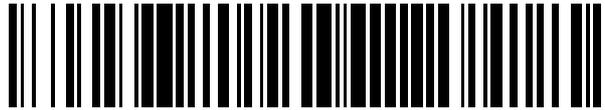


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 607**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2009 E 09793751 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2294202**

54 Título: **Antígenos de la gripe recombinantes solubles**

30 Prioridad:

08.07.2008 US 78963 P

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

14.09.2015

73 Titular/es:

**MEDICAGO INC. (100.0%)
1020 route de l'Eglise Suite 600
Québec, Québec G1S 3M7, CA**

72 Inventor/es:

**COUTURE, MANON;
LANDRY, NATHALIE;
VEZINA, LOUIS-PHILIPPE y
DARGIS, MICHÈLE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 545 607 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antígenos de la gripe recombinantes solubles

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la producción de antígenos de la gripe recombinantes solubles. Más específicamente, la presente invención está dirigida a la producción de antígenos de la gripe recombinantes solubles que retienen la inmunogenicidad.

Antecedentes de la invención

10 La gripe es la causa principal de muerte en los seres humanos debida a un virus respiratorio. Los síntomas comunes incluyen fiebre, dolor de garganta, dificultad para respirar y dolor muscular, entre otros. Durante la temporada de gripe, los virus de la gripe infectan a un 10-20% de la población en todo el mundo, dando lugar a 250-500,000 muertes al año.

15 Los virus de la gripe se clasifican en tipos A, B, o C, en base a las nucleoproteínas y antígenos de proteína de la matriz presentes. Los virus de la gripe tipo A, además se pueden dividir en subtipos de acuerdo con la combinación de glicoproteínas de la superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) presentadas. La HA regula la capacidad del virus para unirse y penetrar en la célula huésped. NA elimina los residuos de ácido siálico terminales de las cadenas de glicano en la célula huésped y las proteínas de la superficie viral, lo que evita la agregación viral y facilita la movilidad virus. En la actualidad, se reconocen 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). Cada virus de la gripe tipo A presenta un tipo de la glicoproteína de HA y un tipo de NA. Generalmente, cada subtipo exhibe especificidad de especie; por ejemplo, se sabe que todos los subtipos HA y NA infectan a las aves, mientras que se ha demostrado que sólo los subtipos H1, H2, H3, H5, N1 y N2 infectan a los humanos. Los virus de gripe que comprenden H5 y H7 se consideran las formas más altamente patógenas del virus de la gripe A, y son más susceptibles de causar futuras pandemias.

25 Las pandemias de gripe son causadas generalmente por los virus de gripe altamente virulentos y transmisibles, y pueden conducir a niveles elevados de enfermedad y muerte en el mundo. La aparición de nuevos subtipos de gripe A produjo 4 grandes pandemias en el siglo 20. La gripe española, causada por un virus H1N1, en 1918-1919 condujo a la muerte de más de 50 millones de personas en todo el mundo entre 1917 y 1920. El riesgo de la aparición de un nuevo subtipo, o de la transmisión a los seres humanos de un subtipo endémico en animales, está siempre presente. De particular preocupación es una forma muy virulenta de la gripe aviar (también llamada "gripe aviar"), brotes de esta se han reportado en varios países de todo el mundo. En muchos casos, la gripe aviar puede resultar en tasas de mortalidad cercanas al 100% en 48 horas. Se ha postulado que la propagación del virus de la gripe aviar (H5N1), identificado por primera vez en Hong Kong en 1997, a otros países de Asia y Europa está vinculada a los patrones migratorios de las aves silvestres.

35 Existe una creciente preocupación de que el virus puede llegar a ser altamente infeccioso para los seres humanos. El principal problema para la salud humana es el hecho de que los virus de gripe son antigénicamente inestables, es decir, que mutan rápidamente. Si el virus de la gripe aviar entrara en contacto con los virus humanos, la recombinación genética del virus aviar podría resultar en un virus de la gripe altamente patógeno que podría causar una enfermedad grave o muerte en los seres humanos. Además, dicha mutación podría resultar en un virus de la gripe que se transmite fácilmente en los seres humanos.

40 El método actual de la lucha contra la gripe en los seres humanos es mediante la vacunación anual. Cada año, la Organización Mundial de la Salud selecciona 3 cepas virales para la inclusión en la vacuna anual de la gripe, que se produce en huevos fertilizados. Sin embargo, el número de dosis de vacuna producido cada año no es suficiente para vacunar a la población del mundo. Por ejemplo, Canadá y los Estados-Unidos obtienen suficientes dosis de vacuna para inmunizar a cerca de un tercio de su población, mientras que sólo el 17% de la población de la Unión Europea puede ser vacunado. Es evidente que la actual producción mundial de vacunas contra la gripe sería insuficiente frente a una pandemia de gripe en todo el mundo. Por lo tanto, los gobiernos y la industria privada por igual han dirigido su atención a las producciones de vacunas eficaces contra la gripe.

50 Como se mencionó anteriormente, el método actual de obtención de vacunas contra el virus de la gripe es por medio de la producción en huevos fertilizados. El virus se cultiva en huevos fertilizados, seguido por la inactivación del virus y la purificación de glicoproteínas virales. Si bien este método mantiene el epítipo antigénico y las modificaciones post-traducción, existe una serie de inconvenientes, incluyendo el riesgo de contaminación debido a la utilización de todo virus y rendimientos variables dependiendo de la cepa del virus. Niveles subóptimos de protección pueden resultar de la heterogeneidad genética en el virus debido a su introducción en los huevos. Otras desventajas incluyen una amplia planificación para la obtención de huevos, los riesgos de contaminación debido a los productos químicos utilizados en la purificación, y los largos tiempos de producción. Además, las personas hipersensibles a las proteínas del huevo, no pueden ser candidatos elegibles para recibir la vacuna.

55

Para evitar el uso de huevos, también se ha producido el virus de la gripe en cultivo de células de mamífero, por ejemplo, en células MDCK o PERC.6, o similares. Otro enfoque es la genética inversa, en la cual los virus se producen mediante la transformación de células con genes virales. Estos métodos, sin embargo, también requieren el uso de todo el virus, así como los métodos elaborados y ambientes de cultivo específicos.

- 5 Se ha explorado, el uso del ADN viral como una vacuna. En esta tecnología, la protección se obtiene mediante la expresión de antígenos virales en células humanas; a continuación, los antígenos se reconocen como antígeno extraño, lo que conduce a una respuesta de anticuerpos específica. Sin embargo, existe el riesgo de activación de oncogenes de introducción de ADN dentro de la porción determinante del genoma de la célula humana - un inconveniente significativo.
- 10 También se han preparado, vacunas que comprenden antígenos virales recombinantes expresados en células de insectos o de plantas transformadas del ADN viral por Dow Agrosience (véase, por ejemplo WO 2004/098530). Aunque el riesgo asociado con el uso de virus vivo se evita y el proceso de producción es más corto, se ven afectadas la conformación de proteínas y las modificaciones post-traducción. Las etapas de purificación y aplicación a gran escala también son relativamente complejas, ya que los antígenos están asociados con las membranas celulares. Además, la dosis de baculovirus-HA recombinante, necesaria para la inmunización eficaz en animales es 10 veces mayor que la de HA natural producida en huevos fertilizados. En ambos casos, los niveles de expresión del antígeno viral son bajos.

20 En un esfuerzo por evitar las dificultades asociadas con la purificación de proteínas de membrana, Huang et al (2001, Vaccine, 19:2163-2171) sustituyó al dominio transmembrana y la cola citoplásmica de la HA del sarampión con una señal de retención en el ER. La proteína HA resultante se produjo en células de plantas de tabaco para el desarrollo de la vacuna oral (vacuna comestible). La HA expresada no es retenida tan fuertemente en el ER como lo es con el dominio transmembrana, simplificando así el procedimiento de purificación. Sin embargo, la forma trimérica natural de HA no se puede formar en esas condiciones, lo que puede afectar la inmunogenicidad de la proteína recombinante.

25 Saelens et al (1999, Eur. J. Biochem, 260:166-175) expresaron un gen de HA que carece del dominio transmembrana en levaduras (*Pichia pastoris*), lo que lleva a la secreción de HA monomérica. Esta forma, sin embargo, fue menos inmunogénica que la HA trimérica. La publicación de Wei et al "Comparative Efficacy of Neutralizing Antibodies Elicited by Recombinant Hemagglutinin Proteins from Avian H5N1 Influenza Virus", Journal of Virology, July 2008, p. 6200-6208 analiza las diversas formas de la proteína rHA por su potencial eficacia como vacuna. WO 02/074795 se refiere a una proteína quimérica que comprende un antígeno y un dominio de oligomerización. WO 2008/054540 proporciona los polinucleótidos y polipéptidos capaces de potenciar la respuesta inmune de un ser humano en necesidad de protección contra la infección por virus de la gripe. WO 2009/076778 se refiere a un método para sintetizar partículas similares a virus de la gripe (VLP) dentro de una planta o una parte de una planta. Mett et al indican en Journal Compilation 2008, 2, p. 33-40, que una vacuna de subunidades de la gripe producida por la planta protege hurones contra la exposición al virus. En Vaccine 26(2008), p. 2930-2934 Shoji et al se refiere a HA expresada en plantas como candidato de vacuna contra la gripe estacional. Huang et al study Vaccine 19(2001), p. 2163-2171 protección hemaglutinina del virus del sarampión derivado de plantas que incluye anticuerpos neutralizantes en ratones. The Switch Between Two-, Three- and Four-Stranded Coiled Coils in GCN4 Leucine Zipper Mutants, se estudia en Science, Vol. 262, 26 November 1993, p. 1401-1407 por Harbury et al.

40 Con el fin de proteger a la población mundial de la gripe y para evitar futuras pandemias, los fabricantes de vacunas tendrán que desarrollar métodos rápidos, eficaces de producción de dosis de vacuna. El uso actual de los huevos fertilizados para producir vacunas es insuficiente e implica un proceso largo. Las tecnologías recombinantes ofrecen enfoques prometedores para la producción de antígenos de la gripe. Sin embargo, la producción de la hemaglutinina se ha limitado a la proteína asociada a la membrana, lo que implica procesos de extracción complejos con bajos rendimientos, o a proteínas solubles pobremente inmunogénicas.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a la producción de antígenos de la gripe recombinantes solubles. Más específicamente, la presente invención está dirigida a la producción de antígenos de la gripe recombinantes solubles que retienen el ensamblaje trimérico y la inmunogenicidad.

50 Es un objeto de la presente invención proporcionar antígenos de la gripe recombinantes solubles.

La presente invención proporciona una hemaglutinina recombinante (rHA), que comprende un dominio de la hemaglutinina y un dominio de oligomerización, un péptido señal y el retículo endoplásmico (ER) como se define en la reivindicación 1. La rHA se produce como un homotrímero soluble quimérico.

55 La presente invención también proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la rHA, como se acaba de describir anteriormente.

5 La presente invención además proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende a) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de la hemaglutinina; y b) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de oligomerización. El ácido nucleico codifica una rHA soluble que forma un homotrímero. El ácido nucleico comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal y una señal de retención en el retículo endoplásmico (ER).

La presente invención también proporciona un vector que comprende el nucleótido como se describió anteriormente.

La invención proporciona además una célula huésped que expresa la rHA, como se describe anteriormente, una célula huésped transformada con el nucleótido como se ha descrito anteriormente, o una célula huésped transformada con el vector como se ha descrito anteriormente.

10 También se proporciona por la presente invención, un método para producir una proteína rHA recombinante. El método comprende proporcionar una célula huésped con un vector que comprende: a) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de hemaglutinina, en donde el ácido nucleico codifica una rHA soluble que forma un homotrímero; y b) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de oligomerización, a continuación, expresando la rHA.

15 La presente invención proporciona además un método de expresar una hemaglutinina recombinante (rHA) dentro de una planta. En una primera etapa, un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de hemaglutinina, en donde el ácido nucleico codifica una rHA soluble que forma un homotrímero y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de oligomerización, se introduce en una planta. En la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico puede ser introducido en la planta en forma transitoria, o el ácido nucleico se introduce en la planta de modo que sea estable.

20 La presente invención también proporciona un método para producir una hemaglutinina recombinante (rHA) en una planta, que comprende: a) introducir una secuencia de ácido nucleico en la planta, o parte de la misma, la secuencia de ácido nucleico que comprende una región reguladora unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de la hemaglutinina y un dominio de oligomerización, en donde el ácido nucleico codifica una rHA soluble que forma un homotrímero; y b) cultivar la planta transgénica, produciendo de este modo la rHA. En la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico puede ser introducido en la planta en forma transitoria, o el ácido nucleico se introduce en la planta de modo que sea estable.

25 rHA es una molécula muy compleja de producir. Los niveles de expresión y los rendimientos de HA recombinante a partir de los sistemas de producción actuales son bajos; y en consecuencia los costes de producción son altos. Esto se debe principalmente a la compleja estructura trimérica de la proteína, que debe someterse a un proceso complejo para el ensamblaje durante su síntesis. Adicionalmente, HA es una gran proteína que tiene un dominio transmembrana, y está altamente glicosilada. La producción de una forma soluble de HA permitiría la producción a niveles más altos y disminuir la complejidad del proceso de purificación. Esto tendría un impacto importante en los costos de producción. La sustitución del dominio transmembrana con hélices α solubles u otra estructura secundaria apropiada para estabilizar HA estructuralmente compatible con el núcleo de espiral enrollada del ectodominio de la proteína HA se muestra que produce trimeros HA solubles, estables. Tales proteínas recombinantes se pueden utilizar para enriquecer las vacunas de gripe actuales, o en la preparación de nuevas vacunas.

Breve descripción de los dibujos

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

La figura 1 muestra un esquema de los dominios de la proteína hemaglutinina (HA) de origen natural.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido de GCN4-pII (SEQ ID NO: 1).

45 La figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de PDI (SEQ ID NOs: 6 y 7; (Acceso Genbank Z11499), un péptido señal de alfalfa. El péptido señal PDI es homólogo a ERp59 de ratón. El sitio de restricción *Bgl*III se indica en negrita.

La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de HA de la cepa de la gripe A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (Acceso Genbank AY289929; Primary accession UniProt KB/TrEMBL: Q6WVG00). El péptido señal de rHA se muestra en cursiva. El sitio de escisión de HA₀ se indica en negrita y el péptido de fusión está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en fondo gris.

50 La figura 5 muestra las secuencias de aminoácidos de diversas construcciones de rHA de acuerdo con la presente invención. La numeración de los aminoácidos se ha ajustado de acuerdo con la numeración de aminoácidos original de HA. El péptido señal PDI se indica en cursiva, el sitio de escisión HA₀ se muestra en negrita, el péptido de fusión

- se subraya, y el codón de parada está representado por *. La figura 5A es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de rHA de longitud completa que comprende el péptido señal de PDI y el dominio transmembrana y la cola citoplásmica. El dominio transmembrana se muestra en fondo gris. La figura 5B es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de rHA retenida en el ER usando la señal de retención SEKDEL. La señal de retención se muestra en fondo gris. La figura 5C es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de rHA retenida en el ER, usando la señal de retención HDEL. La señal de retención se muestra en fondo gris. La figura 5D es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de rHA soluble sin el dominio transmembrana. La figura 5E es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de rHA soluble trimérica usando el péptido trimérico GCN4-pII. El péptido GCN4-pII se muestra en fondo gris. La figura 5F es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de rHA soluble trimérica usando el péptido trimérico GCN4-pII y retenido en el ER. El péptido GCN4-pII se muestra en fondo gris y la señal de retención SKDEL se muestra en cursiva. La figura 5G es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de rHA soluble trimérica usando el péptido trimérico PRD. El péptido PRD se muestra en fondo gris. La figura 5H es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de rHA soluble trimérica utilizando el péptido trimérico PRD, y retenida en el ER. El péptido PRD se muestra en fondo gris y la señal de retención se muestra en cursiva.
- La figura 6 muestra las secuencias de nucleótidos de diversos fragmentos de acuerdo con la presente invención. La secuencia no codificante se presenta en mayúsculas pequeñas y los sitios de restricción útiles están subrayados. La figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 17) del fragmento del gen HA₀. La figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 18) del dominio transmembrana y el fragmento del gen de la cola citoplásmica. La figura 6C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 19) del fragmento del gen SEKDEL retenido en ER. La figura 6D muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20) del fragmento del gen HDEL retenido en ER. La figura 6E muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 21) del fragmento del gen GCN4-pII. La figura 6F muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 22) del fragmento del gen GCN4-pII retenido en ER. La figura 6G muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 23) del fragmento del gen PRD. La figura 6H muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 24) del fragmento del gen PRD retenido en ER.
- La figura 7 es un diagrama esquemático del ADN de transferencia de rHA (ADN-t) en un plásmido binario pCAMBIA, de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La figura 8 es un Western blot que muestra la inmunodetección de la expresión de rHA en el tabaco. Los carriles: 1) estándar de rHA puro (1 ng); 2) 1 ng de rHA estándar se sembraron en 10 µg de extracto de la planta; 3) 10 µg de extracto de la planta; 4) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 540, que expresa la biomasa; 5) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 541, que expresa la biomasa; 6) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 542, que expresa la biomasa; 7) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 544, que expresa la biomasa; 8) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 545, que expresa la biomasa; 9) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 546, que expresa la biomasa; y 10) 10 µg de extracto de proteína a partir de la construcción # 547, que expresa la biomasa.
- La figura 9 es un Western blot que muestra la inmunodetección de la expresión de rHA en el tabaco, con 5 µg del extracto. La figura 9A muestra los resultados de *N. benthamiana*, mientras que la figura 9B muestra los resultados de *N. tabacum*. Los carriles: 1) 5 µg de extractos de plantas para los paneles B, D y A, C, respectivamente; 2) 1 ng de rHA estándar se sembró en 2 y 5 µg del extracto de la planta para los paneles B, D y A, C, respectivamente; 3) Extracto de la construcción # 540, que expresa la biomasa; 4) Extracto de la construcción # 541, que expresa la biomasa; 5) Extracto de la construcción # 542, que expresa la biomasa; 6) Extracto de la construcción # 544, que expresa la biomasa; 7) Extracto de la construcción # 545, que expresa la biomasa; 8) Extracto de la construcción # 546, que expresa la biomasa; y 9) Extracto de la construcción # 547, que expresa la biomasa.
- La figura 10 es un Western blot que muestra la inmunodetección de la expresión de rHA en el tabaco, con 5 µg de extracto, en condiciones reductoras. La figura 10A muestra los resultados de *N. benthamiana*, mientras que la figura 10B muestra los resultados de *N. tabacum*. Los carriles: 1) 5 µg de extracto de la planta; 2) 1 ng de estándar de rHA se sembró en 5 µg de extracto de la planta; 3) Extracto de la construcción # 540, que expresa la biomasa; 4) Extracto de la construcción # 541, que expresa la biomasa; 5) Extracto de la construcción # 542, que expresa la biomasa; 6) Extracto de la construcción # 544, que expresa la biomasa; 7) Extracto de la construcción # 545, que expresa la biomasa; 8) Extracto de la construcción # 546, que expresa la biomasa; y 9) Extracto de la construcción # 547, que expresa la biomasa.
- La figura 11 muestra una placa con los resultados de un ensayo de hemaglutinación. Fila 1: PBS (control negativo); Fila 2: PBS + 1000 ng de HA (PSC); Fila 3: PBS + 100 ng de HA (PSC); Fila 4: PBS + 10 ng de HA (PSC); Fila 5: PBS + 1 ng de HA (PSC); Fila 6: extracto de la planta no transformada; Fila 7: extracto de la planta no transformada + 1000 ng de HA (PSC); Fila 8: extracto de la planta no transformada + 100 ng HA (PSC); Fila 9: extracto de la planta no transformada + 10 ng de HA (PSC); Fila 10: extracto de la planta no transformada + 1 ng de HA (PSC); Fila 11: extracto de planta que expresa la construcción de 540 (rHA transmembrana); y Fila 12: extracto de planta que expresa la construcción de 544 (rHA soluble fusionada a GCN4).

Descripción de la realización preferida

La presente invención se refiere a la producción de antígenos de la gripe recombinantes solubles. Más específicamente, la presente invención está dirigida a la producción de antígenos de la gripe recombinantes solubles que retienen la inmunogenicidad.

La siguiente descripción es de una realización preferida.

- 5 La presente invención provee una hemaglutinina recombinante (rHA) que comprende un dominio de la hemaglutinina y un dominio de oligomerización. La proteína recombinante se produce como un homotrímero soluble. La rHA también comprende un péptido señal y una señal de retención en el retículo endoplásmico (ER).

10 La gripe es causada por los virus de la gripe, que se clasifican en virus de tipo A, B, o C. El tipo A y B son los más frecuentemente asociados con las epidemias. Los virus de la gripe tipo A, además se dividen en subtipos de acuerdo con la combinación de las glicoproteínas de la superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) presentadas. En la actualidad, se reconocen 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). Cada virus de la gripe tipo A presenta un tipo de glicoproteína HA y un tipo de glicoproteína NA.

15 Por el término hemaglutinina recombinante, también referido como "HA recombinante" y "rHA", se entiende una proteína hemaglutinina que se produce por técnicas recombinantes, que son bien conocidas por una persona experta en la técnica. La hemaglutinina (HA) es una proteína de superficie del virus encontrado en los virus de la gripe tipo A. Hasta la fecha, se han identificado dieciséis subtipos de HA (H1-H16). HA es responsable del enlace del virus a los residuos del ácido siálico de fracciones carbohidrato en la superficie de la célula huésped infectada. Después de la endocitosis del virus por la célula, la proteína HA se somete a drásticos cambios conformacionales que inician la fusión de las membranas viral y celular y el virus entra en la célula.

20 La HA es una glicoproteína de tipo I de membrana homotrimérica, que generalmente comprende un péptido señal, un dominio HA₀, un sitio de anclaje que atraviesa la membrana en el terminal C y una pequeña cola citoplásmica (figura 1). El término "homotrímero" u "homotrimérico" indica que un oligómero está formado por tres moléculas de proteína HA. La proteína HA se sintetiza como una proteína precursora de 75 kDa monomérica (HA₀), que se reúne en la superficie en una proteína trimérica alargada. Antes de que ocurra la trimerización, la proteína precursora HA₀ se escinde en un sitio de escisión de activación conservado (también referido como péptido de fusión) en 2 cadenas de polipéptidos, HA1 (328 aminoácidos) y HA2 (221 aminoácidos), unidos por un enlace disulfuro. Aunque esta etapa es central para la infectividad del virus, no es esencial para la trimerización de la proteína. La inserción de HA dentro de la membrana del retículo endoplasmático (ER) de la célula huésped, la escisión del péptido señal y la glicosilación de proteínas son eventos cotraducción. El repliegamiento correcto de HA requiere la glicosilación de la proteína y la formación de 6 enlaces disulfuro intra-cadena. El trímero de HA ensambla dentro del complejo cis- y trans-Golgi, el dominio transmembrana que juega un papel en el proceso de trimerización. Las estructuras cristalinas de las proteínas HA tratadas con bromelaína, que carecen del dominio transmembrana, han mostrado una estructura altamente conservada entre las cepas de gripe (Russell *et al.* 2004). También se ha establecido que HA se somete a grandes cambios conformacionales durante el proceso de infección, lo que requiere que la HA₀ precursora se escinde en las 2 cadenas de polipéptido HA1 y HA2.

La HA recombinante de la presente invención es un subtipo seleccionado entre el grupo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, o H16. Adicionalmente, la rHA se puede basar en la secuencia de una hemaglutinina que está aislada de los virus de la gripe emergentes.

40 La rHA de la presente invención es una construcción de proteína quimérica que comprende un dominio de la hemaglutinina y un dominio de oligomerización. El término "dominio de hemaglutinina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende ya sea el dominio HA₀, o los dominios HA1 y HA2. En otras palabras, la proteína rHA puede ser procesada (i.e., comprende los dominios HA1 y HA2), o puede ser sin procesar (i.e., comprende el dominio HA₀). El dominio de hemaglutinina no incluye el péptido señal, el dominio transmembrana, o la cola citoplásmica encontrada en la proteína de origen natural. El "dominio de oligomerización", también denominado "péptido trimérico", se refiere a un dominio que promueve la oligomerización de la proteína rHA. Los dominios de oligomerización incluyen el péptido GCN4-pII (Harbury *et al.*, 1993, Science, 262:1401-7), y el dominio rico en prolina (PRD) del γ -zeína de maíz.

50 El dominio de oligomerización puede ser el péptido GCN4-pII, una variante de la cremallera de leucina de levadura GCN4. Este mutante de GCN4 lleva residuos Ile, en ambas posiciones a y d (pII), presentes en cada 7 aminoácidos en la hélice alfa, conduciendo a una alta tendencia a la trimerización. La temperatura de fusión (T_m) del trímero es > 100 °C, los que confiere una alta estabilidad intrínseca al oligómero (Harbour *et al.*). La secuencia de aminoácidos de GCN4-pII se muestra en la figura 2. GCN4-pII es apropiado para uso como el dominio de oligomerización; la secuencia de 29 aminoácidos de GCN4-pII se coloca en el extremo del terminal C de la secuencia del dominio HA, esencialmente reemplazando el dominio transmembrana de 26 aminoácidos. Si se desea, los aminoácidos adicionales se pueden colocar en el extremo del terminal C de la rHA de tal manera que la estructura recombinante no termina por una hélice α . Por ejemplo, los residuos de aminoácidos Ser-Ala-Ala se pueden adicionar en el extremo del terminal C de GCN4-pII.

El dominio de oligomerización puede ser el PRD de γ -zeína de maíz, también denominado en este documento como "PRD". Se sabe que la gamma- γ -zeína del maíz se conoce almacena pilas en los cuerpos proteicos, una vez dentro del ER. El péptido sintético PRD adopta una conformación anfipática de poliprolina II, que se agrupa por sí misma como trímeros (Kogan et al, 2002, Biophysical J., 83:1194-1204). En su forma natural, el PRD comprende 8 repeticiones del péptido PPPVHL (SEQ ID NO: 2). El péptido PRD de gamma- γ -zeína de maíz también se coloca en el terminal C del dominio de HA, reemplazando el anclaje de transmembrana. Como la forma natural del PRD es bastante larga, también está dentro del alcance de la presente invención proporcionar el PRD en diferentes longitudes de péptidos (4, 6 u 8 repeticiones de péptidos, es decir, 24, 36, o 48 aminoácidos de longitud). Si se desea, un enlazador de aminoácidos puede ser colocado entre el dominio de HA y el PRD con el fin de permitir la orientación de la cadena peptídica de PRD hacia una hélice izquierda de poliprolina. Cualquier enlazador peptídico apropiado conocido en la técnica se puede utilizar. Por ejemplo, se puede utilizar un tetrapéptido tal como Gly-Gly-Ala-Gly (SEQ ID NO:3). Además, si se desea, los aminoácidos adicionales se pueden colocar en el extremo terminal C de la rHA de tal manera que la estructura recombinante no termina por una hélice α . Por ejemplo, se pueden adicionar los residuos de aminoácidos Ser-Ala-Ala en el extremo del terminal C del PRD.

La rHA de acuerdo con la presente invención comprende además un péptido señal. El péptido señal puede ser cualquier péptido apropiado conocido en la técnica, para dirigir la proteína recombinante a la membrana o compartimento celular deseado. Por ejemplo, se puede utilizar el péptido señal encontrado en HA natural, el cual dirige la HA al ER. En otro ejemplo, el péptido señal puede ser PDI, el péptido señal de alfalfa. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de PDI se muestran en la figura 3. Ventajosamente, el péptido señal PDI tiene un sitio de restricción *bg*/II, que puede ser útil para la clonación.

La rHA como se describe anteriormente también comprende además una señal de retención en el retículo endoplásmico (ER). Cualquier señal de retención en el ER, apropiada conocida por una persona experta en la técnica puede ser utilizada. Por ejemplo, se pueden utilizar las señales de retención de ER, Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu (SEKDEL; SEQ ID NO: 4) o Su-Asp-Glu-Leu (HDEL; SEQ ID NO: 5). La señal de retención en el ER elegida puede estar en el extremo del terminal C, de la secuencia de la proteína rHA. Ventajosamente, retención en ER de una proteína recombinante en plantas se ha demostrado en varios casos para mejorar el nivel de expresión por 2 a 10 veces (Schillberg et al, 2003, Cell Mol. Life Sci. 60:443-445). Sin desear estar limitado por la teoría, las señales de retención de ER pueden permitir un movimiento de vaivén de las proteínas entre el ER y el complejo de Golgi, lo que permite que se produzca la trimerización.

El término "soluble" indica que la rHA se produce en la célula huésped en una forma soluble. Como se describió anteriormente, la conversión de HA recombinante a una forma soluble surge de la sustitución del dominio transmembrana hidrófobo por hélices α solubles, que son estructuralmente compatibles con el dominio de HA. Expresando la rHA en una forma soluble puede aumentar los rendimientos (mayores niveles de expresión) y disminuir la complejidad de la purificación, por lo tanto, la reducción de los costes de producción.

La presente invención también provee un ácido nucleico que codifica la rHA como se describió anteriormente. El ácido nucleico es una construcción quimérica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de hemaglutinina (HA_0) y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de oligomerización. El ácido nucleico que codifica la rHA también comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal y una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de retención en el ER.

La presente invención se refiere además a una construcción de gen quimérico que comprende un ácido nucleico que codifica rHA, como se describe anteriormente, unido operativamente a un elemento regulador. Por "elemento regulador" o "región reguladora", se entiende una porción de ácido nucleico por lo general, pero no siempre, en dirección 5' de un gen, y puede estar compuesto por ADN o ARN, o ambos ADN y ARN. Los elementos reguladores pueden incluir aquellos que son capaces de mediar la especificidad de órganos, o el control del desarrollo o la activación de genes temporales. Adicionalmente, el "elemento regulador" incluye elementos promotores, elementos promotores del núcleo, elementos que son inducibles en respuesta a un estímulo externo, elementos que se activan constitutivamente, o elementos que disminuyen o aumentan la actividad de promotor tal como elementos reguladores negativos o potenciadores de la transcripción, respectivamente. Por una secuencia de nucleótidos que muestra actividad del elemento regulador se entiende que la secuencia de nucleótidos cuando se une operativamente con una secuencia codificante de las funciones de interés como un promotor, un promotor de núcleo, un elemento regulador constitutivo, un elemento negativo o silenciador (i.e. elementos que disminuyen la actividad del promotor), o un potenciador de la transcripción o traducción.

Por "unido operativamente" se entiende que las secuencias particulares, por ejemplo, un elemento regulador y una región codificante de interés, interactúan ya sea directa o indirectamente para llevar a cabo una función pretendida, tales como la mediación o la modulación de la expresión génica. La interacción de las secuencias unidas operativamente puede, por ejemplo, estar mediada por las proteínas que interactúan con las secuencias operativamente unidas.

Los elementos reguladores como se usa en este documento, también incluye elementos que son activos después de la iniciación de la transcripción o la transcripción, por ejemplo, elementos reguladores que modulan la expresión de genes tales como potenciadores de la traducción y transcripción, represores de la traducción y transcripción, y la estabilidad del ARNm o determinantes de la inestabilidad. En el contexto de esta descripción, el término "elemento regulador" también se refiere a una secuencia de ADN, por lo general, pero no siempre, en dirección (5') a la secuencia codificante de un gen estructural, que incluye secuencias que controlan la expresión de la región codificante proporcionando el reconocimiento de la ARN polimerasa y/u otros factores requeridos de la transcripción para iniciar en un sitio particular. Un ejemplo de un elemento regulador que provee para el reconocimiento del ARN polimerasa u otros factores transcripcionales para asegurar el inicio en un sitio particular es un elemento promotor. Un elemento promotor comprende un elemento promotor de núcleo, responsable de la iniciación de la transcripción, así como otros elementos reguladores (como se enumera anteriormente) que modifican la expresión de genes. Se debe entender que las secuencias de nucleótidos, localizadas dentro de intrones, o 3' de la secuencia de región codificante también pueden contribuir a la regulación de la expresión de una región codificante de interés. Un elemento regulador también puede incluir esos elementos situados en dirección (3') en el sitio de iniciación de la transcripción, o dentro de las regiones transcritas, o ambos. En el contexto de la presente invención un elemento regulador post-transcripcional puede incluir elementos que son activos después de la iniciación de la transcripción, por ejemplo potenciadores de la traducción y de la transcripción, represores de la traducción y la transcripción, y los factores determinantes de estabilidad de ARNm.

Los elementos reguladores, o fragmentos de los mismos, pueden estar asociados operativamente (unido operativamente) con elementos o promotores reguladores heterólogos con el fin de modular la actividad del elemento regulador heterólogo. Dicha modulación incluye potenciar o reprimir la actividad transcripcional del elemento regulador heterólogo, la modulación de los eventos post-transcripcionales, o ambos mejorar/reprimir la actividad transcripcional del elemento regulador heterólogo y la modulación de los eventos post-transcripcionales. Por ejemplo, uno o más elementos reguladores, o fragmentos de los mismos, pueden estar asociados operativamente con promotores específicos de tejido constitutivos, inducibles o fragmentos de los mismos, o fragmentos de elementos reguladores, por ejemplo, para secuencias TATA o GC pueden estar asociadas operativamente con los elementos reguladores de la presente invención, para modular la actividad de dichos promotores dentro de las células de plantas, insectos, hongos, bacterias, levaduras, o animales.

Existen varios tipos de elementos reguladores, incluidos los que están regulados por el desarrollo, inducibles y constitutivos. Un elemento regulador que está regulado por el desarrollo, o controla la expresión diferencial de un gen bajo su control, se activa dentro de ciertos órganos o tejidos de un órgano en momentos específicos durante el desarrollo de ese órgano o tejido. Sin embargo, algunos elementos reguladores que están regulados por el desarrollo puede ser preferentemente activos dentro de ciertos órganos o tejidos en las etapas de desarrollo específicas, también pueden ser activos en una forma regulada por el desarrollo, o en un nivel basal en otros órganos o tejidos dentro de una planta también.

Por "promotor" se entiende las secuencias de nucleótidos en el extremo 5' de una región codificante, o fragmento de la misma, que contiene todas las señales esenciales para el inicio de la transcripción y para la regulación de la tasa de transcripción. En general, existen dos tipos de promotores, promotores inducibles y constitutivos. Si se desea la expresión específica de tejido del gen, por ejemplo, expresión específica de la hoja, o semilla, entonces, también se pueden emplear promotores específicos para estos tejidos.

Un promotor inducible es un promotor que es capaz de, activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En la ausencia de un inductor las secuencias de ADN o genes, no serán transcritas. Por lo general, el factor de proteína que se une específicamente a un promotor inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva que entonces se convierte directa o indirectamente en la forma activa por el inductor. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, regulador de crecimiento, herbicida o compuesto fenólico o un estrés fisiológico impuesto directamente por calor, frío, sal o elementos tóxicos o indirectamente a través de la acción de un agente patógeno o enfermedad tal como un virus. Una célula de planta que contiene un promotor inducible puede ser expuesta a un inductor mediante la aplicación externamente del inductor a la célula o planta tal como por pulverización, riego, calentamiento o métodos similares. Ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores de plantas tales como: el promotor plastocianina de la alfalfa (véase, por ejemplo WO01/025455), que es regulada ligeramente; el promotor nitrato reductasa de la alfalfa (NiR; véase por ejemplo el documento WO01/025454, que puede ser inducido por la fertilización con nitratos (3)); y el promotor dehidrina de la alfalfa (Solicitud de EE.UU. número de serie 60/757,486), que es inducido por tensiones ambientales tales como el frío.

Un promotor constitutivo dirige la expresión de un gen a través de las diversas partes de una planta y continuamente durante todo el desarrollo de la planta. Cualquier promotor constitutivo apropiado puede ser usado para conducir la expresión de rHA dentro de una célula transformada, o todos los órganos o tejidos, o ambos, de un organismo huésped. Ejemplos de promotores constitutivos conocidos incluyen aquellos asociados con el transcrito CaMV 35S. (Odell et al., 1985, Nature, 313: 810-812), gen de la actina 1 de arroz (Zhang et al, 1991, Plant Cell, 3: 1155-1165) y genes trifosfato isomerasa 1 (Xu et al, 1994, Plant Physiol. 106: 459-467), gen de ubiquitina 1 de maíz (Cormejo

et al, 1993, Plant Mol Biol. 29: 637-646), genes ubiquitina 1 y 6 de *Arabidopsis* (Holtorf et al, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 637-646), y el gen 4A del factor de iniciación de traducción de tabaco (Mandel et al, 1995 Plant Mol. Biol. 29: 995-1004).

5 El término "constitutivo" como se usa en el presente documento no indica necesariamente que un gen se expresa en el mismo nivel en todos los tipos de células, pero que el gen se expresa en una amplia gama de tipos de células, aunque a menudo se observa alguna variación en la abundancia.

10 La construcción del gen quimérico de la presente invención puede comprender además una región no traducida 3'. Una región no traducida 3' se refiere a aquella porción de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualquier otra señal reguladora capaz de efectuar el procesamiento de ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente efectuando la adición de pistas del ácido poliadenílico hasta el extremo 3' del precursor de ARNm. Las señales de poliadenilación se reconocen comúnmente por la presencia de homología a la forma canónica 5' AATAAA-3' aunque las variaciones no son infrecuentes.

15 Ejemplos de regiones 3' apropiadas son las regiones 3' transcritas no traducidas, que contienen una señal de poliadenilación del tumor de *Agrobacterium* que induce los genes del plásmido (Ti), tales como la nopalina sintasa (gen *Nos*) y genes de plantas tales como los genes de la proteína de almacenamiento de soja y la subunidad pequeña del gen, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO). Por lo tanto, la región no traducida 3' del gen estructural de la presente construcción se puede utilizar para construir genes quiméricos para la expresión en plantas. Otros ejemplos de regiones 3' apropiadas son terminadoras, que pueden incluir, pero no se limitan a la región 3' no codificante de la secuencia de los genes de la *plastocianina* o la *nitrito reductasa* o *dehidrina* de alfalfa.

20 La construcción del gen quimérico de la presente invención también puede incluir además potenciadores, ya sea potenciadores de la traducción o de la transcripción, que puedan ser necesarios. Estas regiones potenciadoras son bien conocidas por las personas expertas en la técnica, y pueden incluir el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. El codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificadora para asegurar la traducción de toda la secuencia. Las señales de control de traducción y los codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Las regiones de iniciación de la traducción se pueden proporcionar de la fuente de la región de iniciación transcripcional, o a partir del gen estructural. La secuencia también se puede derivar del elemento regulador seleccionado para expresar el gen, y se puede modificar específicamente para aumentar la traducción del ARNm.

30 También se consideran parte de esta invención las plantas, partes o tejidos de plantas, células de plantas, árboles, partes de árboles, las células de árboles, células de levaduras, bacterias, hongos, insectos y animales que contienen la construcción de gen quimérico que comprende un ácido nucleico que codifica rHA, de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se debe entender que los elementos reguladores de la presente invención también se pueden combinar con la región codificante de interés para la expresión dentro de un rango de organismos huésped que son susceptibles de transformación. Tales organismos huésped incluyen:

- las plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, por ejemplo, maíz, plantas de cereales, trigo, cebada, avena, tabaco, *Brassica*, soja, alubias, guisantes, alfalfa, patata, tomate, ginseng, *Arabidopsis*; una parte o tejido de estas plantas, por ejemplo, hojas, raíces, tallos, meristemas, estructura floral, las células de estas plantas y

- células de levaduras, hongos, insectos, bacterias y animales.

40 Los métodos para la transformación y regeneración de estos organismos se establecen en la técnica y son conocidos por un experto en la técnica y el método de obtención de plantas transformadas y regeneradas no es crítico para esta invención.

45 Por "transformación" se entiende la transferencia interespecífica de información genética (secuencia de nucleótidos) que se manifiesta genotípicamente, fenotípicamente, o ambos. La transferencia interespecífica de la información genética de una construcción quimérica con un huésped puede ser hereditaria y la transferencia de información genética considerada estable, o la transferencia pueden ser transitoria y la transferencia de información genética no es heredable.

50 Los métodos de regeneración de plantas enteras a partir de células de plantas también son conocidos en la técnica. En general, las células de plantas transformadas se cultivan en un medio apropiado, que puede contener agentes selectivos tales como antibióticos, donde se usan marcadores seleccionables para facilitar la identificación de células de plantas transformadas. Una vez que los callos se forman, la formación de brotes se puede fomentar mediante el empleo de las hormonas vegetales apropiadas de conformidad con los procedimientos conocidos y los brotes se transfieren al medio de enraizamiento para la regeneración de las plantas. A continuación, las plantas se pueden utilizar para establecer generaciones repetitivas, ya sea a partir de semillas o utilizando técnicas de propagación vegetativa.

Las construcciones de la presente invención se pueden introducir en células de plantas usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus de plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de tales técnicas ver por ejemplo Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988); Geierson and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); and Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997). Otros métodos incluyen la captación directa de ADN, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo utilizando protoplastos, microinyección, microproyectiles o buscadores, y la infiltración al vacío. Véase, por ejemplo, Bilang, et al. (*Gene* 100: 247-250 (1991), Scheid et al. (*Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (*Plant Science* 52: 111-116, 1987), Neuhauser et al. (*Theor. Appl Genet.* 75: 30-36, 1987), Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987); Howell et al. (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch et al. (*Science* 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., *Plant Physiology* 91:694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu and Lomonosoff (*J Virol Meth*, 105:343-348, 2002.), Patentes de los Estados Unidos. Nos. 4,945,050; 5,036,006; y 5,100,792, solicitudes de patente de los Estados Unidos U.S. Ser. Nos. 08/438,666, presentada el 10 de mayo de 1995, y 07/951,715, presentada el 25 de septiembre de 1992.

Como se describe a continuación, los métodos de expresión transitoria pueden usarse para expresar las construcciones de la presente invención (véase Liu and Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348). Alternativamente, se puede utilizar un método de expresión transitoria basado en el vacío, como se describe por Kapila et al., 1997. Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, un método de Agro-inoculación o Agro-infiltración, la infiltración con jeringa, sin embargo, otros métodos transitorios también se pueden utilizar como se ha indicado anteriormente. Con la Agro-inoculación, Agro-infiltración, o infiltración con jeringa, una mezcla de *Agrobacteria* que comprende el ácido nucleico deseado entra en los espacios intercelulares de un tejido, por ejemplo las hojas, la porción aérea de la planta (incluyendo el tronco, hojas y flores), otra porción de la planta (tallo, raíz, flor), o toda la planta. Después de atravesar la epidermis el *Agrobacteria* infecta y transfiere las copias de ADN-t en las células. El ADN-t se transcribe episomalmente y el ARNm se traduce, conduciendo a la producción de la proteína de interés en las células infectadas, sin embargo, el paso del ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

Para ayudar en la identificación de células de plantas transformadas, las construcciones de la presente invención se pueden manipular adicionalmente para incluir marcadores seleccionables de plantas. Los marcadores seleccionables útiles incluyen enzimas que proporcionan resistencia a un antibiótico tal como gentamicina, higromicina, kanamicina, y similares. Del mismo modo, las enzimas que proporcionan la producción de un compuesto identificable por cambio de color, tales como *GUS* (β -glucuronidasa), o luminiscencia, tal como luciferasa son útiles.

Cuando las secuencias específicas se denominan en la presente invención, se entiende que estas secuencias incluyen dentro de su alcance, secuencias que son "sustancialmente homólogas" a las secuencias específicas, o secuencias o un complemento de las secuencias se hibridan con una o más de una secuencia de nucleótidos tal como se define en el presente documento en condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente 70%, o más preferiblemente 75% de los nucleótidos coinciden en una longitud definida de la secuencia de nucleótidos siempre que dichas secuencias homólogas muestren uno o más de un elemento regulador de la actividad como se revela en este documento.

Tal similitud de secuencia se puede determinar mediante un programa de comparación de secuencias de nucleótidos, tal como la prevista en DNASIS (utilizando, por ejemplo, los siguientes parámetros: penalización de GAP 5, # de primeras diagonales 5, penalización de GAP fijo 10, k-tupla 2, hueco flotante 10, y tamaño de la ventana 5). Sin embargo, otros métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo los algoritmos de Smith & Waterman (1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482), Needleman & Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), Pearson & Lipman (1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444), y mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y BLAST, disponibles a través de los NIH.), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. 1995 supplement), o el uso de hibridación Southern o Northern en condiciones rigurosas (véase Maniatis et al., in *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Preferiblemente, las secuencias que son sustancialmente homólogas muestran al menos aproximadamente 80% y más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de similitud de secuencia sobre una longitud definida de la molécula.

Un ejemplo de una de tales condiciones de hibridación rigurosas puede ser hibridación durante la noche (de aproximadamente 16-20 horas) en 4 X SSC a 65 °C, seguido de lavado en 0.1 X SSC a 65 °C, durante una hora, o 2 lavados en 0.1 X SSC a 65 °C cada uno, durante 20 o 30 minutos. Alternativamente, una condición de hibridación rigurosa de ejemplo podría ser durante la noche (16-20 horas) en 50% de formamida, 4 x SSC a 42 °C, seguido de lavado en 0.1 X SSC a 65 °C, durante una hora, o 2 lavados en 0.1 X SSC a 65 °C cada uno, durante 20 o 30 minutos, o durante la noche (16-20 horas), o la hibridación en solución reguladora de fosfato acuoso Church (SDS al 7%; solución reguladora NaPO₄ 0.5 M pH 7.2; EDTA 10 mM) a 65 °C, con 2 lavados, ya sea a 50 °C en 0.1 X SSC,

0.1% de SDS durante 20 o 30 minutos cada uno, o 2 lavados a 65 °C en 2 X SSC, 0.1% de SDS durante 20 o 30 minutos cada uno, para secuencia única.

5 La rHA de la presente invención se puede utilizar en conjunto con vacunas contra la gripe existentes, para complementar las vacunas, hacerlas más eficaces, y reducir las dosificaciones necesarias de administración. Como una persona experta en la técnica sabe, la vacuna puede ser dirigida contra uno o más de un virus de la gripe. Ejemplos de vacunas apropiadas incluyen las disponibles comercialmente de Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial, Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, GlaxoSmithKline, y similares.

Ejemplo 1: Estrategia de rHA

10 La HA elegida para ejemplificar la presente invención se obtuvo de la cepa de la gripe A/New Caledonia/20/99 (H1N1). La A/New Caledonia/20/99 HA, ha sido bien caracterizada y las herramientas de inmunodetección están disponibles comercialmente. A medida que las estructuras tridimensionales de todos las HA son bien conservadas, la estrategia de expresión presente se puede aplicar directamente a cualquier otra HA.

15 La expresión de rHA fue dirigida al ER y la vía secretora utilizando el péptido señal del PDI de alfalfa (SEQ ID NO: 3). Este péptido señal se fusiona directamente con la secuencia primaria terminal N de rHA madura (figura 4; SEQ ID NO: 8). La escisión teórica del péptido señal de rHA madura con el péptido señal PDI se verificó utilizando el servidor SignalP 3.0.

rHA puede ser retenida en el ER, mediante las señales de retención SEKDEL (SEQ ID NO: 4) o HDEL (SEQ ID NO: 5), ambas fusionadas al extremo del terminal C de la secuencia de la proteína rHA.

20 Cuando se utilizó el péptido GCN4-pII como el dominio de oligomerización, se fusionó directamente al terminal C del último residuo Tyr del HA₀. El residuo Met en la posición 1 de GCN4-pII fue cambiado a un Leu, porque Leu es más inerte que Met y tiene el volumen de empaquetamiento similar en comparación al Met original. Los aminoácidos Ser-Ala-Ala se adicionaron en el terminal C de GCN4-pII.

25 Cuando se utilizó el PRD de gamma- γ -zeína de maíz, un péptido con 8 repeticiones de la PPPVHL (SEQ ID NO: 2) se fusionó a HA, para reemplazar el dominio transmembrana de HA. Los 4 primeros residuos de prolina también se incluyeron en la fusión. Se excluyó la cisteína del terminal C. Para acomodar la fusión de una hélice de poliprolina al terminal C de HA, el péptido Gly-Gly-Ala-Gly (SEQ ID NO: 3) se adicionó al terminal N del PRD. El péptido Ser-Ala-Ala se adicionó al terminal C del PRD.

En total, 8 diferentes construcciones de genes de rHA estaban dispuestas para probar su expresión *in planta*:

1. La rHA de longitud completa, incluyendo el dominio de transmembrana, con el péptido señal PDI (SEQ ID NO: 9);
- 30 2. El dominio transmembrana y la cola citoplasmática fueron retirados de la rHA del punto 1 y se reemplazaron por la señal de retención SEKDEL (SEQ ID NO: 10);
3. El dominio transmembrana y la cola citoplasmática fueron retirados de la rHA del punto 1 y se reemplazaron por la señal de retención HDEL (SEQ ID NO: 11);
4. El dominio transmembrana y la cola citoplasmática fueron retirados de la rHA del punto 1 (SEQ ID NO: 12);
- 35 5. El dominio transmembrana y las colas citoplasmáticas fueron retirados de la rHA del punto 1 y se reemplazaron por el GCN4-pII (SEQ ID NO: 13);
6. El dominio transmembrana y las colas citoplasmáticas fueron retirados de la rHA del punto 1 y se reemplazaron por el GCN4-pII, con la señal de retención de SEKDEL en el terminal C (SEQ ID NO: 14);
- 40 7. El dominio transmembrana y las colas citoplasmáticas fueron retirados de la rHA del punto 1 y se reemplazaron por el dominio PRD (SEQ ID NO: 15); y
8. El dominio transmembrana y las colas citoplasmáticas fueron retirados de la rHA del punto 1 y se reemplazaron por el dominio PRD, con la señal de retención de SEKDEL en el terminal C (SEQ ID NO: 16).

Ejemplo 2: síntesis de genes

45 Se sintetizaron las ocho diferentes construcciones génicas descritas en el Ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos de tipo salvaje de HA de la cepa de la gripe A/New Caledonia/20/99 solamente se modificó para insertar o eliminar sitios de restricción para facilitar las etapas de clonación. Estas modificaciones menores en la secuencia del gen no cambiaron la secuencia de aminoácidos resultante de la proteína. El gen HA₀ fue sintetizado con un sitio de

restricción Apal en el extremo 5', en fase con el ATG del péptido señal PDI. Los otros 7 genes tienen un sitio de restricción KpnI en su extremo 5'. Cada gen termina en el extremo 3' con un codón de parada (TAA), seguido de un sitio de restricción SacI y StuI. De acuerdo con la estrategia de clonación diseñada, los siguientes sitios de restricción fueron diseñados para ser únicos en el plásmido final: Apal, BstZ17 I, Sac I, Kpn I, Bgl II, and Stu I. Los diferentes fragmentos de genes se sintetizaron en The Plant Biotechnology Institute y se entregaron clonados en pUC18. La información de la secuencia de nucleótidos seleccionada se da en la figura 6 (SEQ ID NOs: 17-24).

Ejemplo 3: ensamblaje genético de vectores que expresan las fusiones de rHA

Las diversas construcciones de ADN fueron ensambladas utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas (Sambrook et al (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, Sec Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY). La cepa DH5 α de *E. coli* utilizada tiene un huésped para la amplificación de los vectores binarios, a menos que se especifique lo contrario. El fragmento del gen HA₀ se ligó directamente en el casete plastocianina (ya que contiene el péptido señal pdi) utilizando los sitios de restricción bg/II y SacI, o fue co-ligado con el otros 7 extremos del terminal C, utilizando los sitios de restricción KpnI, bg/II y SacI. En cada caso, el gen se insertó en un casete de expresión plastocianina contenida en el ADN de transferencia (ADN-t) de unos vectores binarios. El ADN-t es la parte del vector binario que se integra en el genoma (desde el borde derecho al izquierdo) de la célula de la planta huésped tras la transformación. Los vectores binarios utilizados en este ejemplo se obtuvieron a partir del plásmido comercial pCAMBIA 2300 (Cambia, Canberra, Au) y contenían, de las secuencias del borde derecho al izquierdo del ADN-t, los siguientes elementos:

- varios casetes de expresión de propiedad (promotor y terminador), disponible en Medicago, donde se insertan los genes de rHA;

- un sitio de clonación múltiple para facilitar la clonación; y

- el gen que codifica la neomicina fosfotransferasa II (nptII), un marcador seleccionable que confiere resistencia a la kanamicina, bajo el control de un promotor de nopalina sintasa (NOS) y un terminador (35S) del virus del mosaico de la coliflor 35S.

Cada clon se sometió a secuenciación del ADN para verificar la secuencia de nucleótidos de los clones. Las variaciones de nucleótidos fueron toleradas en la secuencia del gen de la rHA, siempre que la secuencia de aminoácidos resultante no obstante codifique la misma secuencia de proteína exacta (SEQ ID NOs: 9-16). Las 8 construcciones de ADN diferentes se enumeran en la Tabla 1, y un ejemplo de ADN-t de la rHA resultante se muestra esquemáticamente en la figura 7.

Tabla 1: Construcciones de ADN para rHA

No.	Estrategia de focalización	Objetivo sub-celular	señal de retención en el ER	SEC ID NO:
540	transmembrana completa secretada	Apoplasto		9
541	retenido en ER	ER	SEKDEL	10
542	retenido en ER	ER	HDEL	11
543	Soluble, secretado	Apoplasto		12
544	GCN4 trimérico soluble	Apoplasto		13
545	GCN4 trimérico soluble	ER	SEKDEL	14
546	PRD trimérico soluble	Apoplasto		15
547	PRD trimérico soluble	ER	SEKDEL	16

El ADN aislado de clones apropiados de *E. coli* finalmente fue insertado en *Agrobacterium tumefaciens* Agl1 u otras cepas. La lista de los clones de *Agrobacterium* que contienen los diversos ADN-t utilizados en la presente invención aparece en la Tabla 1. En la preparación de experimentos de expresión transitoria de las plantas, el ADN plasmídico se aisló a partir de clones de *Agrobacterium* y se sometió a mapeo de digestión de restricción para asegurar la integridad del ADN

Ejemplo 3: Expresión transitoria de rHA en el tabaco

5 Crecimiento de *Agrobacterium*. Los clones de *Agrobacterium* que contienen un vector binario que lleva construcciones de ADN de rHA (Tabla 1) se cultivaron durante 24 horas a 28 °C en 2 ml de YEB o medio LB que contiene 25 y 50 µg/mL de carbenicilina y kanamicina, respectivamente. 10 µl de estos cultivos se usaron como inóculo de partida para generar cultivos de 25 ml de medio de inducción de YEB (medio YEB, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 10 mM, pH ajustado a 5.6, 25 mg/l de carbenicilina, 50 mg/l de kanamicina, acetosiringona 20 µM). Esto último se cultivó en incubadora de agitador rotatorio (220 rpm) a 28 °C, durante 18 horas o hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0.8 a 1.

10 Crecimiento de tabaco no-transgénico. Las plantas *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* se cultivaron a partir de semillas en un sustrato a base de turba (Agromix) en un invernadero. Las plántulas se plantaron inicialmente en un vivero y posteriormente fueron trasplantadas a macetas. Las plantas se regaron dos veces al día y recibir 180 ppm de nitrógeno en cada aplicación. Las condiciones de invernadero se mantuvieron a 25 °C, durante el día y 21 °C durante la noche, bajo un régimen de fotoperíodo de día largo (ciclos de 16 h luz/8 h oscuridad), con un rayo artificial de 20 vatios m⁻² a nivel de planta.

15 Expresión transitoria de rHA tobacco. El cultivo de *Agrobacterium* preparado como se describe anteriormente se centrifugó 8 min a 10 000 g, se resuspendió en el mismo volumen de medio de inoculación (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, ajustado a pH 5.6, y suplementado con acetosiringona 100 mM) y se mantuvo a temperatura ambiente (RT, 23 °C), durante 1 h antes de la inoculación. Alternativamente, la suspensión se puede mantener a 4 °C, durante 24 horas antes de la inoculación. La transformación transitoria de *N. benthamiana* y *N. tabacum* se realizó esencialmente como se describe en Liu and Lomonosoff (2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348), con las siguientes modificaciones. Para la expresión de rHA, se inoculó una mezcla de dos cepas de *Agrobacteria*. La primera cepa contenía uno de los clones descritos en la Tabla 1 y la segunda cepa contenía el supresor de HCPro de silenciamiento del virus de la patata y bajo el control del promotor 35S. Después de la inoculación, las plantas se incubaron en un invernadero. La temperatura se mantuvo a un mínimo de 23 °C, durante el día y 21 °C, durante la noche. Las plantas se regaron dos veces al día y recibieron 180 ppm de nitrógeno en cada aplicación. La cosecha de la biomasa se llevó a cabo después de 4-8 días.

Ejemplo 5: Demostración de la expresión de rHA en hojas de tabaco

Preparación de extractos de proteínas solubles a partir de hojas inoculadas. Se analizaron las hojas directamente después de la cosecha o después de la congelación de la biomasa a -80 °C. Una biomasa vegetal de hojas Agro-inoculadas de ~ 0,1 g fue ponderada y utilizada para el análisis de la expresión transitoria de rHA.

30 Uno de los dos métodos de extracción se utilizó para generar un extracto de proteína total: moliendo el tejido vegetal con un mortero y una mano de mortero, o pulverizando en un MixerMill300 (MM300) de Retsch. 0.1 g de la biomasa de la planta se transfirió a un mortero limpio y pre-enfriado. Se adicionaron 0.3 ml de solución reguladora de extracción en frío (Tris 50 mM, pH 7.4 que contiene NaCl 150 mM, 0.1% de Triton X-100, y 5% de glicerol), así como PMSF y quimostatina a concentraciones finales de 1 mM y 10 µM, respectivamente. Las hojas se molieron con un mortero hasta obtener una preparación homogénea. A continuación, el extracto de la planta se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 20,000 g, durante 20 min a 4 °C. Alternativamente, 0.1 g de tejido de la planta con 0.3 ml de solución reguladora de extracción se introdujo en un microtubo 1.5 no estéril. Una cuenta de tungsteno se adicionó a cada tubo. La caja fue sometida a un ciclo de agitación de 3 min a 30 Hz. El ciclo se repitió 2 veces. Los extractos de plantas se centrifugaron a continuación como se describió anteriormente.

40 Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio y se mantuvo en hielo. Finalmente, se midió el contenido de proteína total de los extractos de proteínas individuales por el método de Bradford utilizando BSA como la proteína de referencia.

45 Inmunodetección de rHA expresada transitoriamente en el material de la hoja de tabaco. Los extractos de proteína de hoja de tabaco Agro-inoculada, se prepararon como se describe anteriormente. Los siguientes 3 controles también se prepararon: 1) 1 ng de rHA pura (rHA recombinante producida por células CHO, Protein Sciences Corporation, Catalog # 3006) a la cual se le adicionó 1 µg de BSA (Pierce), 2) 2-10 µg de extracto de proteína de tabaco obtenido de una biomasa Agro-inoculada con agrobacterias transformadas con un plásmido pCAMBIA vacío, y 3) 1 ng de rHA pura se sembró a 2-10 µg del extracto de proteína de la muestra # 2.

50 Por lo general, 2-10 µg del extracto de proteína de cada biomasa (transformada con una de las 8 construcciones de ADN diferentes, véase la Tabla 1) se cargó en SDS-PAGE para el análisis Western blot. Las muestras se hirvieron, durante 5 min a 100 °C, antes de cargarlas en la SDS-PAGE desnaturalizada (concentración 6% de acrilamida; separación 10% de acrilamida, solución reguladora Tris-glicina) como se ha descrito esencialmente por Thomas (1975, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72:2626-2630). La electroforesis se realizó a 110 voltios durante 90 min utilizando un aparato Mini Protean III (BioRad). A continuación, las proteínas separadas se transfirieron sobre una membrana de PVDF en un Tris 25mM, Glicina 192 mM, metanol al 10% (v/v) solución reguladora pH 8.3 a 100 V durante 30 min o 60 min, cuando se utiliza un Criterion equipo de transferencia o una Mini-trans blot Unit (BioRad), respectivamente.

La inmunodetección de rHA se logró con los siguientes anticuerpos. Un anticuerpo monoclonal de ratón para el virus de gripe A (Fitzgerald Industries International Inc. Catalog # 10- I50) se utilizó como el anticuerpo primario a 1/1,000. El anticuerpo secundario fue una peroxidasa conjugada de IgG anti-ratón de cabra (H + L) (Jackson ImmunoResearch #111-035-146) utilizada a 1/10,000. La actividad de peroxidasa se detectó utilizando sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP (Millipore, catálogo # WBRL50100) o sustrato de transferencia quimioluminiscente BM (POD) (Roche, catálogo # 11500 694 001).

El método de inmunodetección se optimizó para obtener una señal específica contra cada rHA, sin reactividad cruzada con proteínas de plantas endógenas. El límite de detección fue bajo; lo que permitió la detección de las proteínas expresadas en niveles tan bajos como > 0.004% (1 ng en 25 µg de extracto) de las proteínas solubles totales (TSP).

Como se muestra en la figura 8, se expresó rHA en cada condición probada y en ambas especies de tabaco. El uso de condiciones no reductoras permitió la detección de las diferentes formas oligoméricas de hemaglutinina: monómeros, dímeros y trímeros. Con la disminución de cantidades de proteína cargada en el gel, como se ejemplifica en la figura 9, se resuelven las formas oligoméricas de rHA. Estas últimas son las mismas para cada construcción probada y en ambas especies de tabaco: las señales de inmunodetección se observan en el nivel del trímero y del monómero. También se observa una tercera banda inmunoreactiva, que migra entre el peso molecular esperado del dímero y el del trímero.

La sustitución del dominio de transmembrana por los diferentes péptidos helicoidales en espiral triméricos permitió la expresión de rHA con los niveles de expresión iguales o mayores que la forma transmembrana de rHA. Esto es especialmente cierto para la fusión con GCN4-pII. La fusión de rHA con el PRD permite la expresión en los niveles más bajos en comparación con la fusión GCN4-pII. Los niveles de expresión de la fusión GCN4-pII-rHA es de, al menos, 0.01% de TSP (> 1 ng de rHA en 10 mg de TSP). La acumulación de fusiones de rHA parece más alta en *N. benthamiana* en comparación con *N. tabacum*. Finalmente, la retención de rHA en el ER, para cada construcción probada, aumentan significativamente los niveles de expresión de rHA. Esta tendencia se ha observado para muchas otras proteínas. El espacio subcelular del ER, generalmente se reconoce por su baja actividad proteolítica en comparación con otros compartimentos, tales como el apoplasto, lo que resulta en una mayor acumulación de proteínas recombinantes.

Los mismos extractos de proteínas se analizaron en condiciones reductoras y se inmunodetectaron como se describió anteriormente para investigar si la cadena de HA₀ es proteolisada en la forma de dos cadenas de rHA, i.e., HA1 y HA2. Los pesos moleculares esperados de los últimos son 47 y 28 kDa, respectivamente. Se muestra en la figura 10 que el HA₀ no se convierte fácilmente en una forma de dos cadenas. Vale la pena notar que la proteólisis o recorte de rHA parece ser mayor en los extractos de *N. tabacum*.

Ejemplo 6: Demostración de ensamblaje trimérico de rHA

Prueba de hemaglutinación. El ensayo de hemaglutinación se realizó esencialmente como se describe por Nayak et al. (2004, J. Virol Methods, 122:9-15), con las siguientes modificaciones. Los extractos se prepararon mediante homogeneización de tejido en Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 0.1% de Triton X-100, y que contiene PMSV 1 mM y quimostatina 10 µM como inhibidores de proteasa. Las fracciones solubles se diluyeron a 0.2 mg/ml en PBS. Las diluciones dobles seriadas de las muestras (100 µl) se realizaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondo que contienen 100 µL de PBS. Se adicionaron a cada pocillo 100 µl de glóbulos rojos de pollo (2x10⁷ rbc/ml) (Innovative Research, South Field, MI, USA). A continuación, la placa se incubó de 60-120 min a temperatura ambiente. El ensayo incluye los siguientes controles positivos: rHA de PSC, varió de 1 µg a 7.8 pg, se diluyó en PBS o se enriqueció en extracto no transformado. También se realizó un control negativo utilizando extracto no transformado.

El ensayo de hemaglutinación se utilizó para demostrar el ensamblaje trimérico de rHA fusionada a los péptidos en espiral enrollados: Esa prueba, aunque muy simple, se utiliza de forma rutinaria para cuantificar el título de gripe. El principio del ensayo es: la bobina libre de glóbulos rojos rodará en el fondo del pozo del ELISA, formando una pila celular de los glóbulos rojos que se pueden detectar fácilmente. Si se produce la hemaglutinación, los glóbulos sanguíneos formarán una matriz por lo que el glóbulo sanguíneo no puede rodar en el fondo del pozo del ELISA y ningún punto puede ser visto. La figura 11 muestra que la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo se puede realizar directamente en rHA expresada en un extracto de planta. Más sobre la hemaglutinación puede ocurrir con un extracto de planta que expresa la rHA fusionada a GCN4-pII. Dado que el monómero rHA es incapaz de someterse a la hemaglutinación de glóbulos rojos, en este resultado en última instancia demuestra que la rHA quimérica se ensambla a sí mismo como un trímero en la planta.

La Tabla 2 resume las secuencias que figuran en la presente solicitud.

Tabla 2: Descripción de la Secuencia de identificadores de secuencia.

ES 2 545 607 T3

SEQ ID NO:	Descripción de la Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos del péptido GCN4-pII
2	Repetición del péptido del péptido PRD de gamma- γ -zeína de maíz
3	Enlazador del tetrapéptido
4	Señal de retención en ER SEKDEL
5	Señal de retención en ER HDEL
6	Secuencia de aminoácido del péptido señal PDI de la alfalfa
7	Secuencia de nucleótidos del péptido señal PDI de la alfalfa
8	Secuencia de aminoácidos de HA madura
9	rHA de longitud completa, incluyendo el dominio transmembrana, con el péptido señal de HA sustituido por el péptido señal PDI
10	SEQ ID NO: 9, con el dominio transmembrana y la cola citoplásmica, reemplazados por la señal de retención SEKDEL
11	SEQ ID NO: 9, con el dominio transmembrana y la cola citoplásmica, reemplazados por la señal de retención HDEL;
12	SEQ ID NO: 9, sin el dominio transmembrana y la cola citoplásmica
13	SEQ ID NO: 9, con el dominio transmembrana y la cola citoplásmica, reemplazados por el péptido GCN4-pII
14	SEQ ID NO: 13, con la señal de retención SEKDEL en el terminal C
15	SEQ ID NO: 9, con el dominio transmembrana y la cola citoplásmica, reemplazados por el dominio PRD
16	SEQ ID NO: 15, con la señal de retención SEKDEL, en el terminal C
17	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen HA ₀
18	la secuencia de nucleótidos del dominio transmembrana y el fragmento del gen de la cola citoplásmica
19	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen SEKDEL retenido en ER.
20	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen HDEL retenido en ER
21	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen GCN4-pII
22	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen GCN4-pII retenido en ER
23	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen PRD
24	la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen PRD retenido en ER

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medicago Inc. COUTURE, Manon VEZINA, Louis-Philippe DARGIS, Michele LANDRY, Nathalie

<120> ANTÍGENOS DE LA GRIPE RECOMBINANTES SOLUBLES

5 <130> V81901WO

<150> 61/078,963

<151> 2008-07-08

<160> 24

<170> PatentIn version 3.4

5 <210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos del péptido GCN4-pII

<400> 1

Leu Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
 1 5 10 15

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
 20 25 30

Ala Ala

<210> 2

<211> 6

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Repeticiones del péptido PPPVHL

<400> 2

20

Pro Pro Pro Val His Leu
 1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Enlazador tetrapéptido

<400> 3

ES 2 545 607 T3

Gly Gly Ala Gly
1

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> señal de retención SEKDEL

<400> 4

Ser Glu Lys Asp Glu Leu
1 5

10 <210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> señal de retención HDEL

<400> 5

His Asp Glu Leu
1

<210> 6

<211> 24

20 <212> PRT

<213> Medicago sativa

<400> 6

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

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala
20

<210> 7

25 <211> 72

<212> ADN

<213> Medicago sativa

ES 2 545 607 T3

<400> 7

atggcgaaaa acgttgcgat ttccggttta ttgtttctc ttcttctgtt ggttcctct 60

cagatcttcg ct 72

<210> 8

<211> 565

5 <212> PRT

<213> Virus de la gripe

<400> 8

ES 2 545 607 T3

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr
195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala
260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met
275 280 285

Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
290 295 300

ES 2 545 607 T3

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320
 Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335
 Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350
 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365
 His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
 370 375 380
 Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400
 Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415
 Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430
 Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 435 440 445
 Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460
 Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480
 Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495
 Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510
 Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln
 515 520 525
 Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540
 Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560
 Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 9

<211> 572

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA de longitud total con péptido señal PDI y dominio transmembrana y cola citoplasmática

<400> 9

ES 2 545 607 T3

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

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
20 25 30

Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
35 40 45

Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
50 55 60

Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
65 70 75 80

Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
85 90 95

Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
100 105 110

Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
115 120 125

Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
130 135 140

Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
145 150 155 160

His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
165 170 175

Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
180 185 190

Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
195 200 205

Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
210 215 220

Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
225 230 235 240

Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
245 250 255

Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
260 265 270

Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
275 280 285

Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
290 295 300

ES 2 545 607 T3

Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
 305 310 315 320
 Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
 325 330 335
 Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
 340 345 350
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
 355 360 365
 Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
 385 390 395 400
 Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
 405 410 415
 Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
 420 425 430
 Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
 435 440 445
 Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
 450 455 460
 Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480
 Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495
 Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510
 Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525
 Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala
 530 535 540
 Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met
 545 550 555 560
 Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565 570

<210> 10

<211> 540

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA retenida en ER, utilizando señal de retención SEKDEL

<400> 10

ES 2 545 607 T3

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
20 25 30
Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
35 40 45
Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
50 55 60
Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
65 70 75 80
Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
85 90 95
Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
100 105 110
Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
115 120 125
Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
130 135 140
Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
145 150 155 160
His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
165 170 175
Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
180 185 190
Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
195 200 205
Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
210 215 220
Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
225 230 235 240
Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
245 250 255
Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
260 265 270
Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
275 280 285
Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
290 295 300
Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
305 310 315 320

ES 2 545 607 T3

Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
 325 330 335

Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
 340 345 350

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
 355 360 365

Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
 370 375 380

Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
 385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
 405 410 415

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
 420 425 430

Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
 435 440 445

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
 450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480

Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495

Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510

Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525

Glu Ser Met Gly Val Tyr Ser Glu Lys Asp Glu Leu
 530 535 540

<210> 11

<211> 538

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA retenida en ER, utilizando señal de retención HDEL

<400> 11

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

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30

Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45

ES 2 545 607 T3

Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
 85 90 95
 Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125
 Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 130 135 140
 Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
 145 150 155 160
 His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
 165 170 175
 Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
 180 185 190
 Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
 195 200 205
 Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
 210 215 220
 Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
 225 230 235 240
 Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
 245 250 255
 Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
 260 265 270
 Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
 275 280 285
 Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
 290 295 300
 Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
 305 310 315 320
 Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
 325 330 335
 Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
 340 345 350
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
 355 360 365

ES 2 545 607 T3

Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
 370 375 380

Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
 385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
 405 410 415

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
 420 425 430

Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
 435 440 445

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
 450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480

Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495

Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510

Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525

Glu Ser Met Gly Val Tyr His Asp Glu Leu
 530 535

<210> 12

<211> 534

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA soluble sin dominio transmembrana

<400> 12

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

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30

Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45

Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
 50 55 60

Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
 65 70 75 80

Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
 85 90 95

ES 2 545 607 T3

Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125
 Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 130 135 140
 Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
 145 150 155 160
 His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
 165 170 175
 Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
 180 185 190
 Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
 195 200 205
 Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
 210 215 220
 Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
 225 230 235 240
 Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
 245 250 255
 Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
 260 265 270
 Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
 275 280 285
 Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
 290 295 300
 Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
 305 310 315 320
 Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
 325 330 335
 Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
 340 345 350
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
 355 360 365
 Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
 385 390 395 400
 Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
 405 410 415

ES 2 545 607 T3

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
420 425 430
Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
435 440 445
Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
450 455 460
Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
465 470 475 480
Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
485 490 495
Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
500 505 510
Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
515 520 525
Glu Ser Met Gly Val Tyr
530

<210> 13

<211> 568

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA trimérica soluble, utilizando péptido trimérico GCN4-pII

<400> 13

ES 2 545 607 T3

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30
 Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45
 Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
 85 90 95
 Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125
 Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 130 135 140

ES 2 545 607 T3

Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
145 150 155 160

His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
165 170 175

Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
180 185 190

Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
195 200 205

Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
210 215 220

Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
225 230 235 240

Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
245 250 255

Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
260 265 270

Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
275 280 285

Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
290 295 300

Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
305 310 315 320

Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
325 330 335

Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
340 345 350

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
355 360 365

Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
370 375 380

Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
405 410 415

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
420 425 430

Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
435 440 445

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
450 455 460

ES 2 545 607 T3

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480
 Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495
 Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510
 Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525
 Glu Ser Met Gly Val Tyr Leu Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu
 530 535 540
 Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys
 545 550 555 560
 Lys Leu Ile Gly Glu Ser Ala Ala
 565

<210> 14

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA trimérica soluble, utilizando péptido trimérico GCN4-pII y retenida en el ER

<400> 14

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30
 Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45
 Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
 85 90 95
 Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125
 Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 130 135 140

ES 2 545 607 T3

Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
145 150 155 160

His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
165 170 175

Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
180 185 190

Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
195 200 205

Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
210 215 220

Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
225 230 235 240

Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
245 250 255

Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
260 265 270

Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
275 280 285

Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
290 295 300

Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
305 310 315 320

Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
325 330 335

Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
340 345 350

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
355 360 365

Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
370 375 380

Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
405 410 415

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
420 425 430

Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
435 440 445

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
450 455 460

ES 2 545 607 T3

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480
 Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495
 Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510
 Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525
 Glu Ser Met Gly Val Tyr Leu Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu
 530 535 540
 Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys
 545 550 555 560
 Lys Leu Ile Gly Glu Ser Ala Ala Ser Glu Asp Lys Glu Leu
 565 570

<210> 15

<211> 593

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA trimérica soluble, utilizando el péptido trimérico PRD

<400> 15

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30
 Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45
 Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
 85 90 95
 Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125
 Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 130 135 140
 Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
 145 150 155 160

ES 2 545 607 T3

His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
 165 170 175

Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
 180 185 190

Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
 195 200 205

Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
 210 215 220

Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
 225 230 235 240

Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
 245 250 255

Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
 260 265 270

Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
 275 280 285

Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
 290 295 300

Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
 305 310 315 320

Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
 325 330 335

Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
 340 345 350

Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
 355 360 365

Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
 370 375 380

Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
 385 390 395 400

Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
 405 410 415

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
 420 425 430

Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
 435 440 445

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
 450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480

ES 2 545 607 T3

Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495
 Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510
 Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525
 Glu Ser Met Gly Val Tyr Gly Gly Ala Gly Pro Pro Pro Pro Val His
 530 535 540
 Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro
 545 550 555 560
 Val His Leu Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro
 565 570 575
 Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Ser Ala
 580 585 590
 Ala

<210> 16

<211> 599

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> rHA trimérica soluble, utilizando péptido trimérico RDP y retenida en ER

<400> 16

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30
 Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45
 Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser
 85 90 95
 Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125

ES 2 545 607 T3

Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
 130 135 140
 Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser
 145 150 155 160
 His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly
 165 170 175
 Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys
 180 185 190
 Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile
 195 200 205
 Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val
 210 215 220
 Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg
 225 230 235 240
 Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu
 245 250 255
 Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile
 260 265 270
 Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile
 275 280 285
 Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr
 290 295 300
 Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro
 305 310 315 320
 Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg
 325 330 335
 Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu
 340 345 350
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val
 355 360 365
 Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn
 385 390 395 400
 Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val
 405 410 415
 Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys
 420 425 430
 Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu
 435 440 445

ES 2 545 607 T3

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn
 450 455 460

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala
 465 470 475 480

Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn
 485 490 495

Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr
 500 505 510

Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu
 515 520 525

Glu Ser Met Gly Val Tyr Gly Gly Ala Gly Pro Pro Pro Pro Val His
 530 535 540

Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro
 545 550 555 560

Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro
 565 570 575

Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Ser Ala
 580 585 590

Ala Ser Glu Lys Asp Glu Leu
 595

<210> 17

<211> 1623

<212> ADN

5 <213> Virus de la gripe

<400> 17

```

gggccoatgg cgaaaaacgt tgcgattttc ggtttattgt tttctcttct tctgttggtt      60
ccttctcaga tcttcgctga cacaatatgt ataggctacc atgccaacaa ctcaaccgac      120
actgttgaca cagtacttga gaagaatgtg acagtgacac actctgtcaa cctacttgag      180
gacagtcaca atggaaaact atgtctacta aaaggaatag cccactaca attgggtaat      240
tgcagcgttg cgggatggat ctaggaaac ccagaatgcg aattactgat ttccaaggaa      300
tcatggtcct acattgtaga aacaacaaat cctgagaatg gaacatgta cccaggggat      360
ttcgccgact atgaggaact gagggagcaa ttgagtccag tatcttcatt tgagagatte      420
gaaatattcc ccaaagaaag ctcatggccc aaccacaccg taaccggagt atcagcatca      480
tgctcccata atgggaaaag cagtttttac agaaatttgc tatggctgac gggaagaat      540
ggtttgtacc caaacctgag caagtctat gtaaacaaca aagagaaaga agtctctgta      600
ctatggggtg ttcacacccc gctaacata ggaacacaaa gggcaactta tcatacagaa      660
aatgcttatg tctctgtagt gtcttcacat tatagcagaa gattcacccc agaaatagcc      720
  
```

ES 2 545 607 T3

```

aaaagaccca aagtaagaga tcaggaagga agaatcaact actactggac tctgctggaa 780
cctggggata caataatatt tgaggcaaat gaaatctaa tagcgccatg gtatgctttt 840
gcaactgagta gaggctttgg atcaggaatc atcacctcaa atgcaccaat ggatgaatgt 900
gatgccaagt gtcaaacacc tcagggagct ataaacagca gtcttccttt ccagaatgta 960
cacccagtea caataggaga gtgtccaaag tatgtcagga gtgcaaaatt aaggatggtt 1020
acaggactaa ggaacatccc atccattcaa tccagaggtt tgtttggagc cattgccggt 1080
ttcattgaag ggggtggac tggaatggta gatgggtggt atggttatca tcatcagaat 1140
gagcaaggat ctggctatgc tgcagatcaa aaaagtacac aaaatgccat taacgggatt 1200
acaaacaagg tcaattctgt aattgagaaa atgaacactc aattcacagc tgtgggcaaa 1260
gagttcaaca aattggaaag aaggatggaa aacttaaata aaaaagtga tgatgggttt 1320
ctagacattt ggacatataa tgcagaattg ttggttctac tggaaaatga aaggactttg 1380
gatttccatg actccaatgt gaagaatctg tatgagaaag taaaagcca attaaagaat 1440
aatgccaaag aaataggaaa cgggtgtttt gagttctatc acaagtgtaa caatgaatgc 1500
atggagagtg tgaaaaatgg tacctatgac tatccaaaat attccgaaga atcaaagtta 1560
aacagggaga aaattgatgg agtgaaattg gaatcaatgg gagtatacta agagctcagg 1620
cct 1623

```

<210> 18

<211> 219

<212> ADN

5 <213> Virus de la gripe

<400> 18

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagga gaaaattgat 60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac cagattctgg cgatctactc aactgtcgcc 120
agttccctgg ttcttttggg ctccctgggg gcaatcagct tctggatgtg ttccaatggg 180
tctttgcagt gtagaatatg catctaagag ctccaggcct 219

```

<210> 19

<211> 123

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento del gen SEKDEL retenido en ER

<400> 19

ES 2 545 607 T3

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagggg gaaaattgat 60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac tctgagaagg atgaacttta agagctcagg 120

cct 123

```

<210> 20

<211> 117

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> fragmento del gen HDEL retenido en ER

<400> 20

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagggg gaaaattgat 60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac cactgatgaac ttaagagct caggcct 117

```

10 <210> 21

<211> 207

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> fragmento del gen GCN4-pII

<400> 21

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagggg gaaaattgat 60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac ctcaaacaaa tgaagacaa gatcgaagag 120
atcctctcga aaatctacca catcgaaaac gagattgccg ggatcaagaa gctcataggg 180
gagtcagcag cctaagagct caggcct 207

```

<210> 22

<211> 225

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento del gen GCN4-pII retenido en ER

<400> 22

ES 2 545 607 T3

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagggg gaaaattgat      60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac ctcaaacaaa tcgaagacaa gatcgaagag    120
atcctctcga aaatctacca catcgaaaac gagattgccg ggatcaagaa gctcataggg    180
gagtcagcag cctctgagaa ggatgaactt taagagctca ggcct                      225

```

<210> 23

<211> 279

<212> ADN

5 <213> Zeína de maíz

<400> 23

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagggg gaaaattgat      60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac ggaggcgcctg gccaccgcc agttcatcta    120
ccgcctccgg tgcattctgcc acctccgggtt cacctgccac ctccggtgca tctcccaccg    180
ccagtcacac tgcgcctccc ggtccacctg ccaccgcctg tccatgtgcc gccaccggtt    240
catctgccgc ctccatcagc agcctaagag ctcaggcct                              279

```

<210> 24

<211> 297

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento del gen retenido en ER

<400> 24

```

ggtacctatg actatccaaa atattccgaa gaatcaaagt taaacagggg gaaaattgat      60
ggagtgaaat tggaatcaat gggagtatac ggaggcgcctg gccaccgcc agttcatcta    120
ccgcctccgg tgcattctgcc acctccgggtt cacctgccac ctccggtgca tctcccaccg    180
ccagtcacac tgcgcctccc ggtccacctg ccaccgcctg tccatgtgcc gccaccggtt    240
catctgccgc ctccatcagc agcctctgag aaggatgaac ttttaagagct caggcct      297

```

15

REIVINDICACIONES

1. Una hemaglutinina recombinante (rHA), que comprende:
 - a) un dominio de hemaglutinina seleccionado del grupo que consiste de los subtipos de hemaglutinina H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, y H16; y
 - 5 b) un dominio de oligomerización seleccionado del grupo que consiste en un péptido GCN4-pII y un dominio rico en prolina (PRD) de γ -zeína de maíz, en donde los residuos de aminoácidos se adicionan al extremo del terminal C del dominio de oligomerización de tal manera que el dominio de oligomerización no termina en una hélice α ;
 - c) péptido señal
 - d) una señal de retención en el retículo endoplásmico (ER), y
- 10 en donde la rHA se produce como un homotrímero soluble quimérico.
2. La rHA de la reivindicación 1, en donde los residuos de aminoácidos adicionados son Ser-Ala-Ala.
3. La rHA de la reivindicación 1 o 2, en donde la señal de retención en el ER es SEKDEL o HDEL.
4. La rHA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el PRD tiene 4, 6 u 8 repeticiones de péptidos.
5. La rHA de la reivindicación 1, en donde el péptido señal es un péptido señal de la proteína disulfuro isomerasa (PDI).
- 15 6. Una secuencia de nucleótidos que codifica la rHA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que expresa la rHA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Una célula huésped transformada con el ácido nucleico de la reivindicación 6.
- 20 10. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 7.
11. Un método para producir rHA, que comprende proporcionar una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6, y la expresión de la rHA en la célula huésped.
12. Un método de expresión de rHA dentro de una planta que comprende introducir un vector de la reivindicación 7 en la planta y la expresión de la rHA.
- 25 13. El método de la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico se introduce en la planta de una manera transitoria o el ácido nucleico se introduce en la planta de modo que sea estable.
14. Un método para producir una hemaglutinina recombinante (rHA) en una planta que comprende:
 - a) introducir una secuencia de ácido nucleico en la planta, o parte del mismo, la secuencia de ácido nucleico que comprende una región reguladora unida operativamente al ácido nucleico de la reivindicación 6 y
 - 30 b) cultivar la planta transgénica, produciendo de este modo la rHA.
15. El método de la reivindicación 14, en donde en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se introduce en la planta de una manera transitoria o el ácido nucleico se introduce en la planta de modo que sea estable.

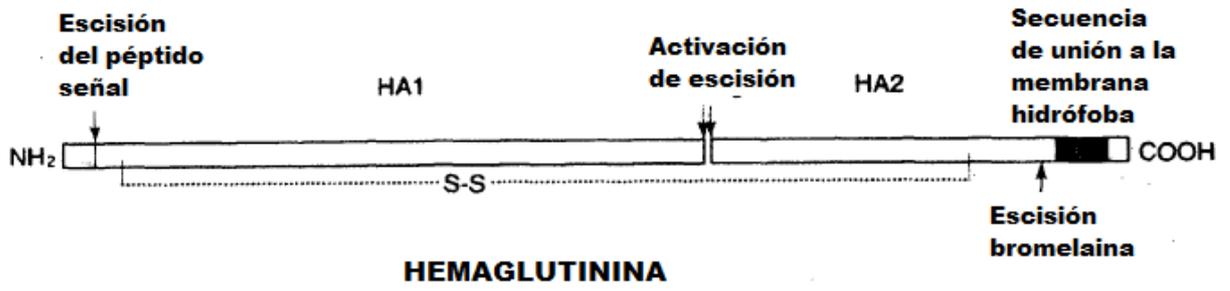


Fig. 1

LKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESAA (SEQ ID NO :1)

Fig. 2

```
1      M  A  K  N  V  A  I  F  G  L  L  F  S  L
1      5' -ATG GCG AAA AAC GTT GCG ATT TTC GGT TTA TTG TTT TCT CTT

15     L  V  L  V  P  S  Q  I  F  A           SEQ ID NO:6
43     CTT CTG TTG GTT CCT TCT CAG ATC TTC GCT -3'  SEQ ID NO:7
```

Fig. 3

1 MKAKLLVLLC TPTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLCI
 61 LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVETP NPENGTCTYPG YFADYEELRE
 121 QLSSVSSFER FEIFPKESW PNHTVTGUSA SCSHNGKSSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS
 181 YVNNKEKEVL VLWGVHHPN IGNQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE
 241 GRINYWTLL EPGDTIIFEA NGNLIAPWYA FALSRRGFGSG IITSNAPMDE CDAKCQTPQG
 301 AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VTGLRNIPSI QSRGLFGAIA GFIEGGWTGM
 361 VDGWYGYHHQ NEQGSYAAD QKSTQNAING ITNKVNSVIE KMNTQFTAVG KEFNKLERRM
 421 ENLNKKVDDG FLDIWTYNAE LLVLENERI LDFHDSNVKN LYEKVKSQK NNAKEIGNC
 481 FEFYHKCNE CMESVKNQTY DYPKYSEESK LNREKIDGVK LESMGVYQIL AIYSTWASSI
 541 VLLVSLGAIS FWMCSNGSIQ CRICI SEQ ID NO:8

Fig. 4

-7 *MAKNVAIFGL LFSLLVLVPS QIFADTICIG YHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHN*
 54 *GKLCCLKGIA PLQLGNCSVA GWILGNPECE LLISKESWSY IVETPNPENG TCYPGYFADY*
 114 *EELREQLSSV SSFERFEIFP KESSWPNHTV TGVSASC SHN GKSSFYRNLL WLTGKNGLYP*
 174 *NLSKSYVNNK EKEVLVLWGV HHPNIGNQR ALYHTENAYV SVVSSHYSRR FTPEIAKRPK*
 234 *VRDQEGRINY YWTLLEPGDT IIFEANGNLI APWYAFALSR GFGSGIITSN APMDECDAC*
 294 *QTPQGAINSS LPFQNVHPVT IGECPKYVRS AKLRMVTGLR NIPSIQSRGL FGAIAGFIEG*
 354 *GWTGMVDGWY GYHHQNEQGS GYAADQKSTQ NAINGITNKV NSVIEKMNTQ FTAVGKEFNK*
 414 *LERRMENLNK KVDDGFLDIW TYNAELLVLL ENERTLDFHD SNVKNLYEKV KSQKNNAKE*
 474 *IGNGCFEFYH KCNNECMESV KNGTYDYPKY SEESKLNREK IDGVKLESMG VY~~HDEI~~**
 SEQ ID NO:11

Fig. 5C

-7 *MAKNVAIFGL LFSLLVLVPS QIFADTICIG YHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHN*
 54 *GKLCCLKGIA PLQLGNCSVA GWILGNPECE LLISKESWSY IVETPNPENG TCYPGYFADY*
 114 *EELREQLSSV SSFERFEIFP KESSWPNHTV TGVSASC SHN GKSSFYRNLL WLTGKNGLYP*
 174 *NLSKSYVNNK EKEVLVLWGV HHPNIGNQR ALYHTENAYV SVVSSHYSRR FTPEIAKRPK*
 234 *VRDQEGRINY YWTLLEPGDT IIFEANGNLI APWYAFALSR GFGSGIITSN APMDECDAC*
 294 *QTPQGAINSS LPFQNVHPVT IGECPKYVRS AKLRMVTGLR NIPSIQSRGL FGAIAGFIEG*
 354 *GWTGMVDGWY GYHHQNEQGS GYAADQKSTQ NAINGITNKV NSVIEKMNTQ FTAVGKEFNK*
 414 *LERRMENLNK KVDDGFLDIW TYNAELLVLL ENERTLDFHD SNVKNLYEKV KSQKNNAKE*
 474 *IGNGCFEFYH KCNNECMESV KNGTYDYPKY SEESKLNREK IDGVKLESMG VY**
 SEQ ID NO:12

Fig. 5D

-7 MAKNVAIFGL LFSLLVLVPS QIFADTICIG YHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHN
54 GKLCLLKGIA PLQLGNCSVA GWILGNPECE LLISKESWSY IVETPNPENG TCYPGYFADY
114 EELREQLSSV SSFERFEIFP KESSWPNHTV TGVSASC SHN GKSSFYRNLL WLTGKNGLYP
174 NLSKSYVNNK EKEVLVLWGV HHPPNIGNQR ALYHTENAYV SVVSSHYSRR FTPEIAKRPK
234 VRDQEGRINY YWTLLEPGDT IIFEANGNLI APWYAFALSR GFGSGIITSN APMDECDAC
294 QTPQGAINSS LPFQNVHPVT IGECPKYVRS AKLRMVTGLR NIPSIQSRGL FGAIAGFIEG
354 GWTGMVDGWY GYHHQNEQGS GYAADQKSTQ NAINGITNKV NSVIEKMNTQ FTAVGKEFNK
414 LERRMENLNK KVDDGFLDIW TYN AELLVLL ENERTLDFHD SNVKNLYEKV KSQLKNNAKE
474 IGNCGFEFYH KCNNECMESV KNGTYDYPKY SEESKLNREK IDGVKLESMG VYLKQTEDK
527 EEELSKIVYHI ENEIARIKKL IGESAR* SEQ ID NO:13

Fig. 5E

-7 MAKNVAIFGL LFSLLVLVPS QIFADTICIG YHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHN
54 GKLCLLKGIA PLQLGNCSVA GWILGNPECE LLISKESWSY IVETPNPENG TCYPGYFADY
114 EELREQLSSV SSFERFEIFP KESSWPNHTV TGVSASC SHN GKSSFYRNLL WLTGKNGLYP
174 NLSKSYVNNK EKEVLVLWGV HHPPNIGNQR ALYHTENAYV SVVSSHYSRR FTPEIAKRPK
234 VRDQEGRINY YWTLLEPGDT IIFEANGNLI APWYAFALSR GFGSGIITSN APMDECDAC
294 QTPQGAINSS LPFQNVHPVT IGECPKYVRS AKLRMVTGLR NIPSIQSRGL FGAIAGFIEG
354 GWTGMVDGWY GYHHQNEQGS GYAADQKSTQ NAINGITNKV NSVIEKMNTQ FTAVGKEFNK
414 LERRMENLNK KVDDGFLDIW TYN AELLVLL ENERTLDFHD SNVKNLYEKV KSQLKNNAKE
474 IGNCGFEFYH KCNNECMESV KNGTYDYPKY SEESKLNREK IDGVKLESMG VYLKQTEDK
527 EEELSKIVYHI ENEIARIKKL IGESAR SEDK EL* SEQ ID NO:14

Fig. 5F

-7 *MAKNVAIFGL LFSLLVLVPS QIFADTICIG YHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHN*
 54 *GKLCLLKZIA PLQLGNCSVA GWILGNPECE LLISKESWSY IVETPNPENG TCYPGYFADY*
 114 *EELREQLSSV SSFERFEIIFP KESSWPNH TV TGVSASCSHN GKSSFYRNL L WLTGKNGLYP*
 174 *NLSKSYVNNK EKEVLVLWGV HHPNIGNQR ALYHTENAYV SVVSSHYSRR FTPEIAKRPK*
 234 *VRDQEGRINY YWTLEPGDT IIFEANGNLI APWYAFALSR GFGSGIITSN APMDECDAC*
 294 *QTPQGAINSS LPFQNVHPVT IGECPKYVRS AKLRMVTGLR NIPSIQSRGL FGAIAGFIEG*
 354 *GWTGMVDGWY GYHHQNEQGS GYAADQKSTQ NAINGITNKV NSVIEKMNTQ FTAVGKEFNK*
 414 *LERRMENLNK KVDDGFLDIW TYNAELLVLL ENERTLDFHD SNVKNLYEKV KSQKNNAKE*
 474 *IGNGCFEFYH KCNNECMESV KNGTYDYPKY SEESKLNREK IDGVKLESMG VYGGAGPPPE*
 527 ~~*VHLPPVHLP PPVHLPPVH LPPVHLPPP VHLPPVHLP PPVHLPPPSA A**~~

SEQ ID NO:15

Fig. 5G

-7 *MAKNVAIFGL LFSLLVLVPS QIFADTICIG YHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHN*
 54 *GKLCLLKZIA PLQLGNCSVA GWILGNPECE LLISKESWSY IVETPNPENG TCYPGYFADY*
 114 *EELREQLSSV SSFERFEIIFP KESSWPNH TV TGVSASCSHN GKSSFYRNL L WLTGKNGLYP*
 174 *NLSKSYVNNK EKEVLVLWGV HHPNIGNQR ALYHTENAYV SVVSSHYSRR FTPEIAKRPK*
 234 *VRDQEGRINY YWTLEPGDT IIFEANGNLI APWYAFALSR GFGSGIITSN APMDECDAC*
 294 *QTPQGAINSS LPFQNVHPVT IGECPKYVRS AKLRMVTGLR NIPSIQSRGL FGAIAGFIEG*
 354 *GWTGMVDGWY GYHHQNEQGS GYAADQKSTQ NAINGITNKV NSVIEKMNTQ FTAVGKEFNK*
 414 *LERRMENLNK KVDDGFLDIW TYNAELLVLL ENERTLDFHD SNVKNLYEKV KSQKNNAKE*
 474 *IGNGCFEFYH KCNNECMESV KNGTYDYPKY SEESKLNREK IDGVKLESMG VYGGAGPPPE*
 527 ~~*VHLPPVHLP PPVHLPPVH LPPVHLPPP VHLPPVHLP PPVHLPPPSA A*~~ *SEKDEL**

SEQ ID NO:16

Fig. 5H

ES 2 545 607 T3

1 gggcccATGG CGAAAAACGT TGCGATTTTC GGTTTATTGT TTTCTCTTCT TCTGTTGGTT
61 CCTTCTCAGA TCTTCGCTGA CACAATATGT ATAGGCTACC ATGCCAACAA CTC AACCGAC
121 ACTGTTGACA CAGTACTTGA GAAGAAATGTG ACAGTGACAC ACTCTGTCAA CCTACTTGAG
181 GACAGTCACA ATGGAAAAC TGTGCTACTA AAAGGAATAG CCCCACTACA ATTGGGTAAT
241 TGCAGCGTTG CCGGATGGAT CTTAGGAAAC CCAGAAIGCG AATTACTGAT TTCCAAGGAA
301 TCATGGTCCT ACATTGTAGA AACACCAAAT CCTGAGAATG GAACATGTTA CCCAGGGTAT
361 TTCGCCGACT ATGAGGAACT GAGGGAGCAA TTGAGTTCAG TATCTTCATT TGAGAGATTC
421 GAAATATTCC CCAAAGAAAG CTCATGGCCC AACCACACCG TAACCGGAGT ATCAGCATCA
481 TGCTCCATA ATGGGAAAAG CAGTTTTTAC AGAAATTTGC TATGGCTGAC GGGGAAGAAT
541 GGTTTGTACC CAAACCTGAG CAAGTCCTAT GTAAACAACA AAGAGAAAGA AGTCCTTGTA
601 CTATGGGGTG TTCATCACCC GCCTAACATA GGGAACCAAA GGGCACTCTA TCATACAGAA
661 AATGCTTATG TCTCTGTAGT GTCTTCACAT TATAGCAGAA GATTCACCCC AGAAATAGCC
721 AAAAGACCCA AAGTAAGAGA TCAGGAAGGA AGAATCAACT ACTACTGGAC TCTGCTGGAA
781 CCTGGGGATA CAATAATATT TGAGGCAAAT GGAAATCTAA TAGCGCCATG GTATGCTTTT
841 GCACTGAGTA GAGGCTTTGG ATCAGGAATC ATCACCTCAA ATGCACCAAT GGATGAATGT
901 GATGCGAAGT GTCAAACACC TCAGGGAGCT ATAAACAGCA GTCTTCCTTT CCAGAATGTA
961 CACCCAGTCA CAATAGGAGA GTGTCCAAAG TATGTCAGGA GTGCAAAATT AAGGATGGTT
1021 ACAGGACTAA GGAACATCCC ATCCATTCOA TCCAGAGGTT TGTTGGAGC CATGCCGGT
1081 TTCATTGAAG GGGGGTGGAC TGAATGGTA GATGGGTGGT ATGGTTATCA TCATCAGAAT
1141 GAGCAAGGAT CTGGCTATGC TGCAGATCAA AAAAGTACAC AAAATGCCAT TAACGGGATT
1201 ACAACAAGG TCAATTCTGT AATTGAGAAA ATGAACACTC AATTCACAGC TGTGGGCAAA
1261 GAGTTCACA AATTGGAAA AAGGATGGAA AACTTAAATA AAAAAGTTGA TGATGGGTTT
1321 CTAGACATTT GGACATATAA TGCAGAATTG TTGGTTCTAC TGGAAAATGA AAGGACTTTG
1381 GATTTCCATG ACTCCAATGT GAAGAATCTG TATGAGAAAAG TAAAAAGCCA ATTAAAGAAT
1441 AATGCCAAAG AAATAGGAAA CGGGTGTTTT GAGTTCTATC ACAAGTGTA CAATGAATGC
1501 ATGGAGAGTG TGAAAAATGG TACCTATGAC TATCCAAAAT ATTCCGAAGA ATCAAAGTTA
1561 AACAGGGAGA AAATTGATGG AGTGAAATTG GAATCAATGG GAGTATACTa agagctcagg
1621 cct SEQ ID NO:17

Fig. 6A

1 GGTACCTATG ACTATCCAAA ATATTCCGAA GAATCAAAGT TAAACAGGGA GAAAATTGAT
61 GGAGTGAAAT TGAATCAAT GGGAGTATAC CAGATTCTGG CGATCTACTC AACTGTCGCC
121 AGTTCCCTGG TTCTTTTGGT CTCCTGGGG GCAATCAGCT TCTGGATGTG TTCCAATGGG
181 TCTTTGCAGT GTAGAATATG CATtaagag ctcaggcct SEQ ID NO:18

Fig. 6B

ES 2 545 607 T3

1 GGTACCTATG ACTATCCAAA ATATTCCGAA GAATCAAAGT TAAACAGGGA GAAAATTGAT
61 GGAGTGAAAT TGGAAATCAAT GGGAGTATAC TCTGAGAAGG ATGAACTTta agagctcagg
121 cct SEQ ID NO:19

Fig. 6C

1 GGTACCTAT GACTATCCA AAATATTCC GAAGAATCA AAGTTAAAC AGGGAGAAA
61 ATTGATGGA GTGAAATG GAATCAATG GGAGTATAC CACGATGAA CTTtaagagc
121 tcaggcct SEQ ID NO:20

Fig. 6D

1 GGTACCTATG ACTATCCAAA ATATTCCGAA GAATCAAAGT TAAACAGGGA GAAAATTGAT
61 GGAGTGAAAT TGGAAATCAAT GGGAGTATAC CTCAAACAAA TCGAAGACAA GATCGAAGAG
121 ATCCTCTCGA AAATCTACCA CATCGAAAAC GAGATTGCCA GGATCAAGAA GCTCATAGGC
181 GAGTCAGCAG CCTtaagagct caggcct SEQ ID NO:21

Fig. 6E

1 GGTACCTATG ACTATCCAAA ATATTCCGAA GAATCAAAGT TAAACAGGGA GAAAATTGAT
61 GGAGTGAAAT TGGAAATCAAT GGGAGTATAC CTCAAACAAA TCGAAGACAA GATCGAAGAG
121 ATCCTCTCGA AAATCTACCA CATCGAAAAC GAGATTGCCA GGATCAAGAA GCTCATAGGC
181 GAGTCAGCAG CCTCTGAGAA GGATGAACTT taagagctca ggcct SEQ ID NO:22

Fig. 6F

1 GGTACCTATG ACTATCCAAA ATATTCCGAA GAATCAAAGT TAAACAGGGA GAAAATTGAT
61 GGAGTGAAAT TGGAAATCAAT GGGAGTATAC GGAGGCGCTG GCCCACC GCC AGTTCATCTA
121 CCGCCTCCGG TGCACTGACC ACCTCCGGTT CACCTGCCAC CTCCGGTGCA TCTCCACCG
181 CCAGTCCACC TGCCGCTCC GGTCCACCTG CCACCGCCTG TCCATGTGCC GCCACCGGTT
241 CATCTGCCGC CTCCATCAGC AGCCtaagag ctcaggcct SEQ ID NO:23

Fig. 6G

1 GGTACCTATG ACTATCCAAA ATATTCCGAA GAATCAAAGT TAAACAGGGA GAAAATTGAT
61 GGAGTGAAAT TGGAAATCAAT GGGAGTATAC GGAGGCGCTG GCCCACC GCC AGTTCATCTA
121 CCGCCTCCGG TGCACTGACC ACCTCCGGTT CACCTGCCAC CTCCGGTGCA TCTCCACCG
181 CCAGTCCACC TGCCGCTCC GGTCCACCTG CCACCGCCTG TCCATGTGCC GCCACCGGTT
241 CATCTGCCGC CTCCATCAGC AGCCTCTGAG AAGGATGAAC TTtaagagct caggcct
SEQ ID NO:24

Fig. 6H

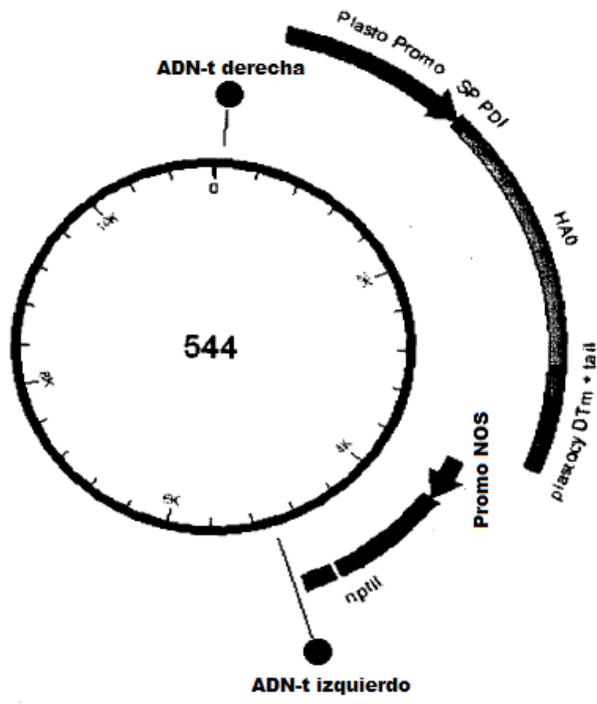


Fig. 7

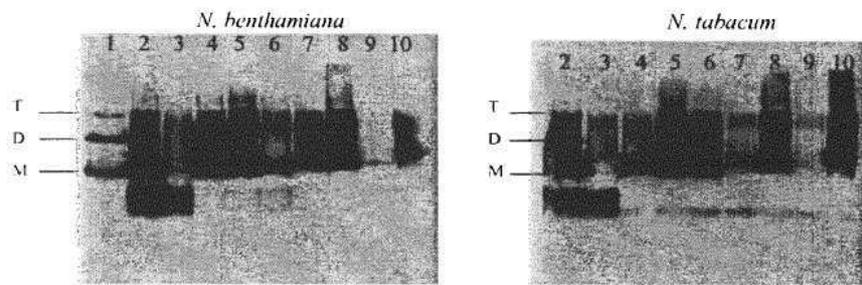


Fig. 8

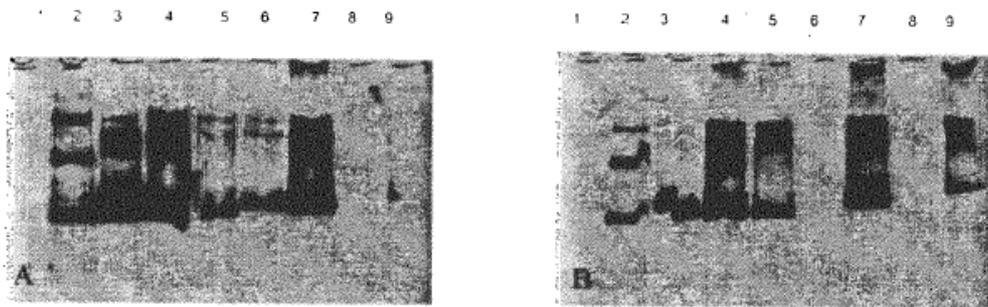


Fig. 9

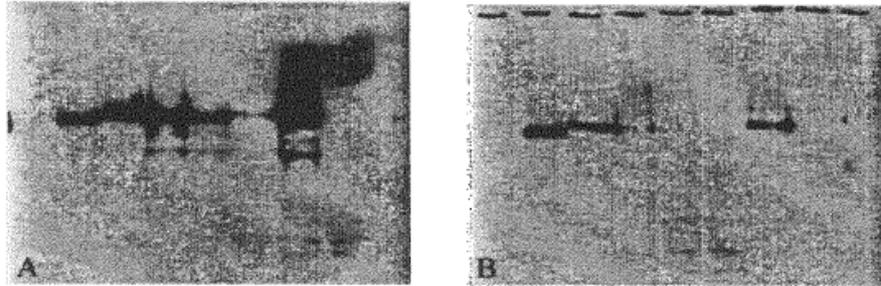


Fig. 10

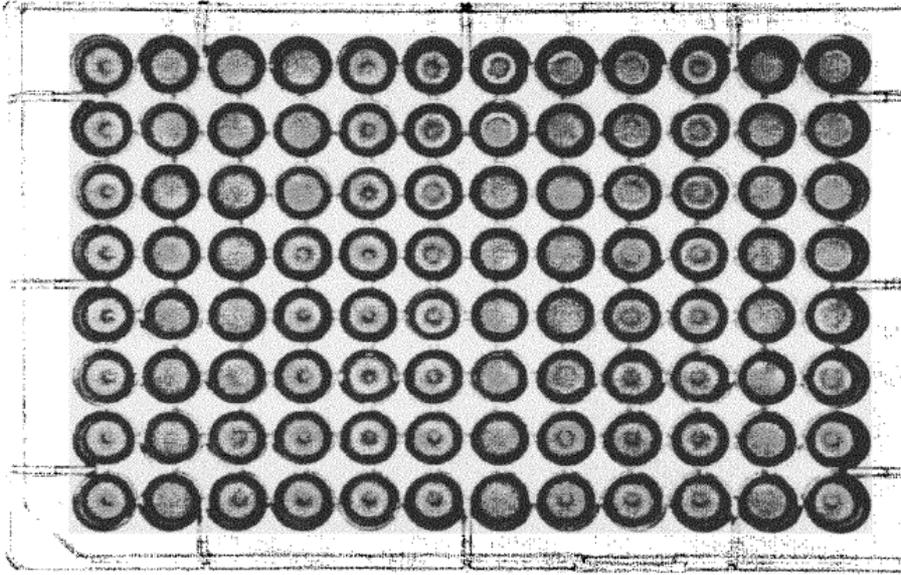


Fig. 11