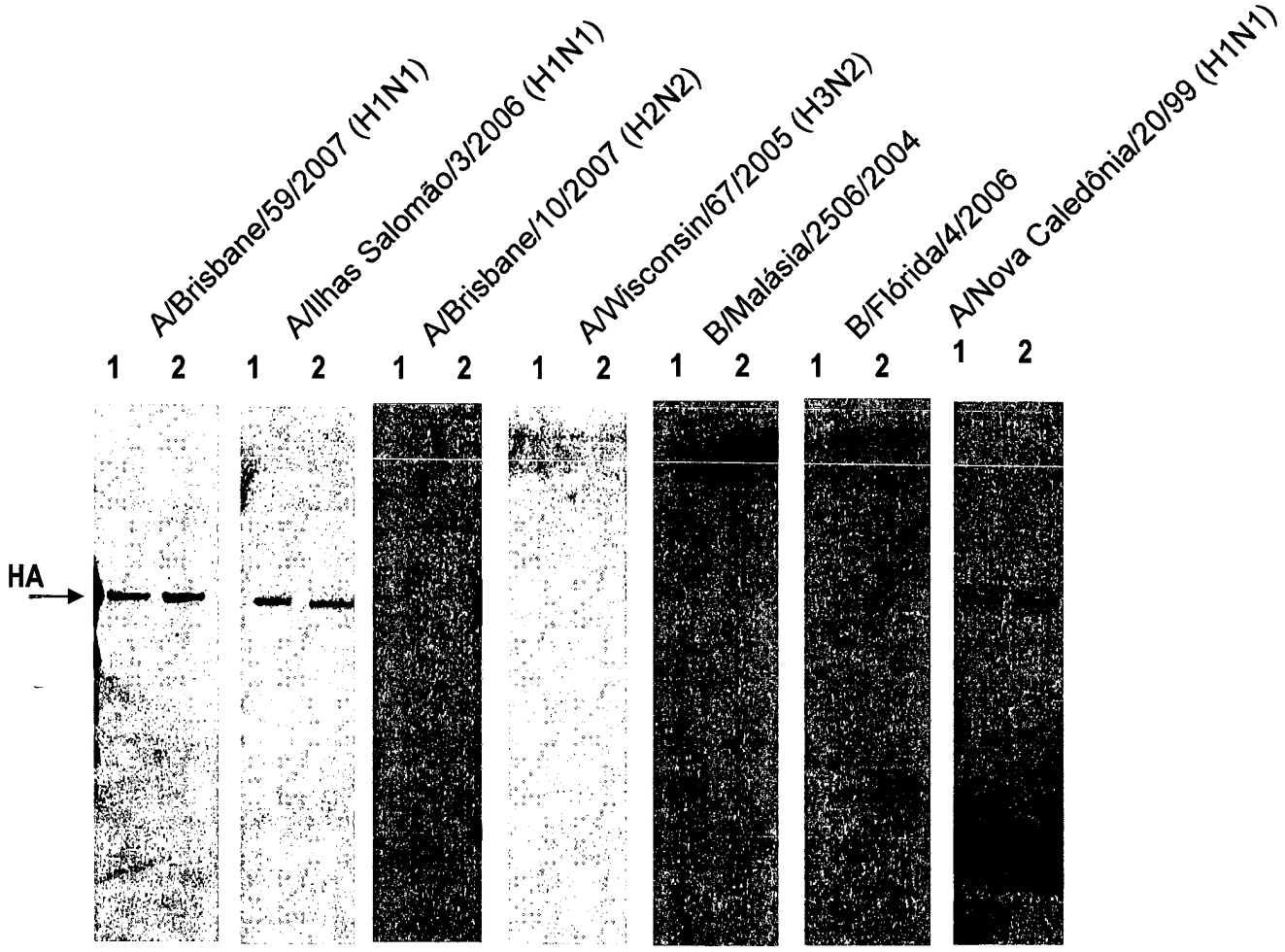

A/Brisbane/59/2007 (H1N1)
A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1)
A/Brisbane/10/2007 (H2N2)
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)
B/Malásia/2506/2004
B/Flórida/4/2006
A/Nova Caledônia/20/99 (H1N1)
1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2
HA

Fig. 48a

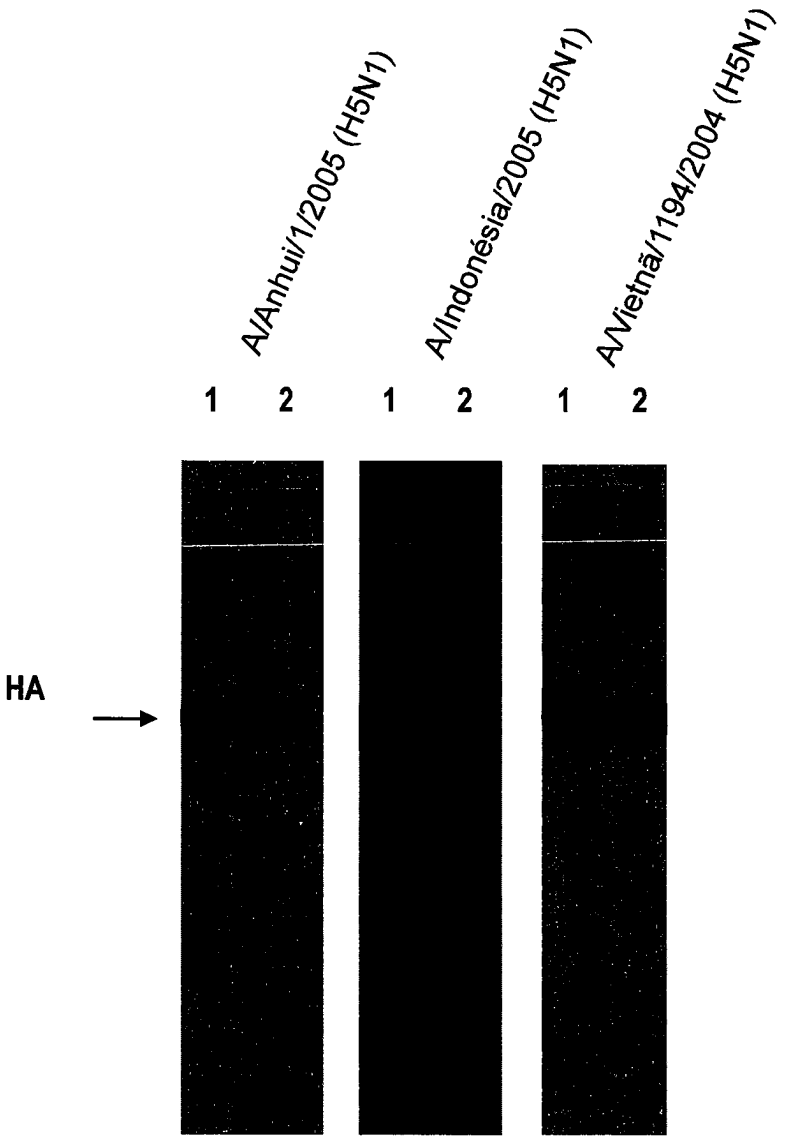

A/Anhui/1/2005 (H5N1)
A/Indonésia/2005 (H5N1)
A/Vietnã/1194/2004 (H5N1)
1
2
1
2
1
2
HA

Fig. 48b

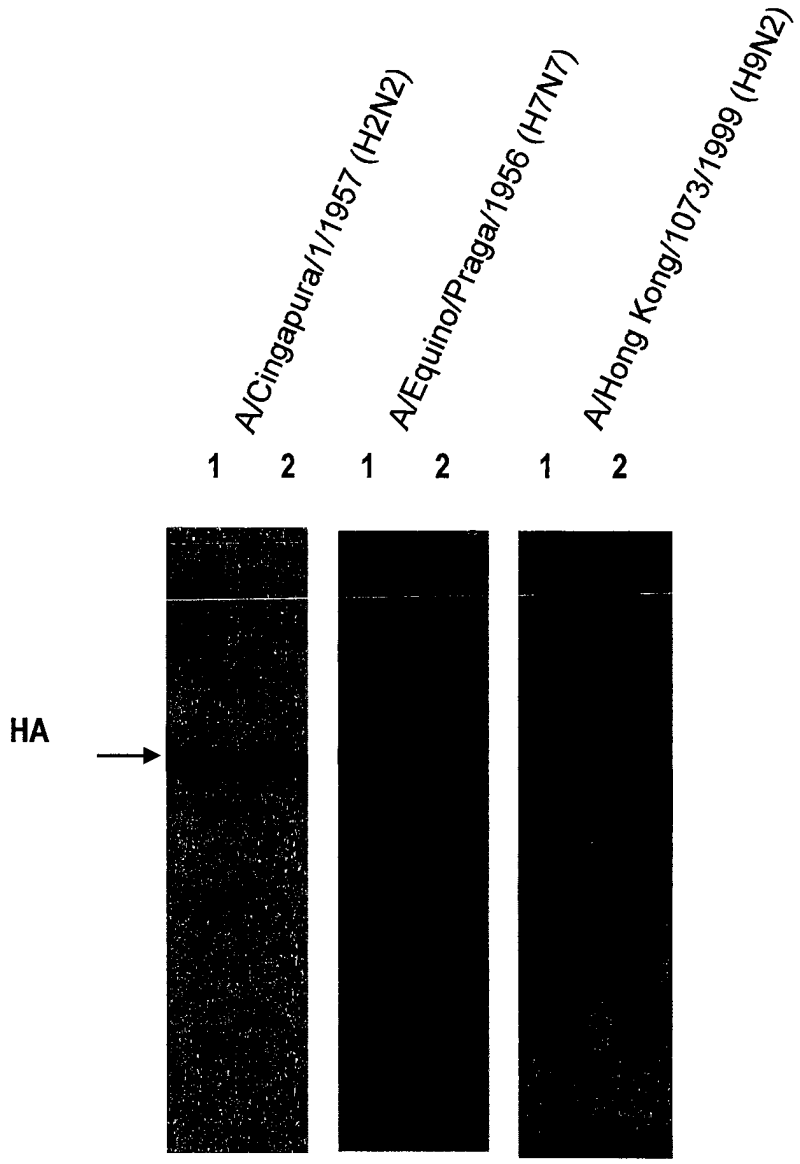

A/Cingapura/1/1957 (H2N2)
A/Equino/Praga/1956 (H7N7)
A/Hong Kong/1073/1999 (H9N2)
1
2
1
2
1
2
HA

Fig. 49

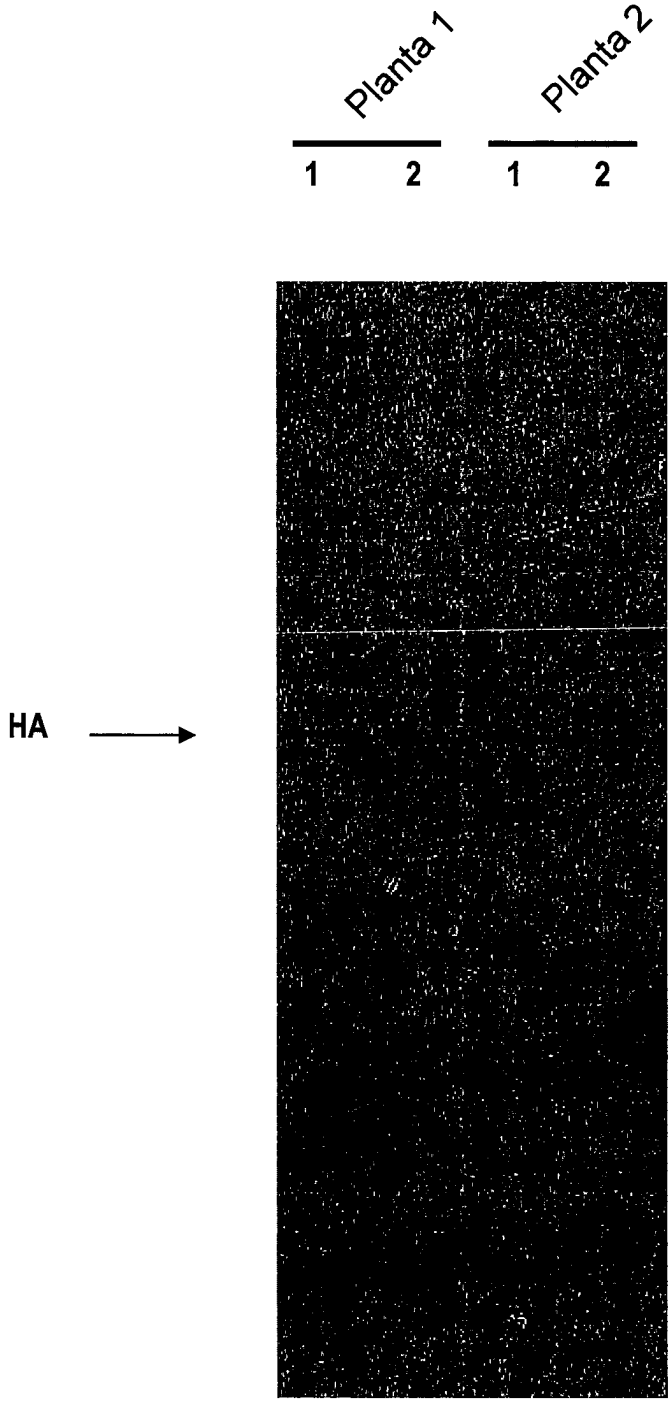


Fig. 50A

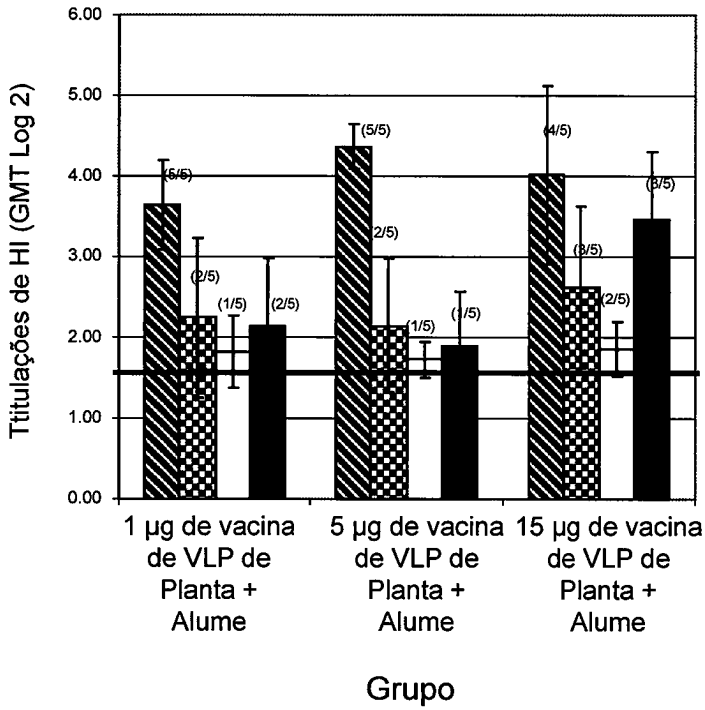


Fig. 50B

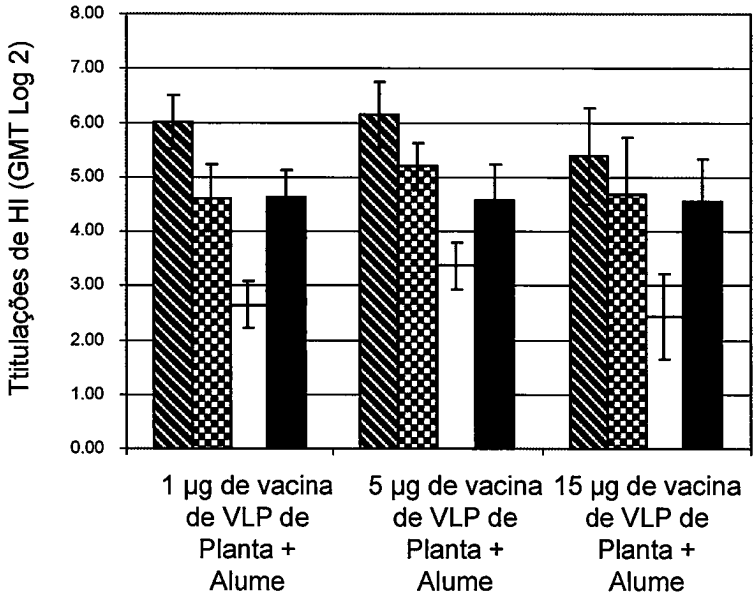


Fig. 51

SEQ ID NO: 60

H5 de A/Indonésia/5/2005 (Construto # 660)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTT
AGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAAC
ATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCA
ACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAA
GAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAG
TTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAA
TAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAAT
AAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAA
GAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTT
CCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAA
CGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAG
GATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATA
ACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACAT
CTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGT
CTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGA
GAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGC
ATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGT
TACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTG
AAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGA
ATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTT
ACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAG
AAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGC
ATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTA
CATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGA
ATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATATTTC
CATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACG
GGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAG
AGTAATGGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATT
ATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATAAA
CTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAAT
CAAACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAA
GAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGT
TGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTC
AAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTT
GAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGA
AGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAA
CTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGAT
AATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATGTATGGA
AAGTATAAGAAACGGAACGTACAACTATCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGG
AAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGG
CGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCG
TTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATAT
GGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTAT
TTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCC
TCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTG
AACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATT
AATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTAT
ATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 52

SEQ ID NO: 61
H1 de A/Nova Caledônia/20/1999 (Construto # 540)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTT
AGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAAC
ATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCA
ACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAA
GAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAG
TTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAA
TAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAA
TAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAA
AGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTT
TCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATA
ACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGA
GGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGA
TAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACAC
ATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGA
GTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTT
GAGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTT
CTCAGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGAC
ACAGTACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATG
GAAAACTATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATG
GATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAA
CACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGA
GCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCA
ACCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAAT
TTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATGTAAACAACA
AAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTAACATAGGGAACCAAAGGGC
ACTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAGATTCACCCC
AGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTACTGGACTCTG
CTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCATGGTATGCTTT
TGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACCAATGGATGAATGTGAT
GCGAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAATGTACACCCAG
TCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAG
GAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGG
TGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATG
CTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAAACAAGGTCAATTCTGTAATT
GAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGG
AAAACTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGG
TTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAA
GTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGAAACGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAA
GTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGTACCTATGACTATCCAAAATATTCCGAAG
AATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTATACCAGATT
CTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCT
TCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTAAGAGCTCTAAGTTAAAATG
CTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATT
AATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAG
TGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTG
TCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCA
AATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAAC
TTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 53

SEQ ID NO: 62

H1 de A/Brisbane/59/2007 (Construto # 774)

CTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACAT
TTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAAT
ATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTT
GTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACA
TAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGA
GGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGA
GAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAA
AAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGT
ATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATA
GAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCC
AAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTA
GGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACG
CATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACC
AATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTC
AAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAAGTAAAACT
ACTGGTCCTGTTATGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCTAA
CAACTCGACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAAAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACC
TGCTTGAGAACAGTCACAATGGAAAACTATGTCTATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGT
AATTGCAGCGTTGCCGGGTGGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAGTC
ATGGTCCTACATTGTAGAAAAACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCTG
ACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTCGAAATATTCCCC
AAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTGTCAGCATCATGCTCCCATAATGGGG
AAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGC
AAGTCCTATGCAAACAACAAAGAAAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAAA
CATAGGTGACCAAAAGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTA
TAGCAGAAAATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCA
ATTACTACTGGACTCTGCTTGAACCCGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAG
CGCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCACCA
ATGGATAAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCA
GAACGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATG
GTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTT
CATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAA
GGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACAAGGT
CAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCAGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTGG
AAAGAAGGATGGAAAACTTGAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAGACATTTGGACATATAATG
CAGAACTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAAT
CTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAGTTAAAGAATAATGCTAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAG
TTCTATCACAAGTGTAACGATGAATGCATGGAGAGTGTAAAGAATGGAACTTATGACTATCCAAAA
TATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGT
CTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGG
CAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTACAGTGTAGAATATGCATCTAAGAGCTCTAA
GTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGA
GCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATT
TACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCG
TACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAAT
ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAA
CAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 54

SEQ ID NO: 63

H1 de A/Ilhas Salomão/3/2006 (H1N1) (Construto # 775)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTA
AGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCAT
TATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAAC
AATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAG
AGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTAC
AAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATA
AGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTT
TTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTA
AACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAAT
TTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAA
CTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAA
AAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGG
AGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCAC
GCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAA
AAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTG
ATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAA
TGAAAGTAAAACTACTGGTCCTGTTATGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGT
ATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGAATGTGA
CAGTGACACACTCTGTCAACCTGCTTGAGGACAGTCACAATGGAAAATTATGTCTATTAAAA
GGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCA
GAATGCGAATTACTGATTTCCAGGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAAAACCAAATCCTGA
GAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAG
TTCAGTATCTTCATTTGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACA
CCACAACCGGAGTATCAGCATCATGCTCCCATAATGGGGAAAGCAGTTTTTACAAAAATTT
GCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATGCAAACAA
CAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTAACATAGGTGACCAA
AGGGCTCTCTATCATAAAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAA
ATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCAACTAC
TACTGGACTCTACTTGAACCCGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGC
GCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCA
CCAATGGATGAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTC
CTTTCCAGAATGTACACCCTGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAA
ATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGA
GCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTTAT
CATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCA
TTAATGGGATTACAAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCT
GTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTAAATAAAAAAGTTGATG
ATGGGTTTATAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGG
ACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAA
GAATAATGCCAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTATCATAAGTGTAACGATGAAT
GCATGGAGAGTGTAAAAAATGGAACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTA
AACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGA
TCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTG
GATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTGAGAGCTCTAAGTTAAAATGC
TTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAA
TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTA
CATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCG
CGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTG
GTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGA
AATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATG
ATAGTACA

Fig. 55

SEQ ID NO: 64
H2 de A/Cingapura/1/57 (H2N2) (Construto # 780)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAA
GTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTAT
TAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTT
TGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAG
AAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTG
TACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAAT
TGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTC
ATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATT
ATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAAT
TTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATT
TCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTT
ACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATC
CAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCT
ACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTA
TCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACA
AAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGCCATCATTTATCTAATTC
TCCTGTTCACAGCAGTGAGAGGGGACCAAATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACA
GAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCGGAACGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGA
GAAGACCCATAACGGAAAGTTATGCAAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAACTAGGGGACT
GTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAA
TGGTCCTATATAATGGAGAAAGAAAACCCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAA
TGATTATGAAGAATTGAAACATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTCGAGAAAGTAAAGATTCT
GCCCAAAGATAGATGGACACAGCATACAACAACTGGAGGTTCACGGGCCTGCGCGGTGTCT
GGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAGAATCAAATTATCCGGTT
GCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGCACCA
TCCCAATGATGAGACAGAACAAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAG
GCACATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCCAGACATAGCAACAAGGCCTAAAGTGAATGGA
CTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCCTATTGGATATGTGGGACACCATAAATTTTGAG
AGTACTGGTAATCTAATTGCACCAGAGTATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGG
ATCATGAAAACAGAAGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAAATGCCAAACTCCTTTGGGAGC
AATAAATACAACATTGCCTTTTCACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCCCCAAATA
TGTAAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCCAGATTGAATCAA
GAGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGT
TGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCAC
TCAAAAGGCATTTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCA
ATTTGAAGCTGTTGGGAAAGAGTTCAGTAACTTAGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAACAAAAA
GATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAAA
ATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAAGTCAGAATGC
AGCTGAGAGACAACGTCAAAGAACTAGGAAATGGATGTTTTGAATTTTATCACAAATGTGATG
ATGAATGCATGAATAGTGTGAAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTA
AACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAAAATTGAGCAGCATGGGGGTTTATCAAATCCTTG
CCATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCT
GGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGAGAGCTCTAAGTTAAAATG
CTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAA
TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACA
TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTA
CAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAAT
ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCAT
TAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 56

SEQ ID NO: 65

H5 de A/Anhui/1/2005 (H5N1) (Construto # 781)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAG
TTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATT
AAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTT
GTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGA
AAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGT
ACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATT
GCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCA
TTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTAT
TTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTA
ATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCAT
AGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTA
AAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAAC
CAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACAT
TATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGA
GAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC
AATAGTCAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACTCGACAGA
GCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAA
GACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTGATTTTAAGAGATTGTA
GTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCCGGAATGG
TCTTACATAGTGGAGAAGGCCAACCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAATTTCAACGA
CTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCC
AAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGG
AACGCCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCCAACAATA
AAGAGAAGCTACAATAATACCAACCAGGAAGATCTTTTGATACTGTGGGGGATTCATCATTCT
AATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACA
TCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGT
GGAAGGATGGATTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAT
GGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTGTT
AAAAGTGAAGTGGAATATGGTAACTGCAATACAAAGTGTCAAACTCCAATAGGGGCGATAAAC
TCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAA
TCAAACAAATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCTAAGAGAAAGAAGAAGAAAA
AGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGGTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGG
TTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCA
CTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTC
AGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGA
AAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAA
ATGAGAGAACTCTAGACTTCCATGATTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTAC
AGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATA
ATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAA
GATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACTGT
CAATTTATTCAACAGTTGCGAGTTCTCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCTGGTCTATCTTTGT
GGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGC
TTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATT
AATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATA
AGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACA
ATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATAT
AGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAA
CAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 57

SEQ ID NO: 66

H5 de A/Vietnã/1194/2004 (H5N1) (Construto # 782)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAG
TTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATT
AAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTT
GTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGA
AAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGT
ACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATT
GCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCA
TTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTAT
TTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTA
ATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCAT
AGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTA
AAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAAC
CAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACAT
TATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGA
GAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTGC
AATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACTCGACAGA
GCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAA
GACACACAATGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAG
TGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAGTTCATCAATGTGCCGGAATGGT
CTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACT
ATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAA
AAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTGGGGGTCAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAA
AGTCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAA
GAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAA
TGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATC
TACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGG
AAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGG
AAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAA
AGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAATACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCT
AGCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCA
AACAGATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAA
GAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATG
GTTGGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATC
CACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATTATTGACAAAATGAACAC
TCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAA
GAAGATGGAAGACGGGTTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTAGTTCTCATGGA
AAACGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACT
ACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGA
TAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAGAAGC
AAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATATTG
TCAATTTATTCTACAGTGGCCAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTA
TGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATG
CTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAA
TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACA
TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTA
CAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAAT
ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATT
AACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 58

SEQ ID NO: 67

H6 de A/Marreco/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (Construto # 783)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTA
AGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCAT
TATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACA
ATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGA
GAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACA
AAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAA
GGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTT
TGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAA
ACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATT
TGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAAC
TCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAA
AAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAG
GATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGC
ATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAA
ACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGAT
TCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATG
ATTGCAATCATTGTAATAGCAATACTGGCAGCAGCCGGAAAGTCAGACAAGATCTGCATTG
GGTATCATGCCAACAATTCAACAACACAGGTAGATACGATACTTGAGAAGAATGTGACTGT
CACACACTCAATTGAATTGCTGGAAAATCAGAAGGAAGAAAGATTCTGCAAGATATTGAACA
AGGCCCCTCTCGACTTAAGGGAATGTACCATAGAGGGTTGGATCTTGGGGAATCCCCAAT
GCGACCTATTGCTTGGTGATCAAAGCTGGTCATACATTGTGGAAAGACCTACTGCTCAAAA
CGGGATCTGCTACCCAGGAACCTTAAATGAGGTAGAAGAACTGAGGGCACTTATTGGATCA
GGAGAAAGGGTAGAGAGATTTGAGATGTTTCCCCAAAGCACCTGGCAAGGAGTTGACACC
AACAGTGGAACAACAAGATCCTGCCCTTATTCTACTGGTGCGTCTTTCTACAGAAACCTCCT
ATGGATAATAAAAACCAAGACAGCAGAATATCCAGTAATTAAGGGAATTTACAACAACACTG
GAACCCAGCCAATCCTCTATTTCTGGGGTGTGCATCATCCTCCTAACACCGACGAGCAAGA
TACTCTGTATGGCTCTGGTGATCGATACGTTAGAATGGGAACTGAAAGCATGAATTTTGCCA
AGAGTCCGGAAATTGCGGCAAGGCCTGCTGTGAATGGACAAAGAGGCAGAATTGATTATTA
TTGGTCGGTTTTAAAACCAGGGGAAACCTTGAATGTGGAATCTAATGGAAATCTAATCGCC
CCTTGGTATGCATACAAATTTGTCAACACAAATAGTAAAGGAGCCGTCTTCAGGTCAGATTT
ACCAATCGAGAACTGCGATGCCACATGCCAGACTATTGCAGGGGTTCTAAGGACCAATAAA
ACATTTCAGAATGTGAGTCCCCTGTGGATAGGAGAATGTCCCAAATACGTGAAAAGTGAAA
GTCTGAGGCTTGCAACTGGACTAAGAAATGTTCCACAGATTGAAACTAGAGGACTCTTCGG
AGCTATTGCAGGGTTTATTGAAGGAGGATGGACTGGGATGATAGATGGGTGGTATGGCTAT
CACCATGAAAATTCTCAAGGGTCAGGATATGCAGCAGACAGAGAAAGCACTCAAAAGGCTG
TAAACAGAATTACAAATAAGGTCAATTCCATCATCAACAAAATGAACACACAATTTGAAGCTG
TCGATCACGAATTTTCAAATCTGGAGAGGAGAATTGACAATCTGAACAAAAGAATGCAAGAT
GGATTTCTGGATGTTTGGACATACAATGCTGAACTGTTGGTTCTTCTTGAAAACGAAAGAAC
ACTAGACATGCATGACGCAAATGTGAAGAACCTACATGAAAAGGTCAAATCACAACTAAGG
GACAATGCTACGATCTTAGGGAATGGTTGCTTTGAATTTTGGCATAAGTGTGACAATGAATG
CATAGAGTCTGTCAAAAATGGTACATATGACTATCCCAAATACCAGACTGAAAGCAAATTAA
ACAGGCTAAAAATAGAATCAGTAAAGCTAGAGAACCTTGGTGTGTATCAAATTCTTGCCATT
TATAGTACGGTATCGAGCAGCCTAGTGTTGGTAGGGCTGATCATGGCAATGGGTCTTTGGA
TGTGTTCAAATGGTTCAATGCAGTGCAGGATATGTATATAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTT
CTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATT
AATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACA
TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCG
TACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTT
AATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAAT
TCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATA
GTACA

Fig. 59

SEQ ID NO: 68

H9 de A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Construto # 785)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAA
GTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAAT
TTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAG
AGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAG
TTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGT
TAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCA
AGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATG
TGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGT
CAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTT
TATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGG
TATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACA
TCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTG
GCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCC
ACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAA
ACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAAACAATA
TCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAATCTGCATCGGCCA
CCAGTCAACAAACTCCACAGAAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGTTCCTGTGACAC
ATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACAAGCCTGGGACA
TCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCCTTCTTGTGACC
TGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTGTAAATGGAAC
GTGTTACCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTTAGTTCCGCTAGTT
CCTACCAAAGAATCCAAATCTTCCCAGACACAACCTGGAATGTGACTTACACTGGAACAAGC
AGAGCATGTTCAGGTTCATTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAAGAGCGGTTTTTA
CCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTTCGTGTGGGGC
ATACATCACCCACCCACCTATACCGAGCAAACAAATTTGTACATAAGAAACGACACAACAAC
AAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAGTGATAGGGCCAAGGCCCCTT
GTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCGGTACTAAAACCAGGCCAAACATT
GCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTCAGGAGGG
AGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAATGTCAGAC
TGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCATTTGGAAC
CTGCCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACTGGCAGTCGGTCTGAGGAACGTGCCT
GCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTCATAGAAGGAGGTTGGCCAG
GACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGC
AGATAGGGATTCAACTCAAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATATAGTCGA
CAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTTAGTGAGGTTGAAACTAGACTCAA
TATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACAAGACGTATGGGCATATAATGCAGAATTGCT
AGTACTACTTGAAAATCAAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAACGTGAACAATCTATATAA
CAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTTTCGAGCTA
TACCATAAATGTGATGATCAGTGCATGGAAACAATTCGGAACGGGACCTATAATAGGAGAAA
GTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGAATCTGAG
GGAACTTACAAAATCCTCACCATTTATTCGACTGTCGCCTCATCTCTTGTGCTTGCAATGGG
GTTTGCTGCCTTCCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATGCAACATTTGTATAT
AAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTT
TGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACT
GGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACT
AGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTT
GCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAAT
GGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATAT
CATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 60

SEQ ID NO: 69

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

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGT
TAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAA
ACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTT
GCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAA
GGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAA
AATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTA
AATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAG
AAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAAT
TGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATT
TGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATA
AGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAG
CCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAA
TCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACA
CATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAA
ATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAA
TTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCTACATTCTATGTCTGGTT
TTCACTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCA
GTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTG
AGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAG
AAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAA
ATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGAT
TATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACAATGAAAGTTTCA
ATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAACAGTTT
CTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGC
CAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCACCACCCGGGTACGGACAATGA
CCAAATCTTCCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAGAAGCCAACAA
ACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCT
ATTGGACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCC
TAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGG
CAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAACGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAAT
GTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCA
ACAGGGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTC
ATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAG
GGAATAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAG
CTGAATAGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAG
TCGAAGGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACCAAAATAGATCTCTGGTCAT
ACAACGCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAAT
GAACAAACTGTTTGAAAAAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGG
TTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATG
ACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGA
AGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTT
GCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTT
GAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTG
TTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGT
GTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACA
TGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAA
CTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCA
GTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGA
TAAATGATAGTACA

Fig. 61

SEQ ID NO: 70

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

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAA
GTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAAT
TTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAG
AGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAG
TTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGT
TAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCA
AGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGT
GATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTC
AAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTA
TATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAACGGTAT
ATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCC
AATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCA
CATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACA
TCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACA
CATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGACTATCATT
GCTTTGAGCTACATTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCAC
GGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACG
AATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGGAAT
ATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGG
GAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAA
GCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGC
CTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACGATGAAAGTTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAATG
GAACAAGCTCTGCTTGCAAAAGGAGATCTAATAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGA
CCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACA
AATTGTACATTTGGGGGGTTCACCACCCGGGTACGGACAATGACCAAATCTTCCTGCATGCT
CAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAGAAGCCAACAAACTGTAATCCCGAATAT
CGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAA
AACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTC
AAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTC
TGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTTCAAAATGTAAACAGGAT
CACATATGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGC
GAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAAT
GGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGGAATAG
GACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCAATCAAATCAATGGGAAGCTGAAT
AGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAGTAGA
AGGGAGAATCCAGGACCTCGAGAAATATGTTGAGGACACTAAAATAGATCTCTGGTCATACA
ACGCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATG
AACAAACTGTTTGAAAGAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGG
TTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTA
TGACCATGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAAGGCGTTGAGC
TGAAGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTT
GTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATT
TGCATTTGAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTG
TTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAG
ATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATA
ACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAAC
ATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATT
AATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTT
TATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 62

SEQ ID NO: 71

H7 de A/Equino/Praga/56 (H7N7)

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAG
TTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATT
AAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTT
GTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGA
AAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGT
ACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATT
GCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCA
TTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTAT
TTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTA
ATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCA
TAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACT
AAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAA
CCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACA
TTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCA
CCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAG
AGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAACACTCAAATTCTAATATTAG
CCACTTCGGCATTCTTCTATGTACGTGCAGATAAAATCTGCCTAGGACATCATGCTGTGTCTA
ATGGAACCAAAGTAGACACCCTTACTGAAAAAGGAATAGAAGTTGTCAATGCAACAGAAACAG
TTGAACAAACAAACATCCCTAAGATCTGCTCAAAAGGAAAACAGACTGTTGACCTTGGTCAAT
GTGGATTACTAGGGACCGTTATTGGTCCTCCCCAATGTGACCAATTTCTTGAGTTCTCTGCTA
ATTTAATAGTTGAAAGAAGGGAAGGTAATGACATTTGTTATCCAGGCAAATTTGACAATGAAGA
AACATTGAGAAAAATACTCAGAAAATCCGGAGGAATTAAAAAGGAGAATATGGGATTCACATA
TACCGGAGTGAGAACCAATGGAGAGACTAGCGCATGTAGAAGGTCAAGATCTTCCTTTTATG
CAGAGATGAAATGGCTTCTATCCAGCACAGACAATGGGACATTTCCACAAATGACAAAGTCCT
ACAAGAACACTAAGAAGGTACCAGCTCTGATAATCTGGGGAATCCACCACTCAGGATCAACT
ACTGAACAGACTAGATTATATGGAAGTGGGAATAAATTGATAACAGTTTGGAGTTCCAAATAC
CAACAATCTTTTGTCCCAAATCCTGGACCAAGACCGCAAATGAATGGTCAATCAGGAAGAATT
GACTTTCACTGGCTGATGCTAGATCCCAATGATACTGTCACTTTCAGTTTTAATGGGGCCTTT
ATAGCACCTGACCGCGCCAGTTTTCTAAGAGGTAAATCTCTAGGAATCCAAAGTGATGCACAA
CTTGACAATAATTGTGAAGGTGAATGCTATCATATTGGAGGTACTATAATTAGCAACTTGCCCT
TTCAAAACATTAATAGTAGGGCAATCGGAAAATGCCCCAGATACGTGAAGCAGAAGAGCTTAA
TGCTAGCAACAGGAATGAAAAATGTTCCTGAAGCTCCTGCACATAAACAACTAACTCATCACA
TGCGCAAAAAAAGAGGTTTATTTGGTGCAATAGCAGGATTCATTGAAAATGGGTGGGAAGGAT
TAATAGACGGATGGTATGGATATAAGCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGGACTGCTGCAGAC
TACAAAAGTACACAATCTGCTATCAACCAAATAACCGGAAAATTGAACAGACTAATAGAAAAAA
CCAACCAGCAATTCGAACTAATAGATAATGAGTTCAATGAAATAGAAAAACAAATTGGCAATGT
TATTAACTGGACTAGAGATTCTATCATCGAAGTATGGTCATATAATGCAGAGTTCCTCGTAGC
AGTGGAGAATCAACACACTATTGATTTAACTGACTCAGAAATGAACAAACTATATGAAAAGGTA
AGAAGACAACTGAGAGAAAATGCTGAGGAAGATGGTAATGGCTGTTTTGAAATATTCCACCAA
TGTGACAATGATTGCATGGCCAGCATTAGAAACAACACATATGACCATAAAAAATACAGAAAA
GAGGCAATACAAAACAGAATCCAGATTGACGCAGTAAAGTTGAGCAGTGGTTACAAAGATATA
ATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGTTTCTTATTTCTTGCCATTGCAATGGGTCTTGTTT
TCATATGTATAAAAAATGGAAACATGCGGTGCACTATTTGTATATAAGAGCTCTAAGTTAAAAT
GCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTA
ATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTAC
ATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGT
ACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAA
TATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCAT
TAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 63

SEQ ID NO: 72

HA de B/Malásia/2506/2004

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAG
TTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTA
AACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGT
TGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAA
AGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACC
AAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTG
TAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAA
AAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAAT
GAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTG
ACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATC
AAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAAT
CTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCAC
AACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAA
TCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTAT
AAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACA
TCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACTCACCACATGTTGTCAAAACTG
CTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTC
ATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGAGGGAAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCA
CAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAACATACCCTCGGCAAGAGTT
TCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAA
AAATTAGACAGCTGCCTAAACTTCTCAGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACTCATAACGT
TATCAATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAA
CGTTACCAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAACGACAACAA
CAAAACAGCAACAAATTCATTAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAA
ATTACCGTTTGGGGGTTCCACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCA
AAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGT
GGCTTCCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGTAGAATTGTTGTTGATTAC
ATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGAGGTATTTTATTGCCTCAAA
AAGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATTGGAGAAG
CAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAAC
ATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAA
CCAAATATAGACCTCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTT
CTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCAC
ATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAA
ATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATG
AACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGACGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAA
GCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGC
ATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGA
ATGGATGCTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTA
CCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTA
AATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGG
CTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCC
ATCTGTCTATAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATT
GTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGA
TGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACT
AACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTT
TTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAAT
GGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCA
TCCCCTTTGATAAATGATAGTACA

Fig. 64

SEQ ID NO: 73

HA de B/Flórida/4/2006

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGT
TAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAA
ACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTT
GCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAA
GGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAA
AATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTA
AATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAG
AAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAAT
TGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATT
TGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATA
AGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAG
CCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAA
TCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACA
CATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAA
ATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAA
TTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAAT
GCAGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTC
AAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGC
AAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAAACTATGCCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCT
GGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATAC
TCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAG
GCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGAT
GCGGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTAC
CAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGC
AACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAATCACTGTT
TGGGGGTTCCATTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAA
AGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGA
TCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAA
ACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTACCAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTG
CGCGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCT
TCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCC
ATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAAATATAGAC
CTCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCCTAGAAGGAG
GATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCA
GTGGCGGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTT
TGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACG
AAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCAAATAG
AACTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGGCACT
TGAGAGAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGA
AACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGG
AGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCACTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGAT
TGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATG
CTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAAGA
GCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCT
TGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAA
TGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAA
GACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTT
ATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTA
TCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAA
TGATAGTACA

Fig. 65

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

SEQ ID NO: 74

MK(X_1)KLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL
E(X_2)SHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLIS(X_3)ESWSYIVE(X_4)P
NPENGTCYPG(X_5)FADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHT(X_6)TGVSA
SCSHNG(X_7)SSFY(X_8)NLLWLTGKNGLYPNLSKSY (X_9)NNKEKEVLVLWGVHHPPN
IG(X_{10})Q (X_{11})ALYH(X_{12})ENAYVSVVSSHYSR(X_{13})FTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLL
EPGDTIIFEANGNLIAP(X_{14})YAFALSRGFGSGII(X_{15})SNAPMD(X_{16})CDAKCQTPQG
AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIA
GFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIE
KMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGF(X_{17})DIWTYNAELLVLLENERT
LDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCN(X_{18})ECMESVKNGTY
DYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAIS
FWMCSNGSLQCRICI

Fig. 66

SEQ ID NO: 75

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDSHNGKLCLLKGIA
PLQLG
NCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIF
PKESSW
PNHTVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPPNI
GNQRALYHT
ENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALS
RGFGSG
IITSNAPMDECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRG
LFGAIA
GFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGK
EFNKLERRM
ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFEF
YHKCNNE
CMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMC
SNGSLQ
CRICI

Fig. 67

SEQ ID NO: 76

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPS
ERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEISLSYSAGALASCMGLIYNRMGAV
TT
EVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVAS
QAR
QMVQAMRTIGTHPSSSAGLKNDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK

Fig. 68

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTC
ACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAG
GAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAT
ATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATA
TAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGG TATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGT
GGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTC
TTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGT
TTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAA
CGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTG
TTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTC
TGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAA
ATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGC
TTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTC GGGCCCATGGTTTTCACACCTCAGATACTTGGACTTAT
GCTTTTTTGGATTTCAGCCTCCAGAGGTGATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCT
GTGACTCCAGGAGATAGTGTCAGTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTA
CACTGGTTTCAACAAAAATCGCATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCA
TATCTGGGATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCA
ACAGTGTGAAGACTGAAGATTTTGGAATGTTTTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCTCTCAC
GTTCGGTGATGGGACAAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCT
TCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACT
TCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCC
TGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACG
TTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCA
ACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGA
ATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTT
TATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACAC
AAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATC
GACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCT
TGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCA
TGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATA
GAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTA
GATTCTAGAGTCTCAAGCTTC GGCGCGCC

Fig. 69

AAGCTTGCTAGCGGCCTCAATGGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTACCCCGGGCTGGTAT
ATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTA
CTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATAT
GGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTT
TGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAA
AACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATAT
CATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGAC
GCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATT
TTTAAAATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTT
GGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCT
ATATATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAAC
GGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGA
GGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGA
GATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCC
ACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACT
TTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTA
ATCATCTTGAGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTG
TTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAG
AGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAA
AGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTA
GTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGG
TCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGAC
TATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCA
AAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAA
GTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAA
GAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAA
TGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATC
AACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGG
AAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGG
AAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAA
AGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCT
AGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCA
AACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAA
GAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATG
GTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATC
CACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACAC
TCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAA
GAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACTTCTGGTTCTCATGGA
AAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACT
ACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGA
TAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACTATCCGCAGTATTCAGAAGAAGC
AAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACT
GTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTT
ATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA GAGCTCTAAGTTAAAATG
CTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAA
TTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACA
TAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTA
CAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAAT
ATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATT
AACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACAC
CAATTAGGAAGGAGCATGCTCGAGGCCTGGCTGGCCGAATTC

Fig. 70

AAGCTTGCTAGCGGCCTCAATGGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTACCCCGGGCTGGTATA
TTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACT
TGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGA
TGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTT
GTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACAT
AATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGA
GGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTA
GAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAA
TTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAA
AGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTG
CCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATT
AATCCCTCCAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACA
GGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCA
CTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTG
AGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCT
ACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAG
AGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCT
CAGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCTAACAACTCGACCGACACTGTTGACA
CAGTACTTGAAAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTGCTTGAGAACAGTCACAATG
GAAAACTATGTCTATTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGGT
GGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAGTCATGGTCCTACATTGTAGA
AAAACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCTGACTATGAGGAACTGAG
GGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGG
CCCAACCACACCGTAACCGGAGTGTCAGCATCATGCTCCCATAATGGGGAAAGCAGTTTTTAC
AGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATGCA
AACAACAAAGAAAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAAACATAGGTGAC
CAAAAGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAA
AATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCAATTACTA
CTGGACTCTGCTTGAACCCGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCC
AAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAATGCACCAATG
GATAAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAG
AACGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATG
GTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGT
TTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAG
CAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACA
AGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCAGTGGGCAAAGAGTTCAACAA
ATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTGAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAGACATTTGGACA
TATAATGCAGAACTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATG
TGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAGTTAAAGAATAATGCTAAAGAAATAGGAAATGG
GTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGTAACGATGAATGCATGGAGAGTGTAAAGAATGGAACTTAT
GACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGG
AATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTT
GGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTACAGTGTAGAATATG
CATCTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAA
TTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAAC
TGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTA
GACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGC
CACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAA
ATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCC
CTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGAGGCCTGGCTGGCC GAATTC

Fig. 71

AAGCTTGCTAGCGGCCTCAATGGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTACCCCGGGCTGGTATAT
TTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTT
GAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGAT
GATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGT
TCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAAT
GTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGG
AATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAG
AGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAA
AAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTG
TATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCAT
AGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCT
CCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCC
CGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGC
CCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACAC
AAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGA
TTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA ATGG
CGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTC
GCTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTA
CCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGC
TGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAA
CTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGG
GACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATG
CCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACAATGAAAGTTTCAATTG
GACTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAACAGTTTCTTT
AGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAA
CAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCACCACCCGGGTACGGACAATGACCAA
ATCTTCCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAAGAAGCCAACAAACTG
TAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTG
GACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGG
GGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAAT
GCAATTCTGAATGCATCACTCCAAACGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAATGTAAA
CAGGATCACATACGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGG
GATGCGAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGA
AAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGGAAT
AGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAGCTGAA
TAGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAAGTCGAA
GGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACCAAAATAGATCTCTGGTCATACAACG
CGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAA
ACTGTTTGAAAAAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTC
AAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATGACCACG
ATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGAAGTCAG
GATACAAAGATTGGATACTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTTGCTTTGT
TGGGGTTCATCATGTGGGCCTGCCAAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGA GAGC
TCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGT
AGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGT
AATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGAC
CTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAA
GTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCG
AAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGAT
AGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGAGGCCTGGCTGGCCGAATTC

Fig. 72

AAGCTTGCTAGCGGCCTCAATGGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTACCCCGGGCTGGTATATT
TATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGA
ACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGAT
AAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTC
TCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGA
GTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTG
ACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTA
CCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAATTAAAAGTTGAG
TCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAA
TTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTCAGT
TAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAA
AAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGAT
AACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGT
GGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCAC
ATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACA
TACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAA ATGGCGAAAAACGTTGCGAT
TTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGATCGAATCTGCACT
GGAATAACATCTTCAAACTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTCAATGTGAC
TGGTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGAC
CAGAGGGAAACTATGCCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCA
ATGTGTGTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATC
CGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGAT
ATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTA
CAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAATGG
CTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATAC
ATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAATCACTGTTTGGGGGTTCCATTCAGATAACAAAACCCAAAT
GAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACAC
ACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGG
CAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTACCAAAGAG
GTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCCTT
GCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTA
CTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGC
TCGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCT
ATTGCTGGTTTCCTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTC
ACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAGAT
AACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCAT
GGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACT
ATAAGCTCGCAAATAGAACTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGA
GCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAA
ATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCAC
CTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCACTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAAT
GATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTA
ACATTGATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTC
TATAA GAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTT
GTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTG
TAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGA
AGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTA
TAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATC
GAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGAT
AGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGAGGCCTGGCTGGCCGAATTC

Fig. 73

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCG
ATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGT
TTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCT
CTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATC
GTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGG
ACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTT
GGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCT
GCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTAC
TTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAA
TTTGTCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGT
TGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAAC
CGACACTGTTGACACAGTACTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACT
TGAGGACAGTCACAATGGAAAACTATGTCTACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGG
TAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCCAA
GGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGG
GTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAG
ATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAACCGGAGTATCAGC
ATCATGCTCCCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAA
GAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTT
GTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTAACATAGGGAACCAAAGGGCACTCTATCATACA
GAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAGATTCACCCCAGAAATAG
CCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTACTGGACTCTGCTGG
AACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCATGGTATGCTTT
TGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACCAATGGATGAATG
TGATGCGAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAATGT
ACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGT
TACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGG
TTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGGTGGTATGGTTATCATCATCAGAA
TGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAATGCCATTAACGGGAT
TACAAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGGGCAAA
GAGTTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTC
TAGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGA
TTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAAT
GCCAAAGAAATAGGAAACGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGTAACAATGAATGCATG
GAGAGTGTGAAAAATGGTACCTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACA
GGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTATACCAGATTCTGGCGATCT
ACTCAACTGTCGCCAGTTCCCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGA
TGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTAA AGGCCTATTTTCTTTAGTTT
GAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGT
GTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGC
AAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATA
TCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAAT
CCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAAT
AATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAT
TATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCG
CGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTC GGCGCGCC

Fig. 74

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCG
ATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGT
TTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCT
CTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATC
GTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGG
ACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTT
GGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCT
GCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTAC
TTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAA
TTTGTCGGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTG
ATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGA
AAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCT
CTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCT
CCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGA
GAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACT
GAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCT
TGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCC
TCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGA
AAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAA
TGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGAC
ATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAA
AGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGA
GTAATGGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGC
AATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGG
GCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCC
AAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGA
GAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGA
TGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGG
GTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAA
CTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTA
GAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACT
TATAATGCCGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAA
ATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGG
GTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAA
CGGAACGTACAACTATCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAG
TGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCG
AGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGA
TCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA AGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATT
CGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGT
AATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAG
ATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAC
CTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCT
TGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAAT
GCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATAC
GCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCT
ATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTC GGCGCGCC

Fig. 75

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCG
ATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGG
TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCAT
CTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGA
TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGT
GGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTC
TTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATT
CTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGT
ACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACA
GAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCA
AATTTGTCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGT
GTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCA
ACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATA
CTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTA
AGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAAT
GTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCA
GGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAG
AAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGC
TCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAA
AGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTT
GGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAA
ACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAAT
AGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTT
AAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCATTGCTCCAGAATATGCA
TACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACT
GCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACA
TACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTG
CAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTT
GGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGG
GTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAA
AGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGT
TTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGA
AGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACTTCTGGTTCTCATGG
AAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCC
GACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACA
AATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACTATCCGCAGTATTC
AGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAAC
TTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATG
GCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA A
GGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGC
GGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTT
AGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAA
AAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAA
TAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTT
GAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTT
TTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCG
CAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAA
GCTTCGGCGCGCC

Fig. 76

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT
CTGTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCAT
TGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCA
AAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
ATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAA
AATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTA
AACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATC
TTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGA
AATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTC
CTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCC
CCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTG
CTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAA
GAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGA
TTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCC ATGAAAGTAAAACTACTG
GTCCTGTTATGCACATTTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGC
TAACAACTCGACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAAAAGAATGTGACAGTGACACAC
TCTGTCAACCTGCTTGAGAACAGTCACAATGGAAAACTATGTCTATTAAAAGGAATAGC
CCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGGTGGATCTTAGGAAACCCAGAATG
CGAATTACTGATTTCCAAGGAGTCATGGTCCTACATTGTAGAAAAACCAAATCCTGAGA
ATGGAACATGTTACCCAGGGCATTTCGCTGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGA
GTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAA
CCACACCGTAACCGGAGTGTCAGCATCATGCTCCCATAATGGGGAAAGCAGTTTTTAC
AGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCT
ATGCAAACAACAAAGAAAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAAA
CATAGGTGACCAAAAGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTT
CACATTATAGCAGAAAATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCA
AGAAGGAAGAATCAATTACTACTGGACTCTGCTTGAACCCGGGGATACAATAATATTT
GAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTG
GATCAGGAATCATCAACTCAAATGCACCAATGGATAAATGTGATGCGAAGTGCCAAAC
ACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAACGTACACCCAGTCACAATA
GGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGA
ACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGG
GGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGG
ATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACA
AGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCAGTGGGCAAAGAGTT
CAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTGAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAG
ACATTTGGACATATAATGCAGAACTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGAT
TTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAGTTAAAGAATAA
TGCTAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTATCACAAGTGTAACGATGAATGCA
TGGAGAGTGTAAAGAATGGAACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTA
AACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGG
CGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAG
CTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTACAGTGTAGAATATGCATCTAA AGGCCTATTT
TCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCT
GTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGG
TCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAG
ACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAA
GTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGA
ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTT
TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGC
GCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCT
CAAGCTTCGGCGCGCC

Fig. 77

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAA
GTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTC
GCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAAT
AGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCT
CATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTC
AGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCT
TTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGT
GGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTA
CGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTG
CCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTG
AAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCT
GCCCAAATTTGTCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCT
TCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGACACAATATGTATAGGCTACCATGCTAA
CAACTCGACCGACACTGTTGACACAGTACTTGAAAAGAATGTGACAGTGACACACTCTG
TCAACCTGCTTGAGAACAGTCACAATGGAAAACTATGTCTATTAAAAGGAATAGCCCCAC
TACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGGTGGATCTTAGGAAACCCAGAATGCGAATTA
CTGATTTCCAAGGAGTCATGGTCCTACATTGTAGAAAAACCAAATCCTGAGAATGGAACA
TGTTACCCAGGGCATTTCGCTGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATC
TTCATTTGAGAGGTTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACACCGTAAC
CGGAGTGTCAGCATCATGCTCCCATAATGGGGAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATG
GCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCAAGTCCTATGCAAACAACAAAG
AAAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCAAACATAGGTGACCAAAAG
GCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAAAT
TCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAGAATCAATTACT
ACTGGACTCTGCTTGAACCCGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAG
CGCCAAGATATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCAACTCAAAT
GCACCAATGGATAAATGTGATGCGAAGTGCCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAG
TCTTCCTTTCCAGAACGTACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGA
GTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTT
TGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGGTTG
GTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGCAC
ACAAAATGCCATTAATGGGATTACAAACAAGGTCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACAC
TCAATTCACAGCAGTGGGCAAAGAGTTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTGA
ATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAGACATTTGGACATATAATGCAGAACTGTTGGTTCT
ACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCCAATGTGAAGAATCTGTATGAGAA
AGTAAAAAGCCAGTTAAAGAATAATGCTAAAGAAATAGGAAATGGGTGTTTTGAGTTCTA
TCACAAGTGTAACGATGAATGCATGGAGAGTGTAAAGAATGGAACTTATGACTATCCAAA
ATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAAT
GGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTCTGGTTCTTTTGGT
CTCCCTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTACAGTGTAGAATAT
GCATCTAA AGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGT
TTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGA
GCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAA
ACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCAT
ATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTA
TGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAA
AATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTC
TAGAGTCTCAAGCTTC GGCGCGCC

Fig. 78

TTAATTAAGAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT
CTGTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATT
GCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATG
GACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAA
AGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTA
TCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAA
ATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAA
ACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTT
CAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAAT
CAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTAT
TCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCAT
ACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTG
ACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAA
TCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTT
AAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGAAGACTATCATTGCTTTGAG
CTACATTCTATGTCTGGTTTTCACTCAAAAACTTCCCGGAAATGACAACAGCACGGCAA
CGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACGAA
TGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGAAA
TATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCACACTAATAGATGCTCTA
TTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAAC
GCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAG
GTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACAATGAAAGTTTCAATTGGACTG
GAGTCACTCAAAACGGAACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAACAGTTTCTTT
AGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTAT
GCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCACCACCCGGGTACG
GACAATGACCAAATCTTCCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAA
AAGAAGCCAACAAACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATC
CCCAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAA
CAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGC
TCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAA
CGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAATGTAAACAGGATCACATACGGGGCC
TGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTAC
CAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTG
GGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGGAATAGGA
CAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAGCTGA
ATAGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAGTTCTCAGAA
GTCGAAGGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACCAAAATAGATCTCT
GGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTAAC
TGACTCAGAAATGAACAAACTGTTTGAAAAAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTG
AGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGA
TCAATCAGAAATGGAACTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCG
GTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGAAGTCAGGATACAAAGATTGGATACTATGGATT
TCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGC
CTGCCAAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGAAGGCCTATTTTCTTTAGTT
TGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAG
AGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCT
TCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAA
TTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAA
GATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTA
AGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTA
GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAG
GATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTCGG
CGCGCC

Fig. 79

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATC
TGTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTG
CGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGA
CCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCT
TCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTT
AATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCT
CTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACG
TTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAG
ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTG
TCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATT
ACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAG
GTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGT
ATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTT
CTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCC ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTT
ATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTCAAAAACTTCCCGGAAA
TGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATA
GTGAAAACAATCACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAG
TTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACTGCA
CACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGG
GACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGGA
TTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACAATGAAA
GTTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAGCTCTGCTTGCATAAGGAGATCT
AATAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAAATTCAAATACCCAGCA
TTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAAAAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCA
CCACCCGGGTACGGACAATGACCAAATCTTCCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATC
ACAGTCTCTACCAAAAGAAGCCAACAAACTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAG
AGTAAGGAATATCCCCAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAAACCGGGAGACA
TACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAA
GTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGC
ATCACTCCAAACGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAATGTAAACAGGATCAC
ATACGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAGGGATG
CGAAATGTACCAGAGAAACAAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAG
AAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTATGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGA
GGGAATAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAAT
GGGAAGCTGAATAGGTTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAG
AGTTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATCCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACCAA
AATAGATCTCTGGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGTTGCCCTGGAGAACCAACATACAA
TTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAAACTGTTTGAAAAAACAAAGAAGCAACTGAGG
GAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGC
CTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCAT
TAAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGCGTTGAGCTGAAGTCAGGATACAAAGATTGGAT
ACTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCAT
CATGTGGGCCTGCCAAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGA AGGCCTATTT
TCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCT
GTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGG
TCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
ACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAA
GTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGA
ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTT
TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCG
CAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCA
AGCTTC GGCGCGCC

Fig. 80

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT
CTGTCACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCAT
TGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCA
AAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
ATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAA
AATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCT
AAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGAT
CTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCG
AAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGT
CCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAG
CCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTC
TGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTA
TAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAA
AGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCC ATGAAGGCAATAATT
GTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTT
CAAACTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTG
TGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGG
ACCAGAGGGAAACTATGCCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTG
GGCAGACCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAA
GTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGC
AACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATC
GATGCGGAAAAGGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCT
AACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGAC
AACAACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAG
GGGAAGACCAAATCACTGTTTGGGGGTTCCATTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAA
CCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACA
CACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCAC
AAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAAT
TGTCTACCAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCGAGTGGCAGGAG
CAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAAT
ACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGG
AAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAAATATAGA
CCTCCTGCAAAACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCCTAG
AAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCA
CATGGAGTGGCAGTGGCGGCGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAGATA
ACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTGG
TGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTC
AGAGCTGACACTATAAGCTCGCAAATAGAACTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAA
TAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAATGCT
GGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAGTGCAA
CCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTC
CCCACTTTTGATTCACTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAA
CCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGC
TAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTAT
AAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGT
GAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCT
CCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAA
AAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAA
ACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATC
ATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTA
TTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGA
AAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTA
CTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTC GGCGCGCC

Fig. 81

TTAATTAA GAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTC
ACTTTATTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAG
GAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCAC
GAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG
ATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTA
TATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAAC
GTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTC
TCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAAC
GTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAA
TAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTG
CTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTA
CTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTAT
AAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTG
TTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCC ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCG
GCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGATCGAATCTGCACTGG
AATAACATCTTCAAACTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTCAATGTGAC
TGGTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGG
ACCAGAGGGAAACTATGCCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAG
ACCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTG
TTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTC
TCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGGCACCA
GGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATT
TTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCCACTAAC
AGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAATCACTGTTTGGGGGTTCCATTC
AGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCT
GCTAATGGAGTAACCACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGATCAAACAGAAGAC
GGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAAC
AGGAACAATTGTCTACCAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCGAGTGGCA
GGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAAT
ACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATT
GCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAA
AACTATTAAAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCCTAGAAGGAGGATGGGAA
GGAATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGG
CGGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGA
GCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACT
CGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCAAATAGAACTTG
CAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGGCACTTGAGA
GAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCA
AACACAAGTGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAA
TTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCACTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGG
ATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGCT
AGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA AGG
CCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTT
CTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTC
GTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGG
AATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGA
TTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATG
TAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCA
ATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGC
GCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTC GGCGCGCC

Fig. 82

ATGTTTGGGCGCGGACCAACAAGGAAGAGTGATAACACCAAATATTACGATATTCT
TGGTGTTTCAAAAAGTGCTAGTGAAGATGAAATCAAGAAAGCCTATAGAAAGGCAG
CGATGAAGAACCATCCAGATAAGGGTGGGGATCCTGAGAAGTTCAAGGAGTTGGG
CCAAGCATATGAAGTGTTGAGCGATCCTGAAAAGAAAGAACTGTATGATCAATATG
GTGAAGATGCCCTTAAAGAAGGAATGGGGGGAGGCGCAGGAAGCTCATTTCATAA
TCCGTTTGATATTTTCGAATCATTTTTTGGTGCAGGCTTTGGTGGTGGTGGTCCTT
CACGCGCAAGAAGACAGAAGCAAGGAGAAGATGTGGTGCATTCTATAAAGGTTTC
CTTGGAGGATGTGTATAACGGCACTACAAAGAAGCTATCACTTTCTAGGAATGCAC
TGTGCTCAAAATGTAAAGGGAAAGGTTCAAAAAGTGGAACTGCTGGAAGGTGTTTT
GGATGCCAGGGCACAGGTATGAAGATTACCAGAAGGCAAATTGGACTGGGCATGA
TTCAACAAATGCAACACGTCTGTCCTGACTGCAAAGGAACAGGCGAGGTCATTAG
TGAGAGAGATAGATGCCCTCAATGCAAGGGAAACAAGATTACTCAAGAAAAGAAG
GTGCTGGAGGTGCATGTGGAAAAGGGGATGCAGCAGGGTCACAAGATTGTATTCG
AAGGACAAGCTGATGAAGCTCCTGATACAATCACAGGAGACATAGTTTTTGTCTTG
CAAGTAAAGGGACATCCGAAGTTTCGGAGGGAGCGTGATGACCTCCACATTGAAC
ACAATTTGAGCTTAACTGAGGCTCTCTGTGGCTTCCAGTTTAATGTCACACATCTT
GATGGAAGGCAACTATTGGTCAAATCGAACCCCGGCGAAGTCATCAAGCCAGGTC
AACATAAAGCTATAAATGATGAGGGAATGCCACAACATGGTAGGCCGTTCATGAAG
GGACGCCTATACATCAAGTTTAGTGTTGATTTCCCGGATTCGGGTTTTCTTTCCCC
AAGCCAAAGCCTGGAATTAGAAAAGATATTACCTCAAAAGACAAGCAAGAACTTGT
CCCAAAAGGAGGTAGATGATTGTGAGGAGACCACCCTGCATGATGTCAATATTGC
AGAGGAGATGAGTCGAAAGAAGCAACAATACCGTGAGGCATATGATGACGATGAT
GATGAAGATGATGAGCACTCGCAGCCTCGGGTGCAATGCGCTCAACAGTAG

Fig. 83

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCTGGTCTGTACATTCATCTTGCCGCCTTTGCA
TTCACTTGGCCACAAAGAGTAGAGAGAAGGAAGAGAAGAGCCCAGACTTCAAGAAGCGACCTTGCAAGTGCAC
TCGAGGGTCAGAAACTGTATATCATATCTATGTGAGAGAAAGGGGAACATTTGAGATGGAGTCCATTTACTTGA
GGTATACTTATTATTTTGATCAATAAATTTGTATACTTCTTATTTAGATCAATAAATTTGTCATTAAGCTATAATCCA
AAATAAATTACGATCAAATATGCAAATGTTAGCCAGTACTTGTGTTAAACTTGATGGCATCTCTTGGTTTCTTTGG
CAATCACATGCCTAAGAAATAAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGTCAGATGACTCTGTTT
GGATAAACAGCTTAATTAAGCGCTTATAGAATATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGCATCTCTTGGT
TTCTCTGGCAATCATATGCCTAAGAAATAAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGTCAGATGA
CCCTGTTTGGGTAAACAGCTTAATTAAGTGCTTATAGAATAAGCGCTTATCATATAAGTGCTTTTGTACAGTTATT
TCTATGAAAGTAGAAGAAATAGTCATATTGTTTTAATATAAGCTATCCTGGAGAGCTTGTGGAAATAACCAGAAA
AGAACTTATGGACACGTCATGAGCTGTTTACATAAGATCTCCCTAACAGTCTCAAAAGTGTTTATGCCAGTAGAT
AAATTCAAATAAGTCAATCTAAACAGACCCTAAATCCATTATGGTACCTATCATTTTAGCTTATTCCATCTTTATTA
AGAATGTCATGAGATAACATAATGATAACACATTATTTTGACACAAATGGGCAGATCTAGCAATTTAACTCTGGA
GTCCTTCAAGACTGCTGTTCTTACGAAGTTCACGTCCCTGAATCATGTTCCTGTATGGAAGCCTGAAAGACCTC
AAATTCTAAAAGGTGGCGATAAATTGAAGGTTTACAAAATATACCCTGCGGGCTTGACACAGAGGCAAGCTCTT
TATACCTTCCAGTTCAACGGGGATGTTGATTTCAGAAGTCACTTGGAGAGCAATCCTTGTGCCAAGTTTGAAGT
AATTTTTGTGTAGCATATGTTGAGCTACCTACAATTTACATGATCACCTAGCATTAGCTCTTTCACTTAACTGAGA
GAATGAAGTTTTAGGAATGAGTATGACCATGGAGTCGGCATGGCTTTGTAATGCCTACCCTACTTTGGCCAACT
CATCGGGGATTTACATTCAGAAAATATACATGACTTCAACCATACTTAAACCCCTTTTTGTAAGATAACTGAATGT
TCATATTTAATGTTGGGTTGTAGTGTTTTTACTTGATTATATCCAGACAGTTACAAGTTGGACAACAAGATTGTG
GGTCTGTACTGTTATTTATTTATTTTTTTTTTAGCAGAAACACCTTATCTTTTGTTTCGTTTGAATGTAGAATGAAA
ATAAAAGAAAGAAAATATAACATCATCGGCCGCGCTTGTCTAATTTCGGGCAGTTAGGATCCTCTCCGGTCACC
GGAAAGTTTCAGTAGAAGAAACAAAACACCGTGACTAAAATGATACTATTATTTTATTTATTGTGTTTTTCTTTTTT
CTACCGGAACTTTTTAGAACGGATCCCAACTCGTTCCGGGGCCGCTACAACTGAAACAAAAGAAGATATTTTCT
CTCTCTTCAGAAATGTAAGTTTTCCTTTACAGATACCCATTCACCATTTGATTCAGATGTGGTGACTAGAGATAA
AGCATACTAATTTGACTCTTGGAAACCCATAAAGTTTATGTTATCCGTGTTCTGGACCAATCCACTTGGGGGCAT
AACCTGTGTCTATGTGTGGTTTGGTTTCCATTCTGATTTATGCGGCGACTTGTAATTTAAAATCTAGGAGGGGCA
GACATTGAACAATCCCAATATTTTAATAACTTATGCAAGATTTTTTTTATTAATGAGATGATGTGTTTGTGACTGA
GATTGAGTCATACATTTCACTAAGAAATGGTTCCAAGTACCAAACTATCATGACCCAGTTGCAAACATGACGTTC
GGGAGTGGTCACTTTGATAGTTCAATTTCATCTTGGCTTCTTATTCCTTTTATAATTCTAATTCTTCTTGTGTAAAC
TATTTCATGTATTATTTTTCTTTAAAATTTACATGTCATTTATTTTGCCTCACTAACTCAATTTTGCATATAACAATG
ATAAGTGATATTTTGACTCACAAAATTTACATCAAATTTCGACATCGTTTATTATGTTCATTGGATGATTAACAAAT
ATAACAAACTTTGCAACTAATTAACCACCAACTGAATATAATTAACTATAACTGTGAAAGTAGTTAACTCATTTTT
ATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAA
AATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATC
CTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACAC
ATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTT
TGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGTTTGGGCG
CGGACCAACAAGGAAGAGTGATAACACCAAATATTACGATATTCTTGGTGTTTCAAAAAGTGCTAGTGAAGATG
AAATCAAGAAAGCCTATAGAAAGGCAGCGATGAAGAACCATCCAGATAAGGGTGGGGATCCTGAGAAGTTCAA
GGAGTTGGGCCAAGCATATGAAGTGTTGAGCGATCCTGAAAAGAAAGAACTGTATGATGAATATGGTGAAGAT
GCCCTTAAAGAAGGAATGGGGGGAGGCGCAGGAAGCTCATTTCATAATCCGTTTGATATTTTCGAATCATTTTT
TGGTGCAGGCTTTGGTGGTGGTGGTCCTTCACGCGCAAGAAGACAGAAGCAAGGAGAAGATGTGGTGCATTC
TATAAAGGTTTCCTTGGAGGATGTGTATAACGGCACTACAAAGAAGCTATCACTTTCTAGGAATGCACTGTGCT
CAAAATGTAAAGGGAAAGGTTCAAAAAGTGGAACTGCTGGAAGGTGTTTTGGATGCCAGGGCACAGGTATGAA
GATTACCAGAAGGCAAATTGGACTGGGCATGATTCAACAAATGCAACACGTCTGTCCTGACTGCAAAGGAACA
GGCGAGGTCATTAGTGAGAGAGATAGATGCCCTCAATGCAAGGGAAACAAGATTACTCAAGAAAAGAAGGTGC
TGGAGGTGCATGTGGAAAAGGGGATGCAGCAGGGTCACAAGATTGTATTCGAAGGACAAGCTGATGAAGCTC
CTGATACAATCACAGGAGACATAGTTTTTGTCTTGCAAGTAAAGGGACATCCGAAGTTTCGGAGGGAGCGTGAT
GACCTCCACATTGAACACAATTTGAGCTTAACTGAGGCTCTCTGTGGCTTCCAGTTTAATGTCACACATCTTGAT
GGAAGGCAACTATTGGTCAAATCGAACCCCGGCGAAGTCATCAAGCCAGGTCAACATAAAGCTATAAATGATG
AGGGAATGCCACAACATGGTAGGCCGTTCATGAAGGGACGCCTATACATCAAGTTTAGTGTTGATTTCCCGGA
TTCGGGTTTTCTTTCCCCAAGCCAAAGCCTGGAATTAGAAAAGATATTACCTCAAAAGACAAGCAAGAACTTGT
CCCAAAAGGAGGTAGATGATTGTGAGGAGACCACCCTGCATGATGTCAATATTGCAGAGGAGATGAGTCGAAA
GAAGCAACAATACCGTGAGGCATATGATGACGATGATGATGAAGATGATGAGCACTCGCAGCCTCGGGTGCAA
TGCGCTCAACAGTAGGAGCTCAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATT
GAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATG
TAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAA
AACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATC GAATTC

Fig. 84

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCTGGTCTGTACATTCATCTTGCCGCCTTTGCATTCAC
TTGGCCACAAAGAGTAGAGAGAAGGAAGAGAAGAGCCCAGACTTCAAGAAGCGACCTTGCAAGTGCACTCGAGGGT
CAGAAACTGTATATCATATCTATGTGAGAGAAAGGGGAACATTTGAGATGGAGTCCATTTACTTGAGGTATACTTATTA
TTTTGATCAATAAATTTGTATACTTCTTATTTAGATCAATAAATTTGTCATTAAGCTATAATCCAAAATAAATTACGATCAA
ATATGCAAATGTTAGCCAGTACTTGTGTTAAACTTGATGGCATCTCTTGGTTTCTTTGGCAATCACATGCCTAAGAAAT
AAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGTCAGATGACTCTGTTTGGATAAACAGCTTAATTAAGCGCT
TATAGAATATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGCATCTCTTGGTTTCTCTGGCAATCATATGCCTAAGAAATA
AATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGTCAGATGACCCTGTTTGGGTAAACAGCTTAATTAAGTGCTT
ATAGAATAAGCGCTTATCATATAAGTGCTTTTGTACAGTTATTTCTATGAAAGTAGAAGAAATAGTCATATTGTTTTAATA
TAAGCTATCCTGGAGAGCTTGTGGAAATAACCAGAAAAGAACTTATGGACACGTCATGAGCTGTTTACATAAGATCTC
CCTAACAGTCTCAAAAGTGTTTATGCCAGTAGATAAATTCAAATAAGTCAATCTAAACAGACCCTAAATCCATTATGGTA
CCTATCATTTTAGCTTATTCCATCTTTATTAAGAATGTCATGAGATAACATAATGATAACACATTATTTTGACACAAATGG
GCAGATCTAGCAATTTAACTCTGGAGTCCTTCAAGACTGCTGTTCTTACGAAGTTCACGTCCCTGAATCATGTTCCTGT
ATGGAAGCCTGAAAGACCTCAAATTCTAAAAGGTGGCGATAAATTGAAGGTTTACAAAATATACCCTGCGGGCTTGAC
ACAGAGGCAAGCTCTTTATACCTTCCAGTTCAACGGGGATGTTGATTTCAGAAGTCACTTGGAGAGCAATCCTTGTGC
CAAGTTTGAAGTAATTTTTGTGTAGCATATGTTGAGCTACCTACAATTTACATGATCACCTAGCATTAGCTCTTTCACTT
AACTGAGAGAATGAAGTTTTAGGAATGAGTATGACCATGGAGTCGGCATGGCTTTGTAATGCCTACCCTACTTTGGCC
AACTCATCGGGGATTTACATTCAGAAAATATACATGACTTCAACCATACTTAAACCCCTTTTTGTAAGATAACTGAATGT
TCATATTTAATGTTGGGTTGTAGTGTTTTTACTTGATTATATCCAGACAGTTACAAGTTGGACAACAAGATTGTGGGTCT
GTACTGTTATTTATTTATTTTTTTTTTTAGCAGAAACACCTTATCTTTTGTTTCGTTTGAATGTAGAATGAAAATAAAAGAA
AGAAAATATAACATCATCGGCCGCGCTTGTCTAATTTCGGGCAGTTAGGATCCTCTCCGGTCACCGGAAAGTTTCAGT
AGAAGAAACAAAACACCGTGACTAAAATGATACTATTATTTTATTTATTGTGTTTTTCTTTTTTCTACCGGAACTTTTTAG
AACGGATCCCAACTCGTTCCGGGGCCGCTACAACTGAAACAAAAGAAGATATTTTCTCTCTCTTCAGAAATGTAAGTTT
TCCTTTACAGATACCCATTCACCATTTGATTCAGATGTGGTGACTAGAGATAAAGCATACTAATTTGACTCTTGGAAAC
CCATAAAGTTTATGTTATCCGTGTTCTGGACCAATCCACTTGGGGGCATAACCTGTGTCTATGTGTGGTTTGGTTTCCA
TTCTGATTTATGCGGCGACTTGTAATTTAAAATCTAGGAGGGGCAGACATTGAACAATCCCAATATTTTAATAACTTATG
CAAGATTTTTTTTATTAATGAGATGATGTGTTTGTGACTGAGATTGAGTCATACATTTCACTAAGAAATGGTTCCAAGTA
CCAAACTATCATGACCCAGTTGCAAACATGACGTTCGGGAGTGGTCACTTTGATAGTTCAATTTCATCTTGGCTTCTTA
TTCCTTTTATAATTCTAATTCTTCTTGTGTAAACTATTTCATGTATTATTTTTCTTTAAAATTTACATGTCATTTATTTTGCC
TCACTAACTCAATTTTGCATATAACAATGATAAGTGATATTTTGACTCACAAAATTTACATCAAATTTCGACATCGTTTAT
TATGTTCATTGGATGATTAACAAATATAACAAACTTTGCAACTAATTAACCACCAACTGAATATAATTAACTATAACTGTG
AAAGTAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAAAC
GGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAA
TCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCT
TCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACA
CTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGTCGGGTAAA
GGAGAAGGACCAGCTATCGGTATCGATCTTGGTACCACTTACTCTTGCGTCGGAGTATGGCAACACGACCGTGTTGA
GATCATTGCTAATGATCAAGGAAACAGAACCACGCCATCTTACGTTGCTTTCACCGACTCCGAGAGGTTGATCGGTGA
CGCAGCTAAGAATCAGGTCGCCATGAACCCCGTTAACACCGTTTTCGACGCTAAGAGGTTGATCGGTCGTCGTTTCTC
TGACAGCTCTGTTCAGAGTGACATGAAATTGTGGCCATTCAAGATTCAAGCCGGACCTGCCGATAAGCCAATGATCTA
CGTCGAATACAAGGGTGAAGAGAAAGAGTTCGCAGCTGAGGAGATTTCTTCCATGGTTCTTATTAAGATGCGTGAGAT
TGCTGAGGCTTACCTTGGTGTCACAATCAAGAACGCCGTTGTTACCGTTCCAGCTTACTTCAACGACTCTCAGCGTCA
GGCTACAAAGGATGCTGGTGTCATCGCTGGTTTGAACGTTATGCGAATCATCAACGAGCCTACAGCCGCCGCTATTG
CCTACGGTCTTGACAAAAAGGCTACCAGCGTTGGAGAGAAGAATGTTCTTATCTTCGATCTTGGTGGTGGCACTTTTG
ATGTCTCTCTTCTTACCATTGAAGAGGGTATCTTTGAGGTGAAGGCAACTGCTGGTGACACCCATCTTGGTGGGGAAG
ATTTTGACAACAGAATGGTTAACCACTTTGTCCAAGAGTTCAAGAGGAAGAGTAAGAAGGATATCACCGGTAACCCAA
GAGCTCTTAGGAGGTTGAGAACTTCCTGTGAGAGAGCGAAGAGGACTCTTTCTTCCACTGCTCAGACCACCATCGAG
ATTGACTCTCTATACGAGGGTATCGACTTCTACTCCACCATCACCCGTGCTAGATTTGAGGAGCTCAACATGGATCTC
TTCAGGAAGTGTATGGAGCCAGTTGAGAAGTGTCTTCGTGATGCTAAGATGGACAAGAGCACTGTTCATGATGTTGTC
CTTGTTGGTGGTTCTACCCGTATCCCTAAGGTTCAGCAATTGCTCCAGGACTTCTTCAACGGCAAAGAGCTTTGCAAG
TCTATTAACCCTGATGAGGCTGTTGCCTACGGTGCTGCTGTCCAGGGAGCTATTCTCAGCGGTGAAGGAAACGAGAA
GGTTCAAGATCTTCTATTGCTCGATGTCACTCCTCTCTCCCTTGGTTTGGAAACTGCCGGTGGTGTCATGACCACTTTG
ATCCCAAGGAACACAACCATCCCAACCAAGAAGGAACAAGTCTTCTCCACCTACTCAGACAACCAACCCGGTGTGTTG
ATCCAGGTGTACGAAGGAGAGAGAGCCAGAACCAAGGACAACAACCTTCTTGGTAAATTTGAGCTCTCCGGAATTCC
TCCAGCTCCTCGTGGTGTCCCCCAGATCACAGTCTGCTTTGACATTGATGCCAATGGTATCCTCAATGTCTCTGCTGA
GGACAAGACCACCGGACAGAAGAACAAGATCACCATCACCAATGACAAGGGTCGTCTCTCCAAGGATGAGATTGAGA
AGATGGTTCAAGAGGCTGAGAAGTACAAGTCCGAAGACGAGGAGCACAAGAAGAAGGTTGAAGCCAAGAACGCTCT
CGAGAACTACGCTTACAACATGAGGAACACCATCCAAGACGAGAAGATTGGTGAGAAGCTCCCGGCTGCAGACAAGA
AGAAGATCGAGGATTCTATTGAGCAGGCGATTCAATGGCTCGAGGGTAACCAGTTGGCTGAGGCTGATGAGTTCGAA
GACAAGATGAAGGAATTGGAGAGCATCTGCAACCCAATCATTGCCAAGATGTACCAAGGAGCTGGTGGTGAAGCCGG
TGGTCCAGGTGCCTCTGGTATGGACGATGATGCTCCCCCTGCTTCAGGCGGTGCTGGACCTAAGATCGAGGAGGTC
GACTAAGAGCTCAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCG
GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTA
TGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTA
GGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATC GAATTC

Fig. 85A

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCTGGTCTGTACATTCATCTTGCCGCCTTTGCATTCA
CTTGGCCACAAAGAGTAGAGAGAAGGAAGAGAAGAGCCCAGACTTCAAGAAGCGACCTTGCAAGTGCACTCGAGGG
TCAGAAACTGTATATCATATCTATGTGAGAGAAAGGGGAACATTTGAGATGGAGTCCATTTACTTGAGGTATACTTATT
ATTTTGATCAATAAATTTGTATACTTCTTATTTAGATCAATAAATTTGTCATTAAGCTATAATCCAAAATAAATTACGATC
AAATATGCAAATGTTAGCCAGTACTTGTGTTAAACTTGATGGCATCTCTTGGTTTCTTTGGCAATCACATGCCTAAGAA
ATAAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGTCAGATGACTCTGTTTGGATAAACAGCTTAATTAAGCG
CTTATAGAATATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGCATCTCTTGGTTTCTCTGGCAATCATATGCCTAAGAA
ATAAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAGTCAGATGACCCTGTTTGGGTAAACAGCTTAATTAAGTG
CTTATAGAATAAGCGCTTATCATATAAGTGCTTTTGTACAGTTATTTCTATGAAAGTAGAAGAAATAGTCATATTGTTTT
AATATAAGCTATCCTGGAGAGCTTGTGGAAATAACCAGAAAAGAACTTATGGACACGTCATGAGCTGTTTACATAAGA
TCTCCCTAACAGTCTCAAAAGTGTTTATGCCAGTAGATAAATTCAAATAAGTCAATCTAAACAGACCCTAAATCCATTA
TGGTACCTATCATTTTAGCTTATTCCATCTTTATTAAGAATGTCATGAGATAACATAATGATAACACATTATTTTGACAC
AAATGGGCAGATCTAGCAATTTAACTCTGGAGTCCTTCAAGACTGCTGTTCTTACGAAGTTCACGTCCCTGAATCATG
TTCCTGTATGGAAGCCTGAAAGACCTCAAATTCTAAAAGGTGGCGATAAATTGAAGGTTTACAAAATATACCCTGCGG
GCTTGACACAGAGGCAAGCTCTTTATACCTTCCAGTTCAACGGGGATGTTGATTTCAGAAGTCACTTGGAGAGCAAT
CCTTGTGCCAAGTTTGAAGTAATTTTTGTGTAGCATATGTTGAGCTACCTACAATTTACATGATCACCTAGCATTAGCT
CTTTCACTTAACTGAGAGAATGAAGTTTTAGGAATGAGTATGACCATGGAGTCGGCATGGCTTTGTAATGCCTACCCT
ACTTTGGCCAACTCATCGGGGATTTACATTCAGAAAATATACATGACTTCAACCATACTTAAACCCCTTTTTGTAAGAT
AACTGAATGTTCATATTTAATGTTGGGTTGTAGTGTTTTTACTTGATTATATCCAGACAGTTACAAGTTGGACAACAAG
ATTGTGGGTCTGTACTGTTATTTATTTATTTTTTTTTTAGCAGAAACACCTTATCTTTTGTTTCGTTTGAATGTAGAATGA
AAATAAAAGAAAGAAAATATAACATCATCGGCCGCGCTTGTCTAATTTCGGGCAGTTAGGATCCTCTCCGGTCACCG
GAAAGTTTCAGTAGAAGAAACAAAACACCGTGACTAAAATGATACTATTATTTTATTTATTGTGTTTTTCTTTTTTCTAC
CGGAACTTTTTAGAACGGATCCCAACTCGTTCCGGGGCCGCTACAACTGAAACAAAAGAAGATATTTTCTCTCTCTTC
AGAAATGTAAGTTTTCCTTTACAGATACCCATTCACCATTTGATTCAGATGTGGTGACTAGAGATAAAGCATACTAATT
TGACTCTTGGAAACCCATAAAGTTTATGTTATCCGTGTTCTGGACCAATCCACTTGGGGGCATAACCTGTGTCTATGT
GTGGTTTGGTTTCCATTCTGATTTATGCGGCGACTTGTAATTTAAAATCTAGGAGGGGCAGACATTGAACAATCCCAA
TATTTTAATAACTTATGCAAGATTTTTTTTATTAATGAGATGATGTGTTTGTGACTGAGATTGAGTCATACATTTCACTA
AGAAATGGTTCCAAGTACCAAACTATCATGACCCAGTTGCAAACATGACGTTCGGGAGTGGTCACTTTGATAGTTCAA
TTTCATCTTGGCTTCTTATTCCTTTTATAATTCTAATTCTTCTTGTGTAAACTATTTCATGTATTATTTTTCTTTAAAATTT
ACATGTCATTTATTTTGCCTCACTAACTCAATTTTGCATATAACAATGATAAGTGATATTTTGACTCACAAAATTTACAT
CAAATTTCGACATCGTTTATTATGTTCATTGGATGATTAACAAATATAACAAACTTTGCAACTAATTAACCACCAACTGA
ATATAATTAACTATAACTGTGAAAGTAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTA
ATCCCTCCAAAAAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAG
GATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTA
CATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAA
AATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCT
TGAGAGAAAATGTCGGGTAAAGGAGAAGGACCAGCTATCGGTATCGATCTTGGTACCACTTACTCTTGCGTCGGAGT
ATGGCAACACGACCGTGTTGAGATCATTGCTAATGATCAAGGAAACAGAACCACGCCATCTTACGTTGCTTTCACCG
ACTCCGAGAGGTTGATCGGTGACGCAGCTAAGAATCAGGTCGCCATGAACCCCGTTAACACCGTTTTCGACGCTAAG
AGGTTGATCGGTCGTCGTTTCTCTGACAGCTCTGTTCAGAGTGACATGAAATTGTGGCCATTCAAGATTCAAGCCGG
ACCTGCCGATAAGCCAATGATCTACGTCGAATACAAGGGTGAAGAGAAAGAGTTCGCAGCTGAGGAGATTTCTTCCA
TGGTTCTTATTAAGATGCGTGAGATTGCTGAGGCTTACCTTGGTGTCACAATCAAGAACGCCGTTGTTACCGTTCCAG
CTTACTTCAACGACTCTCAGCGTCAGGCTACAAAGGATGCTGGTGTCATCGCTGGTTTGAACGTTATGCGAATCATCA
ACGAGCCTACAGCCGCCGCTATTGCCTACGGTCTTGACAAAAAGGCTACCAGCGTTGGAGAGAAGAATGTTCTTATC
TTCGATCTTGGTGGTGGCACTTTTGATGTCTCTCTTCTTACCATTGAAGAGGGTATCTTTGAGGTGAAGGCAACTGCT
GGTGACACCCATCTTGGTGGGGAAGATTTTGACAACAGAATGGTTAACCACTTTGTCCAAGAGTTCAAGAGGAAGAG
TAAGAAGGATATCACCGGTAACCCAAGAGCTCTTAGGAGGTTGAGAACTTCCTGTGAGAGAGCGAAGAGGACTCTTT
CTTCCACTGCTCAGACCACCATCGAGATTGACTCTCTATACGAGGGTATCGACTTCTACTCCACCATCACCCGTGCTA
GATTTGAGGAGCTCAACATGGATCTCTTCAGGAAGTGTATGGAGCCAGTTGAGAAGTGTCTTCGTGATGCTAAGATG
GACAAGAGCACTGTTCATGATGTTGTCCTTGTTGGTGGTTCTACCCGTATCCCTAAGGTTCAGCAATTGCTCCAGGAC
TTCTTCAACGGCAAAGAGCTTTGCAAGTCTATTAACCCTGATGAGGCTGTTGCCTACGGTGCTGCTGTCCAGGGAGC
TATTCTCAGCGGTGAAGGAAACGAGAAGGTTCAAGATCTTCTATTGCTCGATGTCACTCCTCTCTCCCTTGGTTTGGA
AACTGCCGGTGGTGTCATGACCACTTTGATCCCAAGGAACACAACCATCCCAACCAAGAAGGAACAAGTCTTCTCCA
CCTACTCAGACAACCAACCCGGTGTGTTGATCCAGGTGTACGAAGGAGAGAGAGCCAGAACCAAGGACAACAACCT
TCTTGGTAAATTTGAGCTCTCCGGAATTCCTCCAGCTCCTCGTGGTGTCCCCCAGATCACAGTCTGCTTTGACATTGA
TGCCAATGGTATCCTCAATGTCTCTGCTGAGGACAAGACCACCGGACAGAAGAACAAGATCACCATCACCAATGACA
AGGGTCGTCTCTCCAAGGATGAGATTGAGAAGATGGTTCAAGAGGCTGAGAAGTACAAGTCCGAAGACGAGGAGCA
CAAGAAGAAGGTTGAAGCCAAGAACGCTCTCGAGAACTACGCTTACAACATGAGGAACACCATCCAAGACGAGAAG
ATTGGTGAGAAGCTCCCGGCTGCAGACAAGAAGAAGATCGAGGATTCTATTGAGCAGGCGATTCAATGGCTCGAGG
GTAACCAGTTGGCTGAGGCTGATGAGTTCGAAGACAAGATGAAGGAATTGGAGAGCATCTGCAACCCAATCATTGCC
AAGATGTACCAAGGAGCTGGTGGTGAAGCCGGTGGTCCAGGTGCCTCTGGTATGGACGATGATGCTCCCCCTGCTT
CAGGCGGTGCTGGACCTAAGATCGAGGAGGTCGACTAAGAGCTCAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTG
GCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAG
CATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTA

Fig. 85B

ATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
ATCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGGGGCTGGTCTGTACATTCATCTT
GCCGCCTTTGCATTCACTTGGCCACAAAGAGTAGAGAGAAGGAAGAGAAGAGCCCAGACTTCAAGAAGCGAC
CTTGCAAGTGCACTCGAGGGTCAGAAACTGTATATCATATCTATGTGAGAGAAAGGGGAACATTTGAGATGGA
GTCCATTTACTTGAGGTATACTTATTATTTTGATCAATAAATTTGTATACTTCTTATTTAGATCAATAAATTTGTCA
TTAAGCTATAATCCAAAATAAATTACGATCAAATATGCAAATGTTAGCCAGTACTTGTGTTAAACTTGATGGCAT
CTCTTGGTTTCTTTGGCAATCACATGCCTAAGAAATAAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTTCAGAG
TCAGATGACTCTGTTTGGATAAACAGCTTAATTAAGCGCTTATAGAATATCATATGATTGTGTTTGGTCAGACTT
CAGAGCATCTCTTGGTTTCTCTGGCAATCATATGCCTAAGAAATAAATAGTATCATATGATTGTGTTTGGTCAGA
CTTCAGAGTCAGATGACCCTGTTTGGGTAAACAGCTTAATTAAGTGCTTATAGAATAAGCGCTTATCATATAAGT
GCTTTTGTACAGTTATTTCTATGAAAGTAGAAGAAATAGTCATATTGTTTTAATATAAGCTATCCTGGAGAGCTTG
TGGAAATAACCAGAAAAGAACTTATGGACACGTCATGAGCTGTTTACATAAGATCTCCCTAACAGTCTCAAAAG
TGTTTATGCCAGTAGATAAATTCAAATAAGTCAATCTAAACAGACCCTAAATCCATTATGGTACCTATCATTTTAG
CTTATTCCATCTTTATTAAGAATGTCATGAGATAACATAATGATAACACATTATTTTGACACAAATGGGCAGATCT
AGCAATTTAACTCTGGAGTCCTTCAAGACTGCTGTTCTTACGAAGTTCACGTCCCTGAATCATGTTCCTGTATGG
AAGCCTGAAAGACCTCAAATTCTAAAAGGTGGCGATAAATTGAAGGTTTACAAAATATACCCTGCGGGCTTGAC
ACAGAGGCAAGCTCTTTATACCTTCCAGTTCAACGGGGATGTTGATTTCAGAAGTCACTTGGAGAGCAATCCTT
GTGCCAAGTTTGAAGTAATTTTTGTGTAGCATATGTTGAGCTACCTACAATTTACATGATCACCTAGCATTAGCT
CTTTCACTTAACTGAGAGAATGAAGTTTTAGGAATGAGTATGACCATGGAGTCGGCATGGCTTTGTAATGCCTA
CCCTACTTTGGCCAACTCATCGGGGATTTACATTCAGAAAATATACATGACTTCAACCATACTTAAACCCCTTTT
TGTAAGATAACTGAATGTTCATATTTAATGTTGGGTTGTAGTGTTTTTACTTGATTATATCCAGACAGTTACAAGT
TGGACAACAAGATTGTGGGTCTGTACTGTTATTTATTTATTTTTTTTTTTAGCAGAAACACCTTATCTTTTGTTTCGT
TTGAATGTAGAATGAAAATAAAAGAAAGAAAATATAACATCATCGGCCGCGCTTGTCTAATTTCGGGCAGTTAG
GATCCTCTCCGGTCACCGGAAAGTTTCAGTAGAAGAAACAAAACACCGTGACTAAAATGATACTATTATTTTATT
TATTGTGTTTTTCTTTTTTCTACCGGAACTTTTTAGAACGGATCCCAACTCGTTCCGGGGCCGCTACAACTGAAA
CAAAAGAAGATATTTTCTCTCTCTTCAGAAATGTAAGTTTTCCTTTACAGATACCCATTCACCATTTGATTCAGAT
GTGGTGACTAGAGATAAAGCATACTAATTTGACTCTTGGAAACCCATAAAGTTTATGTTATCCGTGTTCTGGACC
AATCCACTTGGGGGCATAACCTGTGTCTATGTGTGGTTTGGTTTCCATTCTGATTTATGCGGCGACTTGTAATTT
AAAATCTAGGAGGGGCAGACATTGAACAATCCCAATATTTTAATAACTTATGCAAGATTTTTTTTATTAATGAGAT
GATGTGTTTGTGACTGAGATTGAGTCATACATTTCACTAAGAAATGGTTCCAAGTACCAAACTATCATGACCCAG
TTGCAAACATGACGTTCGGGAGTGGTCACTTTGATAGTTCAATTTCATCTTGGCTTCTTATTCCTTTTATAATTCT
AATTCTTCTTGTGTAAACTATTTCATGTATTATTTTTCTTTAAAATTTACATGTCATTTATTTTGCCTCACTAACTCA
ATTTTGCATATAACAATGATAAGTGATATTTTGACTCACAAAATTTACATCAAATTTCGACATCGTTTATTATGTTC
ATTGGATGATTAACAAATATAACAAACTTTGCAACTAATTAACCACCAACTGAATATAATTAACTATAACTGTGAA
AGTAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAAAAAA
ACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCC
AACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAAT
CACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACA
CTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGA
GAGAAA*ATGTTTGGGCGCGGACCAACAAGGAAGAGTGATAACACCAAATATTACGATATTCTTGGTGTTTCAAA*
AAGTGCTAGTGAAGATGAAATCAAGAAAGCCTATAGAAAGGCAGCGATGAAGAACCATCCAGATAAGGGTGGG
GATCCTGAGAAGTTCAAGGAGTTGGGCCAAGCATATGAAGTGTTGAGCGATCCTGAAAAGAAAGAACTGTATG
ATCAATATGGTGAAGATGCCCTTAAAGAAGGAATGGGGGGAGGCGCAGGAAGCTCATTTCATAATCCGTTTGA
TATTTTCGAATCATTTTTTGGTGCAGGCTTTGGTGGTGGTGGTCCTTCACGCGCAAGAAGACAGAAGCAAGGA
GAAGATGTGGTGCATTCTATAAAGGTTTCCTTGGAGGATGTGTATAACGGCACTACAAAGAAGCTATCACTTTC
TAGGAATGCACTGTGCTCAAAATGTAAAGGGAAAGGTTCAAAAAGTGGAACTGCTGGAAGGTGTTTTGGATGC
CAGGGCACAGGTATGAAGATTACCAGAAGGCAAATTGGACTGGGCATGATTCAACAAATGCAACACGTCTGTC
CTGACTGCAAAGGAACAGGCGAGGTCATTAGTGAGAGAGATAGATGCCCTCAATGCAAGGGAAACAAGATTAC
TCAAGAAAAGAAGGTGCTGGAGGTGCATGTGGAAAAGGGGATGCAGCAGGGTCACAAGATTGTATTCGAAGG
ACAAGCTGATGAAGCTCCTGATACAATCACAGGAGACATAGTTTTTGTCTTGCAAGTAAAGGGACATCCGAAGT
TTCGGAGGGAGCGTGATGACCTCCACATTGAACACAATTTGAGCTTAACTGAGGCTCTCTGTGGCTTCCAGTTT
AATGTCACACATCTTGATGGAAGGCAACTATTGGTCAAATCGAACCCCGGCGAAGTCATCAAGCCAGGTCAAC
ATAAAGCTATAAATGATGAGGGAATGCCACAACATGGTAGGCCGTTCATGAAGGGACGCCTATACATCAAGTTT
AGTGTTGATTTCCCGGATTCGGGTTTTCTTTCCCCAAGCCAAAGCCTGGAATTAGAAAAGATATTACCTCAAAA
GACAAGCAAGAACTTGTCCCAAAAGGAGGTAGATGATTGTGAGGAGACCACCCTGCATGATGTCAATATTGCA
GAGGAGATGAGTCGAAAGAAGCAACAATACCGTGAGGCATATGATGACGATGATGATGAAGATGATGAGCACT
*CGCAGCCTCGGGTGCAATGCGCTCAACAGTAG*GAGCTCAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCA
ATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAG
CATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACA
TTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTA
CTAGATC GAATTC

Fig. 86

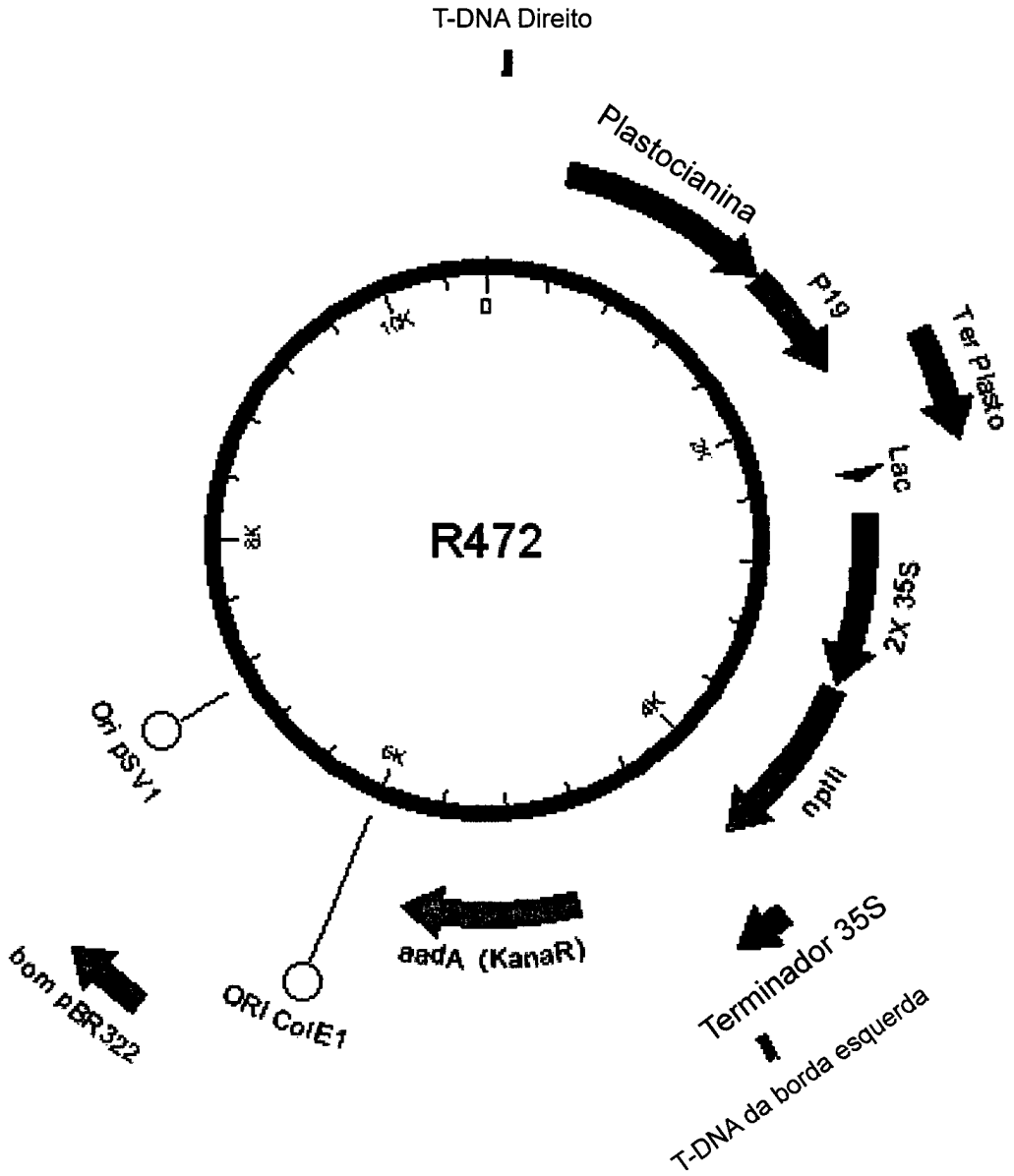
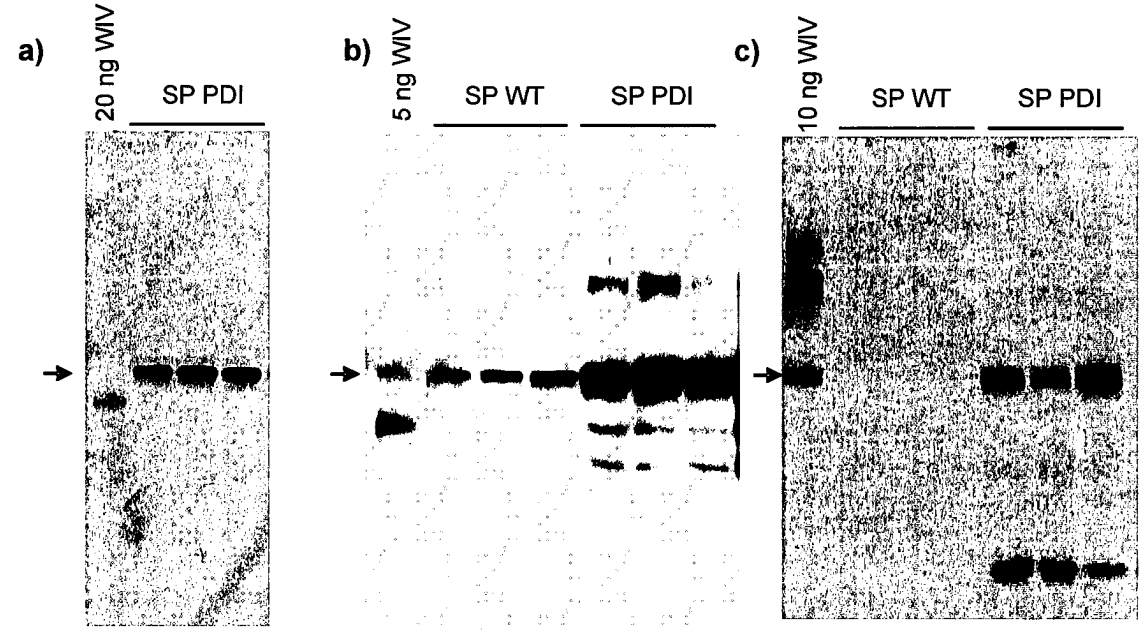
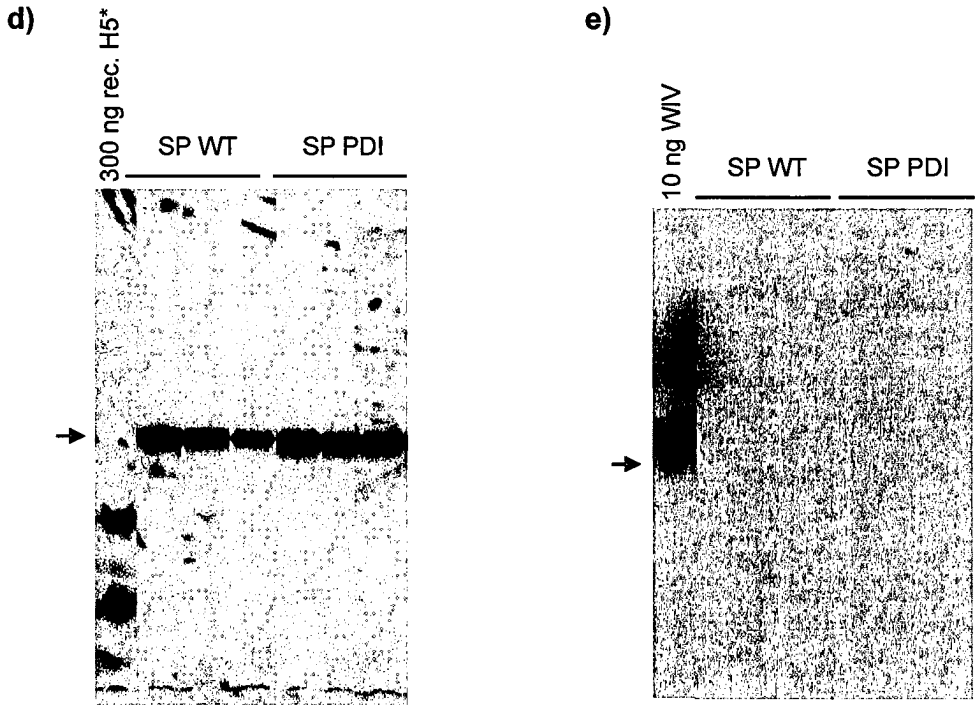

T-DNA Direito
Plastocianina
p19
Ter plasto
Lac
2X 35S
nptII
Terminador 35S
T-DNA da borda esquerda
aadA (KanaR)
ORI ColE1
bom pBR322
Ori pSV1
R472
0
1K
2K
3K
4K
5K

Fig. 87



H1 (A/Nova Caledônia/20/99) H1 (A/Brisbane/59/2007) H3 (A/Brisbane/10/2007)



H5 (A/Indonésia/5/2005) H1 (B/Flórida/4/2006)

* H5 recombinante (A/Vietnã/1023/2004) (de Protein Science Corporation)

Fig. 88

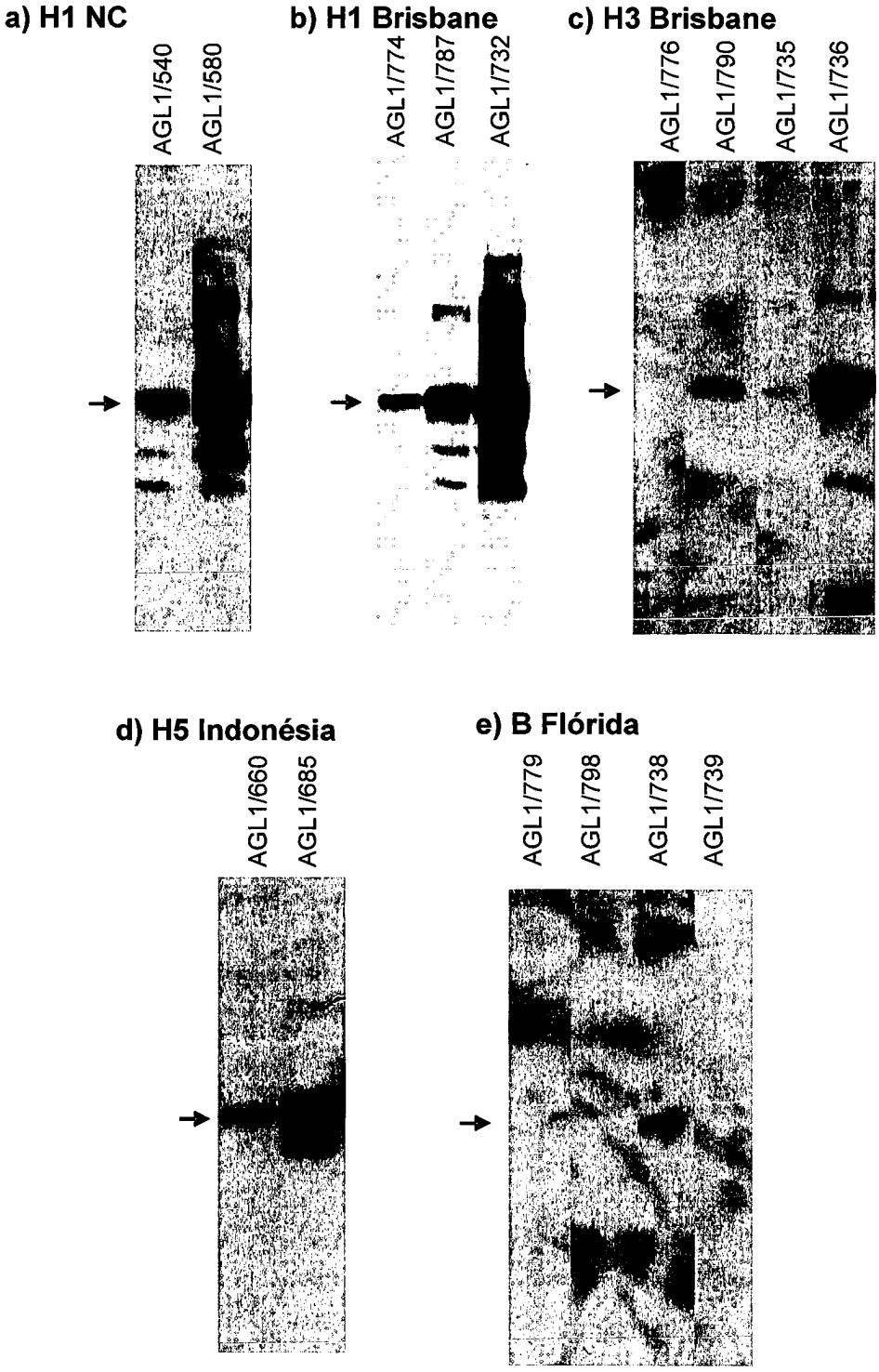
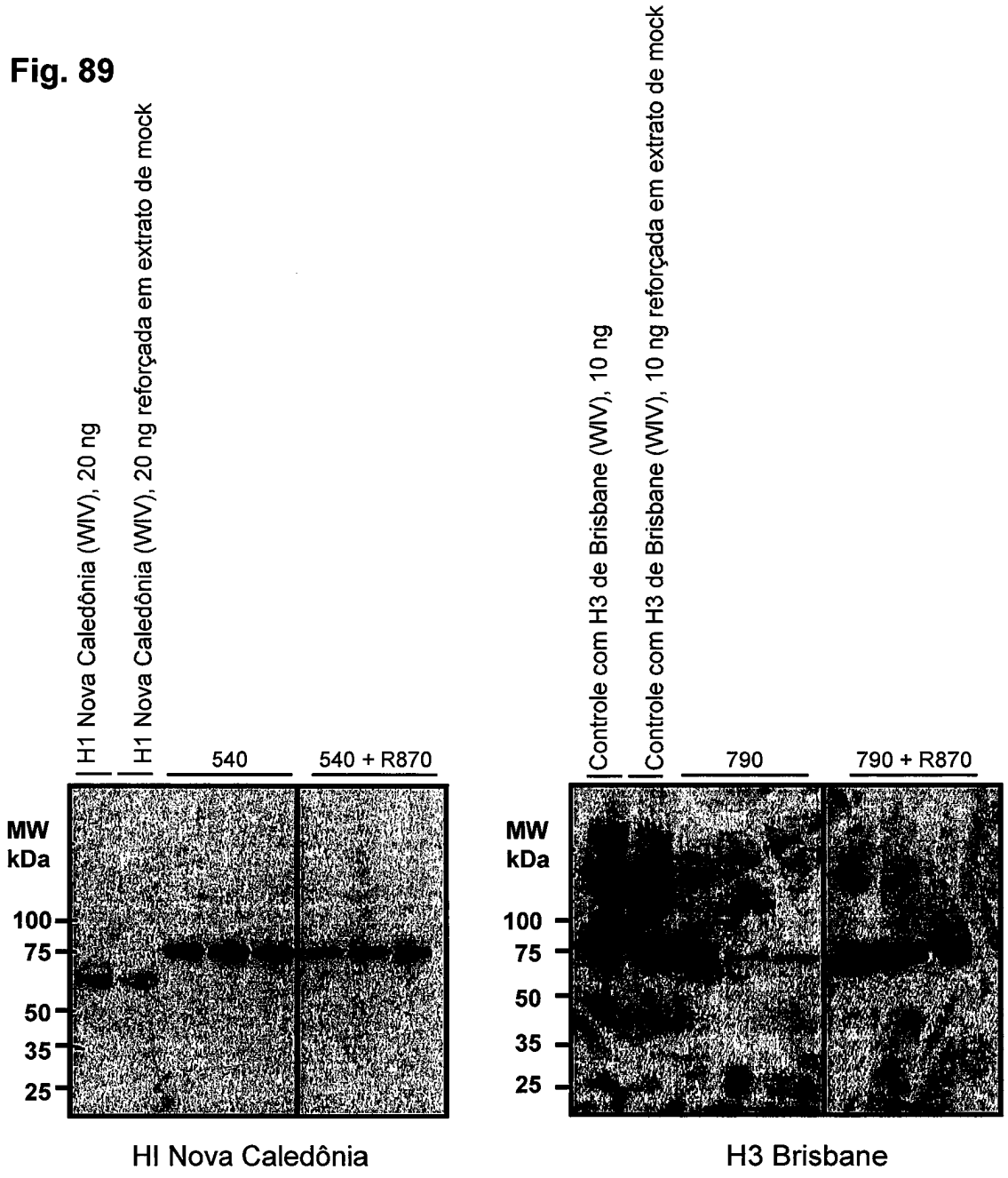

a) H1 NC
AGL1/540
AGL1/580
b) H1 Brisbane
AGL1/774
AGL1/787
AGL1/732
c) H3 Brisbane
AGL1/776
AGL1/790
AGL1/735
AGL1/736
d) H5 Indonésia
AGL1/660
AGL1/685
e) B Flórida
AGL1/779
AGL1/798
AGL1/738
AGL1/739

Fig. 89


H1 Nova Caledônia (WIV), 20 ng
H1 Nova Caledônia (WIV), 20 ng reforçada em extrato de mock
540
540 + R870
MW
kDa
100
75
50
35
25
HI Nova Caledônia
Controle com H3 de Brisbane (WIV), 10 ng
Controle com H3 de Brisbane (WIV), 10 ng reforçada em extrato de mock
790
790 + R870
MW
kDa
100
75
50
35
25
H3 Brisbane