

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 709**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2011** **PCT/CA2011/001427**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012** **WO2012083445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011** **E 11851176 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017** **EP 2655613**

54 Título: **Producción de partículas pseudovíricas en plantas**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426401 P
13.06.2011 US 201161496371 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

D'AOUST, MARC-ANDRE;
COUTURE, MANON;
LAVOIE, PIERRE-OLIVIER y
VEZINA, LOUIS-PHILIPPE

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 624 709 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

Producción de partículas pseudovíricas en plantas.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción de proteínas víricas quiméricas en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere también a la producción de partículas pseudovíricas que comprenden proteínas víricas quiméricas en plantas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La vacunación proporciona protección contra la enfermedad causada por un agente similar induciendo a un sujeto a montar una defensa antes de la infección. Convencionalmente, esto se ha logrado a través del uso de formas vivas atenuadas o enteras inactivadas de los agentes infecciosos como inmunógenos. Para evitar el peligro de usar el virus entero (tal como virus muertos o atenuados) como vacuna, las proteínas víricas recombinantes, por ejemplo subunidades, se han perseguido como vacunas. Tanto las vacunas de péptidos como de subunidades están sujetas a una serie de limitaciones potenciales. Las vacunas de subunidades pueden presentar una inmunogenicidad deficiente, debido a plegado incorrecto, presentación deficiente de antígeno, o diferencias en la composición de carbohidratos y lípidos. Un problema importante es la dificultad de asegurar que la conformación de las proteínas modificadas imita la de los antígenos en su entorno natural. Se deben usar adyuvantes adecuados y, en el caso de péptidos, proteínas portadoras, para aumentar la respuesta inmune. Además, estas vacunas provocan principalmente las respuestas humorales, y por lo tanto pueden fracasar al evocar una inmunidad eficaz. Las vacunas de subunidades son a menudo ineficaces para enfermedades en las que se puede demostrar que todo el virus inactivado proporciona protección.

Las partículas pseudovíricas (VLP) son candidatos potenciales para su inclusión en composiciones inmunógenas. Las VLP se asemejan mucho a viriones maduros, pero no contienen material genómico vírico. Por lo tanto, las VLP son de naturaleza no replicativa, lo que las hace seguras para administración como vacuna. Además, las VLP pueden estar diseñadas para expresar glicoproteínas víricas en la superficie de la VLP, que es su configuración fisiológica más nativa. Además, dado que las VLP se asemejan a viriones intactos y son estructuras de partículas multivalentes, las VLP pueden ser más eficaces en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína que los antígenos de proteínas de envoltura solubles.

Se han generado VLP para más de treinta virus diferentes en sistemas de insectos y mamíferos para propósitos de vacunas (Noad, R. y Roy, P., 2003, Trends Microbiol 11: 438-44). Varios estudios han demostrado que las proteínas recombinantes de influenza se autoensamblan en VLP en cultivo celular usando plásmidos de expresión de mamíferos o vectores de baculovirus (por ejemplo, Gomez-Puertas et al., 1999, J. Gen. Virol., 80, 1635-1645; Neumann et al., 2000, J. Virol., 74, 547-551; Latham y Galarza, 2001, J. Virol., 75, 6154-6165).

Gomez-Puertas et al. (1999, J. Gen. Virol., 80, 1635-1645) demostraron que la formación eficaz de las VLP de influenza depende de los niveles de expresión de las proteínas víricas. Neumann et al. (2000, J. Virol., 74, 547-551) establecieron un sistema basado en plásmidos de expresión de mamífero para generar partículas pseudovíricas de influenza infecciosas enteramente a partir de ADNc clonados. Latham y Galarza (2001, J. Virol., 75, 6154-6165) informaron la formación de VLP de influenza en células de insecto infectadas con baculovirus recombinante que coexpresan los genes HA, NA, M1 y M2. Este estudio demostró que las proteínas del virión de gripe se autoensamblan tras la coexpresión en las células eucariotas y que la proteína de matriz M1 era necesaria para la producción de VLP.

En varios sistemas de expresión, incluyendo baculovirus, virus vaccinia, células de drosophila (DS-2), células Vero y esferoblastos de levadura, la expresión de Pr^{55gag} del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) da como resultado el ensamblaje y liberación de partículas pseudovíricas (VLP), similares en morfología a viriones inmaduros del VIH (revisado por Deml et al., 2005, Molecular Immunology 42: 259-277).

La proteína de envoltura gp160 del VIH se puede incorporar en VLP derivadas de Gag. Sin embargo, sólo se incorporan un número limitado de proteínas de envoltura a pesar de la alta expresión de Pr^{55gag}. Wang et al. demostraron que el reemplazo del dominio transmembrana y los dominios de cola citosólica (TM/CT) de la proteína de envoltura del VIH por los de otra proteína de envoltura vírica, incluyendo la hemaglutinina de influenza, dio como resultado un aumento en la incorporación de la proteína de envoltura en VLP derivadas de Pr^{55gag} (Journal of

Virology, 2007, 81: 10869-10878). También se demostró que la proteína de envoltura de VIH que comprendía TM/CT HA se incorporó en las VLP derivadas de influenza M1 cuando se coexpresan en células de insecto usando un sistema de expresión de baculovirus (documento WO2008/005777).

- 5 La penetración del virus de influenza en una célula depende de la endocitosis mediada por el receptor dependiente de HA. El ciclo de infección por el virus de influenza se inicia por la unión de la proteína HA de superficie del virión a un receptor celular que contiene ácido siálico (glicoproteínas y glicolípidos). La proteína neuraminidasa (NA) media el procesamiento de los receptores de ácido siálico. En los confines ácidos de los endosomas internalizados que contienen un virión de influenza, la proteína HA experimenta cambios conformacionales que conducen a la fusión de
10 membranas víricas y celulares, el no recubrimiento del virus y la liberación mediada por M2 de las proteínas M1 de las ribonucleoproteínas asociadas a la nucleocápside (RNP), que migran al núcleo celular para la síntesis de ARN vírico. Latham y Galarza, 200, J. Virol. 75, 6154- 6165) notificaron la formación de VLP de influenza en células de insecto infectadas con baculovirus recombinante que coexpresan los genes HA, NA, M1 y M2. Además, Gomez-Puertas et al., 2000, J Virol. 74, 11538-11547) muestran que, además de la hemaglutinina (HA), la proteína de matriz
15 (M1) del virus de influenza es esencial para el brote de VLP a partir de células de insecto. Sin embargo, Chen et al. (2007, J. Virol. 81, 7111-7123) muestran que M1 puede no ser necesaria para la formación de VLP.

- Los mecanismos de brotación más caracterizados utilizan una ruta de clasificación vacuolar de proteínas (VPS) del huésped (véase Chen y Lamb, Virology 372, 2008). Se ha demostrado que muchos virus envueltos interactúan con
20 proteínas de la ruta VPS, requiriendo la acción del complejo de clasificación endosómica requerido para los complejos de proteínas de transporte (ESCRT) (véase la Tabla I de Chen y Lamb 2008). El último dominio proteico que interactúa con las proteínas de la ruta VPS se encuentra en el núcleo y proteínas de matriz de los virus, y por lo tanto, la brotación dependiente de VPS requiere la presencia de proteínas de matriz o núcleo. La palmitoilación de la cola citosólica de HA de influenza es necesaria para el brote, pero el mecanismo no se entiende bien y puede estar
25 implicada la participación de otros dominios de proteínas de superficie. Los requisitos mínimos para el brote siguen siendo desconocidos y la participación del ectodominio en este proceso no puede excluirse. Adicionalmente, la ruta VPS en las plantas no se entiende bien (véase Schellmann S., y Pimpl P., Current Op Plant Biol 12: 670-676, 200).

- Se sabe que el brote de influenza es independiente de la ruta de VPS. El brote del virus de la influenza implica la
30 ruta de Rab11 (Bruce et al., J. Virol 84: 5848-5859, 2010). Las proteínas Rab son anclajes de GTPasa situados en la superficie de las vesículas de transporte dentro de las células, y están implicados en la formación de vesículas desde el compartimiento donador, el transporte, el acoplamiento y la fusión al compartimiento aceptor Vazquez-Martinez y Malagon Frontiers in Endocrinology 2: 1-9, 2011). Los componentes de la ruta Rab11 se han identificado en plantas. Sin embargo, los componentes del tráfico de plantas han evolucionado dando lugar a varias
35 características específicas del sistema de endomembrana de la planta, incluyendo, por ejemplo, una vacuola grande y especializada, un movimiento rápido de las pilas de Golgi y una organización única de compartimentos endosómicos, y un número expandido de Rab GTPasas (Rojo E., y Deneke J., Plant Phys 147: 1493-1503, 2008). El brote de partículas o virus de influenza depende de Rab11 (Bruce et. al., J. Virol 84: 5848-5859, 2010), pero no se ha identificado la proteína o dominio proteico que interactúa con Rab11 o las proteínas asociadas a Rab11. Sin
40 embargo, se desconocen el dominio o dominios mínimos de HA que pueden ser necesarios para el proceso de brotación y la producción de VLP.

- En las plantas, Pr^{55gag} del VIH se acumula a niveles extremadamente bajo si no ha diseñado para la acumulación en cloroplastos (Meyers et al., 2008, BMC Biotechnology 8: 53; Scotti et al., 2010, Planta 229: 1109-1122). Sin
45 embargo, la acumulación en el cloroplasto es incompatible con la incorporación de una proteína de envoltura del VIH correctamente plegada, ya que la maduración y el pliegue de ésta última requiere modificaciones postraduccionales específicas de la ruta de secreción. Rybicki et al. (2010, Plant Biotechnology Journal 8: 620-637) señala que "... parece que nadie ha expresado con éxito toda la proteína gp160 del VIH Env o ni siquiera la mayor parte de la proteína, en plantas con un rendimiento razonable..."

- 50 El virus de la rabia (RV) es un miembro de la familia Rhabdoviridae. Al igual que la mayoría de los miembros de esta familia, RV es un ARN de cadena negativa, no segmentado, cuyo genoma codifica cinco proteínas víricas: ARN polimerasa dependiente de ARN (L); una nucleoproteína (N); una proteína fosforilada (P); una proteína de matriz (M) situada en el lado interno de la envoltura de la proteína vírica; y una glicoproteína de superficie externa (G).
55 Dietzschold B et al. (1991), Crit. Rev. Immunol. 10: 427-439.

Las vacunas basadas en cultivos celulares para la rabia se limitan a cultivar las cepas inactivadas del virus en cultivos celulares. Estas vacunas comprenden el virus cultivado en cultivos celulares. Los actuales enfoques biotecnológicos apuntan a expresar el gen de la proteína de cubierta del virus de la rabia para desarrollar una

proteína recombinante segura que podría desplegarse como una vacuna activa. La expresión estable de la glicoproteína del virus de la rabia se ha mostrado en células de ovario de hámster chino (Burger et al., 1991). Se obtuvo una proteína glicosilada de longitud completa de 67 K que co-migró con la proteína G aislada de células infectadas con el virus.

5

El documento WO/1993/001833 muestra la producción de partículas pseudovíricas (VLP) en un sistema de expresión de baculovirus que contiene un genoma de ARN que incluye un dominio 3' y un dominio de relleno rodeado por una vaina de proteína M de la rabia y proteína M1 de la rabia. La VLP también incluye una envoltura lipídica de la proteína G de la rabia.

10

El documento WO 2008/061243 desvela describe partículas pseudovíricas de virus sincitial (VLPS) que expresan y/o contienen proteínas RSV.

El virus varicela-zóster (VZV), también conocido como herpesvirus humano 3 (HHV-3), es un miembro de la subfamilia de alfa herpesvirus de la familia de virus Herpesviridae. Las VLP que expresan glicoproteínas o proteínas de tegumento se han generado previamente a partir de diferentes miembros de la familia de herpesvirus. Se han obtenido partículas ligeras (partículas L) constituidas por proteínas de tegumento envueltas a partir de células infectadas con virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), virus del herpes equino tipo 1 (EHV-1), o virus de pseudorabia (McLauchlan y Rixon (1992) J. Gen. Virol. 73: 269-276; Pat. de Estados Unidos N.º 5.384.122). Se podría generar un tipo diferente de VLP, denominado partículas de envoltura de replicación de ADN pre-vírico (PREP), a partir de células infectadas con HSV-1 en presencia de inhibidores de la replicación del ADN vírico. Las PREP se asemejaban a las partículas L estructuralmente, pero contenían una composición proteica distinta (Dargan et al. (1995) J. Virol. 69: 4924-4932; Pat. de Estados Unidos N.º 5.994.116). Las VLP híbridas que expresan fragmentos de la proteína gE de VZV se han producido mediante una técnica que usa la proteína p1 codificada por el retrotransposón de Ty de levadura (García-Valcarcel et al. (1997) Vaccine 15: 709-719; Welsh et al. (1999) J. Med. Virol. 59: 78-83; Pat. de Estados Unidos N.º 6.060.064). El documento US 2011/0008838 describe VLP quiméricas que comprenden al menos una proteína VZV, pero no comprende una proteína Ty de levadura. Las VLP quiméricas comprenden una proteína de núcleo vírica, tal como influenza M1 o la proteína M de la enfermedad de Newcastle, y al menos una proteína del virus de la varicela zoster (VZV).

30

La propagación de un coronavirus recientemente evolucionado (CoV) causó una amenaza global de pandemia de síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en 2003 (Kuiken, T. et al., 2003, Lancet 362: 263-270). Al igual que con otros coronavirus, SARS-CoV tiene la morfología de las partículas envueltas con proyecciones periféricas típicas, denominadas "corona" o "espigas", que rodean la superficie de un núcleo vírico (Ksiazek, T. G. et al., 2003, N Engl J Med 348: 1953-1966; Lin, Y. et al., 2004, Antivir Ther 9: 287-289). Fuera del coronavirus, el núcleo de la partícula es una capa de envoltura lipídica que contiene principalmente tres proteínas de membrana, la proteína M (membrana) más abundante, la proteína E pequeña (envoltura) y la proteína S (espiga). Los homo-trímeros de la proteína S forman colectivamente la corona mencionada anteriormente, que está implicada en la unión vírica a los receptores del huésped, la fusión de membrana para la entrada vírica, la diseminación célula a célula y el tropismo tisular de los coronavirus.

40

Se han usado sistemas de expresión de baculovirus para producir VLP de SARS (Ho, Y. et al., 2004, Biochem Biophys Res Commun 318: 833-838; Mortola, E. y Roy, P., 2004, FEBS Lett 576: 174-178). Sin embargo, debido a las diferencias intrínsecas entre las células de insecto y las células de mamífero, las VLP ensambladas en las células de insecto (SF9) mostraron un tamaño de 110 nm de diámetro, que es mucho mayor que los 78 nm de los viriones auténticos de SARS-CoV (Lin, Y. et al., 2004, anteriormente, y Ho, Y. et al., 2004, anteriormente). Además, la inmunogenicidad de las VLP de SARS a base de células de insectos permanece sin investigar. Otros investigadores también intentaron utilizar sistemas de expresión de mamíferos para producir VLP de SARS (Huang, Y. et al., 2004, J Virol 78: 12557-65). Sin embargo, la liberación extracelular de VLP no es eficiente, y el rendimiento de VLP no es satisfactorio. Por ejemplo, el documento WO/2005/035556 describe un sistema para hacer partículas pseudovíricas SARS-CoV (SARS-CoV-VLP) que comprenden uno o más vectores recombinantes que expresan la proteína E de SARS-CoV, la proteína M de SARS-CoV, y la proteína S de SARS-CoV en células de mamífero.

50

La formación de VLP, en cualquier sistema, requiere demandas considerables sobre la estructura de las proteínas - la alteración de los tramos de la secuencia de una proteína puede no tener mucho efecto sobre la expresión del propio polipéptido, sin embargo, no existen estudios estructurales para demostrar el efecto de tales alteraciones sobre la formación de VLP. La cooperación de las diversas regiones y estructuras de la proteína han evolucionado con el virus y no puede ser modificable con respecto a las alteraciones similares sin pérdida de formación de VLP.

55

Para mejorar las VLP como vacunas candidatas es necesario explorar otro sistema de expresión junto a células de insecto y mamífero. Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar la capacidad del sistema de expresión de plantas para producir VLP de proteína quiméricas. En particular, existe la necesidad de identificar el número mínimo de proteínas de virus que se ensamblarán en las VLP y evaluar la morfología e inmunogenicidad de las VLP.

5 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la producción de proteínas víricas quiméricas en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere también a la producción de partículas pseudovíricas que comprenden proteínas víricas quiméricas en plantas.

La presente invención proporciona un método para producir una partícula pseudovírica (VLP) en una planta, que comprende,

- 15 a) introducir un ácido nucleico que comprende una región reguladora activa en la planta y ligada operativamente a una secuencia nucleotídica quimérica que codifica, en serie, un ectodominio de una proteína de superficie trimérica vírica o fragmento de la misma, condensada a un dominio transmembrana de hemaglutinina de influenza y cola citoplasmática, en la planta, o una porción de la planta, el ectodominio se obtiene a partir de un virus de una familia de Retroviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae o Filoviridae, y
- 20 b) incubar la planta o porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo la VLP.

El método como se ha descrito anteriormente puede comprender además una etapa (c) de recolección de la planta y purificación de la VLP. Además, la VLP puede no contener una matriz vírica o una proteína núcleo.

25 El ectodominio de la proteína de superficie trimérica vírica puede derivarse, por ejemplo, del género Lentivirus, Lyssavirus, Coronavirus o Ebolavirus. El ectodominio de la proteína de superficie trimérica vírica puede derivarse, por ejemplo, pero sin limitación, del VIH, virus de la rabia, RSV, virus del SARS o virus del Ébola. La proteína de superficie trimérica vírica en su forma nativa puede comprender un ectodominio y un dominio transmembrana/cola citoplásmica, por ejemplo, pero sin limitación, proteína F (RSV, sarampión, paperas, enfermedad de Newcastle), proteína S (SRAS), proteína env, proteína G (rabia), glicoproteína de envoltura, incluyendo E, B, C, I, H (VZV, citomegalovirus, herpesvirus, virus Epstein-barr), glicoproteína GP (ébola, marburg), hemaglutinina (virus de la viruela, virus vaccinia).

35 La presente invención también incluye el método que se ha descrito anteriormente, en el que el dominio transmembrana de influenza y la cola citoplasmática se obtienen de H5 (A/Indonesia/05/2005) o H3 (A/Brisbane/10/2007). El dominio transmembrana y la cola citoplasmática pueden comprender la secuencia nucleotídica definida en la SEQ ID NO: 41, o la SEQ ID NO: 42.

40 La presente invención también proporciona el método que se ha descrito anteriormente, en el que en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa transitoriamente en la planta. Como alternativa, en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico puede expresarse de forma estable en la planta.

La presente invención también incluye el método como se ha descrito anteriormente, en el que, en la etapa de introducción (etapa a), uno o más de un ácido nucleico adicional, seleccionados del grupo de una secuencia nucleotídica que codifica una o más de una proteína de chaperona, proteína de canal de protones, inhibidor de proteasa, o una combinación de los mismos, se introduce en la planta.

50 La presente invención proporciona una VLP producida por el método descrito anteriormente. La proteína de superficie trimérica vírica quimérica de la VLP puede comprender N-glicanos específicos de la planta, o N-glicanos modificados. La VLP puede comprender también uno o más de un lípido derivado de la planta.

La presente invención incluye una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP como se ha descrito anteriormente para inducir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La presente invención se refiere a la producción de una proteína de superficie trimérica vírica quimérica a partir de virus de la familia Retroviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae, Coronaviridae o Filoviridae, y que producen partículas pseudovíricas que comprenden estas proteínas de superficie triméricas víricas quiméricas en las plantas.

Además, la presente invención se refiere a la producción de una proteína de superficie trimérica quimérica vírica del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rabia, virus de la varicela zoster (VZV), virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) o virus del Ébola en plantas. La presente invención se refiere a la producción de partículas pseudovíricas quiméricas del VIH, la rabia, VZV, SARS y Ébola en plantas.

5 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para producir VLP de VIH, rabia, VZV, SARS o Ébola en una planta que comprende introducir un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica del VIH, rabia, VZV, SARS o Ébola ligada operativamente a una región reguladora activa en la planta, a la planta, o una porción de la planta, e incubar la planta o porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo las VLP quiméricas del VIH, rabia, VZV, SARS o Ébola.

La presente invención proporciona además una VLP que comprende una proteína quimérica del VIH, rabia, VZV, SARS o Ébola. La VLP puede producirse por el método que se proporciona por la presente invención. La VLP del VIH, rabia VZV, SARS o Ébola también puede producirse en una planta.

15 Las VLP quiméricas, o las VLP, producidas a partir de proteínas derivadas del VIH, rabia, VZV, SARS o Ébola, de acuerdo con la presente invención no comprenden la proteína M1. Se sabe que la proteína M1 se une al ARN que puede considerarse un contaminante de una preparación de VLP. La presencia de ARN no es deseada cuando se obtiene la aprobación reguladora para un producto antigénico (VLP), por lo tanto, puede ser ventajosa una preparación quimérica de VLP carente de ARN.

Aunque la proteína Env de VIH nativa se acumula mal en las plantas, una proteína quimérica Env del VIH, fusionada a un dominio transmembrana (TM) y un dominio de cola citoplásmica (CT) de HA de influenza se acumula a alto nivel, y brota en VLP de VIH en ausencia de proteína núcleo o de matriz, en las plantas.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

30 La **Figura 1** muestra varias secuencias de nucleótidos y amino, y casetes de expresión para VIH de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 1A** muestra una secuencia de ácido nucleico consenso (SEQ ID NO: 1) de ConS ΔCFI de VIH (Péptido señal nativo en negrita, los dominios nativos transmembrana y citosólicos están subrayados). La **Figura 1B** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido IF-Apal-SpPDI.c (SEQ ID NO: 2). La **Figura 1C** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido SpPDI-VIH gp145.r (SEQ ID NO: 3). La **Figura 1D** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido IF-SpPDI-gp145.c (SEQ ID NO: 4). La **Figura 1E** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido WtdTm-gp145.r (SEQ ID NO: 5). La **Figura 1F** muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) del casete de expresión número 995, de PacI (aguas arriba del promotor) a Ascl (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. ConS ΔCFI de PDISP-VIH está subrayado. La **Figura 1G** muestra una secuencia de aminoácidos de ConS ΔCFI de PDISP-VIH (SEQ ID NO: 7). La **Figura 1H** muestra una representación esquemática de la construcción número 995.

45 La **Figura 2** muestra varias secuencias de nucleótidos y aminoácidos, y casetes de expresión para VIH de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 2A** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido IF-H3dTm+gp145.r (SEQ ID NO:8). La **Figura 2B** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido Gp145+H3dTm.c (SEQ ID NO:9). La **Figura 2C** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido H3dTm.r (SEQ ID NO: 10). La **Figura 2D** muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 11) del casete de expresión número 997, de PacI (aguas arriba del promotor) a Ascl (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. PDISP-VIH Con S ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT está subrayado. La **Figura 2E** muestra una secuencia de aminoácidos de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT (SEQ ID NO:12). La **Figura 2F** muestra una representación esquemática de la construcción número 997.

50 La **Figura 3** muestra varias secuencias de nucleótidos y aminoácidos, y casetes de expresión para VIH de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 3A** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido IF-H5dTm+gp145.r (SEQ ID NO: 13). La **Figura 3B** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido Gp145+H5dTm.c (SEQ ID NO:14). La **Figura 3C** muestra una secuencia de nucleótidos del oligonucleótido IF-H5dTm.r (SEQ ID NO:15). La **Figura 3D** muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 16) del casete de expresión número 999, de PacI (aguas arriba del promotor) a

Ascl (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado. La **Figura 3E** muestra una secuencia de aminoácidos de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT (SEQ ID NO: 17). La **Figura 3F** muestra una representación esquemática de la construcción número 999.

La **Figura 4** muestra una secuencia de aminoácidos y varios casetes de expresión para p19 de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 4A** muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 18) del casete de expresión número 172, de XmaI (aguas arriba del promotor de plastocianina) a EcoRI (inmediatamente aguas abajo del terminador de plastocianina). La secuencia de ácido nucleico TBSV P19 está subrayada. La **Figura 4B** muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:19) de supresor de silenciamiento de TBSV P19. La **Figura 4C** muestra una representación de la construcción número 172.

La **Figura 5** muestra una representación esquemática de los genes Env de VIH quiméricos expresados como se describe en el presente documento.

La **Figura 6** muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de proteína Env del VIH en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carriles 1 a 4, gp160 del VIH-1 recombinante (ab68171), 100, 50, 10 y 5 ng, respectivamente, en 20 µg de proteínas de hoja extraídas de plantas infiltradas con mock (controles positivos). Carril 5, 20 µg de proteínas de plantas infiltradas con mock (control negativo). Carriles 6 a 8, proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/995 (20 µg, 10 µg y 2 µg, respectivamente, completado con 20 µg con proteínas de hoja extraídas de plantas infiltradas con mock). Carriles 9 y 10, proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/997 (20 µg y 10 µg, respectivamente, completado con 20 µg con proteínas de hoja extraídas de plantas infiltradas con mock). Carriles 11 y 12, proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/999 (20 µg y 10 µg, respectivamente, completado con 20 µg con proteínas de hoja extraídas de plantas infiltradas con mock).

La **Figura 7** muestra una caracterización de la estructuras derivadas de ConS ΔCFI del VIH por cromatografía de exclusión de tamaño. Los extractos de proteína de las hojas infiltradas con AGL1/999, que produjeron la proteína quimérica Env/H5, se separaron por filtración en gel en una columna de alta resolución calibrada S-500. (A) El contenido de proteína Env de VIH de las fracciones de elución se reveló por inmunodetección usando los anticuerpos anti-gp120. Carriles 1 a 4, gp160 del VIH-1 recombinante (ab68171), 100, 50, 10 y 5 ng, respectivamente, en 20 µg de proteínas de hoja extraídas de plantas infiltradas con mock (controles positivos). Carril 5, 20 µg de proteínas de plantas infiltradas con mock (control negativo). Carril 6, 20 µg de proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/999. Carriles 7 a 18, fracciones de elución 7 a 18 de cromatografía de filtración en gel. (B) Contenido de proteína relativo de las fracciones de elución 7 a 18 de la cromatografía de filtración en gel.

La **Figura 8** muestra varias secuencias nucleotídicas y amino, y casetes de expresión para la rabia de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 8A** muestra un esquema de la construcción 1074 (C-2X35S-glicoproteína G de la rabia (RabG)+H5 A/Indonesia/5/2005 en dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS en un vector que contiene un inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina). La **Figura 8B** muestra el cebador IF-RabG-S2+4.c (SEQ ID NO:32). La **Figura 8C** muestra el cebador RabG+H5dTm.r (SEQ ID NO:33). La **Figura 8D** muestra el gen G Rab sintetizado (correspondiente al nt 3317-4891 de número de acceso al Genbank EF206707; péptido señal nativo en negrita, dominios nativos transmembrana y citosólico subrayados; SEQ ID NO:34).

La **Figura 8E** muestra el cebador IF-H5dTm.c (SEQ ID NO:35). La **Figura 8F** muestra la construcción 141 del t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). Sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO:36). La **Figura 8G** muestra una representación esquemática de la construcción 141. Los sitios de enzimas de restricción SbfI y StuI usados para la linearización plasmídica se anotan en la representación. La **Figura 8H** muestra la secuencia nucleotídica del casete de expresión número 1074 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP-Rab G -A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado (SEQ ID NO:37). La **Figura 8I** muestra la secuencia aminoacídica de PDISP-Rab G-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT (SEQ ID NO:38). La **Figura 8J** muestra la secuencia nucleotídica para la construcción 144 del t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). Sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en BeYDV + replicasa con el casete de expresión del inhibidor de silenciamiento Plastocianina-P19-Plastocianina (SEQ ID NO:39). La **Figura 8K** muestra una representación esquemática de la construcción 144. Los sitios de enzimas de restricción SbfI y StuI usados para la linearización plasmídica se anotan en la representación. La **Figura 8L** muestra la secuencia nucleotídica del casete de expresión número 1094 de derecha a izquierda de BeYDV LIR.PDISP-Rab G -A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado (SEQ ID NO:40). La **Figura 8M** muestra una representación esquemática de la construcción número 1094. La **Figura 8N** muestra un análisis de inmunotransferencia de expresión de la proteína G de la rabia en una planta. La proteína G de la rabia se expresó en fusión con PDI Sp (construcción 1071), BeYDV + rep, dominio H5A/Indo TM+CT, o una combinación de los mismos. Más específicamente, la construcción 1074 es una fusión de la proteína G de la rabia con PDI Sp y el dominio

H5A/Indo TM+CT. La construcción 1094 es una fusión de la proteína G de la rabia con BeYDV + rep, PDI Sp y el dominio H5A/Indo TM+CT. La construcción 1091 es una fusión de proteína G de la rabia con PDI Sp y BeYDV + rep. La **Figura 80** muestra un análisis de inmunotransferencia de cromatografía de exclusión de tamaño en extractos concentrados y depurados de proteína expresada a partir de la construcción 1074 y la construcción 1094.

La **Figura 9A** muestra un análisis de inmunotransferencia de la proteína G de la rabia purificada expresada a partir de la construcción 1074. La **Figura 9B** muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión de la VLP purificada obtenida a partir de la expresión de la construcción 1074.

La **Figura 10** muestra secuencias para preparar A-2X35S-glicoproteína E del virus de varicela-zóster (VZVgE)+H5 A/Indonesia/5/2005 en dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS (Construcción número 946). La **Figura 10A** muestra el cebador IF-wtSp-VZVgE.c (SEQ ID NO: 20); la **Figura 10B** muestra el cebador IF-H5dTm+VZVgE.r (SEQ ID NO: 21). La **Figura 10C** muestra el gen gE de VZV sintetizado (SEQ ID NO:22; correspondiente al nt 3477-5348 de número de acceso al Genbank AY013752.1) (El péptido señal nativo está en negrita, los dominios nativos transmembrana y citosólico están subrayados). La **Figura 10D** muestra el cebador para VZVgE+HSdTm.c (SEQ ID NO:23). La **Figura 10E** muestra el casete de expresión número 946 (SEQ ID NO:24), de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS).VZV gE-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT subrayado. La **Figura 10F** muestra la secuencia aminoacídica de VZV gE- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT (SEQ ID NO:25). La **Figura 10G** muestra una representación esquemática de la construcción número 946

La **Figura 11A** muestra un análisis de inmunotransferencia de la expresión de la proteína E del virus varicela-zóster (VZV). Carriles 1 a 5, gE de VZV recombinante, 500, 100, 50, 10 y 5 ng, respectivamente (controles positivos). Carril 6, extracto de hojas infiltradas con mock (control negativo). Carriles 7-9, proteína recombinante de la construcción 946, 20, 10 y 2 µg de extracto respectivamente. La construcción 946 comprende el gen gE de VZV con péptido señal de tipo silvestre y el dominio H5A/Indo TM+CT. La **Figura 11B** muestra análisis de inmunotransferencia de la expresión de la cromatografía de exclusión de tamaño en extractos en bruto (construcción 946).

La **Figura 12** muestra varias secuencias nucleotídicas y amino, y casetes de expresión para SARS de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 12A** muestra un esquema de la Construcción número 916 (B-2X35S- glicoproteína S del virus del síndrome respiratorio agudo severo (gS de SARS)+H5 A/Indonesia/5/2005 en el dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS). La **Figura 12B** muestra el cebador IF-wtSp-SARSgS.c (SEQ ID NO:26). La **Figura 12C** muestra el cebador IF-H5dTm+SARSgS.r (SEQ ID NO:27). La **Figura 12D** muestra el gen gS de SARS sintetizado (SEQ ID NO:28; correspondiente al nt 21492-25259 de número de acceso al Genbank AY278741.1; péptido señal nativo en negrita, los dominios nativos transmembrana y citosólico están subrayados). La **Figura 12E** muestra el cebador SARSgS+H5dTm.c SEQ ID NO:29). La **Figura 12F** muestra la secuencia nucleotídica del casete de expresión número 916 (SEQ ID NO:30), de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS).SARS gS-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT subrayada. La **Figura 12G** muestra la secuencia aminoacídica de SARS gS-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT (SEQ ID NO:31). La **Figura 12H** muestra un análisis de inmunotransferencia de la proteína S del virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS). La construcción 916 comprende el gen gS de SARS con péptido señal de tipo silvestre y el dominio transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indo. Carril 1, extracto de plantas infiltradas con mock (controles negativos). Carriles 2 a 4, proteína recombinante de la construcción 916 (20, 10 y 5 µg de extracto).

La **Figura 13** muestra varias secuencias de nucleótidos y amino, y casetes de expresión para el Ébola de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. La **Figura 13A** muestra la secuencia nucleotídica del cebador IF-Opt_EboGP.s2+4c (SEQ ID NO:43). La **Figura 13B** muestra la secuencia nucleotídica del cebador H5iTMCT+Opt_EboGP.r (SEQ ID NO:44). La **Figura 13C** muestra la secuencia nucleotídica del gen GP sintetizado optimizado (correspondiente a nt 6039-8069 con el número de acceso a Genbank AY354458 para la secuencia génica de tipo silvestre. La secuencia (SEQ ID NO:45) se optimizó para el uso de codón y el contenido de GC, delección de los sitios de corte y empalme crípticos, secuencias Shine-Delgarno, secuencia desestabilizante del ARN y sitios de entrada de ribosomas procariotas; Péptido señal nativo en negrita, dominios nativos transmembrana y citosólico subrayados). La **Figura 13D** muestra la secuencia nucleotídica del cebador opt_EboGP+H5iTMCT.c (SEQ ID NO: 46). La **Figura 13E** muestra la representación esquemática de la construcción 1192. Los sitios de enzima de restricción SacII y StuI usados para la linearización plasmídica se anotan en la representación. La **Figura 13F** muestra la secuencia nucleotídica para la construcción 1192 de los bordes del t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO. 47). La **Figura 13G** muestra la secuencia nucleotídica para el casete de expresión número 1366 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP-GP del virus del Ébola

cepa Zaire 95-H5 TM+CT de la secuencia A/Indonesia/5/2005 está subrayado (SEQ ID NO:48). La **Figura 13H** muestra la secuencia aminoacídica de PDISP-GP de virus del Ébola Zaire 95-H5 TM+CT de A/Indonesia/5/2005 9SEQ ID NO. 49). La **Figura 13I** muestra una representación esquemática de la construcción número 1366. La **Figura 13J** muestra un análisis de inmunotransferencia de la expresión de la proteína de glicoproteína (GP) del virus del Ébola. Se añadieron quinientos nanogramos en 20 µg de proteínas extraídas de plantas infiltradas con mock y se cargaron como control positivo (C+). Veinte microgramos de proteínas extraídas de plantas infiltradas con mock se cargaron como control negativo (C-). La construcción 1366 comprende el gen GP del virus del Ébola con péptido señal de tipo silvestre y el dominio H5A/Indo TM+CT. Los números entre paréntesis indican la cantidad de cultivo bacteriano inicial que se usó en la preparación del inóculo para la infiltración. (200) indica que 200 ml de cultivo se mezclaron con 2,3 l de tampón de infiltración y (400) indica que 400 ml de cultivo se mezclaron con 2,1 l de tampón de infiltración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a partículas pseudovíricas (VLP). Más específicamente, la presente invención se refiere a VLP que comprenden proteínas víricas quiméricas, y a métodos de producción de VLP quiméricas en plantas. Las VLP comprenden una proteína de fusión (quimérica) que comprende, en serie, un ectodominio de una proteína de superficie trimérica de virus (proteína de superficie trimérica vírica) condensada a un dominio transmembrana y un dominio de cola citosólica (TM/CT). El ectodominio de la proteína de superficie trimérica de virus es heterólogo con respecto al TM/CT. El TM/CT es un TM/CT de una hemaglutinina de influenza (HA).

La proteína de superficie trimérica de virus (también denominada como una proteína de superficie trimérica vírica) es una proteína que se encuentra en la superficie de un virus con envoltura en forma de un trímero (normalmente homotrímero) y comprende un dominio transmembrana y un dominio de cola citoplasmática (TM/CT) situados en el extremo C-terminal de cada monómero y un ectodominio situado en la región N-terminal de cada monómero. La proteína de superficie trimérica de virus puede ser una glicoproteína o una proteína de envoltura. Un trímero es un complejo macromolecular formado por tres proteínas unidas normalmente no covalentemente. Sin desear quedar ligado a la teoría, el dominio de trimerización de una proteína puede ser importante para la formación de dichos trímeros. Por lo tanto, los monómeros de la proteína de superficie trimérica de virus o un fragmento de la misma, pueden comprender un dominio de trimerización. La proteína de superficie trimérica de virus, o un fragmento de la misma, comprende además un ectodominio. El ectodominio de la proteína de superficie trimérica se expone al entorno exterior y no incluye un dominio transmembrana y un dominio de cola citoplasmática. Como se describe en el presente documento, el ectodominio de la proteína de superficie trimérica de virus no se obtiene de un virus de influenza. Si se usa un fragmento de la proteína de superficie trimérica de virus como se ha descrito anteriormente, se prefiere que la proteína de superficie trimérica de virus conserve la capacidad de formar un trímero.

El dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TM/CT) de la proteína de superficie trimérica de virus, el TM/CT de la proteína de influenza, o ambos, pueden identificarse fácilmente usando métodos como se conoce por un experto en la técnica, por ejemplo, determinando el grado de hidrofobicidad de una secuencia aminoacídica de la proteína, por ejemplo, usando un programa de predicción de transmembrana (por ejemplo, Expert Protein Analysis System; ExPASy.org, operado por el Swiss Institute of Bioinformatics; o el Dense Alignment Surface Method, Cserzo M., et al. 1997, Prot. Eng. vol. 10, n.º 6, 673-676; Lolkema J.S. 1998, FEMS Microbiol Rev. 22, n.º 4, 305-322), determinando el perfil de hidropatía de la secuencia aminoacídica de la proteína (por ejemplo, el perfil de hidropatía de Kyte-Doolittle), determinando la estructura tridimensional de la proteína, e identificando la estructura que es termodinámicamente estable en una membrana (por ejemplo, una única hélice alfa, un complejo estable de varias hélices alfa de transmembrana, un barril beta de transmembrana, una hélice beta, o cualquier otra estructura que sea termodinámicamente estable en una membrana). Una vez identificada, la región TM/CT de la proteína de superficie trimérica de virus puede reemplazarse con la transmembrana y la cola citoplasmática que se obtienen de un virus de influenza como se describe a continuación.

La VLP quimérica de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención, comprende una proteína de superficie trimérica vírica de la cual se reemplazan el dominio transmembrana y el dominio de cola citoplasmática (TM/CT) por el TM/CT obtenido de una HA de influenza. La proteína de superficie trimérica de virus es heteróloga con respecto al TM/CT. La proteína de superficie trimérica de virus, o fragmento de la misma, puede obtenerse, sin limitaciones, de virus de la familia Retroviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Poxviridae o Filoviridae. La proteína de superficie trimérica vírica puede obtenerse, por ejemplo, del género Lentivirus, Lyssavirus, Coronavirus o Ebolavirus. La proteína de superficie trimérica de virus puede obtenerse, por ejemplo, pero sin limitación, del VIH, virus de la rabia, VZV, RSV, virus de SARS, virus del Ébola, sarampión,

papera, varicela, Cytomegalovirus, Ébola/Filovirus, virus del Herpes, virus Epstein-Barr o viruela. La proteína de superficie trimérica de virus puede ser, por ejemplo, una proteína de superficie trimérica y en su forma nativa puede comprender un dominio transmembrana/cola citoplasmática, por ejemplo, pero sin limitación:

- 5 a. Proteína F (paramyxoviridae: RSV, sarampión, papera, enfermedad de Newcastle)
- b. Proteína S (coronaviridae: SARS);
- c. Proteína env (retroviridae: VIH);
- d. Proteína G (rhabdoviridae: rabia);
- 10 e. glicoproteínas de envoltura, tales como E, B, C, I, H (herpesviridae: VZV, cytomegalovirus, virus del herpes, virus Epstein-barr);
- f. Glicoproteínas GP (filoviridae: ébola, marburg);
- g. Hemaglutinina (poxviridae: virus de la viruela, vaccinia virus).

Los ejemplos no limitantes de varias proteínas de superficie triméricas víricas que pueden usarse de acuerdo con la presente invención se describen con más detalle a continuación.

VIH

La presente invención proporciona VLP que comprenden una proteína de inmunodeficiencia humana (VIH) quimérica, y métodos para producir VLP de VIH quiméricas, comprendiendo la proteína quimérica de VIH una proteína de fusión con, por ejemplo, una proteína Env de VIH y una porción de una hemaglutinina de influenza (HA), tal como el dominio transmembrana y el dominio de cola citosólica (TM/CT).

La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína quimérica de VIH ligada operativamente a una región reguladora activa en una planta.

Además, la presente invención proporciona un método para producir VLP quiméricas de VIH en una planta. El método implica la introducción de un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica de VIH ligada operativamente a una región reguladora activa en la planta, en la planta, o una porción de la planta, e incubar la planta o una porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo las VLP quiméricas de VIH.

La presente invención proporciona además una VLP que comprende una proteína quimérica de VIH. La VLP puede producirse por el método que se proporciona por la presente invención.

Virus de la rabia

La presente invención también proporciona VLP que comprenden una proteína del virus de la rabia quimérica, y métodos para producir VLP de la rabia quiméricas, comprendiendo la proteína quimérica de la rabia una proteína de fusión con, por ejemplo, una proteína G de la rabia y una porción de una hemaglutinina de influenza (HA), tal como el dominio transmembrana y el dominio de cola citosólica (TM/CT).

La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína quimérica del virus de la rabia ligada operativamente a una región reguladora activa en una planta.

Además, la presente invención proporciona un método para producir VLP quiméricas del virus de la rabia en una planta. El método implica la introducción de un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica del virus de la rabia ligada operativamente a una región reguladora activa en la planta, en la planta, o una porción de la planta, e incubar la planta o una porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo las VLP quiméricas del virus de la rabia.

La presente invención proporciona además una VLP que comprende una proteína quimérica del virus de la rabia. La VLP puede producirse por el método que se proporciona por la presente invención.

VZV

La presente invención también se refiere a VLP que comprenden una proteína del virus varicela zóster (VZV) quimérica, y métodos para producir VLP de VZV quiméricas, comprendiendo la proteína quimérica de VZV una proteína de fusión con, por ejemplo, una glicoproteína E de VZV y una porción de una hemaglutinina de influenza

(HA), tal como el dominio transmembrana y el dominio de cola citosólica (TM/CT).

La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína quimérica de VZV ligada operativamente a una región reguladora activa en una planta.

5 Además, la presente invención proporciona un método para producir VLP quiméricas de VZV en una planta. El método implica la introducción de un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica de VZV ligada operativamente a una región reguladora activa en la planta, en la planta, o una porción de la planta, e incubar la planta o una porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo las VLP quiméricas de VZV.

La presente invención proporciona además una VLP que comprende una proteína quimérica de VZV. La VLP puede producirse por el método que se proporciona por la presente invención.

15 SARS

La presente invención también se refiere a VLP que comprenden una proteína quimérica del virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y métodos para producir VLP de SARS quiméricas, comprendiendo la proteína quimérica de SARS una proteína de fusión con, por ejemplo, una glicoproteína S de SARS y una porción de una hemaglutinina de influenza (HA), tal como el dominio transmembrana y el dominio de cola citosólica (TM/CT).

La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína quimérica de SARS ligada operativamente a una región reguladora activa en una planta.

25 Además, la presente invención proporciona un método para producir VLP quiméricas de SARS en una planta. El método implica la introducción de un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica del virus de SARS ligada operativamente a una región reguladora activa en la planta, en la planta, o una porción de la planta, e incubar la planta o una porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo las VLP quiméricas de SARS.

30 La presente invención proporciona además una VLP que comprende una proteína quimérica del virus de SARS. La VLP puede producirse por el método que se proporciona por la presente invención.

Ébola

35 La presente invención también se refiere a VLP que comprenden una proteína del virus del Ébola quimérica, y métodos para producir VLP del Ébola quiméricas, comprendiendo la proteína quimérica del Ébola una proteína de fusión con, por ejemplo, una glicoproteína de envoltura del virus del Ébola y una porción de una hemaglutinina de influenza (HA), tal como el dominio transmembrana y el dominio de cola citosólica (TM/CT).

40 La presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína quimérica del virus del Ébola ligada operativamente a una región reguladora activa en una planta.

45 Además, la presente invención proporciona un método para producir VLP quiméricas del Ébola en una planta. El método implica la introducción de un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica del virus del Ébola ligada operativamente a una región reguladora activa en la planta, en la planta, o una porción de la planta, e incubar la planta o una porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo las VLP quiméricas del virus del Ébola.

50 La presente invención proporciona además una VLP que comprende una proteína quimérica del virus del Ébola. La VLP puede producirse por el método que se proporciona por la presente invención.

Quimerización y formación de VLP

55 Tanto el virus de la estomatitis vesicular (un rhabdovirus como la rabia) como el virus Herpes Simplex (un virus herpesvirus como el virus varicela-zóster) brotan de una manera dependiente de VSP4 (Taylor et al. J. Virol 81: 13631-13639, 2007; Crump et al., J. Virol 81: 7380-7387, 2007). Dado que VSP4 interactúa con el dominio tardío de la proteína de matriz, esto sugiere que la proteína de matriz es necesaria para el brote y, como corolario, para la producción de la VLP. Sin embargo, como se describe en el presente documento, las VLP de la rabia y VZV pueden

producirse sin proteína de matriz cuando se reemplaza el dominio TM/CT por los de HA de influenza. Sin desear quedar ligado a la teoría, esto sugiere que la quimerización puede eliminar la dependencia de la co-expresión de proteínas de matriz para la formación de VLP para la rabia y VZV.

- 5 El ectodominio de la proteína de superficie trimérica vírica que se ha descrito anteriormente se fusiona a un dominio transmembrana y un dominio de cola citosólica (TM/CT), de manera que la proteína de superficie trimérica de virus sea heteróloga con respecto al TM/CT. El TM/CT puede ser un TM/CT de una hemaglutinina de influenza (HA), por ejemplo, el TM/CT de H5 o H3, por ejemplo, pero sin limitación, el subtipo A/Indonesia/5/05 (H5N1; "H5/Indo"; N.º de acceso a GenBank ABW06108.1), H5 A/Vietnam/1194/2004 (A-Vietnam; N.º de acceso a GenBank ACR48874.1),
 10 H5 A/Anhui/1/2005 (A-Anhui; N.º de acceso a GenBank ABD28180.1); H3 A/Brisbane/10/2007 ("H3/Bri"; N.º de acceso a GenBank ACI26318.1), H3 A/Wisconsin/67/2005(A-WCN; N.º de acceso a GenBank ABO37599.1). Los TM/CT de los límites de varias secuencias H3 y H5 se describen en el documento WO 2010/148511, Por ejemplo, lo que no se debe considerar limitante de la secuencia aminoacídica para TM/CT puede incluir:

15 H5 (A/Indonesia/05/2005) TM/CT (SEQ ID NO:41): QILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCNSGSLQCRICI
 H3 (A/Brisbane/10/2007) TM/CT (SEQ ID NO:42): DWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

y cualquier secuencia nucleotídica que codifique la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO:41 o 42.

- 20 Una secuencia de ácido nucleico específica a la que se hace referencia en la presente invención puede ser "sustancialmente homóloga" o "sustancialmente similar" a una secuencia, o una secuencia o un complemento de la secuencia que hibrida con una o más de una secuencia de nucleótidos como se define en el presente documento bajo condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente el 70 %, o más preferiblemente el 75 % de los nucleótidos coinciden
 25 en una longitud definida de la secuencia de nucleótidos, siempre que dichas secuencias homólogas exhiban una o más de una de las propiedades de la secuencia, o el producto codificado como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un ectodominio sustancialmente homólogo de una proteína de superficie trimérica de virus, fusionado a un dominio transmembrana y un dominio de cola citosólica obtenido de H3 o H5, un dominio transmembrana y de cola citosólica que es sustancialmente homólogo al TM/CT de H3 o H5 y fusionado al
 30 ectodominio de una proteína de superficie trimérica de virus, o tanto un TM/CT sustancialmente homólogo y un ectodominio sustancialmente homólogo de una proteína de superficie trimérica de virus, forman una VLP. El plegamiento correcto de la proteína quimérica puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación de VLP y la función. El plegamiento de una proteína puede estar influenciado por uno o más factores, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de la proteína, la abundancia relativa de la proteína, el
 35 grado de aglomeración intracelular, la disponibilidad de cofactores que pueden unirse o estar asociados transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada.

- Tal similitud de secuencia puede determinarse usando un programa de comparación de secuencias nucleotídicas, tal como el proporcionado en DNASIS (usando, por ejemplo, pero sin limitación, los siguientes parámetros: Penalización
 40 GAP 5, n.º de diagonales superiores 5, penalización GAP fija 10, k-tupla 2, hueco flotante 10 y tamaño de ventana 5). Sin embargo, otros métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien 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 por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y BLAST, disponibles a través del NIH), o mediante
 45 alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. 1995 complemento), o utilizando 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 exhiben al menos aproximadamente un 80 % y más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de similitud de secuencia sobre una longitud definida de la
 50 molécula.

- Un ejemplo de una de tales condiciones de hibridación rigurosas puede ser hibridación (de aproximadamente 16-20 horas) durante una noche en 4 x SSC a 65 °C seguido por lavado en 0,1 x SSC a 65 °C durante una hora, o 2 lavados en 0,1 x SSC a 65 °C cada 20 o 30 minutos. Como alternativa, una condición de hibridación rigurosa
 55 ejemplar podría ser durante una noche (16-20 horas) en formamida al 50 %, 4 x SSC a 42 °C seguido por lavado en 0,1 x SSC a 65 °C durante una hora, o 2 lavados en 0,1 x SSC a 65 °C durante 20 o 30 minutos, o durante una noche (16-20 horas), o hibridación en tampón de fosfato acuoso Church (SDS al 7 %, tampón NaPO₄ 0,5 M, pH 7,2, EDTA 10 mM) a 65 °C, con 2 lavados a 50 °C en 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno, o 2 lavados a 65 °C en 2 x SSC, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno para regiones de secuencia únicas.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico, una proteína quimérica, una proteína de fusión, una proteína vírica quimérica o una proteína de superficie trimérica vírica quimérica puede describirse como un "ácido nucleico quimérico" o una "secuencia nucleotídica quimérica". Por ejemplo, aunque no debe considerarse limitante, se puede describir una partícula pseudovírica que comprende una proteína quimérica de VIH, una proteína quimérica del virus de la rabia, una proteína quimérica de VZV, una proteína quimérica del SRAS o del virus del Ébola.

Por "proteína quimérica", o "polipéptido quimérico", también denominada proteína de fusión, se entiende una proteína o polipéptido que comprende secuencias aminoácídicas de dos o más de dos fuentes, por ejemplo, pero sin limitación, un ectodominio de una proteína de superficie trimérica vírica, o un fragmento de la misma, por ejemplo, una proteína F (por ejemplo, RSV, sarampión, paperas, enfermedad de Newcastle), proteína S (por ejemplo, SARS), proteína env (VIH), proteína G (rabia), glicoproteínas de envoltura, tales como E, B, C, I, H (VZV, citomegalovirus, herpesvirus, virus de Epstein-barr), glicoproteína GP (por ejemplo, ébola, marburg), hemaglutinina (por ejemplo virus variólico, virus vaccinia) y, por ejemplo, el TM/CT de HA, que se fusiona como un único polipéptido. La proteína quimérica o polipéptido puede incluir un péptido señal que es el mismo que, o heterólogo con, el resto del polipéptido o proteína.

La expresión "péptido señal" se conoce bien en la técnica y se refiere generalmente a una secuencia corta de aminoácidos (de aproximadamente 5-30 aminoácidos), encontrada generalmente en el extremo N de un polipéptido que puede dirigir la translocación del polipéptido recién traducido a un organelo particular, o facilitar el posicionamiento de dominios específicos de la cadena polipeptídica con respecto a otros. Como ejemplo no limitante, el péptido señal puede dirigirse a la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico y/o facilitar la colocación del dominio proximal del extremo N en relación con un dominio de anclaje a la membrana del polipéptido naciente para ayudar en la escisión y el plegamiento de la proteína madura, por ejemplo, aunque no debe considerarse limitante, una proteína HA madura.

Un péptido señal (SP) puede ser nativo de la proteína o proteína del virus, o un péptido señal puede ser heterólogo con respecto a la secuencia primaria de la proteína o proteína vírica que se expresa. Una proteína o proteína vírica puede comprender un péptido señal de un primer tipo, subtipo o cepa de influenza con el equilibrio de HA de uno o más de un tipo, subtipo o cepa de influenza diferente. Por ejemplo, el péptido señal nativo de los subtipos B de HA H1, H3, H5, H6, H7, H9 o tipo B de influenza puede usarse para expresar la proteína vírica quimérica en un sistema vegetal. En algunas realizaciones de la invención, el SP puede ser influenza de tipo B, H1, H3 o H5; o del subtipo H1/Bri, H1/NC, H5/Indo, H3/Bri o B/Flo. En alguna realización, el SP puede ser de proteína Env de VIH, proteína G de la rabia, glicoproteína E de VZV, glicoproteína S de SARS o glicoproteína de envoltura de virus del Ébola.

Un péptido señal también puede ser no nativo, por ejemplo, a partir de una proteína, proteína vírica, una proteína de superficie trimérica de virus o hemaglutinina de un virus distinto de la proteína de superficie trimérica vírica, o de un polipéptido vegetal, animal o bacteriano. Un ejemplo no limitante de un péptido señal que puede usarse es el de la proteína de alfalfa disulfuro isomerasa (PDI SP, nucleótidos 32-103 con n.º de Acceso Z11499).

Por lo tanto, la presente invención proporciona una proteína vírica quimérica que comprende un péptido señal nativo o no nativo, y ácidos nucleicos que codifican tales proteínas víricas quiméricas.

El plegamiento correcto de la proteína vírica quimérica expresada puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación de VLP, la función de la proteína vírica quimérica y el reconocimiento de la proteína vírica quimérica por un anticuerpo, entre otras características. El plegamiento y la acumulación de una proteína puede estar influenciado por uno o más factores, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de la proteína, la abundancia relativa de la proteína, el grado de aglomeración intracelular, el pH en un compartimento celular, la disponibilidad de cofactores que pueden unirse o estar asociados transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada, la presencia de una o más proteínas chaperona, o similares.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) o proteínas de estrés son ejemplos de proteínas chaperonas, que pueden participar en diversos procesos celulares incluyendo síntesis de proteínas, tráfico intracelular, prevención de plegado erróneo, prevención de agregación de proteínas, ensamblaje y desmontaje de complejos de proteínas, plegamiento de proteínas, y disgregación de proteínas. Los ejemplos de tales proteínas chaperonas incluyen, pero sin limitación, Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, ciclofilinas, ClpP, GrpE, ubiquitina, calnexina, y proteína disulfuro isomerasas (véase, por ejemplo, Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25: 59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27: 437-496

(1993); Patente de Estados Unidos n.º 5.232.833). Como se describe en el presente documento, las proteínas chaperonas, por ejemplo, pero sin limitación, Hsp40 y Hsp70, pueden usarse para asegurar el plegado de una proteína vírica quimérica.

- 5 Los ejemplos de Hsp70 incluyen Hsp72 y Hsc73 de células de mamífero, DnaK de bacterias, particularmente micobacterias tales como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (tales como Bacille-Calmette Guérin: a la que se hace referencia en el presente documento como Hsp71). DnaK de *Escherichia coli*, levadura y otros procariotas, y BiP y Grp78 de eucariotas, tales como *A. thaliana* (Lin et al. 2001 (Cell Stress and Chaperones 6: 201-208). Un ejemplo particular de una Hsp70 es *A. thaliana* Hsp70 (codificada por Genbank ref: 10 AY120747.1). La Hsp70 es capaz de unirse específicamente a ATP, así como a polipéptidos y péptidos desplegados, participando así en el plegamiento y despliegue de proteínas, así como en el ensamblaje y desensamblado de complejos de proteínas.

- 15 Los ejemplos de Hsp40 incluyen DnaJ de procariotas tales como *E. coli* y *Mycobacterium* y HSPJ1, HDJ1 y Hsp40 de eucariotas, tales como alfalfa (Frugis et al., 1999. Plant Molecular Biology 40: 397-408). Un ejemplo particular de una Hsp40 es *M. sativa* MsJ1 (Genbank ref: AJ000995.1). Hsp40 desempeña un papel como una chaperona molecular en el plegamiento de proteínas, termotolerancia y replicación del ADN, entre otras actividades celulares.

- Entre Hsps, Hsp70 y su co-chaperona, Hsp40, están implicados en la estabilización de polipéptidos de traducción y recién sintetizados antes de que la síntesis esté completa. Sin desear quedar ligado a la teoría, Hsp40 se une a los 20 parches hidrófobos de polipéptidos desplegados (nacientes o recién transferidos), facilitando así la interacción del complejo Hsp70-ATP con el polipéptido. La hidrólisis de ATP conduce a la formación de un complejo estable entre el polipéptido, Hsp70 y ADP, y la liberación de Hsp40. La asociación del complejo Hsp70-ADP con los parches hidrófobos del polipéptido evita su interacción con otros parches hidrófobos, evitando el plegamiento incorrecto y la 25 formación de agregados con otras proteínas (revisado en Hartl, FU. 1996. Nature 381: 571-579).

- Las proteínas chaperonas nativas pueden ser capaces de facilitar el plegamiento correcto de niveles bajos de proteína recombinante, pero a medida que aumentan los niveles de expresión, la abundancia de chaperonas nativas puede convertirse en un factor limitante. Los altos niveles de expresión de la proteína vírica quimérica en las hojas 30 agroinfiltradas pueden conducir a la acumulación de la proteína vírica quimérica en el citosol, y la coexpresión de una o más proteínas chaperonas tales como Hsp70, Hsp40, o tanto Hsp70 como Hsp40 pueden reducir el nivel de proteínas mal plegadas o agregadas, y aumentar el número de proteínas que presentan características estructurales terciarias y cuaternarias que permiten la formación de partículas pseudovíricas.

- 35 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para producir VLP de proteína vírica quimérica en una planta, en el que un primer ácido nucleico que codifica una proteína vírica quimérica se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una chaperona. El primer y segundo ácidos nucleicos pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse en la planta secuencialmente.

- 40 Las VLP quiméricas producidas a partir de proteínas derivadas de virus, de acuerdo con la presente invención, no comprenden la matriz vírica o la proteína núcleo. Una proteína de matriz vírica es una proteína que organiza y mantiene la estructura del virión. Las proteínas de matriz víricas normalmente interactúan directamente con las membranas celulares y pueden estar implicadas en el proceso de brotación. Las proteínas núcleo víricas son proteínas que forman parte de la nucleocápside y típicamente están directamente asociadas con el ácido nucleico 45 vírico. Los ejemplos de proteínas de matriz o núcleo víricas son las proteínas gag M1, RSV, M y retrovirus de influenza. Se sabe que la proteína M1 se une al ARN (Wakefield L., y Brownlee G.G., Nucl Acids res 11: 8569-8580, 1989), que es un contaminante de la preparación de VLP. La presencia de ARN no es deseada cuando se obtiene la aprobación reguladora para el producto de VLP quimérica, por lo tanto, puede ser ventajosa una preparación quimérica de VLP carente de ARN.

- 50 El uso de las expresiones "región reguladora", "elemento regulador" o "promotor" en la presente solicitud se refiere a una porción de ácido nucleico típicamente, pero no siempre, aguas arriba de la región codificante de la proteína de un gen, que puede estar compuesta por ADN o ARN, o tanto ADN como ARN. Cuando una región reguladora está activa, y en asociación operativa, u operativamente ligada, con un gen de interés, esto puede dar como resultado la 55 expresión del gen de interés. Un elemento regulador puede ser capaz de mediar la especificidad del órgano, o controlar el desarrollo o activación del gen temporal. Una "región reguladora" puede incluir elementos promotores, elementos promotores del núcleo que muestran una actividad promotora inicial, elementos que pueden inducirse en respuesta a un estímulo externo, elementos que median la actividad promotora, tales como elementos reguladores negativos o potenciadores transcripcionales. La "región reguladora", como se usa en el presente documento,

también puede incluir elementos que están activos después de la transcripción, por ejemplo, elementos reguladores que modulan la expresión génica, tales como potenciadores traduccionales y transcripcionales, represores traduccionales y transcripcionales, secuencias de activación aguas arriba, y determinantes de inestabilidad de ARNm. Varios de estos últimos elementos pueden localizarse próximos a la región codificante.

- 5 En el contexto de esta divulgación, la expresión "elemento regulador" o "región reguladora" se refiere típicamente a una secuencia de ADN, normalmente, pero no siempre, aguas arriba (5') con respecto a la secuencia codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante proporcionando el reconocimiento de la ARN polimerasa y/u otros factores requeridos para iniciar la transcripción en un sitio particular. Sin embargo, debe
- 10 entenderse que otras secuencias de nucleótidos, ubicadas dentro de los intrones, o 3' de la secuencia, pueden también contribuir a la regulación de expresión de una región codificante de interés. Un ejemplo de un elemento regulador que proporciona el reconocimiento de la ARN polimerasa u otros factores de transcripción para asegurar el inicio en un sitio particular es un elemento promotor. La mayoría, aunque no todos los elementos promotores eucariotas contienen una caja TATA, una secuencia de ácido nucleico conservada que consta de pares de bases de
- 15 nucleótidos de adenosina y timidina normalmente situados aproximadamente 25 pares de bases aguas arriba de un sitio de inicio de la transcripción. Un elemento promotor comprende un elemento promotor inicial, responsable del inicio de la transcripción, así como otros elementos reguladores (como se han enumerado anteriormente) que modifican la expresión génica.
- 20 Existen varios tipos de regiones reguladoras, incluyendo aquellas que se regulan con respecto al desarrollo, inducibles o constitutivas. Una región reguladora que se regula con respecto al desarrollo, o controla la expresión diferencial de un gen bajo su control, se activa en ciertos órganos o tejidos de un órgano en momentos específicos durante el desarrollo de ese órgano o tejido. Sin embargo, algunas regiones reguladoras que se regulan con respecto al desarrollo pueden estar activas preferiblemente en ciertos órganos o tejidos en fases de desarrollo
- 25 específicas, también pueden estar activas de una manera regulada con respecto al desarrollo, o a un nivel basal también en otros órganos o tejidos en la planta. Los ejemplos de regiones reguladoras específicas de tejido, por ejemplo, véase específicas de una región reguladora, incluyen el promotor de napina, y el promotor de cruciferina (Rask et al., 1998, J. Plant Physiol. 152: 595-599; Bilodeau et al., 1994, Plant Cell 14: 125-130). Un ejemplo de un promotor específico de la hoja incluye el promotor de plastocianina (véase, el documento US 7.125.978).
- 30 Una región reguladora inducible es aquella que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias o genes de ADN en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias o genes de ADN no serán transcritos. Típicamente, el factor de proteína que se une específicamente a una región reguladora inducible para activar la transcripción puede presentarse en una forma activa, que es luego directa o indirectamente
- 35 convertida en la forma activa por el inductor. Sin embargo, el factor de proteína también puede estar ausente. 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 mediante la acción de un patógeno o agente infeccioso tal como un virus. Una célula vegetal que contiene una región reguladora inducible puede ser expuesta a un inductor aplicando externamente el inductor a la
- 40 célula o planta por ejemplo por aspersión, riego, calentamiento o métodos similares. Los elementos reguladores inducibles pueden derivarse ya sea de genes de la planta o que no son de la planta (por ejemplo, Gatz, C. y Lenk, L.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358; los ejemplos de promotores inducibles potenciales incluyen, pero sin limitación, un promotor inducible por tetraciclina (Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89-108; un promotor inducible por esteroides (Aoyama, T. y Chua, N.H., 1997, Plant 1, 2, 397-404; y un promotor inducible
- 45 por etanol (Salter, M.G., et al, 1998, Plant Journal 16, 127-132; Caddick, M.X., et al, 1998, Nature Biotech. 16, 177-180, genes IB6 y CK11 inducibles por citoquinina (Brandstatter, I. y Kieber, J., 1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982-985; y el elemento inducible por auxina, DR5 (Ulmasov, T., et al., 1997, Plant Cell 9, 1963-1971;).
- 50 Una región reguladora constitutiva dirige la expresión de un gen a través de las diferentes partes de una planta y continuamente durante todo el desarrollo de la planta. Los ejemplos de elementos reguladores constitutivos conocidos incluyen promotores asociados con el transcrito CaMV 35S (Odell et al., 1985, Nature, 313: 810-812), los genes actina 1 de arroz (Zhang et al, 1991, Plant Cell, 3: 1155-1165), actina 2 (An et al., 1996, Plant J., 10: 107-121), o tms 2 (documento U.S. 5.428.147, y triosefosfato isomerasa 1 (Xu et al., 1994, Plant Physiol. 106: 459-467),
- 55 el gen de ubiquitina 1 de maíz (Cornejo et al, 1993, Plant Mol. Biol. 29: 637-646), los genes de *Arabidopsis* ubiquitina 1 y 6 (Holtorf et al, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 637-646), y el gen del factor 4A de inicio de la traducción del tabaco (Mandel et al, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 995-1004).

El término "constitutivo" como se usa en el presente documento, no necesariamente indica que un gen bajo el

control de la región reguladora constitutiva se exprese al mismo nivel en todos los tipos de células, sino que el gen se expresa en un amplio rango de tipos celulares aún cuando a menudo se observa una variación en abundancia. Los elementos reguladores constitutivos pueden estar acoplados con otras secuencias para mejorar adicionalmente la transcripción y/o traducción de la secuencia de nucleótidos a la que están unidos operativamente. Por ejemplo, el sistema CPMV-HT se deriva de las regiones no traducidas del virus del mosaico del caupí (CPMV) y demuestra una traducción mejorada de la secuencia codificante asociada. Por "nativo" se entiende que la secuencia de ácido nucleico o aminoácido es de origen natural, o "tipo silvestre". Por "ligada operativamente" significa que las secuencias particulares, por ejemplo un elemento regulador y una región codificante de interés, interactúan directa o indirectamente para realizar una función pretendida, tal como la mediación o modulación de la expresión génica. La interacción de secuencias ligadas operativamente puede, por ejemplo, medirse por proteínas que interactúan con las secuencias ligadas operativamente.

La proteína o polipéptido quimérico puede expresarse en un sistema de expresión que comprende un sistema de expresión basado en virus, ADN o ARN, por ejemplo, pero sin limitación, un casete de expresión basado en comovirus y un elemento de amplificación basado en geminivirus.

El sistema de expresión como se describe en el presente documento, comprende un casete de expresión basado en un virus bipartita, o un virus con un genoma bipartita. Por ejemplo, los presentes virus bipartitas pueden ser de la familia de los Comoviridae. Los géneros de la familia de los Comoviridae incluyen Comovirus, Nepovirus, Fabavirus, Chervavirus y Sadwavirus. Los Comovirus incluyen virus del mosaico del caupí (CPMV), virus del mosaico grave del caupí (CPSMV), virus del mosaico de la calabaza (SqMV), virus del moteado del trébol rojo (RCMV), virus del moteado de la vaina del frijol (BPMV), virus del mosaico del nabo (TuRSV), virus del mosaico verdadero del haba (BBtMV), virus de la mancha del haba (BBSV), virus del mosaico del rábano (RaMV). Los ejemplos de secuencias de ARN-2 de comovirus que comprenden elementos potenciadores que pueden ser útiles para diversos aspectos de la invención incluyen, pero sin limitación: ARN-2 de CPMV (n.º de Acceso al GenBank NC_003550), ARN-2 de RCMV (n.º de Acceso al GenBank NC_003738), ARN-2 de BPMV (n.º de Acceso al GenBank NC_003495), ARN-2 de CPSMV (n.º de acceso al GenBank NC_003544), ARN-2 de SqMV (GenBank n.º de acceso NC_003800), ARN-2 de TuRSV (n.º de Acceso al GenBank NC_013219.1), ARN-2 de BBtMV (n.º de Acceso al GenBank GU810904), ARN-2 de BBSV (n.º de Acceso al GenBank FJ028650), RaMV (n.º de Acceso al GenBank NC_003800).

Los segmentos del genoma de ARN como vírico bipartita se denominan como ARN-1 y ARN-2. ARN-1 codifica las proteínas implicadas en la replicación, mientras que ARN-2 codifica las proteínas necesarias para un movimiento célula a célula en las dos proteínas cápside. Puede usarse cualquier casete a base de comovirus adecuado, incluyendo, CPMV, CPSMV, SqMV, RCMV o BPMV, por ejemplo, el casete de expresión puede basarse en CPMV.

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

Los sistemas de expresión también pueden comprender elementos de amplificación de un geminivirus, por ejemplo, un elemento de amplificación del virus del enanismo amarillo del frijol (BeYDV). BeYDV pertenece al género de Mastrevirus adaptado a las plantas dicotiledóneas. BeYDV es un monopartita que tiene un genoma de ADN circular monocatenario y puede replicarse con números de copias muy elevados mediante un mecanismo en círculo rodante. Los sistemas de vectores de replicón de ADN derivado de BeYDV se han usado para una rápida producción de proteínas de alto rendimiento en plantas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "elementos de amplificación" se refiere a un segmento de ácido nucleico que comprende al menos una porción de una o más regiones intergénicas largas (LIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en el presente documento, "región intergénica larga" se refiere a una región de una región intergénica larga que contiene un sitio de unión rep capaz de mediar la escisión y la replicación por una proteína Rep de geminivirus. En algunos aspectos, el segmento de ácido nucleico que comprende una o más LIR, puede comprender además una región intergénica corta (SIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en el presente documento, la "región intergénica corta" se refiere a la cadena complementaria (la IR corta (SIR) de un Mastrevirus). Cualquier elemento de amplificación derivado de geminivirus adecuado puede usarse en el presente documento. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2000/20557; WO2010/025285; Zhang X. et al. (2005, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 93, 271-279), Huang Z. et al. (2009, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 103, 706-714), Huang Z. et al. (2009, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 106, 9-17);

La proteína quimérica o polipéptido quimérico puede producirse como un transcrito a partir de una secuencia de

nucleótidos quimérica, y la proteína quimérica o polipéptido quimérico pueden escindirse después de la síntesis y, según se requiera, asociarse para formar una proteína multimérica. Por lo tanto, una proteína quimérica o un polipéptido quimérico también incluye una proteína o polipéptido que comprende subunidades que están asociadas a través de puentes disulfuro (es decir, una proteína multimérica). Por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende secuencias aminoacídicas de dos o más de dos fuentes puede procesarse en subunidades, y las subunidades pueden asociarse a través de puentes disulfuro para producir una proteína quimérica o un polipéptido quimérico.

La proteína vírica quimérica de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención comprende un dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM/CT) de una HA de influenza. El TM/CT puede ser el TM/CT nativo de HA de cualquier tipo, subtipo de virus de influenza, incluyendo, por ejemplo, los tipos y subtipos B, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Los ejemplos no limitantes de tipos y subtipos H1, H3, H5 o B incluyen el subtipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), el subtipo H1 A/California/04/09 (H1N1), el subtipo A/Indonesia/5/05 (H5N1), A/Brisbane/59/2007, B/Florida/4/2006, y H3 A/Brisbane/10/2007 (véanse, por ejemplo, los documentos WO2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/003235). Además, el TM/CT puede ser cualquiera de los TM/CT de HA en los que se han suprimido 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o sobre los que se ha añadido cualquier clase de secuencia espaciadora o enlazadora de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

Preferiblemente, el TM/CT de H5 o H3, por ejemplo, pero sin limitación, el subtipo A/Indonesia/5/05 (H5N1; "H5/Indo"; N.º de acceso a GenBank ABW06108.1), H5 A/Vietnam/1194/2004 (A-Vietnam; N.º de acceso a GenBank ACR48874.1), H5 A/Anhui/1/2005 (A-Anhui; N.º de acceso a GenBank ABD28180.1); H3 A/Brisbane/10/2007 ("H3/Bri"; N.º de acceso a GenBank ACI26318.1), H3 A/Wisconsin/67/2005(A-WCN; N.º de acceso a GenBank ABO37599.1). Los dominios TM/CT de los límites de varias secuencias de H3 y H5 se describen en el documento WO 2010/148511. Los ejemplos no limitantes de secuencias aminoacídicas para el TM/CT incluyen la SEQ ID NO:41 y 42, y cualquier secuencia nucleotídica que codifique la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO:41 o 42.

La variación de aminoácidos se tolera en hemaglutinina de virus de influenza. Dicha variación proporciona nuevas cepas que se están identificando continuamente. La infectividad entre las nuevas cepas puede variar. Sin embargo, se mantiene la formación de trímeros de hemaglutinina, que posteriormente forman VLP. La presente invención, por lo tanto, proporciona una proteína vírica quimérica que comprende una secuencia aminoacídica de hemaglutinina, o un ácido nucleico que codifica una proteína vírica quimérica que comprende una secuencia aminoacídica de hemaglutinina, que forma VLP en una planta, e incluye secuencias conocidas y secuencias de HA variantes que pueden desarrollarse.

La expresión "partícula pseudovírica" (VLP), o "partículas pseudovíricas" o "VLP" se refiere a estructuras que se auto-ensamblan y comprenden proteínas estructurales tales como una proteína vírica quimérica. Las VLP y las VLP quiméricas generalmente son morfológicamente y antigénicamente similares a los viriones producidos en una infección, pero carecen de información genética suficiente para replicarse y, por lo tanto, no son infecciosas. Las VLP y las VLP quiméricas pueden producirse en células huésped adecuadas, incluyendo células huésped vegetales. Después de la extracción de la célula huésped y tras el aislamiento y la purificación adicional en las condiciones adecuadas, las VLP y las VLP quiméricas se pueden purificar como estructuras intactas.

Las VLP de la presente invención pueden producirse en una célula huésped que se caracteriza por carecer de la capacidad de sialilar proteínas, por ejemplo por ejemplo, una célula vegetal, una célula de insecto, hongos, y otros organismos, incluyendo esponja, coelenterata, anélidos, artrópodos, moluscos, nematelmintos, troquelminos, platelmintos, quetognatos, tentaculados, clamidia, espiroquetas, bacterias gram positivas, cianobacterias, arqueobacterias, o similares. Véanse, por ejemplo, Gupta et al., 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 370-372; Toukach et al., 2007. *Nucleic Acids Research* 35: D280-D286; Nakahara et al., 2008. *Nucleic Acids Research* 36: D368-D371.

La invención también proporciona VLP quiméricas que obtienen una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula, en la que se expresan las VLP quiméricas. Por ejemplo, si el virus quimérico se expresa en un sistema basado en planta, la VLP quimérica resultante puede obtener una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula vegetal.

Generalmente, el término "lípidos" se refiere a las moléculas de origen natural y solubles en grasa (lipófilas). Una VLP quimérica producida en una planta de acuerdo con algunos aspectos de la invención puede complejarse con lípidos obtenidos de plantas. Los lípidos obtenidos de plantas pueden estar en forma de una bicapa lipídica, y pueden comprender además una envoltura que rodea la VLP. Los lípidos obtenidos de plantas pueden comprender componentes lipídicos de la membrana plasmática de la planta, donde la VLP se produce, incluyendo, fosfolípidos,

tri, di y monoglicéridos, así como un esteroles soluble en grasa o metabolitos que comprenden esteroides. Los ejemplos incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol, fosfatidilserina, glicoesfingolípidos, fitoesteroides o una combinación de los mismos. Un lípido derivado de plantas puede denominarse, como alternativa, como un "lípido vegetal". Los ejemplos de fitoesteroides incluyen campesterol, estigmasterol, ergosterol, 5 brasicasterol, delta-7-estigmasterol, delta-7-avenasterol, daunoesterol, sitoesterol, 24-metilcolesterol, colesterol o beta-sitoesterol - véase, por ejemplo, Mongrand et al., 2004. Como entenderá un experto en la técnica, la composición lipídica de la membrana plasmática de una célula puede variar con el cultivo o las condiciones de crecimiento de la célula u organismo del que se obtiene la célula. En general, el beta-sitoesterol es el fitoesterol más abundante.

10

Las membranas celulares comprenden generalmente bicapas lipídicas, así como proteínas para diversas funciones. Las concentraciones localizadas de lípidos particulares pueden encontrarse en la bicapa lipídica, denominada como "balsas lipídicas". Estos microdominios de balsas lipídicas pueden estar enriquecidos con esfingolípidos y esteroides. Sin desear quedar ligado a la teoría, las balsas lipídicas pueden tener funciones importantes en la endo y exocitosis, 15 la entrada o egreso de virus u otros agentes infecciosos, transducción de señal de inter-célula, la interacción con otros componentes estructurales de la célula u organismo, tales como matrices intracelulares y extracelulares.

15

La VLP producida dentro de una planta puede inducir una proteína vírica quimérica que comprende N-glicanos específicos de plantas. Por lo tanto, esta invención también proporciona una VLP que comprende proteínas víricas 20 quiméricas que tienen N-glicanos específicos de plantas.

20

Además, se conoce la modificación de N-glicano en las plantas (véase, por ejemplo, el documento U.S. 60/944.344; y pueden producirse proteínas víricas quiméricas que tengan N-glicanos modificados. Pueden obtenerse proteínas víricas quiméricas que comprendan un patrón de glicosilación modificado, por ejemplo, N-glicanos fucosilados, 25 xilosilados, o ambos, fucosilados y xilosilados reducidos, o pueden obtenerse proteínas víricas quiméricas que tengan un patrón de glicosilación modificado, en el que la proteína carece de fucosilación, xilosilación, o ambos, y comprende un aumento de galactosilación. Además, la modulación de modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la adición de galactosa terminal, puede dar como resultado una reducción de la fucosilación y la xilosilación de las proteínas de virus quiméricas expresadas en comparación con una planta de tipo silvestre que expresa 30 proteínas de virus quiméricas.

30

Por ejemplo, sin considerarse limitante, la síntesis de proteínas de virus quiméricas que tienen un patrón de glicosilación modificado se puede conseguir coexpresando la proteína del virus quimérica junto con una secuencia de nucleótidos que codifica beta-1,4galactosiltransferasa (GalT), por ejemplo, pero sin limitación, GalT de mamífero, 35 o GalT humano, pero también se puede usar GalT de otras fuentes. El dominio catalítico de GalT también se puede fusionar a un dominio CTS (es decir, la cola citoplásmica, el dominio transmembrana, la región del tallo) de N-acetilglucosaminil transferasa (GNT1), para producir una enzima híbrida GNT1-GalT, y la enzima híbrida puede co-expresarse con una proteína vírica quimérica. La proteína vírica quimérica también puede co-expresarse junto con una secuencia de nucleótidos que codifica N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), por ejemplo, pero sin 40 limitación, GnT-III de mamífero o GnT-III humano, también puede usarse GnT-III de otras fuentes. Adicionalmente, también se puede usar una enzima híbrida GNT1-GnT-III, que comprende el CTS de GNT1 fusionado a GnT-III.

40

Por lo tanto, la presente invención también proporciona VLP que comprenden una proteína vírica quimérica que tiene N-glicanos modificados.

45

Sin desear quedar ligado a la teoría, la presencia de N-glicanos vegetales en la proteína vírica quimérica puede estimular la respuesta inmune promoviendo la unión de la proteína vírica quimérica por las células que presentan antígeno. La estimulación de la respuesta inmune usando N-glicano vegetal se ha propuesto por Saint-Jore-Dupas et al. (2007). Además, la conformación de la VLP puede ser ventajosa para la presentación del antígeno, y potenciar el 50 efecto adyuvante de la VLP cuando se compleja con una capa lipídica derivada de plantas.

50

Las VLP pueden evaluarse para determinar la estructura y el tamaño, por ejemplo, por ensayo de hemaglutinación, microscopía electrónica, o por cromatografía de exclusión de tamaño.

55

Para la cromatografía de exclusión de tamaño, las proteínas solubles totales pueden extraerse del tejido vegetal mediante homogeneización (Polytron) del material vegetal triturado congelado en tampón de extracción, y el material insoluble se elimina por centrifugación. La precipitación con acetona o PEG enfriados con hielo también puede ser beneficiosa. La proteína soluble se cuantifica y el extracto pasa a través de una columna Sephacryl™, por ejemplo, una columna Sephacryl™ S500. Puede usarse Blue Dextran 2000 como un estándar de calibración. Después de la

cromatografía, las fracciones pueden analizarse adicionalmente mediante inmunotransferencia para determinar el complemento proteico de la fracción.

- La fracción separada puede ser, por ejemplo, un sobrenadante (si se centrifuga, sedimenta o precipita), o un filtrado (si se filtra), y se enriquecen con proteínas, o proteínas superestructurales, tales como, por ejemplo, estructuras en forma de roseta o partículas de mayor orden, de peso molecular más alto, tales como VLP. La fracción separada puede procesarse adicionalmente para aislar, purificar, concentrar, o una combinación de los mismos, las proteínas, o proteínas superestructurales, por ejemplo, mediante etapas de centrifugación adicionales, precipitación, etapas cromatográficas (por ejemplo, exclusión de tamaño, intercambio iónico, cromatografía de afinidad), filtración de flujo tangencial, o una combinación de los mismos. La presencia de proteínas purificadas, o proteínas de superestructura, puede ser confirmada, por ejemplo, mediante un análisis Western nativo o SDS-PAGE, utilizando un anticuerpo de detección apropiado, electroforesis capilar, microscopía electrónica, o cualquier otro método que será evidente para un experto en la técnica.
- 15 Los perfiles de elución pueden variar dependiendo de las condiciones de elución utilizadas. Las Figuras 7, 8O y 11B muestran un ejemplo de un perfil de elución de un análisis de cromatografía de exclusión de maños de un extracto de planta que comprende VLP quiméricas. En este caso, las VLP que comprenden proteínas de superficie triméricas quiméricas de VIH, G quiméricas de la rabia, y quiméricas del virus VZV, eluyen en el volumen hueco de la columna, las rosetas y las estructuras de alto peso molecular eluyen en aproximadamente las fracciones 13 a 14, y las de menor peso molecular, o la forma soluble de proteínas de superficie triméricas víricas quiméricas eluyen en fracciones de aproximadamente 15 a aproximadamente 17.

- Las VLP pueden purificarse o extraerse utilizando cualquier método adecuado, por ejemplo, extracción química o bioquímica. Las VLP son relativamente sensibles a la desecación, al calor, al pH, a los tensioactivos y a los detergentes. Por lo tanto, puede ser útil utilizar métodos que maximicen los rendimientos, minimicen la contaminación de la fracción de VLP con proteínas celulares, mantengan la integridad de las proteínas, o las VLP, y, cuando sea necesario, la envoltura o membrana lipídica asociada, métodos para aflojar la pared celular para liberar las proteínas, o VLP. Por ejemplo, se pueden usar métodos que producen protoplastos y/o esferoplastos (véase, por ejemplo, WO 2011/035422, para obtener VLP como se describe en el presente documento. La minimización o eliminación del uso de detergentes o tensioactivos tales como, por ejemplo, SDS o Triton X-100, puede ser beneficiosa para mejorar el rendimiento de la extracción de VLP. Las VLP pueden evaluarse después para determinar la estructura y tamaño, por ejemplo, por microscopía electrónica, o por cromatografía de exclusión de tamaños, como se ha mencionado anteriormente

- 35 La una o más de una construcción genética quimérica de la presente invención puede expresarse en cualquier huésped vegetal apropiado que se transforme por la secuencia nucleotídica, o construcciones, o vectores de la presente invención. Los ejemplos de huéspedes apropiados incluyen, pero sin limitación, cultivos agrícolas, incluyendo alfalfa, canola, *Brassica spp.*, maíz, *Nicotiana spp.*, alfalfa, patata, ginseng, guisante, avena, arroz, semilla de soja, trigo, cebada, girasol, algodón, y similares.

- 40 La una o más construcciones genéticas quiméricas de la presente invención pueden comprender además una región no traducida 3'. Una región no traducida 3' se refiere a esa porción de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualquier otra señal regulador capaz de realizar un procesamiento de ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente realizando la adición de pistas de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. Las señales de poliadenilación se reconocen comúnmente por la presencia de homología con respecto a la forma canónica 5' AATAAA-3', aunque las variaciones no son poco frecuentes. Los ejemplos no limitantes de regiones 3' apropiadas son las regiones no traducidas transcritas 3' que contienen una señal de poliadenilación de genes plasmídicos que inducen tumor (Ti) de *Agrobacterium*, tales como los genes de nopalina sintasa (gen Nos) y genes vegetales, tal como los genes de proteína de almacenamiento de soja, la subunidad pequeña del gen de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO; documento US 4.962.028; el promotor usado en la expresión de plastocianina, descrito en el documento US 7.125.978).

- Una o más de las construcciones genéticas quiméricas de la presente invención también pueden incluir 55 potenciadores adicionales, potenciadores de traducción o transcripción, según se requiera. Los potenciadores pueden situarse 5' o 3' con respecto a la secuencia que se transcribe. Las regiones potenciadoras se conocen bien por los expertos en la técnica, y pueden incluir el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. El codón de inicio, si está presente, deberá estar en fase con el marco de lectura ("dentro del marco") de la secuencia codificante para proporcionar una traducción correcta de la secuencia transcrita.

Las construcciones de la presente invención pueden introducirse en las células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de dichas técnicas véanse, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, 5 Academy Press, Nueva York VIII, págs. 421-463 (1988); Geier y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed. (1988); y Miki y Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2ª Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. Londres, págs. 561-579 (1997). Otros métodos incluyen la captación de ADN directa, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo, usando protoplastos, microinyección, microproyectiles o triquitas, e infiltración al vacío. Véanse, por ejemplo, Bilang, et al. (*Gene* 100: 247-250 (1991)), 10 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 y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu y Lomonosoff (*J Virol Meth.* 105:343-15 348, 2002), Pat. de Estados Unidos N.º 4.945.050; 5.036.006; y 5.100.792, Solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 08/438.666, presentada el 10 de mayo de 1995, y 07/951.715, presentada el 15 de septiembre de 1992).

Como se describe a continuación, pueden usarse métodos de expresión transitoria para expresar las construcciones de la presente invención (véase Liu y Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105: 343-348). Como 20 alternativa, puede usarse un método de expresión transitorio a base de vacío, como se describe por Kapila et al., 1997. Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, un método de Agro-inoculación o Agro-infiltración, infiltración con jeringa, sin embargo, también pueden usarse otros métodos transitorios como se ha indicado anteriormente. Con la Agro-inoculación, o Agro-infiltración, o infiltración por jeringa, una mezcla de Agrobacterias que comprende el ácido nucleico deseado entra en los espacios intercelulares de un tejido, por 25 ejemplo, las hojas, la porción aérea de la planta (incluyendo el tallo, hojas y flores), otra porción de la planta (tallo, raíz, flores), o la planta completa. Después de cruzar la epidermis, las copias de t-ADN se transfieren e infectan de Agrobacteria a las células. El t-ADN se transcribe de manera episomal y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en células infectadas, sin embargo, el pase de t-ADN dentro del núcleo es transitorio.

30 Para facilitar la identificación de células vegetales transformadas, las construcciones de esta invención pueden manipularse además para incluir marcadores seleccionables de plantas. Los marcadores seleccionables útiles incluyen enzimas que proporcionan resistencia a productos químicos tales como un antibiótico, por ejemplo, gentamicina, higromicina, canamicina, o herbicidas tales como fosfotricina, glifosato, clorosulfuro, y similares. De 35 manera similar, pueden usarse enzimas que proporcionan la producción de un compuesto que puede identificarse por un cambio de color, tal como GUS (beta-glucuronidasa), o luminiscencia, tal como luciferasa o GFP.

También se consideran parte de esta invención las plantas transgénicas, células vegetales o semillas que contienen la construcción del gen quimérico de la presente invención. Los métodos para regenerar las plantas completas a 40 partir de células vegetales también se conocen en la técnica. En general, las células vegetales transformadas se cultivan en un medio apropiado, que puede contener agentes selectivos tales como antibióticos, donde los marcadores seleccionados se usan para facilitar la identificación de células vegetales transformadas. Una vez que el callo se forma, la formación del brote puede fomentarse al emplear las hormonas vegetales apropiadas de acuerdo con métodos conocidos y los brotes se transfieren al medio de raíz para regeneración de las plantas. Después, las 45 plantas pueden usarse para establecer generaciones repetitivas, de semillas o usando técnicas de propagación vegetativa. Las plantas transgénicas también pueden generarse sin usar cultivos tisulares.

La presente invención desvela secuencias nucleotídicas:

50 Tabla 1. Lista de números de identificación de secuencias.

SEQ ID NO:	Descripción	Tabla/Figura
1	Secuencia de ácido nucleico consenso de ConS ΔCFI de VIH (Péptido señal nativo en negrita, los dominios nativos transmembrana y citosólicos están subrayados)	Figura 1 A
2	IF-Apal-SpPDI.c	Figura 1B

3	SpPDI-VIH gp145.r	Figura 1C
4	IF-SpPDI-gp145.c	Figura 1D
5	WtdTm-gp145.r	Figura 1E
6	Casete de expresión número 995, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. ConS ΔCFI de PDISP-VIH está subrayado.	Figura 1F
7	Secuencia aminoacídica de ConS ΔCFI de PDISP-VIH	Figura 1G
8	IF-H3dTm+gp145.r	Figura 2A
9	Gp145+H3dTm.c	Figura 2B
10	H3dTm.r	Figura 2C
11	Casete de expresión número 997, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. PDISP-VIH Con S ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT está subrayado.	Figura 2D
12	Secuencia aminoacídica de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT	Figura 2E
13	IF-H5dTm+gp145.r	Figura 3A
14	Gp145+H5dTm.c	Figura 3B
15	IF-H5dTm.r	Figura 3C
16	Casete de expresión número 999, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayada.	Figura 3D
17	Secuencia aminoacídica de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT	Figura 3E
18	Casete de expresión número 172, de XmaI (aguas arriba del promotor de plastocianina) a EcoRI (inmediatamente aguas abajo del terminador de plastocianina). La secuencia de ácido nucleico TBSV P19 está subrayada.	Figura 4A
19	Secuencia aminoacídica del supresor de silenciamiento P19 del TBSV	Figura 4B
20	IF-wtSp-VZVgE.c	Figura 10A
21	IF-H5dTm+VZVgE.r	Figura 10B
22	Gen gE de VZV sintetizado (correspondiente a nt 3477-5348 de número de acceso al Genbank AY013752.1)	Figura 10C
23	VZVgE+H5dTm.c	Figura 10D
24	Casete de expresión número 946, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). VZV gE-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT subrayado	Figura 10E
25	Secuencia aminoacídica de VZV gE- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT	Figura 10F
26	IF-wtSp-SARSGS.c	Figura 12B
27	IF-H5dTm+SARSGS.r	Figura 12C
28	Gen gS de SARS sintetizado (correspondiente a nt 21492-25259 de número de acceso al Genbank AY278741.1) (Péptido señal nativo en negrita, dominios transmembrana y	Figura 12D

	citosólico nativos subrayados)	
29	SARSGS+H5dTm.c	Figura 12E
30	Casete de expresión número 916, de Pacl (aguas arriba del promotor) a Ascl (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). SARS gS-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT subrayado	Figura 12F
31	Secuencia aminoacídica de SARS gS- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT	Figura 12G
32	IF-RabG-S2+4.c	Figura 8B
33	RabG+H5dTm.r	Figura 8C
34	Gen G Rab sintetizado (correspondiente a nt 3317-4891 de número de acceso al Genbank EF206707) (Péptido señal nativo en negrita, dominios transmembrana y citosólico nativos subrayados)	Figura 8D
35	IF-H5dTm.c	Figura 8E
36	Construcción 141 de t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). Sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de Plastocianina-P19-Plastocianina	Figura 8F
37	Casete de expresión número 1074 del promotor 2X35S al terminador de NOS. PDISP-Rab G -A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado.	Figura 8H
38	Secuencia aminoacídica de PDISP-Rab G- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT	Figura 8I
39	Construcción 144 de t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). Sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en BeYDV + replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de Plastocianina-P19-Plastocianina	Figura 8J
40	Casete de expresión número 1094 de derecha a izquierda de BeYDV LIR.PDISP-Rab G -A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado.	Figura 8L
41	H5 (A/Indonesia/05/2005) TM/CT: QILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI	
42	H3 (A/Brisbane/10/2007) TM/CT: DWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI	
43	IF-Opt_EboGP.s2+4c	Figura 13A
44	H5iTMCT+Opt_EboGP.r	Figura 13B
45	Gen GP sintetizado optimizado	Figura 13C
46	Opt_EboGP+H5iTMCT.c	Figura 13D
47	Construcción 1192	Figura 13F
48	Casete de expresión número 1366	Figura 13G
49	Secuencia aminoacídica de PDISP-GP del virus del Ébola Zaire 95-H5 TM+CT de A/Indonesia/5/2005	Figura 13 H

La presente invención se ilustrará en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

5

Construcciones

Tabla 2: Construcciones que comprenden secuencias que codifican la proteína del VIH

Sistema de expresión	Sistema de amplificación	Sp	5'	Proteína	3'	NptII (Ori tDNA)	Plasto-P19 (Ori tDNA)	N.º Const.
CPMV HT	-	WtSp	-	Gp145ΔCFI	wt TM+CT	L→R	-	994
CPMV HT	-	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	wt TM+CT	L→R	-	995
CPMV HT	-	WtSp	-	Gp145ΔCFI	H3 A/Bri TM+CT	L→R	-	996
CPMV HT	-	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H3 A/Bri TM+CT	L→R	-	997
CPMV HT	-	WtSp	-	Gp145ΔCFI	H5 A/Indo TM+CT	L→R	-	998
CPMV HT	-	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H5 A/Indo TM+CT	L→R	-	999
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	wt TM+CT	-	L→R	985
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H3 A/Bri TM+CT	-	L→R	987
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H5 A/Indo TM+CT	-	L→R	989

Tabla 3: Construcciones que comprenden secuencias que codifican una proteína del virus de la rabia

Sistema de expresión	Sistema de amplificación	Sp	5'	Proteína	3'	NptII (Ori tDNA)	Plasto-P19 (Ori tDNA)	N.º Const.
CPMV HT	-	wt SP	-	G de la rabia	-	-	L→R	1070
CPMV HT	-	Sp PDI	-	G de la rabia	-	-	L→R	1071
CPMV HT	BeYDV+rep	wt SP	-	G de la rabia	-	-	L→R	1090
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	G de la rabia	-	-	L→R	1091
CPMV HT	-	Sp PDI	-	G de la rabia	H5 A/Indo TM+CT	-	L→R	1074
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	G de la rabia	H5 A/Indo TM+CT	-	L→R	1094
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	G de la rabia (A447S)	-	-	L→R	1072
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	G de la rabia (A447S)	-	-	L→R	1092
CPMV HT	-	Sp PDI	-	G de la rabia (M44I+V392G)	-	-	L→R	1073

CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	G de la rabia (M44I+V392G)	-	-	L→R	1093
CPMV HT		Sp PDI	-	G de la rabia (M44I+V392G)	H5 A/Indo TM+CT	-	L→R	1075
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	G de la rabia (M44I+V392G)	H5 A/Indo TM+CT	-	L→R	1095

Tabla 4: Construcción que comprende secuencias que codifican la proteína de VZV

Sistema de expresión	Sistema de amplificación	Sp	5'	Proteína	3'	NptII (Ori Tdna)	Plasto-P19 (Ori tDNA)	N.º Const.
CPMV HT	-	WtSp	-	gE VZV	wt TM+CT	L→R		944
CPMV HT	-	Sp PDI	-	gE VZV	wt TM+CT	L→R	-	945
CPMV HT	-	WtSp	-	gE VZV	HS A/Indo TM+CT	L→R	-	946
CPMV HT	-	Sp PDI	-	gE VZV	HS A/Indo TM+CT	L→R	-	947

Tabla 5: Construcción que comprende secuencias que codifican la proteína de SARS

Sistema de expresión	Sistema de amplificación	Sp	5'	Proteína	3'	NptII (Ori tDNA)	Plasto-P19 (Ori tDNA)	N.º Const.
CPMV HT		WtSp	-	gS SARS	wt TM+CT	L→R		914
CPMV HT	-	Sp PDI	-	gS SARS	wt TM+CT	L→R	-	915
CPMV HT		WtSp	-	gS SARS	H5 A/Indo TM+CT	L→R	-	916
CPMV HT		Sp PDI	-	gS SARS	H5 A/Indo TM+CT	L→R	-	917

5

Ejemplo 1: Ensamblaje de casetes de expresión con proteína de VIH2X35S-CPMV HT-PDISP-VIH ConS ΔCFI-NOS (construcción número 995)

- 10 Una secuencia que codifica el péptido señal PDI de alfalfa condensado a ConS ΔCFI de VIH con dominio transmembrana y de cola citosólica nativo se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT como se indica a continuación. En primer lugar, la secuencia de ácido nucleico del gen ConS ΔCFI de VIH, que comprendía el péptido señal nativo y los dominios transmembrana y citoplasmáticos se sintetizó por GeneArt AG (Regensburg, Alemania) de acuerdo con las secuencias desveladas en Liao et al, (2006, Virology 353: 268-282). La secuencia de ácido
- 15 nucleico de ConS ΔCFI de VIH se presenta en la Figura 1A (SEQ ID NO: 1). El péptido señal de la proteína disulfuro isomerasa (PDISP) de alfalfa (nucleótidos 32-103; n.º de acceso Z11499) se unió al ConS ΔCFI de VIH por el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía PDISP se amplificó usando los cebadores IF-Apal-SpPDLc (Figura 1B, SEQ ID NO: 2) y SpPDI-VIH gp145.r (Figura 1C, SEQ ID NO: 3) con la construcción número 540 (véase
- 20 la Figura 52, SEQ ID NO: 61 del documento WO 2010/003225. que se incorpora en el presente documento por referencia, para la secuencia de construcción número 540) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía ConS ΔCFI sin el péptido señal nativo se amplificó usando los cebadores IF-SpPDI-gp145.c (Figura 1D, SEQ ID NO: 4) y WtdTm-gp145.r (Figura 1E, SEQ ID NO: 5) usando el segmento ConS ΔCFI sintetizado (Figura 1A, SEQ ID NO:

1) como plantilla. En una segunda ronda de PCR, se usaron los cebadores IF-Apal-SpPDI.c (Figura 1B, SEQ ID NO: 2) y WtdTm-gp145.r (Figura 1E, SEQ ID NO: 5) junto con ambos productos PCR de la primera ronda de PCR como plantilla. El producto PCR resultante se digirió con la enzima de restricción Apal y se clonó en una construcción 972 modificada digerida con Apal-Stul. El plásmido aceptor 972 modificado (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia original de construcción número 972) se trató para eliminar un sitio de restricción SbfI aguas arriba del promotor 2X35S. El sitio SbfI se eliminó mediante la digestión del plásmido 972 con SbfI, tratando el plásmido resultante con T4 ADN polimerasa para eliminar el 3' saliente y ligando de nuevo el plásmido tratado, dando como resultado el plásmido 972 modificado sin el sitio SbfI. A la construcción resultante se le dio el número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6). La secuencia aminoacídica de ConS ΔCFI de PDISP-VIH se presenta en la Figura 1G (SEQ ID NO: 7). La representación del plásmido 995 se presenta en la Figura 1H. Esta construcción no codifica una proteína M1.

2X35S-CPMV HT -PDISP-VIH ConS ΔCFI+ H3 A/Brisbane/10/2007 (TmD + cola citop.)-NOS (construcción número 997)

Una secuencia que codificaba el péptido señal PDI de la alfalfa fusionado a ConS ΔCFI VIH y a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H3 A/Brisbane/10/2007 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que comprendía ConS ΔCFI PDISP-VIH sin los dominios nativos transmembrana y citoplasmático se amplificó usando los cebadores IF-Apal-SpPDI.c (Figura 1B, SEQ ID NO: 2) e IF-H3dTm+gp145.r (Figura 2A, SEQ ID NO: 8), usando la construcción número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citosólico de H3 A/Brisbane/10/2007 se amplificó usando los cebadores Gp145+H3dTm.c (Figura 2B, SEQ ID NO: 9) y H3dTm.r (Figura 2C, SEQ ID NO: 10), usando la construcción número 776 (véase la Figura 60, SEQ ID NO: 69 del documento WO 2010/003225, para la secuencia de la construcción número 776) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-Apal-SpPDI.c (Figura 1B, SEQ ID NO: 2) y H3dTm.r (Figura 2C, SEQ ID NO: 10) como cebadores. El producto de la segunda PCR se digirió después con Apal y se clonó en la construcción número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6) digerido con las enzimas de restricción Apal y Stul. A la construcción resultante se le dio el número 997 (Figura 2D, SEQ ID NO: 11). La secuencia aminoacídica de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT se presenta en la Figura 2E (SEQ ID NO: 12). La representación del plásmido 997 se presenta en la Figura 2F. Esta construcción no codifica una proteína M1.

2X35S-CPMV HT-PDISP-VIH ConS ΔCFI-H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + cola citop.)-NOS (construcción número 999)

Una secuencia que codificaba el péptido señal PDI de la alfalfa fusionado a ConS ΔCFI de VIH y a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indonesia/5/2005 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT como se indica a continuación usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía ConS ΔCFI de PDISP-VIH sin los dominios transmembrana y citoplasmático nativos se amplificó usando los cebadores IF-Apal-SpPDI.c (Figura 1B, SEQ ID NO: 2) e IF-H5dTm+gp145.r (Figura 3A, SEQ ID NO: 13), usando la construcción número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 A/Indonesia/5/2005 se amplificó usando los cebadores Gp145+H5dTm.c (Figura 3B, SEQ ID NO: 15) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15), usando la construcción número 972 (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225 para la secuencia de construcción número 972) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-Apal-SpPDI.c (Figura 1B, SEQ ID NO: 2) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15) como cebadores. El producto de la segunda PCR se digirió después con Apal y se clonó en la construcción número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6) digerido con las enzimas de restricción Apal y Stul. A la construcción resultante se le dio el número 999 (Figura 3D, SEQ ID NO: 16). La secuencia aminoacídica de PDISP-VIH ConS ΔCFI- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT. TM+CT se presenta en la Figura 3E (SEQ ID NO: 17). La representación del plásmido 999 se presenta en la Figura 3F. Esta construcción no codifica una proteína M1.

Plastocianina-P19-plastocianina (construcción número 172)

Una secuencia que codificaba el supresor P19 de silenciamiento del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV) se clonó entre el promotor de plastocianina de la alfalfa y la 3'UTR y el terminador como se indica a continuación. La construcción número R472 (véase el documento WO 2010/003225 A1, para el ensamblaje y la

Figura 86 del documento WO 2010/003225 A1 para una representación del plásmido R472) se digirió con las enzimas de restricción DraIII (84 pares de bases aguas arriba del ATG inicial) y SacI (9 pares de bases aguas abajo del codón de terminación) para eliminar un fragmento que comprendía 84 pb del promotor de plastocianina de la alfalfa y la secuencia que codifica el supresor de silenciamiento P19 del TBSV. El fragmento resultante se clonó en la construcción 540 (véase el documento WO 2010/003225, para el ensamblaje y la Figura 6 de la misma patente para una representación del plásmido 540) digerido previamente con DraIII y SacI. A la construcción resultante se le dio el número 172 (SEQ ID NO: 4A, Figura 18). La secuencia aminoacídica de la proteína P19 de TBSV se presenta en la Figura 4B (SEQ ID NO: 19). Una representación del plásmido 172 se presenta en la Figura 4C.

10 Preparación de biomasa vegetal, inóculo, agroinfiltración

Las expresiones "biomasa" y "materia vegetal" como se usan en el presente documento, pretenden reflejar cualquier material obtenido a partir de una planta. La biomasa o materia vegetal pueden comprender una planta completa, tejido, células, o cualquier fracción de los mismos. Además, la biomasa o materia vegetal pueden comprender componentes vegetales intracelulares, componentes vegetales extracelulares, extractos líquidos o sólidos de plantas, o una combinación de los mismos. Además, la biomasa o materia vegetal pueden comprender plantas, células vegetales, tejido, un extracto líquido, o una combinación de los mismos, de hojas, tallos, flores, frutos, raíces de la planta o una combinación de los mismos. Una porción de una planta puede comprender materia vegetal o biomasa.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en llanos rellenados con un sustrato de musgo de turbera comercial. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperiodo 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales.

Las *Agrobacteria* transfectadas con cada construcción se dejaron crecer en un medio YEB complementado con ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de canamicina y 25 µg/ml de carbenicilina a pH 5,6, hasta que alcanzaron un OD₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 2,5 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 2-6 días hasta la cosecha. A menos que se especifique otra cosa, todas las infiltraciones se realizaron como co-infiltración con la cepa AGL1/R472 en una relación 1:1.

Las cepas de *A. tumefaciens* que comprenden las diversas construcciones como se describe en el presente documento se denominan usando el prefijo "AGL1". Por ejemplo, la construcción número 995 que comprende *A. tumefaciens* (véase la Figura 1H), se denomina "AGL1/995".

Cosecha de hojas y extracción de proteínas totales

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 °C y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra del material vegetal congelado-triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogenización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y estos extractos en bruto aclarados (sobrenadantes) se conservaron para su análisis.

50 Análisis de proteínas e inmunotransferencia

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

La inmunotransferencia se realizó por incubación con un anticuerpo primario anti-gp120 policlonal de cabra (Abcam,

ab21179) diluido 1:2500 en 2 µg/ml en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. La detección por quimioluminiscencia se realizó después de la incubación con anticuerpos secundarios anti-cabra de burro conjugados con peroxidasa (JIR 705-035-147), diluidos 1:10000 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation)

Ejemplo 2: Expresión de proteínas de envoltura de VIH nativas y quiméricas en plantas

ConS ΔCFI de VIH es una proteína de envoltura M consenso del grupo VIH con bucles variables acortados, delección del sitio de escisión, el dominio de fusión y una región inmunodominante en gp41. Se demostró que provocaba anticuerpos neutralizantes de subtipo cruzado de amplitud y nivel similares o mayores que las proteínas de envoltura de tipo silvestre en cobayas (Liao et al., Virology (2006) 353: 268-282).

La figura 5 presenta las construcciones usadas en este estudio. En la construcción número 995, la región codificante para el ConS ΔCFI VIH maduro (denominado más adelante como Env), que comprendía el TM/CT nativo, se puso bajo el control del sistema de expresión CPMV-HT. En las construcciones número 997 y 999, los dominios TM/CT de Env de VIH se reemplazaron por los de la hemaglutinina de influenza (HA) de A/Brisbane/10/2007 (H3N2) y A/Indonesia/05/2005 (H5N1), respectivamente. En todos los casos, un péptido señal de origen vegetal - procedente de la proteína de alfalfa disulfuro isomerasa (PDI) - reemplazó el péptido señal nativo de la proteína Env de VIH.

La producción de Env de VIH de las construcciones 995, 997 y 999 se comparó en plantas *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Los extractos de proteína de plantas infiltradas con AGL1/995, AGL1/997 y AGL1/999 se analizaron por transferencia Western, y el resultado se muestra en la Figura 6, donde los carriles 1 a 4 son controles positivos que contienen diversas cantidades de gp160 de VIH-1 recombinante (ab68171); carril 5, control negativo; carriles 6 a 8, proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/995; carriles 9 y 10, proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/997; carriles 11 y 12, proteínas extraídas de hojas infiltradas con AGL1/999.

Como se muestra en la Figura 6, la expresión de la Env nativa de VIH no pudo detectarse en las condiciones usadas para la detección, lo que confirma el bajo nivel de acumulación indicado previamente para la proteína Env de VIH en las plantas (Rybacki et al., 2010, Plant Biotechnology Journal 8: 620-637). Las formas quiméricas de Env, en las que los dominios TM/CT se reemplazaron por el de H3 de influenza (construcción # 997) o el de H5 (construcción #999), se acumularon a niveles mucho mayores que la forma nativa. Como se ha indicado anteriormente, las construcciones #997 y #999 no codifican una proteína M1.

Ejemplo 3 Ensamblaje de Env quimérica de VIH en partículas pseudovíricas

También se examinó la capacidad de la Env de VIH quimérica para ensamblarse en una VLP en una planta en ausencia de una proteína núcleo o matriz. Los extractos de proteína de AGL1/997 (Env/H3) y AGL1/999 (Env/H5) se sometieron a cromatografía de filtración en gel seguida del análisis de las fracciones de elución para determinar el contenido de Env usando anticuerpos anti-gp120 de cabra. La transferencia Western presentada en la Figura 7A muestra que para los extractos de plantas infiltradas con AGL1/999, el contenido de Env quimérica/H5 en la fracción de elución alcanza su máximo en las fracciones 7 a 10, lo que indica su ensamblaje en estructuras de peso molecular muy elevado de más de 2 millones de daltons. El examen del contenido de proteína relativo en las fracciones 7 a 18 muestra claramente que la gran mayoría de las proteínas huésped eluyeron en las fracciones de 11 a 18 (Figura 7B). Estos resultados muestran que Env/H5 se ensambla en estructuras de peso molecular alto de un tamaño más allá del peso molecular esperado del homotrímero. Se obtuvieron resultados similares para Env/H3 en las plantas infiltradas con AGL1/997. En conjunto, estos resultados demuestran que la Env/H5 quimérica de VIH se acumuló en un alto nivel en plantas agroinfiltradas y se ensambló en partículas pseudovíricas en ausencia de proteína núcleo o de matriz. Estos resultados también demuestran que la fusión de los dominios TM/CT de HA de influenza a los antígenos distintos de influenza es suficiente para ensamblar y liberar las VLP que presentan el antígeno diferente de influenza.

Ejemplo 4: Ensamblaje de casetes de expresión con proteína de la rabia

C-2X35S-CPMV HT-PDISP-glicoproteína G de la rabia (RabG)+H5 A/Indonesia/5/2005 en dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS (Construcción número 1074; Figura 8A, 8H).

Una secuencia que codificaba el ectodominio de glicoproteína G de la rabia (RabG) fusionado a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indonesia/5/2005 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-

HT-PDISP-NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina como se indica a continuación usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía el ectodominio G Rab sin el péptido señal nativo, los dominios transmembrana y citoplasmático, se amplificó usando los cebadores IF-RabG-S2+4.c (Figura 8B, SEQ ID NO:32) y RabG+H5dTm.r (Figura 8C, SEQ ID NO:33), usando el gen G Rab sintetizado (correspondiente al nt3317-4891 de número de acceso al Genbank EF206707) (Figura 8D, SEQ ID NO:34) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 A/Indonesia/5/2005 se amplificó usando los cebadores IF-H5dTm.c (Figura 8E, SEQ ID NO:35) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15), usando la construcción número 972 (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia de construcción número 972) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-RabG-S2+4.c (Figura 8B, SEQ ID NO:32) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15) como cebadores. El fragmento resultante se clonó dentro del marco con el péptido señal PDI de alfalfa en el sistema de expresión 2X35S-CPMV HT-NOS usando el sistema de clonación en fusión de Clontech (Mountain View, CA). La construcción 141 (Figura 8F, 8G) se digirió con las enzimas de restricción SbfI y StuI y se usó para la reacción de ensamblaje en fusión. La construcción número 141 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "en fusión" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV HT. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19 del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. El vector es un plásmido basado en pCAMBIA y la secuencia de los bordes del t-ADN de izquierda a derecha se presenta en la Figura 8F (SEQ ID NO:36). Una representación esquemática del vector 141 se presenta en la Figura 8G. A la construcción resultante se le dio el número 1074 (Figura 8H, SEQ ID NO: 37). La secuencia aminoacídica de PDISP - Rab G - A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT se presenta en la Figura 8I (SEQ ID NO:38). La representación del plásmido 1074 se presenta en la Figura 8A. Esta construcción no codifica una proteína M1.

25 D-2X35S-PDISP-glicoproteína G de la rabia (RabG)+H5 A/Indonesia/5/2005 en dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS en sistema de amplificación BeYDV + replicasa (Construcción número 1094: Figura 8L, 8M)

Una secuencia que codificaba el ectodominio de la glicoproteína G de la rabia (Rab G) fusionado a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indonesia/5/2005 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en BeYDV+replicasa en un plásmido que contenía el casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina como se indica a continuación usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía el ectodominio G Rab sin el péptido señal nativo, los dominios transmembrana y citoplasmático, se amplificó usando los cebadores IF-RabG-S2+4.c (Figura 8B, SEQ ID NO:32) y RabG+H5dTm.r (Figura 8C, SEQ ID NO: 33), usando el gen G Rab sintetizado (correspondiente a nt 3317-4891 de Genbank n.º de acceso EF206707) (Figura 8D, SEQ ID NO:34) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 A/Indonesia/5/2005 se amplificó usando los cebadores IF-H5dTm.c (Figura 8E, SEQ ID NO: 35) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15), usando la construcción número 972 (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia de construcción número 972) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-RabG-S2+4.c (Figura 8B, SEQ ID NO:32) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15) como cebadores. El fragmento resultante se clonó dentro del marco con el péptido señal PDI de alfalfa en el casete de expresión 2X35S-CPMV HT-NOS en el sistema de amplificación BeYDV+replicasa usando el sistema de clonación en fusión de Clontech (Mountain View, CA). La construcción 144 se digirió con la enzima de restricción SbfI y StuI y se usó para la reacción de ensamblaje en fusión. La construcción número 144 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "en fusión" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV HT en el sistema de amplificación BeYDV. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19 del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. El vector es un plásmido basado en pCAMBIA y la secuencia de los bordes del t-ADN de izquierda a derecha se presenta en la Figura 8J (SEQ ID NO:39). Una representación esquemática del vector 144 se presenta en la Figura 8K. A la construcción resultante se le dio el número 1094 (Figura 8L, SEQ ID NO:40). La secuencia aminoacídica de PDISP - Rab G - A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT se presenta en la Figura 8I (SEQ ID NO:38). La representación del plásmido 1094 se presenta en la Figura 8M. Esta construcción no codifica una proteína M1.

55

Ejemplo 5: Expresión de proteínas quiméricas de la rabia en plantas

La proteína G se expresó en fusión con PDI Sp (construcción 1071). La construcción 1074 es una fusión de la proteína G de la rabia con PDI Sp y el dominio H5A/Indo TM+CT. La construcción 1094 es una fusión de la proteína

G de la rabia con BeYDV + rep, PDI Sp y el dominio H5A/Indo TM+CT. La construcción 1091 es una fusión de la proteína G de la rabia con PDI Sp y BeYDV + rep.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en llanos rellenados con un sustrato de musgo de turbera comercial. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperiodo 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales.

10 Las *Agrobacteria* transfectadas con cada construcción (construcciones 1071, 1071, 1074, 1091, y 1094) se dejaron crecer en un medio YEB complementado con ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de canamicina y 25 µg/ml de carbenicilina a pH 5,6, hasta que alcanzaron un OD₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 2,5 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 2-6 días hasta la cosecha. A menos que se especifique otra cosa, todas las infiltraciones se realizaron como co-infiltración con la cepa AGL1/R472 en una relación 1:1.

20 Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 °C y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra del material vegetal congelado-triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogenización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y estos extractos en bruto aclarados (sobrenadantes) se conservaron para su análisis.

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

La inmunotransferencia se realizó por incubación con 0,5 µg/ul de un anticuerpo primario Santa Cruz SE-57995 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. La detección por quimioluminiscencia se realizó después de la incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa, JIR, 115-035-146 diluido 1:10,000 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation).

40 Como se muestra en la Figura 8N, la proteína G de la rabia se expresó en fusión con PDI Sp (construcción 1071), BeYDV + rep (construcciones 1094 o 1091), dominio H5A/Indo TM+CT (construcción 1074), o una combinación de los mismos.

Ejemplo 6: Ensamblaje de la proteína G quimérica de la rabia en partículas pseudovíricas

45 También se examinó la capacidad de la proteína G de la rabia quimérica para ensamblarse en una VLP en una planta en ausencia de una proteína núcleo o matriz. Los extractos de proteína de plantas transformadas usando la construcción 1074 o la construcción 1094, se depuraron y se sometieron a cromatografía de filtración en gel seguida del análisis de las fracciones de elución para determinar el contenido de G de la rabia usando anticuerpos primarios Santa Cruz SE-57995. La transferencia Western presentada en la Figura 8O muestra que los extractos de las plantas infiltradas, el contenido de G quimérica de la rabia en las fracciones de elución alcanza el máximo en las fracciones 8 a 14 para la proteína producida usando la construcción 1074, y divide una mayor parte de la proteína que se eluye en las fracciones 8 a 12 para los extractos de proteína preparados usando la construcción 1094, lo que indica su ensamblaje en estructuras de peso molecular muy elevado de más de 2 millones de daltons. Estos resultados muestran que G de la rabia se ensambla en estructuras de peso molecular alto de un tamaño más allá del peso molecular esperado del homotrímero.

La Figura 9A muestra un análisis de inmunotransferencia de la proteína G de la rabia purificada expresada a partir de la construcción 1074. La Figura 9B muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión de la VLP de

proteína G de la rabia purificada obtenida de la expresión de la construcción 1074 que muestra la morfología de la VLP.

Por lo tanto, la proteína G de la rabia se acumula en altos niveles en plantas agroinfiltradas y se ensambla en partículas pseudoviricas en ausencia de proteína núcleo o de matriz. Estos resultados también demuestran que la fusión de los dominios TM/CT de HA de influenza al antígeno distinto de influenza, tal como proteína G de la rabia, es suficiente para ensamblar y liberar las VLP que presentan el antígeno diferente de influenza.

Ejemplo 7: Ensamblaje de casetes de expresión con SARS

10 B-2X35S-CPMV HT-glicoproteína S del virus del síndrome respiratorio agudo severo (gS de SARS)+H5 A/Indonesia/5/2005 en dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS (Construcción número 916; Figuras 12A, 12F)

15 Una secuencia que codificaba el ectodominio de la glicoproteína S de SARS (gS de SARS) fusionado a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indonesia/5/2005 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT como se indica a continuación usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía el ectodominio de gS de SARS sin los dominios nativos transmembrana y citoplasmático se amplificó usando los cebadores IF-wtSp-SARSgS.c (Figura 12B, SEQ ID NO:26) e IF-H5dTm+SARSgS.r (Figura 12C, SEQ ID NO:27), usando el gen gS de SARS sintetizado (correspondiente al nt21492-25259 de número de acceso al Genbank AY278741.1; Figura 12D, SEQ ID NO:28) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 A/Indonesia/5/2005 se amplificó usando los cebadores SARSgS+H5dTm.c (Figura 12E, SEQ ID NO:29) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15), usando la construcción número 972 (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia de construcción número 972) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-wtSp-SARSgS.c (Figura 12B, SEQ ID NO:26) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15) como cebadores. El producto de la segunda PCR se digirió después con Apal y Stul y se clonó en la construcción número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6) digerido con las enzimas de restricción Apal y Stul. A la construcción resultante se le dio el número 916 (Figura 12F, SEQ ID NO:30). La secuencia aminoacídica de SARS gS - A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT se presenta en la Figura 12G (SEQ ID NO:31). La representación del plásmido 916 se presenta en la Figura 12A. Esta construcción no codifica una proteína M1.

35 Ejemplo 8: Experimentos de expresión con SARS quiméricas con y sin factores potenciadores de la producción en plantas

Las proteínas SARS se expresaron usando la construcción 916 que comprendía el gen gS de SARS con un péptido señal de tipo silvestre y el dominio H5A/Indo transmembrana y de cola citosólica.

40 Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en llanos rellenados con un sustrato de musgo de turbera comercial. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperiodo 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales.

45 Las *Agrobacterium* transfectadas con cada construcción (construcción 916) se dejaron crecer en un medio YEB complementado con ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de canamicina y 25 µg/ml de carbenicilina a pH 5,6, hasta que alcanzaron un OD₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 2,5 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 2-6 días hasta la cosecha. A menos que se especifique otra cosa, todas las infiltraciones se realizaron como co-infiltración con la cepa AGL1/R472 en una relación 1:1.

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 °C y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra del material vegetal congelado-triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de

fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogenización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y estos extractos en bruto aclarados (sobrenadantes) se conservaron para su análisis.

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

La inmunotransferencia se realizó por incubación con 2 ug/ul de un anticuerpo primario Imgenex IMG-690 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. La detección por quimioluminiscencia se realizó después de la incubación con anticuerpo secundario anti-conejo de ratón conjugado con peroxidasa, JIR, 115-035-144 diluido 1:10,000 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation).

La Figura 12H muestra el análisis de inmunotransferencia de la expresión de la proteína S del virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en el tabaco. Se observa la expresión de la construcción 916 (gen gS de SARS con péptido señal de tipo silvestre y dominio H5A/Indo transmembrana y de cola citosólica).

Ejemplo 9: Ensamblaje de casetes de expresión con proteína de VZV

A-2X35S-CPMV HT-glicoproteína E del virus varicela-zóster (VZVgE)+H5 A/Indonesia/5/2005 en el dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS (Construcción número 946)

Una secuencia que codificaba el ectodominio de la glicoproteína E de VZV (gE de VZV) fusionado a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indonesia/5/2005 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT como se indica a continuación usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía el ectodominio gE de VZV sin los dominios nativos transmembrana y citoplasmático se amplificó usando los cebadores IF-wtSp-VZVgE.c (Figura 10A, SEQ ID NO:20) e IF-H5dTm+VZVgE.r (Figura 10B, SEQ ID NO:21), usando el gen gE de VZV sintetizado (correspondiente al nt 3477-5348 del número de acceso al Genbank AY013752.1; Figura 10C, SEQ ID NO:22) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 A/Indonesia/5/2005 se amplificó usando los cebadores VZVgE+H5dTm.c (Figura 10D, SEQ ID NO:23) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15), usando la construcción número 972 (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia de construcción número 972) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-wtSp-VZVgE.c (Figura 10A, SEQ ID NO:20) e IF-H5dTm.r (Figura 3C, SEQ ID NO: 15) como cebadores. El producto de la segunda PCR se digirió después con Apal y Stul y se clonó en la construcción número 995 (Figura 1F, SEQ ID NO: 6) digerido con las enzimas de restricción Apal y Stul. A la construcción resultante se le dio el número 946 (Figura A5, SEQ ID NO: A5). La secuencia aminoacídica de gE de VZV- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT se presenta en la Figura 10F (SEQ ID NO:25). La representación del plásmido 946 se presenta en la Figura 10G. Esta construcción no codifica una proteína M1.

Ejemplo 10: Expresión de proteínas quiméricas de VZV en plantas

La expresión de la proteína E del virus varicela-zóster (VZV) se demostró usando la construcción 946, que comprendía el gen gE de VZV con péptido señal de tipo silvestre y el dominio H5A/Indo TM+CT.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en llanos rellenados con un sustrato de musgo de turbera comercial. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperiodo 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales.

Las *Agrobacteria* transfectadas con cada construcción (construcción 946) se dejaron crecer en un medio YEB complementado con ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de canamicina y 25 µg/ml de carbenicilina a pH 5,6, hasta que alcanzaron un OD₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y

MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 2,5 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 2-6 días hasta la cosecha. A menos que se especifique otra cosa, todas las infiltraciones se realizaron como co-infiltración con la cepa AGL1/R472 en una relación 1:1.

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 °C y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra del material vegetal congelado-triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogeneización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y estos extractos en bruto aclarados (sobrenadantes) se conservaron para su análisis.

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

La inmunotransferencia se realizó por incubación con 1 ug/ul de proteína anti-gE de VZV de mAb de ratón (abcam, ab52549) como anticuerpo primario en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. La detección por quimioluminiscencia se realizó después de la incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa, JIR, 115-035-146 diluido 1:10,000 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation).

La figura 11A muestra un análisis de inmunotransferencia de la expresión de la proteína E del virus varicela-zóster (VZV) en los Carriles 7-9 de la construcción 946 (20, 10 y 2 µg de extracto respectivamente). Carriles 1 a 5, controles positivos - gE de VZV recombinante, 500, 100, 50, 10 y 5 ng, respectivamente; Carril 6, control negativo.

También se examinó la capacidad de la proteína E de VZV quimérica para ensamblarse en una VLP en una planta en ausencia de una proteína núcleo o matriz. Los extractos de proteína de plantas transformadas usando la construcción 946 se depuraron y se sometieron a cromatografía de filtración en gel seguida de análisis de las fracciones de elución para la proteína E de VZV usando anticuerpo primario de proteína anti-gE de VZV de mAb de ratón (abcam, ab52549). La transferencia Western presentada en la Figura 11B muestra que, en los extractos de plantas infiltradas, las fracciones de elución de la proteína E quimérica de VZV alcanzan su máximo en las fracciones 10 a 13, lo que indica un ensamblaje de la proteína E de VZV en estructuras de peso molecular muy alto de más de 2 millones de daltons. Estos resultados muestran que la proteína E de VZV se ensambla en estructuras de peso molecular alto de un tamaño más allá del peso molecular esperado del homotrímero.

Por lo tanto, la proteína E de VZV se acumula en altos niveles en plantas agroinfiltradas y se ensambla en partículas pseudovíricas en ausencia de proteína núcleo o de matriz. Estos resultados también demuestran que la fusión de los dominios TM/CT de HA de influenza al antígeno distinto de influenza, tal como proteína E de VZV, es suficiente para ensamblar y liberar las VLP que presentan el antígeno diferente de influenza.

Ejemplo 11. Ensamblaje del casete de expresión con glicoproteína (GP) quimérica del virus del Ébola

A-2X35S-CPMV HT-PDISP-GP del virus del Ébola Zaire (EboGP)+H5 A/Indonesia/5/2005 en dominio transmembrana y de cola citoplasmática (TM+CT)-NOS (Construcción número 1366)

Una secuencia que codificaba el ectodominio de glicoproteína del virus del Ébola (GP) de la cepa Zaire 1995 fusionada a los dominios transmembrana y de cola citosólica de H5 A/Indonesia/5/2005 se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV HT-PDISP-NOS en un plásmido que contenía un casete de expresión de plastocianina-P19-plastocianina como se indica a continuación, usando el método de ligación basado en PCR presentado por Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). El gen GP del Ébola se optimizó para el uso de codón y para determinar el contenido por GC de la secuencia génica de tipo silvestre (correspondiente al nt 6039-8069 de número de acceso al GenBank AY354458). Después, los sitios de corte y empalme crípticos, las secuencias Shine-Delgarno, las secuencias desestabilizantes de ARN y los sitios de entrada de ribosomas procariotas se eliminaron de la

secuencia optimizada para evitar una estructura o secuencia no deseada. En una primera ronda de PCR, un fragmento del gen GP optimizado que contenía la secuencia que codificaba el ectodominio (sin el péptido señal y los dominios transmembrana y citoplasmático) se amplificó usando los cebadores IF-Opt_EboGP.s2+4c (Figura 13A, SEQ ID NO: 43) y H5iTMCT+Opt_EboGP.r (Figura 13B, SEQ ID NO: 44), con el gen GP sintetizado (Figura 13C, SEQ ID NO: 45) como plantilla. Un segundo fragmento que contenía los dominios transmembrana y citoplasmático de H5 de A/Indonesia/5/2005 de Influenza se amplificó usando los cebadores Opt_EboGP+H5iTMCT.c (Figura 13D, SEQ ID NO: 46) e IF-H5dTm.r (Figura 13E, SEQ ID NO: 15), usando la construcción número 972 (véase la Figura 94, SEQ ID NO: 134 del documento WO 2010/003225, para la secuencia de construcción número 972) como plantilla. Los productos PCR de ambas amplificaciones se mezclaron entonces y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación usando IF-Opt_EboGP.s2+4c (Figura 13A, SEQ ID NO: 43) e IF-H5dTm.r (Figura 13E, SEQ ID NO: 15) como cebadores. El producto PCR resultante se clonó dentro del marco con el péptido señal PDI de alfalfa en el sistema de expresión 2X35S-CPMV HT-NOS usando el sistema de clonación en fusión de Clontech (Mountain View, CA). La construcción 1192 (Figura 13E) se digirió la enzima de restricción SacII y StuI y se usó para la reacción de ensamblaje en fusión. La construcción número 1192 es un plásmido aceptor diseñado para la clonación "en fusión" de genes de interés dentro del marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV HT. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19 del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. El vector es un plásmido basado en pCambia y la secuencia de los bordes del t-ADN de izquierda a derecha se presenta en la Figura 13F (SEQ ID NO: 47). A la construcción resultante se le dio el número 1366 (Figura 13G, SEQ ID NO: 48). La secuencia aminoacídica de PDISP-GP del virus del Ébola Zaire 95-H5 TM+CT de A/Indonesia/5/2005 se presenta en la Figura 13H (SEQ ID NO: 49). La representación del plásmido 1366 se presenta en la Figura 13I.

Ejemplo 12. Expresión de GP del virus del Ébola quimérica en plantas

La expresión de la glicoproteína (GP) del virus del Ébola (EV) se demostró usando la construcción 1366, que comprende el gen GP de EV con péptido señal de tipo silvestre y el dominio H5A/Indo TM+CT.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en llanos rellenados con un sustrato de musgo de turbera comercial. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperiodo 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales.

Las *Agrobacteria* transfectadas con cada construcción (construcción 946) se dejaron crecer en un medio YEB complementado con ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de canamicina y 25 µg/ml de carbenicilina a pH 5,6, hasta que alcanzaron un OD₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 2,5 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 2-6 días hasta la cosecha.

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 °C y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra del material vegetal congelado-triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogeneización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y estos extractos en bruto aclarados (sobrenadantes) se conservaron para su análisis.

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

La inmunotransferencia se realizó por incubación con 150 ng/ml de Zaire de GP anti-Ébola de conejo purificado por afinidad (IBT Bioservices, 0301-012) como anticuerpo primario en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. La detección por quimioluminiscencia se realizó después de la incubación con anticuerpos secundarios anti-

conejo de cabra conjugados con peroxidasa (JIR 11-035-144), diluidos 1:7500 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation). La Figura 13J muestra análisis de inmunotransferencia de la expresión de la GP quimérica del virus del Ébola en extractos de proteínas de plantas transformadas con el número de construcción 1366. El resultado obtenido muestra que la GP quimérica del Ébola se expresa de forma transitoria.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula pseudovírica (VLP) en una planta, que comprende,
 - 5 a) introducir un ácido nucleico que comprende una región reguladora activa en la planta y ligada operativamente a una secuencia nucleotídica quimérica que codifica, en serie, un ectodominio de una proteína de superficie trimérica vírica condensada a un dominio transmembrana de influenza y un dominio de cola citoplasmática (TM/CT), en la planta, o una porción de la planta, en el que el TM/CT es de una hemaglutinina de influenza y el ectodominio se obtiene a partir de un virus de una familia de Retroviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae o Filoviridae, y
 - 10 b) incubar la planta o porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo de este modo la VLP, la VLP que comprende proteínas víricas, en el que las proteínas víricas consisten en proteínas de superficie víricas quiméricas.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que el ectodominio de la proteína de superficie trimérica vírica se obtiene a partir del género Lentivirus, Lyssavirus, Coronavirus o Ebolavirus.
3. El método según la reivindicación 1, en el que el ectodominio de la proteína de superficie trimérica vírica se obtiene a partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rabia, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), o virus del Ébola.
- 20 4. El método según la reivindicación 1, en el que el ectodominio de la proteína de superficie trimérica vírica se obtiene a partir de la proteína F, proteína S, proteína env, proteína G, una glicoproteína de envoltura E, glicoproteína de envoltura B, glicoproteína de envoltura C, glicoproteína de envoltura I, glicoproteína de envoltura H, 25 glicoproteína GP, o hemaglutinina.
5. El método según la reivindicación 1, en el que en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa de forma transitoria en la planta.
- 30 6. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se expresa de forma estable en la planta.
7. El método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de:
- 35 c) cosechar la planta y purificar la VLP.
8. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa de introducción (etapa a), uno o más de un ácido nucleico adicional, seleccionados del grupo de una secuencia nucleotídica que codifica una o más de una proteína de chaperona, proteína de canal de protones, inhibidor de proteasa, o una combinación de los mismos, se introduce en la planta.
- 40 9. El método según la reivindicación 1, en el que la VLP no contiene una matriz vírica o una proteína núcleo.
- 45 10. El método según la reivindicación 1, en el que en la etapa de introducción (etapa a), el dominio transmembrana de influenza y el dominio de cola citoplasmática es un dominio transmembrana y dominio de cola citoplasmática H5, o un dominio transmembrana y dominio de cola citoplasmática H1, o un dominio transmembrana y dominio de cola citoplasmática H3.
- 50 11. Una VLP producida por el método según la reivindicación 1 o la reivindicación 10.
12. La VLP según la reivindicación 11, que comprende una proteína vírica quimérica que lleva N-glicanos específicos de planta, o N-glicanos modificados.
- 55 13. La VLP según la reivindicación 11, que comprende uno o más de un lípido derivado de la planta.
14. Una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP de la reivindicación 11 para inducir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. El método según la reivindicación 1, en el que el dominio transmembrana de influenza y el dominio de cola citoplasmática se obtiene de H5 (A/Indonesia/05/2005) y comprende la secuencia nucleotídica definida en la SEQ ID NO:41, o el dominio transmembrana de influenza y el dominio de cola citoplasmática se obtiene de H3 (A/Brisbane/10/2007) y comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO:42.

5

Figura 1A, SEQ ID NO: 1: Secuencia de ácido nucleico consenso de ConS ΔCFI de VIH (Péptido señal nativo en negrita, los dominios nativos transmembrana y citosólicos están subrayados)

ATGCGCGTGCCGCGCATCCAGCGCAACTGCCAGCACTGTGGCGCTGGGGCACCTGATCCTGGGCATGCTG
ATGATCTGCTCCGCCGCCGAGAACTGTGGGTGACCGTGACTACGGCGTGCCCGTGTGGAAAGGAGGCCAAC
ACCACCTGTTCTGCGCTCCGACGCCAAGGCTACGACACCGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCCACGCCT
GCGTGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGATCGTGCTGGAGAACGTGACCGAGAACTTCAACATGTGGAAGA
ACAACATGGTGAGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGTGGGACCAAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCT
GACCCCTGTGCGTGACCTGAACTGCACCAACGTGAACGTGACCAACACCAACAACACCGAGGAGAAG
GGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAACATCACCACCGAGATCCGCGACAAGAAGCAGAAGGTGTACGCCCTGT
TCTACCGCTGGACGTGGTGCCCATCGACGACAACAACAACAACCTCTCCAACCTACCGCTGATCAACTGCAAC
ACCTCCGCCATCACCAGGCTGCCCAAGGTGCTCTCGAGCCATCCCATCACTACTGCGCCCCCGCGG
CTTCGCGATCCTGAAGTGCAACGACAAGAAGTTCAACGCGACCGGCCCTGCAAGAAGCTGTCCACCGTGACG
TGCACCCACGGCATCAAGCCCGTGGTGCTCCACCCAGCTGCTGCTGAACGGCTCCCTGGCCGAGGAGGAGATCA
TCATCCGCTCCGAGAACATCACCAACAACGCCAAGACCATCATCGTGACGTGAACGAGTCCGTGGAGATCAA
CTGCACCCGCCCAACAACAACACCCGCAAGTCCATCCGCATCGGCCCGGCCAGGCCCTTACGCCACCGGC
GACATCATCGGCGACATCCGCCAGGCCACTGCAACATCTCCGGCACCAAGTGGAACAAGACCTGACGACGG
TGGCAAGAAGCTGCGCGAGCACTTCAACAACAAGACCATCATCTCAAGCCCTCTCCGGCGGCGACCTGGA
GATCACCACTCCTTCAACTGCGCGGCGAGTTCTTCTACTGCAACACCTCCGGCCTGTTCAACTCCACCTG
GATCGGCAACGGCACCAAGAACAACAACAACCAACGACACCATCACCTGCCCTGCCGCATCAAGCAGATC
ATCAACATGTGGCAGGGCGTGGGCCAGGCCATGTACGCCCCCATCGAGGCAAGATCACCTGCAAGTCC
AACATCACCGGCTGCTGCTGACCCGCGACGGCGCAACAACAACACCAACGAGACCGAGATCTTCCGCCCG
GCGGCGGCGACATGCGCGACAACCTGGCGCTCCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGATCGAGCCCTGG
GCCTGGCCCCCAAGGCCAAGCTGACCGTGACGCGCCGCGCAGCTGCTGTCGGCATCGTGACGACGAGT
CCAACCTGCTGCGCGCCATCGAGGCCAGCAGCACTGCTGACGCTGACCGTGTGGGCATCAAGCAGCTGC
AGGCCCGCGTGTGGCGTGGAGCGCTACCTGAAGGACGACGCTGCTGGAGATCTGGGACAACATGACCT
GGATGGAGTGGGAGCGCGAGATCAACAACCTACACCGACATCATCTACTCCCTGATCGAGGAGTCCAGAAC
AGCAGGAGAAGAAGCAGACGAGGAGTGTGGCCCTGGACAAGTGGGCTCCCTGTGGAACCTGTTGACATCA
CAAAGTGGTGTGTACATCAAGATCTTATCATGATCGTGGGCGGCTGATCGGCTGCGCATCGTGTTCGCC
GTGCTGTCCATCGTGAACCGCTGCGCCAGGGCTACTCCCCCTGTCTTCCAGACCTGATCCCAACCCCCG
CGGCCCCGACCGCCCCGAGGGCATCGAGGAGGAGGGCGGCGAGCAGGACCGCGACCGCTCCATCCGCTGG
TGAACGGCTTCTGGCCCTGGCTGGGACGACCTGCGCTCCCTGTGCTGTTCTCTACACCGCTGCGCGAC
TTATCTGATCGCCGCGCCGACCGTGAGCTGCTGGGCGCAAGGGCTGCGCCGCGGCTGGGAGGCCCTG
AAGTACCTGTGGAACCTGCTGACGACTGGGCGCAGGAGCTGAAGAACTCCGCCATCTCCCTGCTGGACCA
CCGCCATCGCGTGCGCGAGGGCACCGACCGCTGATCGAGGTGGTGCAGCGCGCTGCGCGCCATCCTGA
ACATCCCCCGCGCATCCGCCAGGGCTGGAGCGCGCCCTGCTGTAA

Figura 1B, SEQ ID NO: 2

IF-Apal-SpPDI.c
 TGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGCGGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTA

Figura 1C, SEQ ID NO: 3

SpPDI-HIV gp145.r
 CACAGGTTCTCGGCGCGCAAGATCTGAGAAGGAACCAACAAGAAGAG

Figura 1D, SEQ ID NO: 4

IF-SpPDI-gp145.c
 TCTCAGATCTTCGCCCGGAGAACCTGTGGGTGACCGTGACTAC

Figura 1E, SEQ ID NO: 5

WtdTm-gp145.r
CCTTTACAGCAGGGCGCGCTCCAGGCCCTGGCGGATGC

Figura 1F, SEQ ID NO: 6: Casete de expresión número 995, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. ConS ΔCFI de PDISP-VIH está subrayado.

TTAATTAAAGTCGACAAGCTTGCATG**CCGGT**CAACATGTTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAATATCA
AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCTCCGG
ATTCCATTGCCAGCTATCTGCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATC
ATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCAC
GAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGT
GGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACT
TTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGCACTTTATTGTGAAGATA
GTGGAAAAGGAAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCT
GCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACG
TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATAGGTTTGTATAAAAGC
GAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTCTAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCT
TTTCTTGGTGGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTCTTGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCG
AAATCAAAGATCTTTGTGGACACGTAGTGCAGCGCCATTAAATAACGTGTAAGTGTCTTATTTCTGCGTG
TGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTGAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACT
TTGGCGGGGTGCAATATCTTACTTCTGCTTACGAGGTATTGTTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGA
TTGGTCTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGT
TAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGGGGCCATGGCGAAAACGTTGCGAATTTCCGGCTTATTGTTTT
TCTTCTTGTGTGGTTCCTTCTCAGATCTTCCGCCGCGAGAACCTGTGGGTGACCGTGTACTACGCGTGGCCG
TGTGGAAGGAGGCCAACACCCCTGTTCTGCGCTCCGACGCCAAGGCTACGACACCGAGGTGCAACAACG
TGGGGCCACCCACGCTGCTGCGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGATCGTCTGGAGAACGTGACCGAGAA
CTTCAACATGTGGAAGAACAACATGGTGGAGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGTGGGACCAGTCCCTG
AAGCCCTGCGTGAAGCTGACCCCTGTGCGTGACCTGAACTGCACCAACGTGAACGTGACCAACACCA
ACAACACCGAGGAGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCTTCAACATCACCAACGAGATCCGCGACAAGAAGC
AGAAGGTGTACGCCCTGTCTACCGCTGGACGTGGTGGCCATCGACGACAACAACAACCTCTTCAACTAC
CGCTGTATCAACTGCAACACCTCCGCCATCACCCAGGCTGCCCCAAGGTGTCTTCCGAGCCATCCCCATCA
CTACTGCGCCCCCGCGGCTTCCGCATCTGAAGTGAACGACAAGAAGTTCAACGGCACCGGCCCTGCAAG
AACGTGTCCACCGTGCAAGTGCACCCACGGCATCAAGCCCGTGGTGTCCACCCAGCTGCTGTGAACGGCTCC
TGGCGGAGGAGGAGATCATCATCCGCTCCGAGAACATCACCAACAACGCCAAGACCATCATCGTGACGTGA
CGAGTCCGTGGAGATCAACTGCACCCGCCCAACAACAACACCCGCAAGTCCATCCGCATCGGCCCGGCCAG
GCCTTCTACGCCACCGGACATCATCGGCGACATCCGCCAGGCCACTGCAACATCTCCGGCACCAAGTGA
ACAAGACCTGCAAGTGGCCAAAGAGTGCAGGAGCACTTCAACAACAAGACCATCATCTTCAAGCCCTC
CTCCGGCGGCGACCTGGAGATCACCAACCTCTTCAACTGCGCGCGGAGTCTTCTACTGCAACACCTCCG
GCCTGTTCAACTCCACTGGATCGGCAACGGCACCAAGAACAACAACAACCAACGACACCATCACCTGCC
CTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGGGCGTGGGCCAGGCCATGTACGCCCCCCCCATCGAGGG
CAAGATCACCTGCAAGTCCAACATCACCGGCTGCTGCTGACCCGCGACGGCGGCAACAACAACCAACGAG
ACCGAGATCTTCCGCCCCGGCGGCGGACATGCGCGACAACCTGGCGCTCCGAGCTGTACAAGTACAAGGTG
GTGAAGATCGAGCCCTGGGCGTGGCCCCACCAAGGCCAAGTGAACGTGACCGTGCAGGCCCGCCAGCTGCTGC
GGCATCGTGCAGCAGTCCAACCTGCTGCGCGCATCGAGGCCAGCAGCACTGCTGAGCTGACCGTGT
GGGCATCAAGCAGTGCAGGCCGCGTGTGGCCGTGGAGCGCTACCTGAAGGACGAGAGCTGTGGAG
ATCTGGGACAACATGACCTGGATGGAGTGGAGCGCGAGATCAACAACCTACACCGACATCATCTACTCCCTGA
TCGAGGAGTCCGAAGACGAGGAGAAGACGAGCAGGAGCTGCTGGCCCTGGACAAGTGGGCTCCCTGT
GGAACGTGTTGACATCAACCACTGGCTGTGGTACATCAAGATCTTCACTCATGATCGTGGCGGCTGATCGG

CCTGCGCATCGTGTTCGCGTGTCTCATCTGAACCGCGTGCAGGGCTACTCCCCCTGTCTTCCAGA
CCCTGATCCCCAACCCCGCGGCCCGACCGCCCGAGGGCATCGAGGAGGAGGGCGCGAGCAGGACCGC
GACCGCTCCATCCGCTGGTGAACGGCTTCCTGGCCCTGGCTGGGACGACCTGCGCTCCCTGTGCTTCTC
CTACCACCGCTGCGCGACTTCATCTGATCGCCGCGCCGACCGTGGAGCTGCTGGGCCGCAAGGGCTGCGC
CGCGGCTGGGAGGCCCTGAAGTACCTGTGGAACCTGCTGCAGTACTGGGGCCAGGAGCTGAAGAATCCGCG
ATCTCCTGCTGGACACCGCCATCGCGTGGCCGAGGGCACCAGCCGCTGATCGAGGTGGTGCAGCGC
GCCTGCGCGCCATCTGAACATCCCCGCGCATCCGCCAGGGCTGGAGCGCGCCTGCTGTAAGGCCTA
TTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCAATTTCTATGTTTGGTGAGCGTTTTCTGTGCTCAGAGTGT
GTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGA
TTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTC
AAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTT
GAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAG
TCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTTATCGCGCGC
GGTGTCTATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCC

Figura 1G, SEQ ID NO: 7: Secuencia aminoacídica de ConS ΔCFI de PDISP-VIH

MAKNVAIFGLLFSLLVLPVSIQFAAENLWVTYYYGVPVWKEANTTLFCASDAKAYDTEVHNWVWATHACVPTDPNP
 QEIVLENTENFMWKNMVEQMHEIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTTNTTEEGEIKNCNFNI
 TTEIRDKKQKVYALFYRLDVVPIDNNNNSSNYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNDDKFNFTG
 PCKNVSTVQCTHGKPVVSTQLLLNGSLAEEIIIRSENITNNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYAT
 GDIIGDIRQAHCNISGKWNKTLLQVAKKLREHFNNKTIIFKPSSGGDLITTHSFNCRGEFFYCNTSGLFNSTWIGN
 GTKNNNNNTDITLPCRIKQIINMWQGVGQAMYAPPIEGKITCKSNITGLLLTRDGGNNNTNETEIFRPGGDMR
 DNWRSELYKYKVIEPLGVAPTAKALTVQARQLLSGIVQQSNLLRAIEAQHLLQLTVWGKQLQARVLAVERYL
 KDQQLLEIWDNMTWMEWEREINNYTDIISLIEESQNNQKEQELLDKWASLWNNWFDITNWLWYIKIFIMIV
 GGLIGLIRFVAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTLIPNPRGPDREGEIEEGGEQDRDRSIRLVNGFLALAWDDLRLSLCLFSY
 HRLRDFILIAARTVELLGRKGLRRGWEALKYLWNLQYWQQLKNSAISLLDTTAIAVAEGTDRVIEVVQRACRAILN
 IPRRIROGLERALL

Figura 1H: Representación esquemática de la construcción número 995

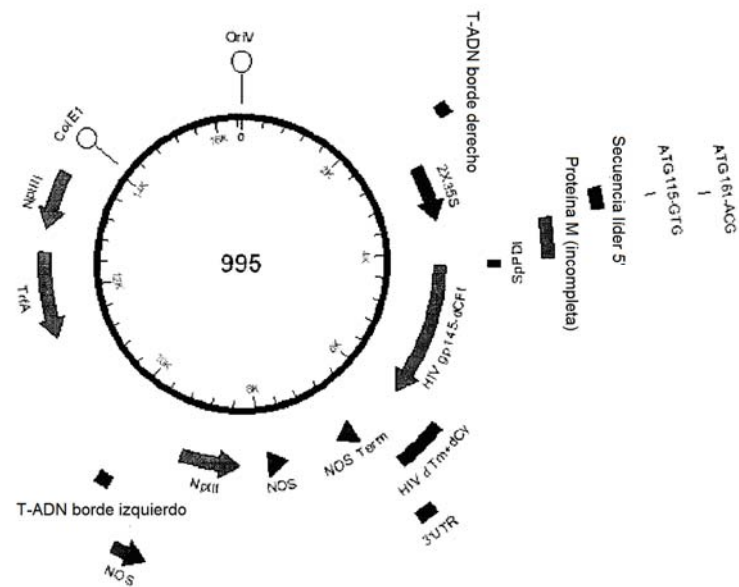


Figura 2A, SEQ ID NO: 8:

IF-H3dTm+gp145.r
CCATAGTATCCAATCGATGTACCACAGCCAGTTGGTGATGTCGAAC

Figura 2B, SEQ ID NO: 9:

Gp145+H3dTm.c
TGGCTGTGGTACATCGATTGGATACTATGGATTTCCTTGCCATATCAT

Figura 2C, SEQ ID NO: 10:

H3dTm.r
CCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTTGCCTT

Figura 2D, SEQ ID NO: 11: Casete de expresión número 997, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador de NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. PDISP-VIH Con S ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT está subrayado.

TTAATTAAGTCGACAAGCTTGCATGCGGTCACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCA
AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGG
ATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATC
ATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCTCTGCGGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACCCAC
GAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGT
GGAGCAGCACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACT
TTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCT
GCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAGACGTTCCAACCCACG
TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCTCTCTATATAAGGAAAGTTCATTTCACTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGC
GAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCT
TTTCTTGGTGAGCGATCTTCAAGTGTGATGCTGCTTGGCACCAGTACAACGTTTCTTCTACTGAAGCG
AAATCAAAGATCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTCTGGTG
TGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTGTTACGATTCTGCTGACT
TTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGA
TTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTGAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAAGTTGGAGAAAGATTGT
TAAGCTTCTGTATTTCTGCCAAATTTGTGGGCCCATGGCGAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTT
TCTTCTTGTGTTGGTCTCTCAGATCTTGGCGCCGAGAACCTGTGGGTGACCGTGTACTACGGCGTGCCCG
TGTGGAAGGAGGCCAACACCCCTGTTCTGCGCTCCGACGCCAAGGCTACGACCCGAGGTGCACAACGT
GTGGGCCACCCACGCTGCGTGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGATCGTGTGGAGAACGTGACCGAGAA
CTTCAACATGTGGAAGAACAACATGGTGGAGCAGATGACGAGGACATCATCTCCCTGTGGGACAGTCCCTG
AAGCCCTGCGTGAGCTGACCCCTGTGCGTGACCTGAAGTGCACCAACGTGAACGTGACCAACACCAACA
ACAACACCGAGGAGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCTTCAACATCACACCGAGATCCGCGACAAGAAGC
AGAAGGTGTACGCCCTGTTCTACCGCTGGACGTGGTGCCTCATCGACGACAACAACAACCTCTCCAACATAC
CGCTGATCAACTGCAACACCTCCGCCATCACCCAGGCTGCCCCAAGGTGTCTTCGAGCCCATCCCCATCCA
CTACTGCGCCCCCGCGCTTCCCATCTGAAGTGAACGACGACAAGAAGTTCAACGGCACCGGCCCTGCAAG
AACGTGTCCACCGTGCAAGTGCACCCACGGCATCAAGCCGTGGTGTCCACCCAGCTGCTGCTGAACGCTCC
TGCCGAGGAGGAGATCATCTCGCTCCGAGAACATCAACAACACGCCAAGACCATCATCGTGACGTGAA
CGAGTCCGTGGAGATCAACTGCACCCGCCCCAACAACAACCCCGCAAGTCCATCCGATCGGCCCCGCGCAG
GCCTTCTACGCCACCGGCGACATCATCGGCGACATCCGCCAGGCCACTGCAACATCTCCGGCACCAAGTGGA
ACAAGACCTGACGAGGTGGCCAAGAAGCTGCGCGAGCACTTCAACAACAAGACCATCATCTTCAAGCCCTC
CTCCGCGGCGACCTGGAGATCACCACTCTCTCAACTGCGCGGCGAGTCTTCTACTGCAACACCTCCG
GCCTGTTCAACTCCCTGGATCGGCAACGGCACCAAGAACAACAACAACACGACACCATCACCTGCC
CTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGGGCTGCGGCCAGGCCATGTACGCCCCCCCATCGAGGG
CAAGATCACCTGCAAGTCCAACATCACCGCCTGCTGCTGACCCGCGACGCGGCAACAACAACAACCAAGAG
ACCGAGATCTTCCGCCCCGCGGCGGCGACATGCGCGACAACCTGGCGCTCCGAGCTGTACAAGTACAAGGTG
GTGAAGATCGAGCCCTGGGCGTGCCCCACCAAGGCCAAGCTGACCGTGACGCGCCGCGAGCTGTCTCC
GGCATCGTGACGAGCAGTCCAACCTGCTGCGCGCATCGAGGCCAGCAGCACCTGTGACGCTGACCGTGT
GGGCGATCAAGCAGCTGACGCGCCGCTGCTGGCGTGAGCGCTACCTGAAGGACGAGCAGCTGTGGAG
ATCTGGGACAACATGACCTGGATGGAGTGGAGCGCGAGATCAACAACCTACACCGACATCATCTACTCCCTGA
TCGAGGAGTCCAGAACCGAGGAGAAGAAGAGCAGGAGCTGCTGGCCCTGGACAAGTGGGCTCCTGT
GGAACTGGTTCGACATCACTAAGTGGTGTGATCGATTGGATACTATGGATTCTTCTTGGCATATCATGT
TTTTGCTTTGTGTTGCTTGTGGGTTTCATCATGTGGGCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTG
CATTTGAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTC
TGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGTAATTTAATTTCTTGTGAGCTCTGTTAGCAGGTGCTCCCTTCAGCAA
GGACACAAAAGATTTTAATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGA
CCTGCAGATCGTTCAACATTTGGCAATAAAGTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATC

ATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTT
TTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
ATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCC

Figura 2E, SEQ ID NO: 12: Secuencia aminoacídica de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Brisbane/10/2007 H3 TM+CT

MAKNVAIFGLLFSLLVLPVPSQJFAAENLWVTVYGVVPVWKEANTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNP
QEIVLENVTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTTNNTEEGEIKNCSFN
TTEIRDKKQKVYALFYRLDVPIDDNNNNSSNYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNDDKFN
PCKNVSTVQCTHGKIPVSTQLLNGSLAEEIIIRSENITNNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYAT
GDIIGDIRQAHCNISGKWNKTLQQVAKKLREHFNNKTIIFKPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSGLFNSTWIGN
GTKNNNTNDTITLPCRIKQIINMWQGVQAMYPPIEGKITCKSNITGLLLTRDGGNNNTNETEIFRPGGGDMR
DNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKLTVQARQLSGIVQQSNLLRAIEAQHLLQLTVWGKQLQARVLAVERYL
KDQQLLEIWDNMTWMEWEREINNYTDIISLYIEESQNNQKEKNEQELLALDKWASLWNNWFDITNWLWYIDWILW
ISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Figura 2F: Representación esquemática de la construcción número 997

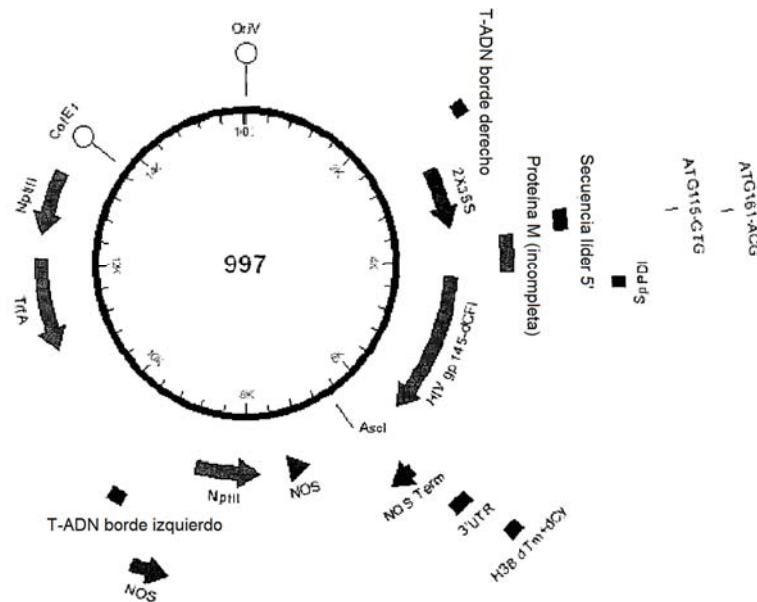


Figura 3A, SEQ ID NO: 13:

IF-H5dTm+gp145.r
AATTGACAGTATTTGGATGTACACAGCCAGTTGGTGATGTCGAAC

Figura 3B, SEQ ID NO: 14:

Gp145+H5dTm.c
CTGGCTGTGGTACATCCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGC

Figura 3C, SEQ ID NO: 15:

IF-H5dTm.r
CCTTTAAATGCAAATCTGCATTGTAACGATCCAT

Figura 3D, SEQ ID NO: 16: Casete de expresión número 999, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador de NOS). El sitio de restricción SbfI eliminado está en negrita. PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayada.

TTAATTAAGTCGACAAGCTTGCATG**CCGGT**CAACATGGTGGAGCACGACACATTGTCTACTCCAAAAATATCA
AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGG
ATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATC
ATTGCGATAAAAGGAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCAC
GAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGCTTCAACACAGCTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGT
GGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACT
TTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
GTGGAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAAGGAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCT
GCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTCAACCCACG
TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCAACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGC
GAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTAACTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTCTTCTGTC
TTTCTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTCTCGGCACCGAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCG
AAATCAAAGATCTTTGTGACACGATAGTGCAGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTCTTCTTCTGCTGA
TGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACT
TTCGGCGGTGCAATATCTTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGA
TTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGAGAGAAAGATTGT
TAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGGGGCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTT
TCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCCGCCGAGAACCTGTGGGTGACCGTGTACTACGGCGTGCCCG
TGTGGAAGGAGGCCAACCCACCTGTTCTGCGCTCCGACGCCAAGGCTACGACACCGAGGTGCACAACGT
GTGGGCCACCCACGCTGCGTGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGATCGTGTGGAGAACGTGACCGAGAA
CTTCAACATGTGGAAGAACAACATGGTGGAGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCGTGGGACCGTCCCTG
AAGCCCTGCGTGAAGCTGACCCCTGTGCGTGACCTGAACTGCACCAACGTGAACGTGACCAACACCCACA
ACAACACCGAGGAGAAGGGGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAACATCACCCAGGATCCGCGACAAGAAGC
AGAAGGTGTACGCCCTGTTTACCGCTGGACGTGGTGCCATCGACGACAACAACAACAACTCTCCAATAC
CGCTGATCAACTGCAACACCTCCGCCATCACCAAGGCTGCCCAAGGTGCTTTCGAGCCCATCCCATCCA
CTACTGCGCCCGCGGCTTCCGCATCCTGAAGTGCAACGACAAGAAGTTCAACGGCACCGGCCCTGCAAG
AACGTGTCCACCGTGACGTGCACCCACGGCATCAAGCCCGTGGTGTCCACCCAGTGTGCTGAAACGGTCCC
TGGCGGAGGAGATCATCATCGCTCCGAGAACATCACCAACACGCCAAGACCATCATCGTGACGCTGAA
CGAGTCCGTGGAGATCAACTGCACCGCCCAACAACAACCCGCAAGTCCATCCGCATCGGCCCGGCCAG
GCCTTCTACGCCACCGGACATCATCGGCGACATCCGCCAGGCCACTGCAACATCTCCGGCACCAAGTGA
ACAAGACCTGCAGCAGGTGGCCAAGAAGCTGCGGAGCACTTCAACAACAAGACCATCATCTTCAAGCCCTC
CTCCGGCGGCGACCTGGAGATCACCACTCTTCAACTGCGCGGCGAGTCTTCTACTGCAACACCTCCG

GCCTGTTCAACTCCACCTGGATCGGCAACGGCACCAAGAACAACAACACCAACGACACCATCACCTGCC
CTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGGGCGTGGGCCAGGCCATGTACGCCCCCCCATCGAGGG
CAAGATCACCTGCAAGTCAACATCACCGGCTGCTGCTGACCCGCGACGGCGGCAACAACAACACCAACGAG
ACCGAGATCTTCCGCCCCGGCGGGCGGACATGCGCGACAACCTGGCGCTCCGAGCTGTACAAGTACAAGGTG
GTGAAGATCGAGCCCCGGCGTGGCCCCACCAAGGCCAAGCTGACCGTGCAGGCCCGCAGCTGCTGTCC
GGCATCGTGACGAGCAGTCCAACCTGCTGCGCGCCATCGAGGCCAGCAGCACCTGCTGCAGCTGACCGTGT
GGGGCATCAAGCAGCTGCAGGCCCGCTGCTGGCCGTGGAGCGCTACCTGAAGGACGACGAGCTGCTGGAG
ATCTGGGACAACATGACCTGGATGGAGTGGGAGCGGAGATCAACAACACTACCGGACATCATCTACTCCCTGA
TGAGGAGTCCCAGAACGACGAGGAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGCCCTGGACAAGTGGGCTCCCTGT
GGAACTGGTTCGACATCAACAACCTGGCTGTTGATCATCAAACTGTCATTTATTCACAGTGGCGAGTTC
CTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTG
CATTTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTC
TGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGTCTGTCCTTCAGCAA
GGACACAAAAGATTTTAAATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGA
CCTGCAGATCGTTCAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATC
ATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTT
TTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
ATTATCGCGCGCGGTGTATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCC

Figura 3E. SEQ ID NO: Secuencia aminoacídica de PDISP-VIH ConS ΔCFI-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT

MAKNVAIFGLLFSLLVLPVPSQIFAAENLWVTVYVGVVWKEANTTLFCASDAKAYDTEVHNWVATHACVPTDNP
 QEIVLENTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTTNNTEEKGEIKNCSFNI
 TTEIRDKKQKVYALFYRLDVVPIDNNNNSSNYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNDDKFNKG
 PCKNVSTVQCTHGKPVVSTQLLNGSLAEIEIIIRSENITNNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYAT
 GDIIGDIRQAHCNISGKWNKTLQVAKKLREHFNNKTIIFKPSSGGDLEITHSFNCRGEFFYCNTSGLFNSTWIGN
 GTKNNNNTNDITLPCRIKQIINMWQGVGQAMYAPPIEGKITCKSNITGLLLTRDGGNNNTNETEIFRPGGDMR
 DNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYL
 KDQQLLEIWDNMTWMEWEREINNYTDIISLIEESQNNQEKNEQELLALDKWASLWNWFDITNWLWYIQLSIYS
 TVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGLQCRICI

Figura 3F: Representación esquemática de la construcción número 999

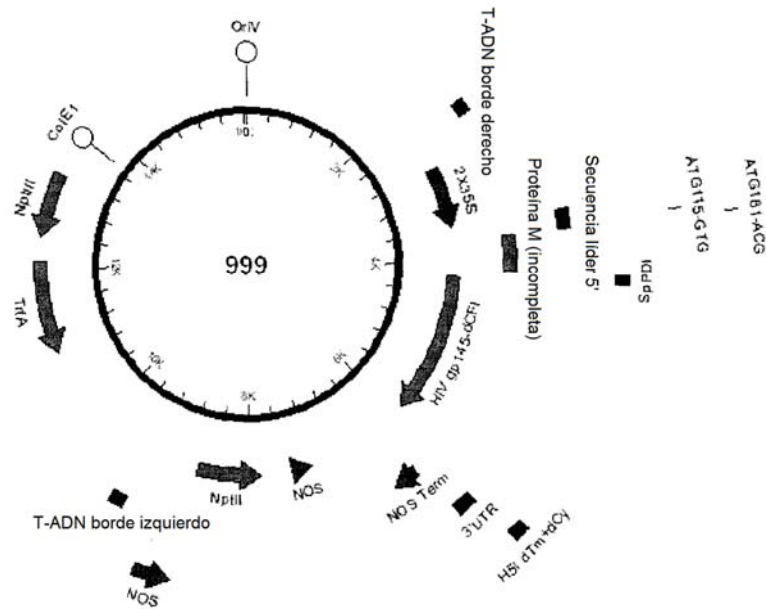


Figura 4A, SEQ ID NO: 18: Casete de expresión número 172, de XmaI (aguas arriba del promotor de plastocianina) a EcoRI (inmediatamente aguas abajo del terminador de plastocianina). La secuencia de ácido nucleico TBSV P19 está subrayada.

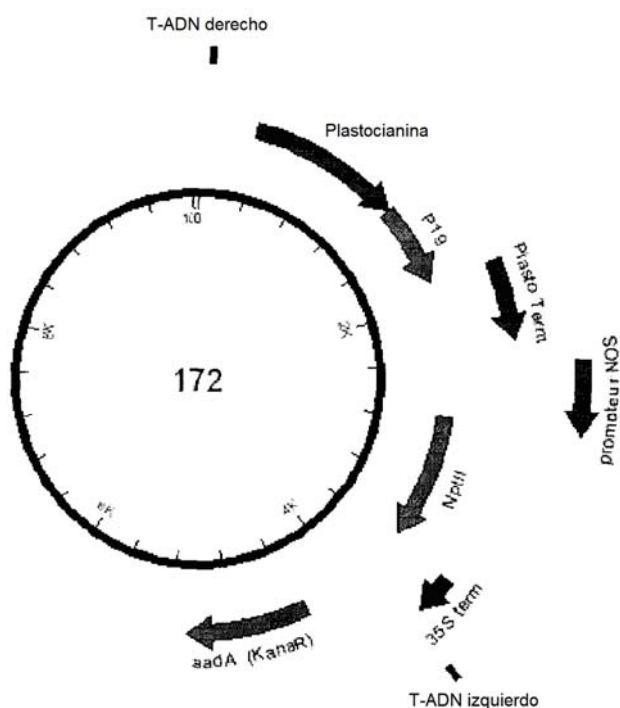
CCCCGGCTGGTATATTTATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATT
TTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGA
TAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTC
ATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGGGAGAAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAA
AGTTGTACAAAAGTTGTACAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAG
GGTTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATT
AAAAAGAAAGAATAAATATTTTAAAAATAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATT
GATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTC
CTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATT
AATCCCTCCAAAAAAGGATATTTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCG
TAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGT
GGCAGATCTACATTATCTAAATCACACATTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATC
ACCATTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAA
CAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACTTCTGACGAAAGTCCGAGTTGG
ACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGG
GTTTCGGGAAAGTTGATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCTTGG
ATCTTGGACGGGAGATTGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGACCAGATCGGATGTACCTATA
GTATTTCGGTTTCGAGGAGTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACTCTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCA

ATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGTGGAAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTG
AAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTCGAGGGCGAGCTCTAAGTTAAATGCTTCTCGTCT
 CCTATTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAAGAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAAT
 ACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCC
 ATAACAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGCTTATATTTGAACAACTAAAAATTGAACATCTTTGC
 CACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTT
 ATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTAATTTTATATCATCCCCTTGATAAATGATAGTAC
 ACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGAGGCCTGGCTGGCCGAATTC

Figura 4B, SEQ ID NO: 19: Secuencia aminoacídica del supresor de silenciamiento P19 del TBSV

MERAIQGNDAREQANSERWDGGSGGTTSPFKLPDESPSWTEWRLHNDETNSNQDNPLGFKESWGFGKVVFVKRY
 LRYDRTEASLHRVLGWSWTGDSVNYAASRFFGFDQIGCTYSIRFRGVSVTVSGGSRTLQHLCEMAIRSKQELLQLAPIEV
 ESNVSRGCPETQTFEKESE

Figura 4C: Representación de la construcción número 172



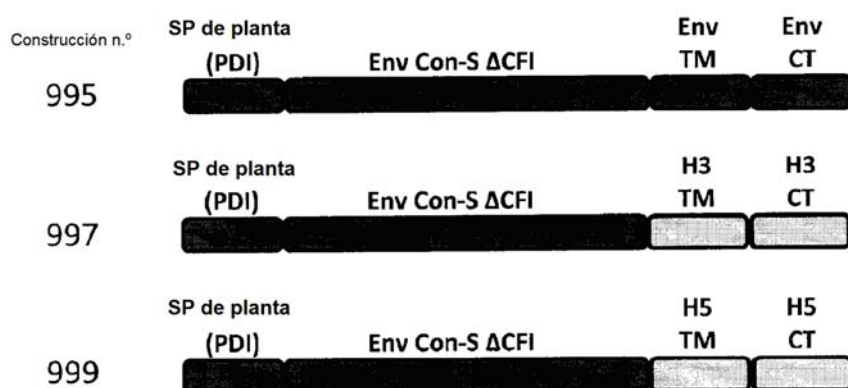


Figura 5

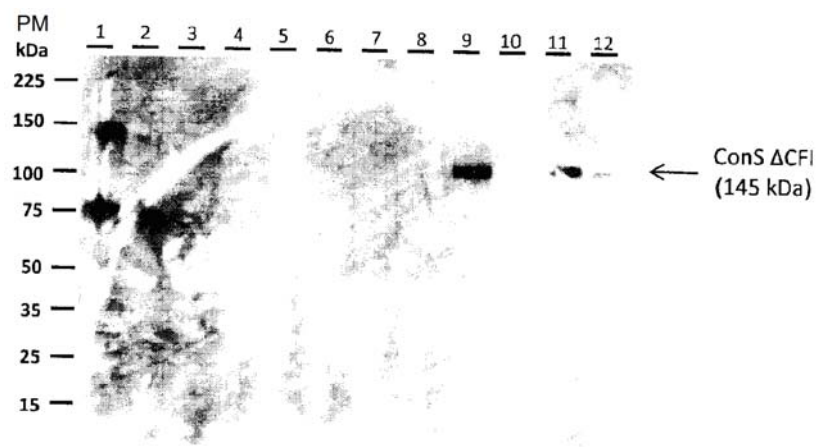


Figura 6

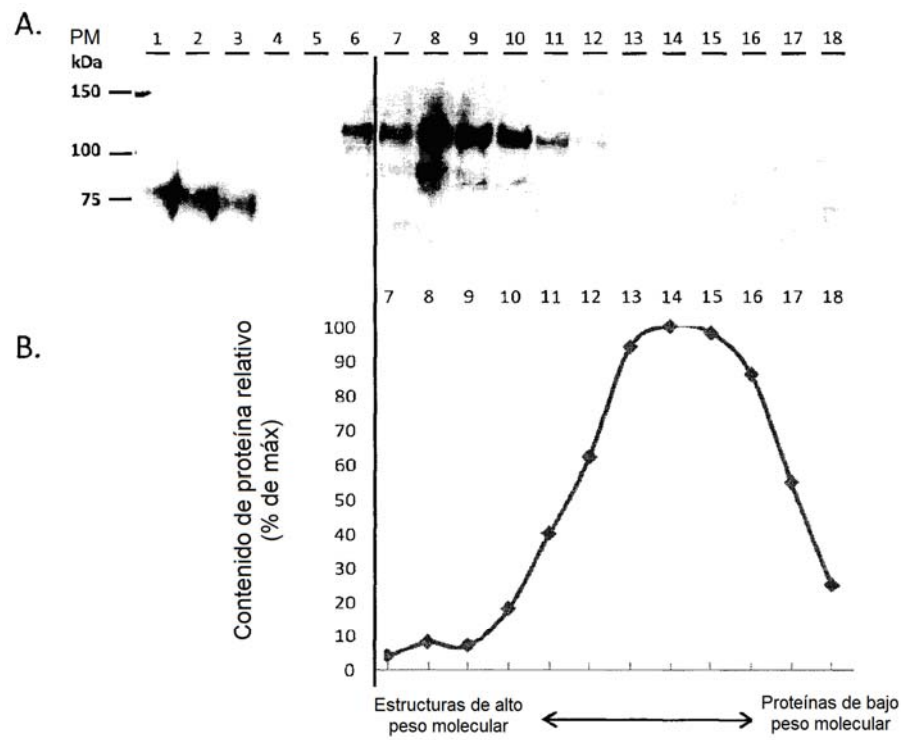


Figura 7

Figura 8A:
Representación esquemática de la construcción número 1074

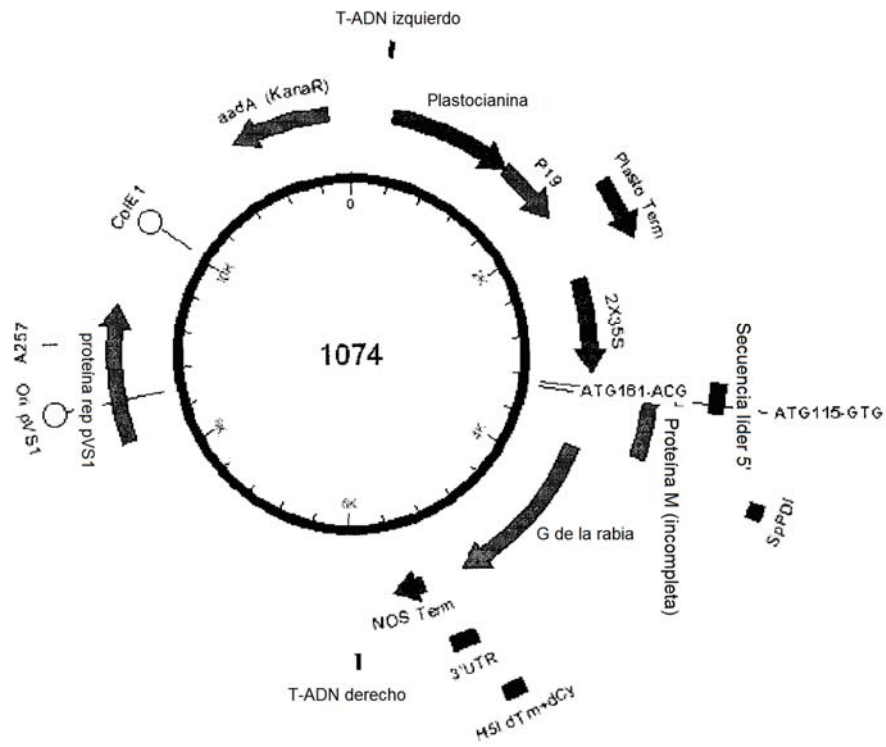


Figura 8B, SEQ ID NO:32

IF-RabG-S2+4.c

TCTCAGATCTTCGCCAAATTCCCTATTTACACGATACCAGAC

Figura 8C, SEQ ID NO:33

RabG+H5dTm.r

CTGTTGAATAAATTGACAGTATTTGATACTTCCCCCAGTTCGGGAGAC

Figura 8D, SEQ ID NO:34

Gen G Rab sintetizado (correspondiente a nt 3317-4891 de número de acceso al Genebank EF206707) (Péptido señal nativo en negrita, dominios transmembrana y citosólico nativos subrayados)

ATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGGTTTTTCCATTGTGTTTTGGGAAATTC
CCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACATCACCTCAG
CTGCCCCAAACAATTTGGTAGTGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCCTAC
ATGGAACTTAAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAATGAACGGGTTCACTTGACACAGGCGT
TGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTTGGTTATGTCACAACCACGTTCAAAAGAA
AGCATTTCCGCCAACACCAGATGCATGTAGAGCCGCGTACAACGGAAGATGGCCGGTGA
CCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACCGCTGGCTTCGAAGTGTAA
AAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGAC
AGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTA
CCTACTGCTCCACTAACCACGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATG
TCTTGTGACATTTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGC
CGGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCATATAAGTCTTTAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGG
AGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTGCGGATGCAAACATCAAATGAAACCA
AATGGTGCCCTCCCGATCAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCA
CCTTGTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGTGCTCGGATGCACTAGAGTCCATC
ATGACAACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCCTAGTCATTTAAGAAAACCTTGCCCTGGGTTT
GGAAAAGCATATACCATATTTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGT
CAGAACTTGAATGAGATCTCCCTTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCAT
CCTCATGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATC
CCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGAATCCTCGGTTATCCC
CCTTGTGCACCCCTGGCAGACCCGCTACCGTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGAT
TTTGTGAAGTTCACCTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCC
GAAGTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGTGCAAGGGCCCTGACTGCCCTTGATGTTGATAATTT
TCCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCCTACGCAACACAATCTCAGAGGG
ACAGGGAGGGAGGTGTCAGTCACTCCCAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCAC
ACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTGA

Figura 8E, SEQ ID NO:35

IF-H5dTm.c

CAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGC

Figura 8F, SEQ ID NO:36

Construcción 141 de t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). Sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de Plastocianina-P19-Plastocianina

TGGCAGGATATATTGGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
 ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
 AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTTGAACAAAAATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTAT
 TAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAAATTTTGTTGC
 AACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAG
 GGAGAATAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAATAGTTGTACAA
 ATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGC
 ATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGATAAATTATTTTAAATTT
 AAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTAT
 TAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCA
 GTTAACCTCATTTTATATTTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
 AACGGTATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATC
 CAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCCACGCATCTGTGGCAGATCTA
 CATTATCTAAATCACACATCTTCCACACATCTGAGCCACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCTAT
 TCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAAGACTA
 ATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGC
 TAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAGTCC
 GAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAA
 GGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACT
 GCACAGAGTCCCTGGATCTTGGACGGGAGATTGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCCA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCCGGAAC
 TCTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGT
 GGAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTAAGTCAAACTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAA
 AATGCTTCTTCGTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTA
 ATCGTTGTTGTTATGAATACTATTTGTATGAGATGAAGTGGTGAATGTAAATTCATTACATAAGTGGAG
 TCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTTGTCTTATATT
 GAACAACTAAAAATGAACATCTTTGCCACAATTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAG
 TTCAATAGATTAAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTA
 ATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCTTCAGTTTGCAAGCTGCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGGC
 GCGTTGGGAATTACTAGCGCGTGTGCAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACT
 TGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGAGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGG
 GTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAGG
 AGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCCC
 GACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAAGCGTTCCAACCA
 CGTCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATA
 TCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGGAAACC
 TCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAGGAAAGGTGGCTCCT
 ACAATGCCATCATTGCCATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCGGACAGTGGTCCCAA
 GATGGACCCCAACCAAGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAAGCGTTTCAACCAAGTCTTCAAGCAAGT
 GGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCTTC
 CTCTATAAAGGAAGTTCATTTCTTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAAGCT
 GGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCT
 TTCTTGGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTCTCGGCACCAAGTACAACGTTTTCTTCACTGA
 AGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACAGTAGTGCGGGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTC
 TTGTGCGGTGGTCTTGGAAAAAGAACTTGTCTGGAGGCTGCTGTTGAGCCCCATACATTACTTGTTA
 CGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTGACGAGGATTGTTGCGCTGACTT
 CTTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTG
 GTTTTGAACCTTGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATTTCTGCCAAATTTGTCGGGCCCATGGCGAA
 AAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCCCTGACGG
 CTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAATC
 CATGGTGACCCGAGGATGCTGCAAGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTTACACTCTGAGCAGC
 GATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTTACACTCTGAGCAGC
 TCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTACCTGCAACGTTGCCCAACCGGCCA

GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTC
 CCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTA
 AGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGAT
 GATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAG
 TCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATC
 ACCATCACCATCACCATTAAAGGCCATTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTAT
 GTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGT
 TTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAC
 CGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATT
 GAATCCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTA
 ACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATAC
 GCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTA
 GATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
 TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTGCCAGCTGGC
 GTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTA
 GAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTCCCGCCTTCAGTTAACTATCAGTGTTTGACAGGAT
 ATATTGGCGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 8G

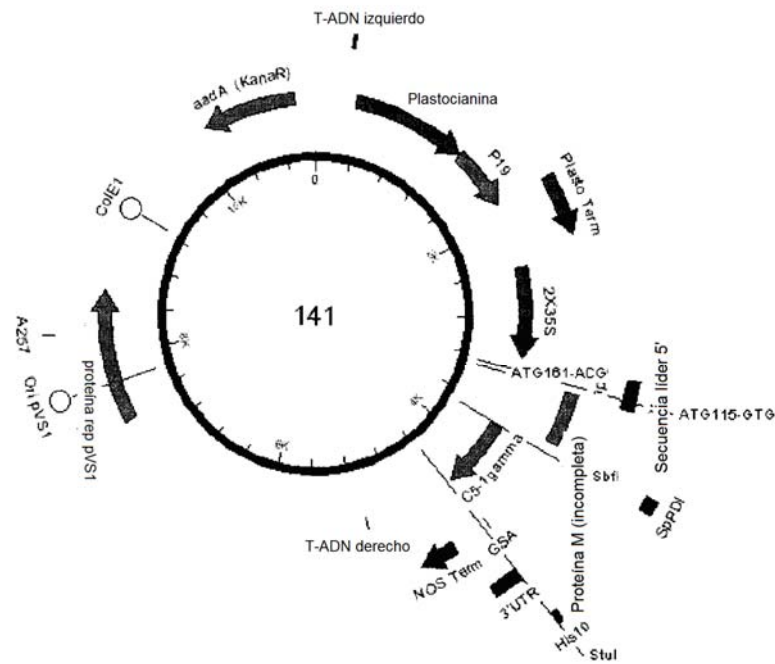


Figura 8H, SEQ ID NO:37

Casete de expresión número 1074 del promotor 2X35S al terminador de NOS. PDISP-Rab G -A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
 TGTCACCTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCA
 TCGTGGAAAAAGAACGCTTCAACACAGCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGC
 ACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTT
 TCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAA
 GATAGTGGAAAAGGAAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAGGCCATCGTTGAAG
 ATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGA
 CGTTCCAACACAGCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACA
 ATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTGGAGAGGTATTTAAAT
 CTTAATAGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATC
 TCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCG
 GCACCACTACAACGTTTTCTTCACTGAACCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGATAGTCCGCCGC
 CATTAAATAACGTGACTTGTCTATTCTTGTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCTGGAGGCT
 GCTGTTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTCTG
 CTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTA
 TTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTG
 CCCAAATTTGTGGGCCCCATGGCGAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTCTCTCTTGTGTTGG
TTCTTCTCAGATCTTCGCCAAATTCCTTATTACAGATACAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGA
TTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAACAAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCA
GGGTCTCCTACATGGAACCTTAAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAAATGAACGGGTTCACCTTGACA
GCGCTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAAGTTCGTTGGTTATGTGACAAACACGTTCAAAGAAAG
CATTTCGCCCAACACCAAGATGCATGTAGAGCCGCTACAAGTGAAGATGGCCGGTGACCCAGATA
TGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCTGACTACCGCTGGCTTCGAAGTGTAAAAACCAAGGAGTC
TCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTT
CCCTAGCGGGAAGTCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCAAGATTACACCA
TTTGGATGCCGGAAGTCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAG
CATCCAAAGGGAGTGAGACTTGGCGCTTGTAGATGAAAGAGGCCATATAAGTCTTTAAAGGAGCAT
GCAAACCTCAAGTTATGTGAGATTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGGATGCAAAACAT
CAAATGAAACCAAATGGTCCCCTCCGATCAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTG
AGCACCTTGTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATG
ACAACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGCTCAGTCATTTAAGAAAACCTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCA
TATACCATATCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAAGTTGGAATGAG
ATCCTCCCTTCAAAGGGGTGTTAAGAGTTGGGGGAGGTGTCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTC
AATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCCTCCAGCAA
CATATGGAGTTGTTGGAATCCTCGGTTATCCCCCTTGTGCAACCCCTGGCAGACCCGTTACCGTTTTC
AAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATTTGTGAAGTTACCTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGG
AGTTGACTTGGGTCTCCGAACTGGGGGAAGTATCAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTT
CCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAG
AATTTGCAATTTAAAGGCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCCGTGTGCAATTTCTATGTTGGTG
 AGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGG
 TCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATT
 CGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG
 TTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTACATGTAA
 TGCATGACGTTATTTATGAGATGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGGCATAC
 AAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGAT

Figura 8I, SEQ ID NO:38

Secuencia aminoacídica de PDISP-Rab G- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT

MAKNVAIFGLLSLLVLPVSQIFAKFPIYIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNL
SGFSYMEKLVGYILAUKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAA
YNWKMGADPRYEESLHNPYPDYRWLRVTKTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFP
SGKCSGVAVSSTYCTNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDE
RGLYKSLKGACKLKL CGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPDQLVNLHDFRSDEIE
HLVVEELVRKEECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLM EADAHY
KSVRTWNEILPSKGCLRVGGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSLLQQHMELL
ESSVIPLVHPLADPSTVFKDGDEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYQILSIYS
TVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGLQCRICI*

Figura 8J, SEQ ID NO: 39

Construcción 144 de t-ADN de izquierda a derecha (subrayado). Sistema de expresión
2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en BeYDV + replicasa con casete de expresión del inhibidor
de silenciamiento de Plastocianina-P19-Plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTAAGTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTAT
TAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTC
AACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAG
GGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACAAAATAGTTGTACAA
ATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGC
ATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAAATAAATTATTTTAAAT
AAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTAT
TAGTAATTAGAAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCA
GTTAACTCATTTTTATTTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AACGGTATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATC
CAATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTA
CATTATCTAAATCACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCAT
TCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTA
ATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGC
TAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAGTCC
GAGTTGGACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAA
GGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACGAGACGGAAGCTTCACT
GCACAGAGTCCCTGGATCTTGGACGGGAGATTGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCA
CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCCGGAAC
TCTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAGTCTACAGCTTGCCCAATCGAAGT
GGAAAGTATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAA
AATGCTTCTTCGTCCTCTATTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTGTTCTTGTAAGAGAGCTTAATTA
ATCGTTGTTGTTATGAATACTATTGTATGAGATGAACCTGGTGAATGTAATTCATTACATAAGTGGAG
TCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAGACATGAAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATT
GAACAATAAAATGAACATCTTTGCCACAACCTTTAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAG
TTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTA
ATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCTAGGAGATTG

TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCCGC
 GCGTTGGGAATTACTAGCGCGTGTGACACGCGTGGCGCGCCCTAGCAGAAAGGCATGTTGTTGTGACT
 CCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAA
 TTTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCACTTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGC
 CGAATTTTAAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCAGAGCGGTCCAGATTAA
 AGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTA
 TTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTGCGATACGAATTATTCTGACAAAGCTTCTTAAGCCG
 GTCAACATGGTGGAGCACGACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
 TGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCA
 TCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGC
 ACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTT
 TCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAG
 GATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAGGCCATCGTTGAAG
 ATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGA
 CGTTCCAACACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAAGGGATGACGCACA
 ATCCCACTATCCTTGCAGAACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGTATTAATAA
 CTAAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATC
 TCTCTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTCTTGTGCGTGAAGCATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTCG
 GCACCATGACACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTTTTGTGGACACGTAGTGGCGCGC
 CATTAAATAACGTGTACTTGCCTATTCTTGTGCGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCT
 GGTGTTGAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTGGCGGGTGCAATATCTCTACTCTG
 CTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTA
 TTTTCTTGAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTG
 CCAAAATTTGTCGGGCCATGGCGAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTGTGTTGG
 TTCTTCTCAGATCTTGCCTGCAGGCTCCTCAGCCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCC
 CCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTCA
 GCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTCTGC
 AGTCTGACCTCTACACTCTGACGAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTC
 ACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTG
 GTTGAAGCCTTGATATGTACAGTCCAGAAATATCATCTGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 ATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCG
 AGGTCCAGTTGAGCTGGTTTTGATAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGA
 GCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAA
 GGAAGGCCTATTTCTTTAGTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAAGGTTTT
 CTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTGCTCCCTT
 CAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAA
 GCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTC
 TTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACG
 TTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAT
 ATAGCGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAA
 GCTTGGCGCGGGTACCGAGCTCGAATTCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAATCAATAAAATGATT
 ATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATAACACACGAAATAACAA
 AAAAAACACAATCCAAAAACAAACACCCAAACAAAATAACACTATATATATCCTCGTATGAGGAGAGGCAC
 GTTCAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTA
 TCTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCTTGTGATAACATCCAGTCTTCTGTCAGGATTGCAAGAATTAT
 AGAAGGGATCCACCTTTTATTTCTTCTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAA
 CCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGGTG
 TCATCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCGAGACTTCTAGCCAGGT
 GGTCTTTCGGTACGAGTTGGTCCGAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCTTCCCTCAT
 CCTGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTGAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGT
 GTAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCCAGTTGTGACGATCTTCTGGCAGCGGA
 GATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATT

CCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCATTGATGAGGGAATTCCTTTGATCATGTCAAGATACTCCTCCTT
 AGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATCGTGCCTCAGATTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCG
 GAAATCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTG
 GCTGGATATTAGGGTGATTTCCCTTCAAAATCGAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTTATCAAG
 CTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAA
 TAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGT
 AGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCC
 GAGGGGTTGCCCTCAAACCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGGTAATT
 TAAGTAGTTAGTGAAAATGACGTCTTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCACAAAGGGGGGCCACGCC
 GAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTAAA
 GTAGAAAAGTTCGCCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTAT
 TTGATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACGGCCGGCCACTAGTG
 GCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCA
 GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTT
 GCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGCGTTTCCGCGCTTCAGT
 TTAACATATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 8K

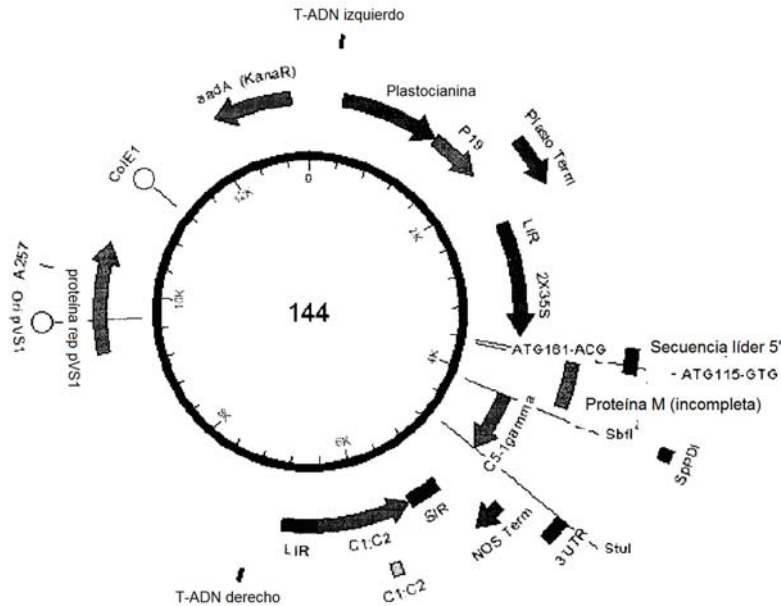


Figura 8L, SEQ ID NO:40

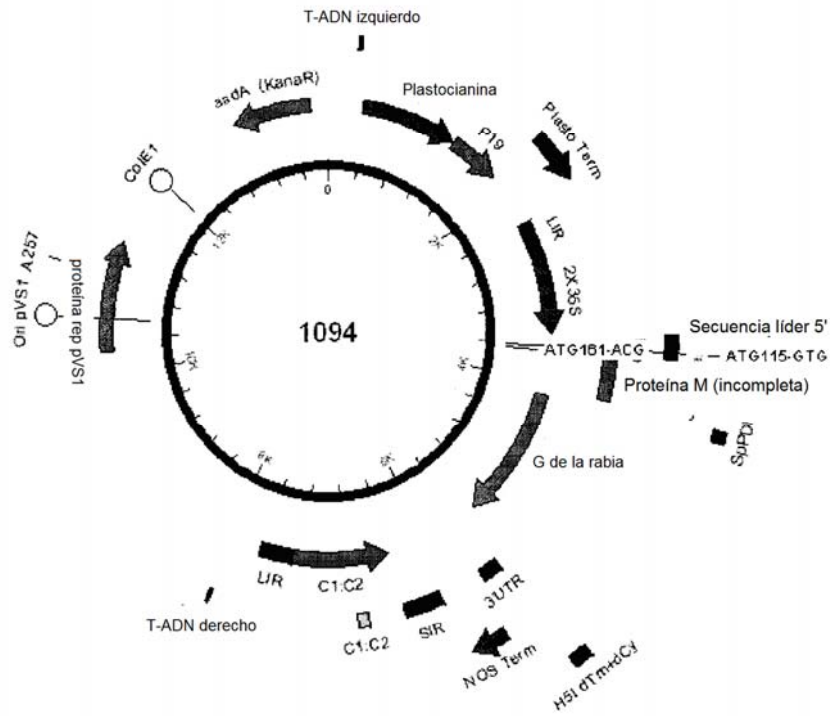
Casete de expresión número 1094 de derecha a izquierda de BeYDV LIR.PDISP-Rab G -A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT está subrayado.

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAG
GCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAGATGACGTCACTTTACTTAAAGACGA
AGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGT
GCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACAC
TATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACG
AATTATTCTGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATA
TCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACC
TCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGAAAGGAGGTGGCTCCT
ACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA
GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
GGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTC
AGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTTCCATTG
CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGAAAGGAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTG
CGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCCACCCA
CGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCT
CCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTT
CATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTTGGGGAACCCGAACCA
AACCTTCTTCTAAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGGTGTGAGCGATC
TTCAACGTTGTGAGATCGTGTCTCGCCACCACTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCT
CTTTGTGGACAGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCTTG
GGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTC
GGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGTC
TGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTGCAACTTGGAGAA
AGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCCAAATTTGTGGGGCCCATGGCGAAAACGTTGGGATTTTCG
GCTTATTGTTTTCTCTTCTGTGTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGCAAATTCCTATTACACGATACCA
GACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAACAAATTTGGTAGTGGG
GGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTCTCTCTACATGGAACTTAAAGTTGGATACATCTTAGCCAT
AAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACCTTCGTTGGTTA
TGTCACACCAACGTTCAAAGAAAGCATTTCGCCCCAACACCAAGATGCATGTAGAGCCGCTACAACCT
GAAGATGGCCGTTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCTGACTACCGCTGGCTTC
GAACTGTAAAAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATG
ACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGCTTCTACCTAC
TGCTCCACTAACCCAGATTACACCATTTGGATGCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGCTTGTGACATT
TTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGCGGCTTTGTAGATGAAAGAGG
CCTATATAAGTCTTTAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGAT
GGAACATGGGTGCGCATGCAACATCAAATGAAACCAATGGTGCCCTCCCGATCAGTTGGTGAACCT
GCACGATTTTCTGCTCAGACGAATTTGAGCACCTTGTGTAGAGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGT
GTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGCTCAGTCATTTAAGAA
AACCTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACT
ACAAGTCAGTCAGAACTTGAATGAGATCCTCCCTTCAAAGGGTGTGTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGT
CATCCTCATGTGAACGGGTGTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCAG
AGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGAATCCTCGGTTATCCCCCTTGTGCACC
CCCTGGCAGACCCGCTACCGTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATTTTGTGGAAGTTCACCTT
CCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAGTATCAATACT
GTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGAT
GTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAAATTA
TATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTA

ATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTATTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGC
AATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTAC
GTTAAGCATGTAATAATTAAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCC
GCAATTATACATTTAATACCGGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGC
GGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATCCGA
GTGTACTTCAAGTCAGTTGGAATCAATAAAATGATTATTTATGAATATATTCATTGTGCAAGTAGATA
GAAATTACATATGTTACATAACACACGAAATAAACAAAAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAACAA
AATAACACTATATATATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCACTGACTCGACGATTCGGAGCAAAAA
AGTCTCCCCGTACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCAAT
GATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAGAATTATAGAAGGGATCCACCTTTTATTTTCTTCTTTT
TCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACCT
GAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGT
TCCAGTAGTTGTGTCGCCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATG
TAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCCACTCCTCCCTCATCCTGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTCA
GATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGC
GTCTCTCTCCAGTTGTGTCAGATCTTCGTGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTG
CTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGA
GGGAATTCCTTTGATCATGTCAAGATACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATC
GTGCGTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCTT
TGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTCCTTCAAAATCG
AAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCA
TCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGAGAAAC
TGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTG
AAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCG
GCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGCATTTTGTAAATTTAAGTAGTTAGTGAAAAATGACGTCATTTACTT
AAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTA
TCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGG
TGTTCACTATATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCG
TCGGATACGAATTATTCGTAC

Figura 8M

Representación esquemática de la construcción número 1094



G de la rabia

Transferencia Western en biomasas

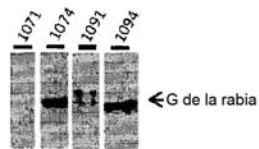


Figura 8N

Cromatografía de exclusión de tamaño en extractos concentrados y depurados

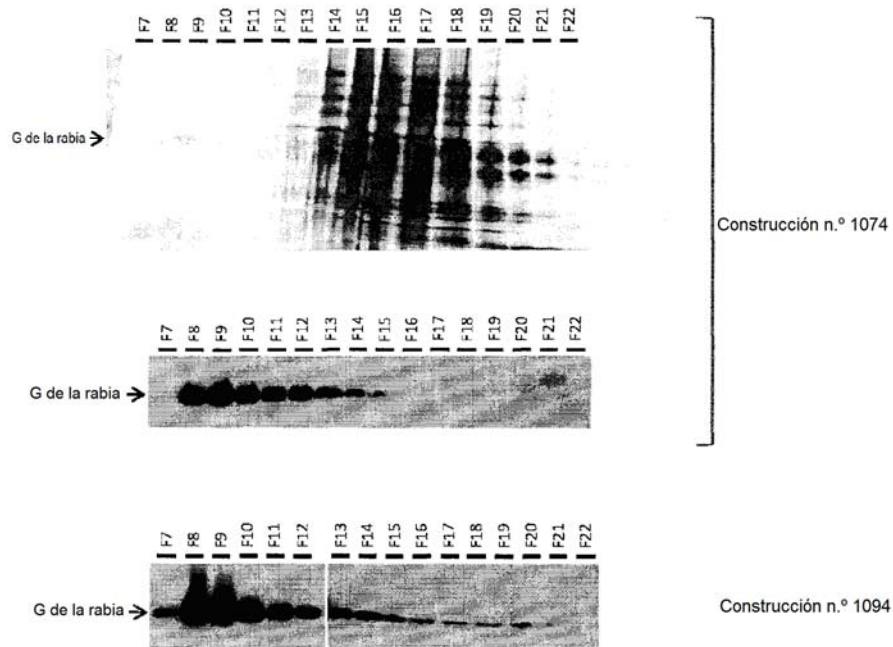


Figura 8O

Anticuerpo primario : Santa Cruz SE-57995 0.25µg/µL
Anticuerpo secundario: Anti-ratón de cabra, JIR, 115-035-146 (1/10000)

G de la rabia

Purificación (1074)



Figura 9A

Microscopía electrónica de transmisión en VLP purificada (1074) (la barra es de 100 nm)

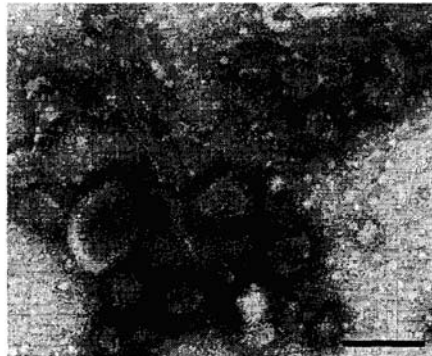


Figura 9B

Figura 10A, SEQ ID NO: 20

IF-wtSp-VZVgE.c

TGCCCCAAATTTGTCGGGGCCCATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTG

Figura 10B, SEQ ID NO: 21

IF-H5dTm+VZVgE.r

AATTGACAGTATTTGTCGTAGAAGTGGTGACGTTCCGGGGTTTACG

Figura 10C, SEQ ID NO: 22

Gen gE de VZV sintetizado (correspondiente a nt 3477-5348 de número de acceso al Genbank AY013752.1) (Péptido señal nativo en **negrita**, dominios nativos transmembrana y citosólico subrayados)

ATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGGATTGATGGGGTTCGGAATTATCACGGGAACGTTGC
GTATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCGATACGATGATTTTCACACCGATGAAGACAACTG
GATACAACTCCGTATATGAGCCTTACTACCATTCAGATCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATCGGGGA
GAGTCTTCGCGAAAAAGCGTACGATCATAACTCACCTTATATATGGCCACGTAATGATTATGATGGATTTT
TAGAGAACGCACACGAACACCATGGGGTGATAATCAGGGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGGTTA
ATGCAACCCACACAAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGGGGACGATACGGGCATCCACGTTATCCCTAC
GTTAAACGGCGATGACAGACATAAAATTGTAATGTGGACCAACGTCATACGGTGACGTGTTTAAAGG
AGATCTTAATCCAAACCCCAAGGCCAAAGACTCATTGAGGTGTCACTGGAAGAAAAATCACCCGTTTAC
TTTACGCGCACCGATTGAGCGGATTTATGGAGTCCGGTACACCGAGACTTGGAGCTTTTTGCCGTCATT
AACCTGTACGGGAGACGAGCGCCGCCATCCAGCATATATGTTTAAACATACAACATGCTTTCAGA
CGTGGTGGTGGATGTGGATTGCCCGGAAAAATACTAAAGAGGATCAGTTGGCCGAAATCAGTTACCGTT
TTCAAGGTAAGAAGGAAGCGGACCAACCGTGGATTGTTGTAACACGAGCAGCTGTTTGATGAACCTC
GAATTAGACCCCCCGAGATTGAACCGGGTGTCTTGAAAGTACTTCGGACAGAAAAACAATACTTGGGT
GTGTACATTTGGAACATGCGCGGCTCCGATGGTACGTCTACCTACGCCACGTTTTTGGTCACCTGGAAA
GGGGATGAAAAACAAGAAACCTACGCCCGCAGTAACCTCAACCAAGAGGGGCTGAGTTTCATAT
GTGGAATTACCACTCGCATGTATTTTCAGTTGGTGATACGTTTACGTTGGCAATGCATCTTCAGTATAAG
ATACATGAAGCGCCATTTGATTTGCTGTTAGAGTGGTTGTATGTCCCATCGATCCTACATGTCAACCAA
TGCGGTTATATTCTACGTGTTTGTATCATCCCAACGCACCCCAATGCCTCTCTCATATGAATTCGGTTG
TACATTTACCTCGCCACATTTAGCCCAGCGTGTGCAAGCACAGTGTATCAAAATTGTGAACATGCAGA
TAACTACACCGCATATTGTCTGGGAATATCTCATATGGAGCCTAGCTTTGGTCTAATCTTACACGACGG
GGGCACCACGTTAAAGTTTGTAGATACACCGAGAGTTTGTGGGATTATACGTTTTTGGGTGATTTT
AACGGGCATGTTGAAGCCGTAGCATACACTGTTGTATCCACAGTAGATCATTTTGTAAACGCAATTGAA
GAGCGTGGATTTCCGCCAACGGCCGGTCAGCCACCGCGACTACTAAACCAAGGAAATTACCCCG
TAAACCCCGGAACGTACCACTTCTACGATATGCCGCATGGACCGGAGGGCTTGCAGCAGTAGTACTT
TTATGCTCTGTAATATTTTAACTCTGTACGGCTAAACGAATGAGGGTTAAAGCCTATAGGGTAGACAAGT
CCCGGTATAACCAAGCATGTATTACGCTGGCCTTCCAGTGGACGATTTTCGAGGACTCGGAATCTACG
GATACGGAAGAAGAGTTTGATAACCGGATTGGAGGGAGTCACGGGGGTTCCAGTTACACGGTGTATAT
AGATAAGACCCGGTGA

Figura 10D, SEQ ID NO: 23

VZVgE+H5dTm.c

GCCACTGTTGAATAAATTGACAGTATTTGTCGTAGAAGTGGTGACG

Figura 10E, SEQ ID NO: 24

Casete de expresión número 946, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). VZV gE-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT subrayado

TTAATTAAGTCGACAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATA
TCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTC
CTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
ATGCCATCATTGCCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAAACCAGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGT
GATAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAG
GGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCT
ACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC
ATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAA
AGAAGACGTTCCAACCACGTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG
CACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTGGAGAGGTATTA
AATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCA
TCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCCTC
GGCACCAGTACAACGTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAAGTGGCGGCC
ATTAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCTGGAGGCTGCT
GTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGAATATCTCTACTTCTGCTTG
ACGAGGTATTGTTGCCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTGTCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTT
CTTTGAACAGAGTTTTCGGTGGTTTTCGAAGTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCA
AATTTGTGCGGCCATGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGTATTGATGGGGTTCGGAATTATCACG
GGAACGTTGCGGTATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCAGTACGATGATTTTCACACCGATGAAGA
CAAACCTGGATACAACTCCGTATATGAGCCTTACTACCATTCAGATCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATC
GGGGAGAGTCTTCGCGAAAAGCGTACGATCATAACTCACCTTATATATGGCCACGTAATGATTATGATGGA
TTTTTAGAGAACGCACACGAACACCATGGGGTGTATAATCAGGGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGGTT
AATGCAACCCACACAAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGGGGACGATACGGGCATCCACGTTATCCCTACGT
TAAACGCGCATGACAGACATAAATTTGTAATGTGGACCAACGTCAATACGGTGACGTGTTTAAAGGAGAT
CTTAATCCAAAACCCCAAGGCCAAGACTCATTGAGGTGTCAGTGGAAAGAAATCACCGTTTACTTTACG
CGCACCGATTACGCGGATTTATGGAGTCCGTACACCGAGACTTGGAGCTTTTGGCGTCACTAACCTGTA
CGGGAGACGACGCGCCGCCATCCAGCATATATGTTTAAACATACAACATGCTTCAAGACGTGGTGGTG
GATGTGGATTGCGCGGAAATACTAAAGAGGATCAGTTGGCCGAATCAGTTACCGTTTTCAAGGTAAGAA
GGAAGCGGACCAACCGTGGATTGTTGTAACACGAGCAGACTGTTTGTGAACTCGAATTAGACCCCCCG
AGATTGAACCGGGTGTCTTGAAAGTACTTCGGACAGAAAAACAATCTTGGGTGTGTACATTTGGAACATG
CGCGGCTCCGATGGTACGCTACCTACGCCACGTTTTTGGTCACCTGGAAAGGGGATGAAAAACAAGAAA
CCCTACGCCCGCAGTAACCTCTCAACCAAGAGGGGCTGAGTTTCATATGTGGAATTACCACTCGCATGTAT
TTTCAGTTGCTGATACGTTTAGCTTGGCAATGCATCTTCAGTATAAGATACATGAAGCGCCATTGATTTG
CTGTTAGAGTGGTTGATGTCCCATCGATCCTACATGTCAACCAATGCGGTTATATTCTACGTGTTTGTA
TCATCCCAACGCACCCCAATGCCTCTCTCATATGAATTCGGTTGTACATTTACCTCGCCACATTTAGCCC

AGCGTGTTCGACGACAGTGTATCAAAATTGTGAACATGCAGATAACTACACCGCATATTGTCTGGGAATA
TCTCATATGGAGCCTAGCTTTGGTCTAATCTTACACGACGGGGGCACACGTTAAAGTTTGTAGATACACC
CGAGAGTTTGTGCGGATTATACGTTTTTGTGGTGTATTTAAGCGGCATGTTGAAGCCGTAGCATACACTG
TTGTATCCACAGTAGATCATTTTGTAAACGCAATTGAAGAGCGTGGATTTCGGCCACGGCCGGTCAGCCA
CCGGCGACTACTAAACCAAGGAAATTACCCCGTAAACCCGGAACGTCACCACTTCTACGACAAATACT
GTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGT
GCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTA
TTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAAT
TTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTA
AAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAAT
AAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCAGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTT
AAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCA
ATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGT
CATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCC

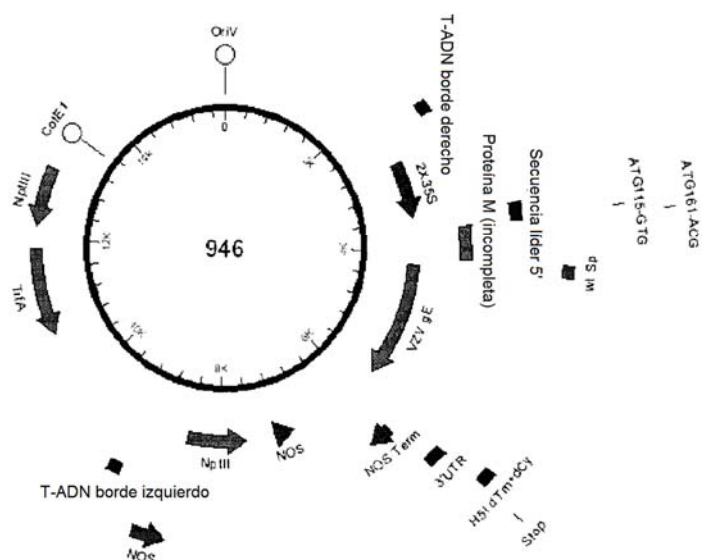
Figura 10F, SEQ ID NO:25

Secuencia aminoácida de VZV gE- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT

MGTVNKPVVGLMGFGIITGTLRITNPFVRASVLRYYDFHTDEKLDNTNSVYEPYHSDHAESSWVNRGESS
RKAYDHNSPYIWPNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD
RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQQQRLEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAA
PAIQHICLKHTTCFQDVVVDVCAENTKEDQLAEISYRFQGGKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEFG
VLKVLRTKQYLVGYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGD
TFSLAMHLQYKIEAPFDLLEWLYVPIDPTCQFMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVAS
TVYQNCHEADNYTAYCLGISHMEPSFGLIILHDGTTILKFVDTPELSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTV
DHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRQILSIYSTVASSIALAIMMAGLSLWMCNCS
LQCRICI*

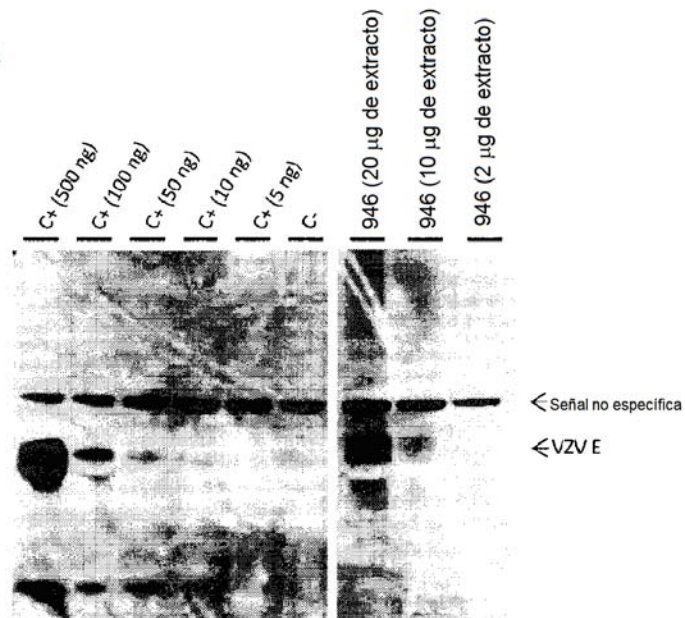
Figura 10G

Representación esquemática de la construcción número 946



Virus varicela-zóster (VZV)

Figura 11A



Control positivo (C+): gE de VZV, Abcam, ab43050
 Control negativo (c-): Extracto de hojas infiltradas con mock
 Anticuerpo primario: Proteína anti-VZVgE de mAb de ratón, abcam, ab52549 (1 µg/ml)
 Anticuerpo secundario: Anti-ratón de cabra, JIR, 115-035-146 (1/10000)

Figura 11B

Cromatografía de exclusión de tamaño en extractos en bruto (946)

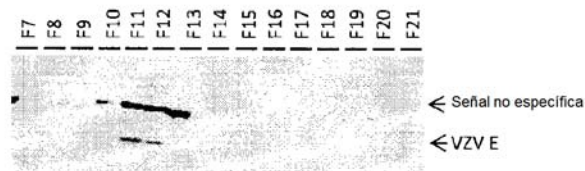


Figura 12A

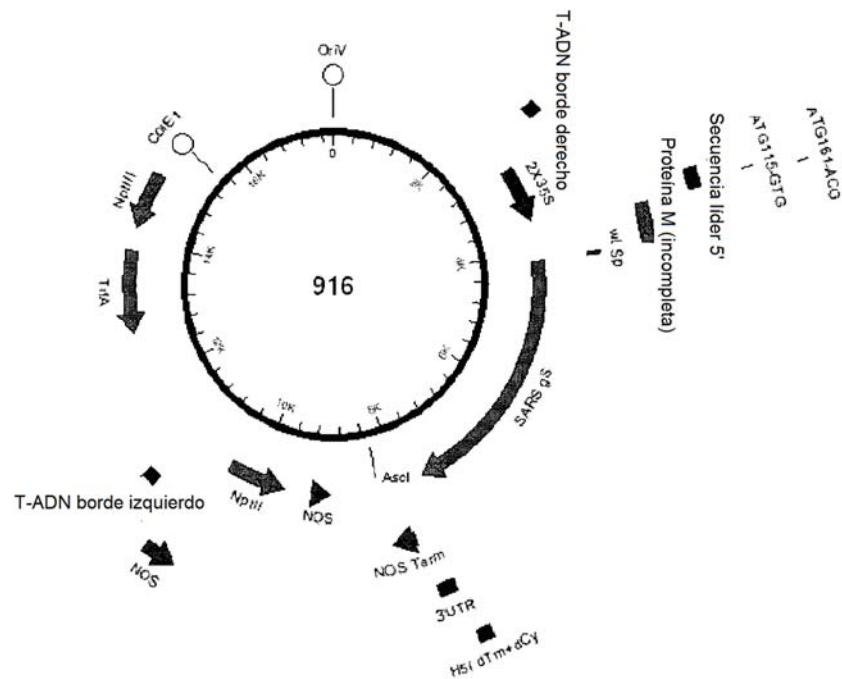


Figura 12B, SEQ ID NO:26

IF-wtSp-SARSgS.c

TGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGTTTATTTTCTTATTATTCTTACTCTC

Figura 12C, SEQ ID NO:27

IF-H5dTm+SARSgS.r

AATTGACAGTATTTGAGGCCATTTAATATATTGCTCATATTTTCC

Figura 12D, SEQ ID NO:28

Gen gS de SARS sintetizado (correspondiente a nt 21492-25259 de número de acceso al Genebank AY278741.1) (Péptido señal nativo en **negrita**, dominios transmembrana y citosólico nativos subrayados)

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATG
 ATGTTCAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTT
 AGATCAGACACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACT
 ATTAATCATACGTTTGGCAACCTGTCAACCTTTTAAGGATGGTATTTATTTTGTGCCACAGAGAAAT
 CAAATGTTGTCCGTGGTGGGTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAA
 CAATCTACTAATGTTGTTATACGAGCATGTAACTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTA
 AACCCATGGGTACACAGACACATACTATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCATTTTCGAGTACATATC
 TGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAGTCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTAAAA
 ATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTATCAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGG
 TTTTAACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCTCTTGGTATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTAC
 AGCCTTTTCACTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCAGCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCC
 AACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCTGTTGATTGTTCTCAAAATCCA
 CTTGCTGAACCTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTACCAGACCTCTAATTTCA
 GGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAACTTGTGTCCTTTTGGAGAGGTTTT
 TAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAATTTCTAATTTGTTGCTGATTACT
 CTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTCACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAATGAT
 CTTTGCTTCTCAAATGCTATGCAGATTTCTTTGATGCAAGGGAGATGATGAAGACAAAATAGCGCCAG
 GACAAACTGGTGTTATTGCTGATTATAAATTGAAATTTGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCCTTGCTG
 GAATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAATTATAAATATAGSTATCTTAGACATGGCA
 AGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCTTTCTCCCTGATGGCAACCTTGCACCCAC
 CTGCTCTTAATTGTTATTGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACCCACTACTGGCATTGGCTACCAACCT
 TACAGAGTTGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTTAATGCACCGGCCACGGTTTGTGGACCAAAATATCCA
 CTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGCAATTTTAAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCT
 TCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAATTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTCCAG
 ATCCTAAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCTTGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGG
 AACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAACTGCAGTGTGTTTCTCAGCAATTC
 ATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTGGAACAATGTATTCCAGACTCAAGCAG
 GCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTGACACTTCTTATGAGTGCAGACATTCCTATTGGAGCTGGCATT
 GTGCTAGTTACCATACAGTTTCTTATTACGTAGTACTAGCCAAAATCTATTGTGGCTTATACTATGTCT
 TTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAACTTTTCAATTAGCAT
 TACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGCGGAGAT
 TCTACTGAATGTGCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCCTCTCAG
 GTATTGCTGTGTAACAGGATCGCAACACACGTGAAGTGTTGCTCAAGTCAACAAATGTACAAACCC
 CAACTTTGAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTCAAAATATTACCTGACCCCTCTAAAGCCAACTAAGAGG
 TCTTTTATTGAGGACTTGCTCTTAAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCG
 AATGCCTAGGTGATATTAAATGCTAGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGTC
 CACCTCTGCTCACTGATGATATGATTGCTGCCTACACTGCTGCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTG
 GATGGACATTTGGTGTGGCGCTGCTCTTCAATACCTTTTGTATGCAAAATGGCATATAGGTTCAATG
 GCATTGGAGTTACCCAAATGTTCTCTATGAGAACCACCAAAACAAATCGCCAACCAATTTAAACAAGCGAT
 TAGTCAAATTCAGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAAACCA
 GAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTTAAACAACCTAGCTCTAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTA
 AATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAATTGACAGGTTAATTACAGGCAGA
 CTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAAT
 CTTGCTGCTACTAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCT
 ACCACCTTATGTCCTTCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTTGTTCTTCTACATGTCACGTATGTGCCAT

CCCAGGAGAGGAACCTTCACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCCAAAGCATACTTCCCTCGTGAA
GGTGTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTTATTACACAGAGGAACCTCTTTCTCCACAAATAATTAC
TACAGACAATACATTTGCTCAGGAAATTTGATGTCGTTATTGGCATCATTAAACACACAGTTTATGAT
CCTCTGCAACCTGAGCTCGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATACATACCA
GATGTTGATCTTGGCGACATTTAGGCATTAACGCTTCTGTCGTCACATTCAAAAAGAAATGACCGC
CTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAAT
ATATTAATGGCCTTGGTATGTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAAT
CITGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGCTCITGTTGTTCTTCTGCTGCAA
GTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAA

Figura 12E, SEQ ID NO:29

SARSgS+H5dTm.c

ATATATTAAATGGCCTCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTG

Figura 12F, SEQ ID NO:30

Casete de expresión número 916, de PacI (aguas arriba del promotor) a AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). SARS gS-A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT subrayado

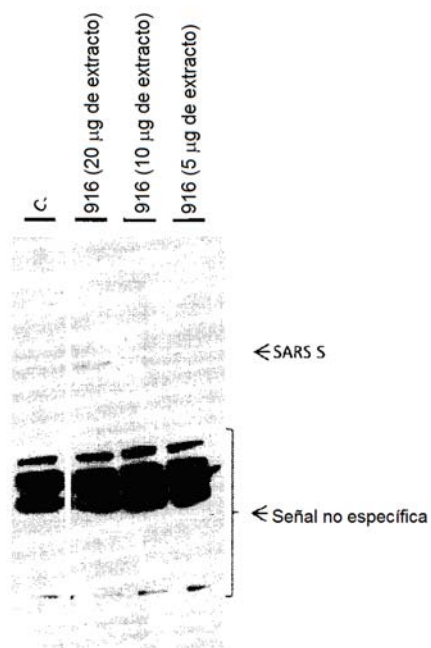
TTAATTAAGTCGACAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAA
TATCAAGATACAGTCTCAGAAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAA
CCTCCTCGGATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTC
CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCA
AAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCACGTCTTCAAAGCAA
GTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
TCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCAT
TGCCGAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCAT
TGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAT
CTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAG
TTCAATTCATTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTGTAAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAAC
CAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGTGCGTGAGCGA
TCTTCAACGTTGTGATCGTCTCGGCACCACTACACGTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGAT
CTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCATTCTTGTGCGGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTACGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTT
TCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGATTTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTT
GCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGA
GAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATTTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGTTTATTTCTTATTATTCTT
ACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTTCAAGCTCCTAATTACACTC
AACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGACACTCTTTATTAACT
CAGGATTTATTTCTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATACGTTTGGCAACCC
TGTCATACCTTTTAAAGGATGTTATTTTGTCTGCCACAGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGTTGGGTT
TTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTATACG
AGCATGTAACCTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTGTCTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACAT
ACTATGATATTCGATAATGCATTAATTGCACTTTCGAGTACATATCTGATGCCCTTTTCGCTTGATGTTTC
AGAAAAGTCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTAAAAATAAGATGGGTTTCTCTATGTTT

ATAAGGGCTATCAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACITTTGAAACCTATTTTT
 AAGTTGCCTCTTGGTATTAAACATTACAAATTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGATGAT
 TTGGGGCACGTCAGCTGCAGCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACATTTATGCTCAAGTATGAT
 GAAAATGGTACAATCACAGATGCTGTTGATTGTTCTCAAAATCCACTTGCTGAACTCAAAATGCTCTGTTA
 AGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTACCAGACCTCTAATTTAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTG
 TGAGATTTCCCTAATATTACAACTTTGTGTCCTTTTGGAGAGGTTTTAATGCTACTAAATTCCTCTCTGTC
 TATGCTATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTGTGTTGCTGATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTT
 TTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAATGATCTTTGCTTCTCCAATGCTATGCA
 GATTCTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAATAGCGCCAGGACAACTGGTGTTATTGCTGAT
 TATAATTATAAATGCCAGATGATTTATGGGTTGTGCTTGGTGGAACTAGGAACATTGATGCTA
 CTTCACCTGGTAATTATAATTATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGA
 CATATCTAATGTGCCCTTCTCCCCTGATGGCAAACTTGACCCCCACCTGCTCTTAATTGTTATTGGCCA
 TTAAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCTTT
 TGAACCTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTGTGGACCAAAATATCCACTGACCTTATTAAGAACCACTGT
 GTCAATTTTAAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTCAACCAAT
 TCAACAAATTTGGCCGTGATGTTCTGATTTCACTGATTCCGTTGAGATCCTAAACATCTGAAATATTA
 GACATTTACCTTGTCTTTTTGGGGGTGAAGTGAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTG
 CTGTTCTATATCAAGATGTTAAGTGCACCTGATGTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGC
 TTGGCGCATATATTCTACTGGAAACAATGATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGACGA
 TGTCGACACTTCTTATGAGTGGGACATTCCTATTGGAGCTGGCATTGTGCTAGTTACCATACAGTTTCT
 TTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTGGCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGC
 TTAAGTCTAATAACACCATTTGCTATACCTACTAATTTTCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTT
 CTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGCGGAGATTCTACTGAATGTGCTAATTTGCT
 TCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCACCTCTCAGGTATTGCTGCTGAACAGGATCG
 CAACACACGTGAAGTGTTCGCTCAAGTCAAAACAATGTACAAAAACCCCAACTTTGAAATATTTTGGTGGT
 TTTAATTTTTACAAATATTACCTGACCTCTAAAGCCAACCTAAGAGGTCTTTTTATTGAGGACTGCTCTT
 TAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGATTAATGCG
 TAGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGGCCACCTCTGCTCACTGATGATAT
 GATTGCTGCCCTACACTGCTGCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGTGCGCC
 CTGCTCTTCAAATACCTTTTGTATGCAATGGCATATAGGTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAATGT
 TCTCTATGAGAACCAAAAACAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATTCACAAATCACTT
 ACAACAACATCAACTGCATTGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACA
 CTTGTTAAACAACCTAGCTCTAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTGCGGACTTGA
 TAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAATTTGACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGT
 AACACAACAACCTAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAATGTCTGA
 GTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTACCACTTATGCTTCCCACA
 AGCAGCCCCGCGATGGTGTGCTTCCCTACATGTACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCA
 CAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGTGTTTTTGTGTTAATGGCA
 CTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTCTCCACAATAAATTAACACAGACAATACATTTGTCTCA
 GGAATTTGTGATGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTCGACT
 CATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATACATCACCAGATGTTGATCTTGGCGACATTT
 AGGCATTAAACGCTTCTGCTGCAACATTCAAAAAGAAATGACCGCCTCAATGAGGTGCTAAAAATTTA
 AATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTTGGGAAATATGAGCAATATTAATGGCCTCAAATACTCT
 CAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGT
 GCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTA
 TTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAAT
 TTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTATTA
 AAAAAAAGACCGGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAA
 TAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTAAGT
 TAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCG
 CAATTTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGCG
 GTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCC

Figura 12G, SEQ ID NO:31

Secuencia aminoacídica de SARS gS- A/Indonesia/5/2005 H5 TM+CT

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTLQDLFL
 PFYSNVTGFHTINHTFGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNS
 TNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNF
 KHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFA
 QDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY
 QTSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNST
 FFSTFKCYGVSATKLNLCFSNVYADSFVVGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFM
 GCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNPFSPDGKPCPTPALNCY
 WPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNGLTG
 TGVLTSSKRFQPFQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCSFGGVSVITPGTNASSE
 VAVLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPI
 GAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMA
 KTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYK
 TPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINARDLI
 CAQKFNGLTVLPPLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGI
 GVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSS
 NFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKM
 SECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKA
 YFPREGVFVFNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNCDVVGIIINNTVYDPLQPELDSF
 KEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ
 YIKWPQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCNGLQCRICI*



Control negativo (C-): Extracto de hojas infiltradas con mock
 Anticuerpo primario: Policlonal IgG1 de conejo, Imgenex, IMG-690 (2 µg/ml)
 Anticuerpo secundario: IgG anti-conejo de ratón, JIR, 111-035-144 (1/10000)

Figura 12H

Figura 13A (SEQ ID NO: 43)

IF-Opt_EboGP.s2+4c

TCTCAGATCTTCGCCATCCCTCTGGGAGTGATCCACAATTCGACT

Figura 13B (SEQ ID NO: 44)

H5iTMCT+Opt_EboGP.r

TTGAATAAATTGACAGTATCTGGCGCCATCCGGTCCACCAGTTATCGT

Figura 13C (SEQ ID NO: 45)

gen GP sintetizado optimizado (correspondiente a nt 6039-8069 con el número de acceso a Genbank AY354458 para la secuencia génica de tipo silvestre. El gen se optimizó para el uso de codón y el contenido de GC, delección de los sitios de corte y empalme crípticos, secuencias Shine-Delgarno, secuencia desestabilizante del ARN y sitios de entrada de ribosomas procariotas (Péptido señal nativo en negrita, dominios nativos transmembrna y citosólico subrayados).

ATGGGGGTGACCGGAATCCTTCAGCTCCCTCGCGATAGGTTCAAACGGACGTCCTTCTTCTCTGG
GTGATCATCCTGTTTCAGCGCACCTTCTCAATCCCTCTGGGAGTGATCCACAATTCGACTCTCCAGGTG
AGCGAGGTGACAACTCGTGTGCCGCGATAAGTTGTCCAGCACCAATCAGCTCAGAAAGTTGGCCTCA
ACCTGGAGGGGAATGGGGTCGCCACAGACGTGCCATCCGCGACCAAGCGCTGGGGCTTTCCGGTCGGGTG
TTCCCCCTAAAGTCGTGAATTACGAGGCCGGGGAGTGGGCTGAAAACGTACAACTGGAAATCAAGA
AACCCGACGGCAGCGAGTGTCTGCCCGCGGGCCAGACGGGATCAGGGGTTTCCCGAGGTGCCGGTACG
TGCACAAGGTCTCGGGAACCGGCCCGTGCGCCGCGGATTTGCCCTTCCATAAGGAGGGCGCATTCTTCT
CTACGATAGACTGGCCTCCACGGTCATCTATCGCGGCACACCTTCGCGGAGGGGGTGGTGGCATTCTC
ATCCTGCCGCGAGCTAAGAAAGATTTCTTCAGCTCCACCTCTCAGGGAACCAAGTCAACGCCACAGAGG
ATCCCTCCTCGGGATATTACAGCACCAATTCGGTACCAGGCCACAGGCTTCGGGACCAATGAGACTGA
GTACCTGTTTCGAGGTGGACAACCTAACATACGTGCAGCTCGAATCGCGGTTTACCCCGCAGTTCTTTTGC
AACTTAACGAGACGATCTATACAGTGGTAAACCGAGCAACACGACCGGGAAGCTCATCTGGAAAGTAA
ACCCGAGATCGACACCAAGATTGGAGAGTGGGCTTTCTGGGAAACCAAGAAAAACCTGACCCGGAAGA
TCAGGTGGGAGGAGTTGAGCTTCACTGCCGTCTCCAATAGAGCAAAAAACATCAGCGGCCAGAGCCCTG
CCCGGACTTCCAGCGACCCAGGTACCAACACACGACAGAGGACCAAGATTATGGCCTCGGAGAATT
CCTCTGAATGGTCCAGGTGCATAGCCAGGGGCGGAAGCTGCCGTCTCGCACCTGACAACCTTGGCAAC
GATTTCACACAGCCCAACCAACCCACGACAAAGCCCGGCCCGACAACCTCACCCATAATACCCCGGTC
TATAAGCTGGACATTTCCGAAGTACGCGAGTGGAGCAGCACCAACCGGAGGACCGACAACGACTCAACA
GCTAGCGATACCCCTCCGCCACACGGCAGCGGGCCACCAAGGCTGAGAACCAATACGAGCAAG
GGCACCGACCTCTGGACCCCGGACTACCAACGAGCCCCAGAATCACAGCGAAACGGCGGCAACAAC
AACACACACCATCAGGATACTGGGAGGAGTCGGCTCCAGCGGAAACTGGGCCTGATCACAACACC
ATAGCCGGGGTCGCCGGGCTGATCACTGGAGGCCGGAGGGCACGAGAGAGGCCATTGTGAACGCCAG
CCCAATGCAACCAAACTCCACTACTGGACCACGAGGACGAGGGGGCCGCTATCGGCCTGGCCTGG
ATCCCATACTTTGGGCCCGCGCTGAGGGCATATACAGGAGGGCCTCATGCACAATCAGGACGGACTG
ATCTCGGACTCCGCCAGCTTGCCAACGAGACCACTCAGGCGTTGCAGCTGTTTCTCGGGGCCACTACCG
AGCTCAGGACGTTTCAGCATTCTGAATCGGAAGGCAATCGATTTCCTACTCCAGCGGTGGGGCGGACATG
CCACATCCTGGGACCCGATTGTTGCATCGAGCCCCACGACTGGACCAAGAACATTACAGATAAAATCGA
CCAGATCATTCATGATTTCTGGACAAGACACTGCCGACACAGGGGGACAACGATAACTGGTGGACCGG

ATGGCGCCAGTGGATCCCAGCCGGGATTGGCGTGACAGGTGTCATTATCGCCGTGATCGCCCTGTTTTGC
ATTGCAAATTCGTTTTCTAG

Figura 13D (SEQ ID NO: 46)

Opt_EboGP+H5iTMCT.c

GGATGGCGCCAGATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCC

Figura 13E

Representación esquemática de la construcción 1192. Los sitios de enzima de restricción SacII y StuI usados para la linearización plasmídica se anotan en la representación.

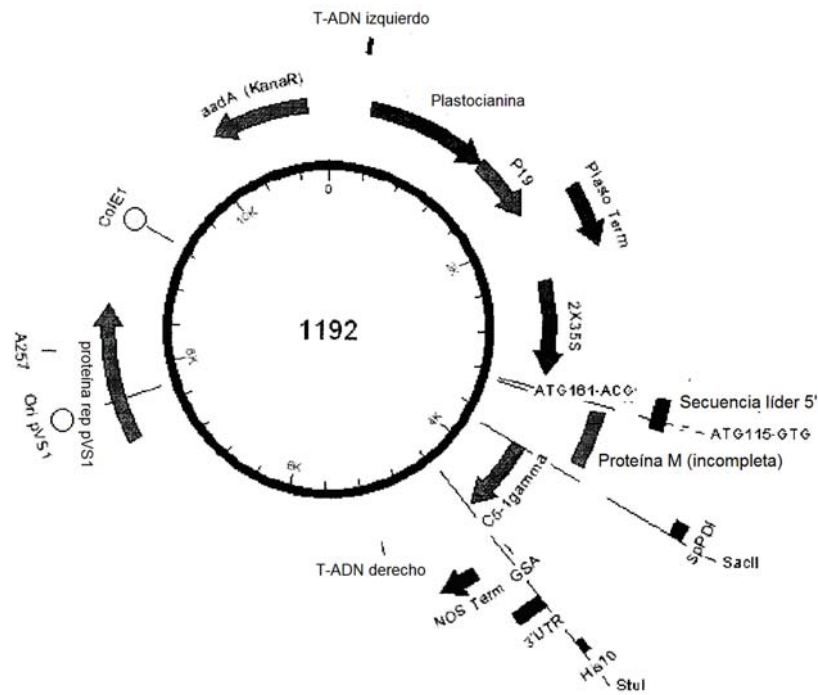


Figura 13F, SEQ ID NO: 47

Construcción 1192 de los bordes del t-ADN de izquierda a derecha (subrayado), 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento plastocianina-P19-plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
 ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
 AGTTTAAGTTAGCAAGTGTTGACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATT
 TTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGITG
 CAACATTTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
 GGGAGAATAAAAAATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
 AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
 CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGATAAATTTTAA
 AATTAAAAGTTGAGTCAITTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
 TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
 AAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA
 ACATTAACCTCAACCAATCACACAATCTGTATGAGATAAACCCTTTAAGGCCACGCTGTGGCACA
 TCTACATTATCTAAATCACACATTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
 CCATCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
 ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
 AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAG
 TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTC
 AAGGAAAGCTGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
 CTGCACAGAGTCTTGGATCTTGGACGGGAGATTCCGTTAATATGCAGCATCTCGATTTCCTGGTTTCGA
 CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCCGGAAC
 CTTACGATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
 TGCCTTCTCGTCTCCTATTATATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
 CGTTGTGTATGAAATACTATTGTATGAGATGAACGTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
 AGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
 ACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
 CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTACTA
 ATTTTATATCATCCCCCTTGTATAAATGATAGTACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
 TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCCGCGG
 TTGGGAATTAAGTACGCGGTGTCGACAAGCTTGATGCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCT
 ACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAA
 TATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGA
 AGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGT
 GGTCCCAAAGATGGACCCCAACCAAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTTCAACCAACGCTTCA
 AAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGAT
 ACAGTCTCAGAAGACCAAGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGA
 TTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCC
 ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
 CACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTTCAACCAACGCTTCAAGCAAGTGGATTGATGTG
 ATAICTCCACTGACGTAAGGGATGACGACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGG
 AAGTTCAITTCATTGAGAGGATTAAAAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCG
 AAAAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGTGAGC
 GATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAAGTACAACGTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAG
 ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATCTTGTGCGGTGGTCT
 TGGGAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGTGTTTCAAGCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACTTTC
 GGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTACGAGGATTTGTGTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTGCTG
 ATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACCTGGAGAAAG
 ATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTT

ATTGTTTTCTCTTCTTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCGCCGCGGCTCTCAGCCAAAACGACACCCCA
TCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAA
GGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTC
CCAGCTGTCCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGACCTGGCCCA
GCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCA
GGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCAGAAATATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAG
CCCAAGGATGTGCTACCAATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATG
ATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGA
GGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGC
AAGGAGCGATCGCTACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCTATTTCTTTAGTTTGAAT
TTACTGTTTATCGGTGTCATTTCTATGTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGT
AATTTAATTTCTTTGTGAGCTCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTT
TATTAATAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAC
ATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTT
GAATTTAAGTAAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTATGATTA
GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTAT
CGCGCGCGGTGTCATCTATGTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGC
ACTGGCGCTGCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCGAGCA
CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA
GCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTTCCCGCTTCAGTTTAACT
ATCAGTGTGACAGGATATATTGGCGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 13G, SEQ ID NO: 48

Casete de expresión número 1366 del promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP-GP del virus del Ébola Zaire 95-H5 TM+CT de la secuencia A/Indonesia/5/2005 subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCAGACACACTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGTCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGC
ACACACTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
ACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACCTTATTGTGAAGATA
GTGGAAGGAAGGAGGTGGTCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
ACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAATCCCACT
ATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTGGAGAGGTATTAAATCTTAATAGG
TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
CAAACCTCTCTCTTGTCTTCTTGTGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACGATACA
ACGTTTCTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGACACGTAAGTGGCGCCATTAAATAACG
TGTAATGTCCTATTCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTACGCCCA
TACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
TTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTCTTGTGAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGC
CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTTGTTTCTCTCTTGTGTGGTTCCTTCTCAGATCTTCG
CCATCCCTCTGGGAGTGATCCACAATTCGACTCTCCAGGTGAGCGAGGTGACAAAACCTGTGTGCCGGA
TAAGTTGTCCAGCACAATCAGCTCAGAAGTGTGGCCTCAACCTGGAGGGGAATGGGGTCGCCACAGA
CGTGGCATCCGCGACCAAGCGCTGGGGCTTTCGGTGGGGTGTTCCTTAAAGTCGIGAAATTACGAGGCC
GGGGAGTGGGCTGAAAACCTGTACAACCTGGAAATCAAAGAAACCCGACGGCAGCGAGTGTCTGCCCGC
GCCCGAGACGGGATCAGCGGTTTCCCGAGGTGCCGGTACGTGCACAAGGTCTCGGGAACCGGCCGTGC
GCCGGCGATTTCGCTTCCATAAGGAGGGCGCATTTCTTCTACGATAGACTGGCTTCCAGGTCATCTA

TCGCGGCACCACCTTCGCGGAGGGGGTGGTGGCATTCTCATCTGCGCGAGGCTAAGAAAGATTCTTC
 AGCTCCCACTCTCAGGGAACCAAGTCAACGCCACAGAGGATCCCTCCCGGGATATTACAGCACCAAA
 TTCGGTACCAGGCCACAGGCTTCGGGACCAATGAGACTGAGTACCTGTTTCGAGGTGGACAACTAACATA
 CGTCAGCTCGAATCGCGGTTTACCCCGCAGTTCCTTTTGCAACTTAACGAGACGATCTATACCAGTGGT
 AAACGGAGCAACACGACCGGGAAGCTCATCTGGAAAGTAAACCCGGAGATCGACACCACGATTGGAGA
 GTGGGCTTCTGGGAAACCAAGAAAAACCTGACCCGGAAGATCAGGTCGGAGGAGTTGAGCTTCACTGC
 CGTCTCCAATAGAGCAAAAAACATCAGCGGCCAGAGCCCTGCGCGGACTTCCAGCGACCCAGGTACCAA
 CACCACGACAGAGGACCACAAGATTATGGCCTCGGAGAATTCTCTGCAATGGTCCAGGTGCATAGCCA
 GGGGCGGAAGCTGCCCTCTCGCACCTGACAACCTTGGCAACGATTTCACCAGCCCAACACCCACG
 ACAAAGCCCGGCGCGACAATCCACCCATAATACCCCGGCTATAAGCTGGACATTTCGAAGCTACGC
 AGGTGGAGCAGCACCCAGGAGGACGACAACGACTCAACAGCTAGCGATACCCCTCCCGCCACACGG
 CAGCGGGCCACCCAAGGCTGAGAACCAATACGAGCAAGGGCACCGACTCTCTGGACCCCGGACTA
 CCACGAGCCCCAGAATCACAGCGAAACGGCGGGCAACAACAACACACACCATCAGGATACTGGGGAG
 GAGTCGGCTCCAGCGAAAACCTGGGCTGATCACAACACCATAGCCGGGGTCGCCGGGCTGATCACT
 GGAGCGCGGAGGGCAGCAGAGAGGCCATTGTGAACGCCAGCCCAATGCAACCCAAACCTCCACTAC
 TGGACCAACGAGGACGAGGGGGCGCTATCGGCCTGGCTGGATCCCATACTTTGGGCCCGCGCTGAG
 GGCATATACAGGAGGGCTCATGCACAATCAGGACGGACTGATCTGCGGACTCCGCCAGCTTGCCAAC
 GAGACCACTCAGGCGTTGCAGCTGTTCTGCGGGCCACTACCGAGCTCAGGACGTTACGATTCTGAATC
 GGAAGGCAATCGATTTCCTACTCCAGCGGTGGGGCGGGACATGCCACATCTGGGACCCGATTGTGCAT
 CGAGCCCCACGACTGGACCAAGAACATTACAGATAAAATCGACCAGATCATTATGATTTCGTGGACAA
 GACACTGCCCGACAGGGGGACAACGATAAATGGTGGACCGGATGGCGCCAGATACTGTCAATTTATTC
 AACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCAATGGA
 TCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTIAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCAT
 TTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCT
 CCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTTCAGAAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAA
 AAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTGGCAATAAAGTTTCTTA
 AGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAAT
 AATTAACATGTAATGATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTATGATTAGAGTCCGCAATTATACATT
 AATACGGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCTATGT
 TACTAGAT

Figura 13 H, SEQ ID NO: 49

Secuencia aminoácida de PDISP-GP de virus del Ébola Zaire 95-H5 TM+CT de A/Indonesia/5/2005

MAKNVAIIFGLLFSLLVLVPSQIFAIPLGVIHNSTLQVSEVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLN
 LEGNGVATDVPSATKRWGRSGVPPKVVNVEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPD
 GIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILP
 QAKKDFSSSHPLREPVNATEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVENDLTYVQLESR
 FTPQFLLQLNETIYTSKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFT
 AVSNRAKNISGQSPARTSSDPGNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTLT
 ATISTSPQPTTKPGPDNSTHNTVPYKLDISEATQVEQHRRRTDNDSTASDTPPATTAAGP
 PKAENTNTSKGTDLLDPATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGV
 AGLITGGRRARREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAJGLAWIPYFGPAEGLIYTEGLM
 HNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDC
 CIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWQRQLSIYSTVASSLALAIMM
 AGLSLWMCSNGSLQCRICI*

Figura 13I

Representación esquemática de la construcción número 1366

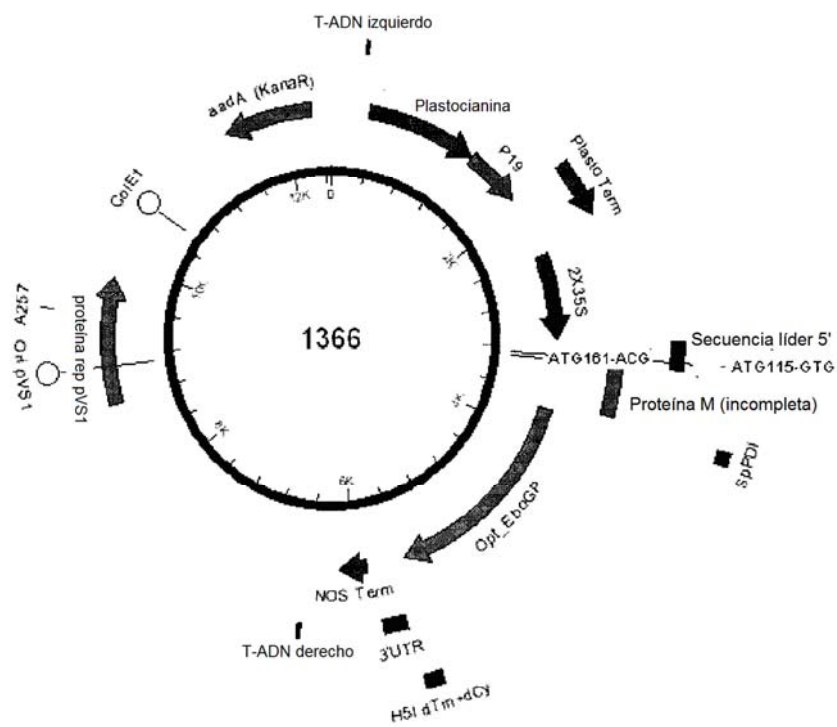




Figura 13J