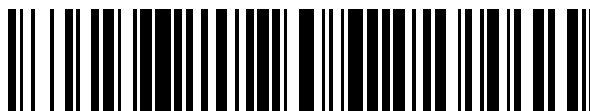


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 875**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C07K 14/005 (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: **15.03.2013** **PCT/US2013/032096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13142329**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13712662 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2827893**

54 Título: **Partículas tipo virus que comprenden una proteína de la matriz de un virus encapsulado de plantas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

22.03.2012 US 201261614141 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

FRAUNHOFER USA INC. (100.0%)
Center For Molecular Biotechnology 9 Innovation
Way
Newark, DE 19711-5449, US

72 Inventor/es:

PROKHNEVSKY, ALEXEI y
YUSIBOV, VIDADI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 875 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

Partículas tipo virus que comprenden una proteína de la matriz de un virus encapsulado de plantas y usos de las mismas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a partículas tipo virus (VLP) encapsulados producidos en plantas, y procedimientos para producir y utilizar los VLP.

Antecedentes de la invención

- 10 Las partículas tipo virus (VLP) son estructuras complejas formadas por el auto-ensamblaje de proteínas víricas sin la presencia del genoma vírico. La plataforma VLP se utiliza cada vez más para aumentar la inmunogenicidad específica de diana. Las VLP se pueden producir en varios sistemas de expresión, incluyendo las plantas. La producción de VLP en plantas ofrece ventajas adicionales, incluyendo la seguridad y ahorro de tiempo. Sin embargo, la formación de VLP en plantas es parte de un proceso fisiológico y da como resultado la formación de partículas de distintos tamaños y formas, haciendo que la fabricación comercial y la ruta regulatoria regular sea altamente desafiante. El tamaño de las partículas del virus de gripe de tipo silvestre depende de la cepa y varía entre 70 y 270 nm (Nayak y col., 2009, Virus Res 143(2):147-161). Las partículas víricas (VLP) de gripe producidas en plantas tienen diferentes formas y un amplio intervalo de tamaños. Por ejemplo, se ha informado de VLP de gripe encapsuladas pleomórficas que tienen de 100 a 150 nm de tamaño (Vezina y col., 2011, BioPharm International Supplements 24(5):s27-s30). Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de VLP uniformes adecuadas para el desarrollo de una vacuna.
- 20 El documento WO 2008/058396 A1 desvela VLP que comprenden una proteína de revestimiento del virus del mosaico de la papaya no encapsulado (PapMV) que presenta por ejemplo un antígeno de gripe.

El documento WO 2011/0350004 A1 desvela VLP que comprenden una proteína de revestimiento vírica de plantas fusionada con una proteína diana. En particular se desvelan VLP que comprenden una proteína de revestimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) no encapsulado fusionada con una hemaglutinina del virus de la gripe.

Sumario de la invención

La materia objeto desvelada de la presente invención se refiere a nuevas partículas tipo virus (VLP) que tienen una proteína de la matriz derivada de un primer rhabdovirus de plantas y un polipéptido de superficie y sus usos. Estas VLP están encapsuladas y tienen tamaños sustancialmente uniformes.

- 30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula tipo virus (VLP). La VLP comprende una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus encapsulado de plantas y un polipéptido de superficie. El polipéptido de superficie comprende una parte expuesta en la superficie de un polipéptido diana, en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta en la superficie del polipéptido de superficie es antigénica, un dominio transmembrana, y una cola citosólica. La cola citosólica es de una proteína transmembrana (por ejemplo, una glicoproteína) de un segundo rhabdovirus de plantas. La VLP se puede producir en una célula vegetal, una planta o una parte de una planta.

El primer y segundo rhabdovirus de plantas pueden ser el mismo o diferentes, preferentemente el mismo. El rhabdovirus de plantas se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en el virus de la necrosis amarilla de la lechuga (LNYV), virus del mosaico del cereal norteño (NCMV), virus Sonhus (SonV) y virus amarillo necrótico del brócoli (BNYV). Preferentemente, el rhabdovirus de plantas es el virus necrótico amarillo de la lechuga (LNYV).

- 40 La parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es un polipéptido antigénico, tal como un componente vacunal, o un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un polipéptido terapéutico.

El polipéptido diana se selecciona de entre el grupo que consiste en un virus animal, una bacteria, parásito u hongo. El virus animal se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un virus de gripe, virus sincitial respiratorio (RSV), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), un virus de la hepatitis B (VHB), un virus de hepatitis C (VHC), un papilomavirus humano (HPV), un virus de Ébola, un virus de fiebre amarilla, un rotavirus, y un virus de la estomatitis vesicular (VSV).

El polipéptido diana puede ser un polipéptido de superficie nativo. El polipéptido de superficie nativo puede ser una hemaglutinina de un virus de gripe.

- 50 El polipéptido diana puede ser un polipéptido de superficie artificial. El polipéptido de superficie artificial puede ser un antígeno protector 83 (PA83) de *Bacillus anthracis*, Pfs25 de *Plasmodium falciparum* u otra proteína o péptido soluble.

El virus de gripe se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un virus de gripe A y un virus de gripe B. El virus de gripe se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en gripe A cepa Indonesia 05/05, virus de gripe A

cepa California /04/2009 (H1N1), gripe A cepa /Victoria/3/75 (H3N2) y gripe B Hong Kong/330/2001.

El polipéptido diana puede ser un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un polipéptido terapéutico.

El dominio transmembrana puede ser nativo o ajeno a la parte expuesta en la superficie del polipéptido de superficie. El dominio transmembrana puede derivarse de una proteína transmembrana celular o vírica.

- 5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de producción de partículas tipo virus (VLP) en una célula vegetal, una planta, o una parte de una planta. La una o más moléculas de ácido nucleico comprende una primera moléculas de ácido nucleico comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus de planta y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de superficie. El polipéptido de superficie comprende una parte expuesta en la superficie de un polipéptido diana, en la que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo, y en la que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica, un dominio transmembrana y una cola citosólica. La cola citosólica es de una proteína transmembrana (por ejemplo, una glicoproteína) de un segundo rhabdovirus de plantas. El primer y el segundo rhabdovirus pueden ser el mismo o diferentes, preferentemente el mismo. El procedimiento comprende adicionalmente el mantenimiento de la célula vegetal, la planta o parte de una planta en condiciones que permitan la co-expresión de la proteína de la matriz el polipéptido de superficie de manera que se produce una VLP. Las VLP pueden ser sustancialmente de un tamaño uniforme. El procedimiento puede comprender adicionalmente la purificación de las VLP de una célula vegetal, la planta o la parte de una planta.

- La una o más moléculas de ácido nucleico se puede introducir en la célula vegetal, la planta o la parte de una planta por infiltración, bombardeo de partículas o inoculación. La una o más moléculas de ácido nucleico se pueden introducir en la planta o una parte de la misma de manera transitoria o estable.

- Se proporcionan distintas composiciones inmunogénicas. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una cantidad eficaz de las VLP de la presente invención, y las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. En otras realizaciones, la composición inmunogénica comprende una cantidad eficaz de VLP producida por el procedimiento de la presente invención, y las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. La composición inmunogénica puede comprender adicionalmente un adyuvante y/o un excipiente.

Se describe en el presente documento un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria a un polipéptido diana. El procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención, en la que las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme.

- También se describe en el presente documento un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria protectora frente a un patógeno en un sujeto. El procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención, en la que las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. El polipéptido diana es del agente patógeno. El agente patógeno puede ser un virus de gripe. El polipéptido diana se puede derivar de una hemaglutinina.

- Se proporciona adicionalmente una célula vegetal recombinante que comprende una o más moléculas de ácido nucleico. La una o más moléculas de ácido nucleico comprenden una primera secuencia de nucleótidos que codifican una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus de plantas y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de superficie. El polipéptido de superficie comprende (a) una parte expuesta a la superficie de un polipéptido diana, en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica, (b) un dominio transmembrana, y (c) una cola citosólica de una proteína transmembrana (por ejemplo, una glicoproteína) de un segundo rhabdovirus de plantas. El primer y segundo rhabdovirus puede ser el mismo o diferente, preferentemente el mismo. También se proporciona una planta o una parte de la misma que comprende la célula vegetal de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra (A) una imagen de microscopía electrónica y (B) la organización de un rhabdovirus de plantas.
- La Figura 2 es un diagrama que ilustra la organización del genoma de la región de T-ADN de un vector miniBYV para la co-expresión de dos proteínas diana, es decir la Diana 1 y Diana 2, cada una unida operativamente a una región reguladora. L-Pro, proteinasa líder tipo papaína; Met, Hel y Pol, metiltransferasa, ARN helicasa, dominios de ARN polimerasa dependientes de ARN de la replicasa, respectivamente; 2Enx35S, promotor 35S con amplificadores duales del virus del mosaico de la coliflor; NOS terminador de la nopalina sintasa; LB y RB, bordes izquierdo y derecho del T-ADN, respectivamente.
- La Figura 3 es un diagrama que ilustra la organización del genoma de la región de ADN-T de un vector miniBYV-HAi-TM/M_{LNYV} o miniBYV-HAi-TM/M_{NCMV} para la co-expresión de una proteína HAi-TM y una proteína de la matriz del virus amarillo necrótico de lechuga (LNYV) o el virus del mosaico de cereal norteno (NCMV) (M_{NCMV}), respectivamente. L-Pro, proteinasa líder tipo papaína; Met, Hel y Pol, metiltransferasa, ARN helicasa, dominios de ARN polimerasa dependientes de ARN de la replicasa, respectivamente; 2Enx35S, promotor 35S con amplificadores duales del virus del mosaico de la coliflor; NOS terminador de la nopalina sintasa; LB y RB, bordes izquierdo y derecho del T-ADN, respectivamente.

La Figura 4 es un diagrama que ilustra la organización del genoma de la región de ADN-T de un vector miniBYV-HAi-TM(G)/M_{LN_{YV}} para la co-expresión de una proteína HAi-TM(G)_{LN_{YV}} y una proteína M_{LN_{YV}}. L-Pro, proteinasa líder tipo papaína; Met, Hel y Pol, metiltransferasa, ARN helicasa, dominios de ARN polimerasa dependientes de ARN de la replicasa, respectivamente; 2Enx35S, promotor 35S con amplificadores duales del virus del mosaico de la coliflor; NOS terminador de la nopalina sintasa; LB y RB, bordes izquierdo y derecho del T-ADN, respectivamente.

La Figura 5 representa una transferencia de western representativa para el transcurso del análisis de la expresión de HAi-TM detectada por un anticuerpo monoclonal primario anti-HAi 5G6 después de la infiltración. Se utilizó HAi de referencia en una cantidad de 60, 30, o 15 ng como la referencia de cuantificación. Calles 1 y 2, *N. benthamiana* infiltrada manualmente; 3 y 4, *N. benthamiana* infiltrada al vacío.

La Figura 6 muestra (A) distribución de VLP HAi-TM a lo largo de un gradiente de sacarosa al 10 %-40 % y (B) morfología de las VLP HAi-TM de la fracción 10 de (A) detectada por tinción negativa en microscopía de transmisión electrónica (TEM).

La Figura 7 muestra (A) distribución de VLP HAi-TM/M1 a lo largo de un gradiente de sacarosa al 10 %-40 % y (B) morfología de las VLP HAi-TM/M1 de la fracción 10 de (A) detectada por tinción negativa en TEM.

La Figura 8 muestra (A) expresión de la proteína de la matriz (M1) de gripe A/indonesia/05/2005 en muestras de hojas (calles 1-3, diferentes réplicas de las plantas infiltradas que producen VLP HAi-TM/M1); y (B) ausencia de la proteína M1 de las VLP HAi-TM/M1 en las fracciones de gradiente de sacarosa 10-40 % como se muestra en la Figura 7A. Ref, proteína M1 de referencia.

La Figura 9 muestra (A) la distribución de VLP HAi-TM/M_{LN_{YV}} en un gradiente de sacarosa 10 %-40 % y (B) marcación Inmunogold de las VLP HAi-TM/M_{LN_{YV}} con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HAi 5G6.

La Figura 10 muestra (A) la distribución de VLP HAi-TM(G)/M_{LN_{YV}} en un gradiente de sacarosa 10 %-40 % y (B) marcación Inmunogold de las VLP HAi-TM(G)/M_{LN_{YV}} con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HAi 5G6.

La Figura 11 muestra las secuencias de aminoácidos de (A) una hemaglutinina del virus de gripe aviar H5N1 (A/Indonesia/05/2005)(HAi-TM) (SEQ ID NO: 1) que tiene un péptido de señal PR1a de *Nicotiana tabacum* (subrayado), un ectodominio HAi, un dominio HAi transmembrana (en negrita), y una cola HAi citosólica (en cursiva), y (B) una hemaglutinina del virus de gripe aviar H5N1 (A/Indonesia/05/2005) (HAi-TM(G)_{LN_{YV}}) (SEQ ID NO: 2) que tiene un péptido de señal PR1a de *N. tabacum* (subrayado), un ectodominio HAi, un dominio transmembrana de una glicoproteína LN_{YV} (en negrita), y una cola citosólica de una glicoproteína LN_{YV} (en cursiva).

La Figura 12 muestra las secuencias de aminoácidos de (a) una proteína de la matriz (M_{LN_{YV}}) (SEQ ID NO: 3) y (B) una proteína de la matriz del virus de gripe aviar H5N1 (A/Indonesia/05/2005) (proteína M1) (SEQ ID NO: 4).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevas partículas tipo víricas (VLP) que comprenden una proteína de la matriz de un rhabdovirus de plantas y un polipéptido de superficie que se pueden producir en plantas. Estas VLP están encapsuladas, y son de un tamaño sustancialmente uniforme, y se pueden utilizar para diseñar y fabricar vacunas humanas eficaces.

El término “proteína” que se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula biológica que comprende restos de aminoácidos. Una proteína puede comprender uno o más polipéptidos. Cada polipéptido puede ser una subunidad de una proteína. La proteína puede estar en una forma nativa o modificada, y puede presentar una función biológica cuando su polipéptido o polipéptidos están plegados apropiadamente o ensamblados.

El término “polipéptido” que se utiliza en el presente documento se refiere a un polímero de restos de aminoácidos sin limitación con respecto a la longitud mínima del polímero. Preferentemente, el polipéptido tiene al menos 4 aminoácidos. Un polipéptido puede ser una proteína de longitud completa, o un fragmento o variante de la misma.

El término “fragmento” de una proteína como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma en una parte, pero no toda, a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Preferentemente, un fragmento es un fragmento funcional de una proteína que mantiene la misma función que la proteína.

El término “variante” de una proteína que se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de la proteína excepto porque tiene al menos un aminoácido modificado, por ejemplo, eliminado, insertado, o sustituido, respectivamente. La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora, preferentemente en un resto de aminoácido no esencial de la proteína. Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es una en la que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se conocen en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una variante de una proteína puede tener una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 %, o 99 %, preferentemente al menos

aproximadamente un 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, idéntico a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Preferentemente, una variante es una variante funcional de una proteína que mantiene la misma función que la proteína.

5 La expresión “derivado de” que se utiliza en el presente documento se refiere a un origen o fuente, y puede incluir moléculas de origen natural, recombinantes, purificadas y no purificadas. Las moléculas de la presente invención pueden derivarse de moléculas víricas o no víricas. Una proteína o polipéptido derivada de una proteína o polipéptido original, en parte o completa, y puede ser un fragmento o variante de la proteína o polipéptido original.

10 El término “nativo” como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula (por ejemplo, una proteína o polipéptido) que es de origen natural. El término “artificial” que se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula (por ejemplo, una proteína o un polipéptido) que no es de origen natural, sino que se sintetiza artificialmente, por ejemplo, de manera recombinante o química.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula tipo virus (VLP) que comprende una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus de plantas y un polipéptido de superficie, en el que el polipéptido de superficie comprende una parte expuesta a la superficie de un polipéptido diana, en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del péptido de superficie es antigénica.

(a) un dominio transmembrana, y

(b) una cola citosólica de la proteína transmembrana de un segundo rhabdovirus de plantas.

20 La VLP comprende una proteína de la matriz y un polipéptido de superficie. La proteína de la matriz es de un primer rhabdovirus de plantas, más preferentemente, virus amarillo necrótico de la lechuga. El polipéptido de superficie comprende una parte expuesta a la superficie de una diana en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénico, un domino transmembrana y una cola citosólica. La cola citosólica puede derivarse de una glicoproteína rhabdovírica. El domino transmembrana y la cola citosólica puede derivarse de los mismos o diferentes virus encapsulados de plantas, preferentemente del mismo virus encapsulado de plantas. En una realización, el dominio transmembrana se deriva de una proteína diana mientras que la cola citosólica es de una glicoproteína de rhabdovirus. En otra realización, el dominio transmembrana y la cola citosólica se derivan ambos de la misma glicoproteína rhabdovírica. La proteína de la matriz, el domino transmembrana y la cola citosólica se pueden derivar del mismo rhabdovirus de plantas. La VLP se puede producir en una célula vegetal u otras células. La célula vegetal puede estar en una planta, una parte de una planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, tejidos florales, semillas y peciolo), o un medio de cultivo celular. La planta puede ser una planta cultivada completa. Preferentemente, la célula vegetal está en una hoja de una planta. El medio de cultivo celular puede ser cualquier medio adecuado para el crecimiento de células vegetales, preferentemente en suspensión. La célula vegetal es preferentemente adecuada para la expresión de una VLP. Por ejemplo, la célula vegetal puede estar en hojas de *N. benthamiana*. Otras plantas adecuadas incluyen *Nicotiana clelandii*, *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Brassica spp*, *Lactuca sativa*, *Pisum sativum*, *Nicotiana tabacum*, *Plantago lanceolata*, *Tetragonia tetragonoides*, *Montia perfoliata*, *Stellaria media*, *Medicago truncatula*, y *Chenopodium foliosum*.

La VLP puede comprender una membrana. El polipéptido de superficie de la VLP puede estar integrado en la membrana. La membrana se puede derivar de la célula en la que se ensambla, se hace o se produce la VLP.

40 La proteína de la matriz puede ser de una proteína de la matriz natural de cualquier rhabdovirus de plantas. La proteína de la matriz puede tener una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99 %, más preferentemente aproximadamente el 100 %, idéntica a la de la proteína de la matriz natural correspondiente.

45 La parte de superficie expuesta derivada de un polipéptido diana es una parte del polipéptido de superficie que está en la superficie de la VLP. El polipéptido de superficie es un polipéptido antigénico, tal como un componente vacunal, o un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un polipéptido terapéutico. El polipéptido de superficie, sea en la VLP o purificado a partir de la VLP, se puede utilizar para varios fines. Por ejemplo, el polipéptido de superficie es antigénico y se utiliza para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se introduce en el sujeto. También puede utilizarse como un agente diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto cuando se utiliza en el ensayo de una muestra del sujeto sospechoso de tener la enfermedad o el trastorno.

55 El polipéptido de superficie es de un polipéptido diana antigénico, y es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se introduce en el sujeto y puede utilizarse para formar o ser un candidato vacunal. Puede comprender uno o más epítopos (lineales y/o conformacionales) capaces de estimular el sistema inmunitario de un sujeto para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno celular y/o humoral. Una respuesta inmunitaria humoral se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B, o linfocitos B, mientras que una respuesta inmunitaria celular se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T, o

linfocitos T, y/u otros glóbulos blancos. En general un epítipo de linfocitos B contienen al menos aproximadamente 5 aminoácidos pero pueden ser 3-4 aminoácidos, mientras que un epítipo de linfocito T incluye al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos y un epítipo de linfocito T auxiliar incluye al menos 12-20 aminoácidos. El polipéptido diana se puede derivar, en parte o por completo, de una proteína natural (por ejemplo, una proteína de superficie o subunidad de toxina) de un organismo patógeno o un patógeno. El polipéptido diana puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 %, preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99 %, más preferentemente aproximadamente el 100 %, idéntica a la de la proteína natural patogénica correspondiente. El agente patógeno puede ser un agente patógeno intracelular o extracelular. El agente patógeno se selecciona de entre virus animales, bacterias, parásitos y hongos. Un virus animal se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en el virus de gripe, un virus sincitial respiratorio (RSV), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), un virus de hepatitis B (VHB), un virus de hepatitis C (VHC), un papilomavirus humano (HPV), un virus Ébola, un virus de la fiebre amarilla, un rotavirus, y un virus de la estomatitis vesicular (VSV). Preferentemente, el polipéptido diana se deriva de un virus de gripe.

El polipéptido diana puede ser un polipéptido de superficie nativo o un polipéptido de superficie artificial. El polipéptido de superficie nativo puede ser una hemaglutinina de un virus de influenza. El polipéptido de superficie artificial puede ser el antígeno protector 83 (PA83), Pfs25, u otra proteína o péptido solubles. El PA83 es de *Bacillus anthracis*. El Pfs25 de *Plasmodium falciparum*.

Un virus de gripe se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un virus de gripe A y un virus de gripe B. El virus de gripe se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en la cepa Indonesia 05/05 de gripe A, la cepa california/05/2009 (H1N1) de gripe A, cepa Victoria/3/75 (H3N2) de gripe A y Hong Kong/330/2001 de gripe B.

El domino transmembrana del polipéptido de superficie puede ser una proteína nativa o una proteína artificial. El domino transmembrana puede ser nativo o ajeno a la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie del polipéptido diana. El domino transmembrana se puede derivar de una proteína transmembrana, preferentemente la misma proteína transmembrana, de la que se derivan la proteína de la matriz y la cola citosólica. El domino transmembrana se puede derivar de una proteína transmembrana celular o vírica, o una proteína de superficie. El domino transmembrana puede derivarse o no del polipéptido diana. La proteína transmembrana vírica puede ser una proteína transmembrana de un virus de plantas. El virus de plantas puede ser un virus encapsulado de plantas, preferentemente el virus encapsulado de plantas del que se derivan la proteína de la matriz y la cola citosólica. El domino transmembrana se puede derivar de una glicoproteína de un virus, preferentemente de una glicoproteína de un virus encapsulado de plantas, más preferentemente una glicoproteína del virus encapsulado de plantas de la que se derivan la proteína de la matriz y la cola citosólica.

Un virus encapsulado de plantas tiene una envoltura lipídica. Esta envoltura lipídica se deriva normalmente de la membrana de una célula huésped de la que brota la partícula vírica. El virus de plantas encapsulado puede ser un rhabdovirus de plantas o no rhabdovirus. Ejemplos de rhabdovirus incluyen el virus del amarilleo necrótico de la lechuga (LNYV), el virus del mosaico del cereal nortño (NCMV), Virus Sonhus (SonV), virus del amarilleo necróticos del brócoli (BNYV), y otros rhabdovirus de plantas reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Preferentemente, el virus encapsulado de plantas es el virus del amarilleo necrótico de la lechuga (LNYV).

Los rhabdovirus LNYV y NCMV se caracterizan por un ARN en sentido negativo monocistrónico y pertenecen a la familia Rhabdoviridae y el género Cytorhabdovirus. Los rhabdovirus de plantas se caracterizan por una estructura de forma bacilar (Fig. 1A) y tienen aproximadamente 130-350 nm de longitud y aproximadamente 40-100 nm de anchura (Jackson y col, 2005, Ann. Rev. Phytopathol. 43:623-660). Las dos proteínas del virus que son claves para el ensamblaje de las partículas de forma bacilar son la proteína de la matriz (proteína M) y la glicoproteína (proteína G). La proteína M forma una capa dentro de la envoltura del virión e interactúa con la cola citosólica de la proteína G (Fig. 1B).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de VLP de la presente invención en una célula vegetal, una planta, o una parte de la planta. El procedimiento comprende la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico en la célula vegetal, la planta o la parte de la planta. La una o más moléculas de ácido nucleico comprenden una primera secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la matriz y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de superficie. La proteína de la matriz es de un primer rhabdovirus de plantas. El polipéptido de superficie comprende una parte expuesta a la superficie. La proteína de la matriz es de un primer rhabdovirus de plantas. El polipéptido de superficie comprende una parte expuesta a la superficie derivada de un polipéptido diana, en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica, un domino transmembrana, y una cola citosólica. La cola citosólica es de una proteína transmembrana (por ejemplo, una glicoproteína) de un segundo rhabdovirus de plantas. Por ejemplo, la cola citosólica se puede derivar de una glicoproteína de un rhabdovirus de plantas. El domino transmembrana puede derivarse o no del polipéptido diana. El primer y segundo rhabdovirus de plantas pueden ser el mismo o diferentes, preferentemente el mismo. El procedimiento comprende adicionalmente el mantenimiento de la célula vegetal, la planta, o la parte de la planta en condiciones que permiten la co-expresión de la proteína de la matriz y el polipéptido de superficie de manera que se

produce una VLP.

Las VLP que se producen por un procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden ser de cualquier tamaño. Por ejemplo, las VLP pueden tener un diámetro en el intervalo de aproximadamente 5-350 nm, incluyendo de aproximadamente 40-60 nm. Preferentemente las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. La expresión "de un tamaño sustancialmente uniforme" que se utiliza en el presente documento significa que al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, de las VLP tienen un diámetro con menos de aproximadamente un 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o 5 %, preferentemente menos de aproximadamente un 30 %, más preferentemente menos de aproximadamente un 20 %, más preferentemente menos de un 10 %, del diámetro medio de todas las VLP. El diámetro de una VLP puede estar en el intervalo o valor medio de una o más mediciones del diámetro de las VLP. El diámetro de una VLP se puede determinar por técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, por observación utilizando un microscopio electrónico, fraccionamiento en gradiente de sacarosa, cromatografía de exclusión por tamaño, y dispersión de luz dinámica. Los valores del diámetro de la VLP se pueden analizar utilizando distintos software, por ejemplo el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) y otros software disponibles en el mercado.

La una o más moléculas de ácido nucleico puede comprender adicionalmente una región reguladora unida operativamente a la primera o segunda secuencia de nucleótidos. La región reguladora se puede activar en una célula vegetal por la expresión de la proteína codificada por la primera o segunda secuencia de nucleótidos. La región reguladora puede incluir un promotor, por ejemplo, un promotor vírico de plantas. Preferentemente, la primera y segunda secuencias de nucleótidos están en la misma molécula de ácido nucleico, pero unidas a regiones reguladoras diferentes. La una o más moléculas de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente una tercera secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido de superficie adicional.

Para cada molécula de ácido nucleico, se proporciona un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico. El vector puede incluir una secuencia limítrofe de una secuencia de un ADN de transferencia bacteriano en cualquier extremo, situado en un ADN de transferencia bacteriano para permitir el suministro del ácido nucleico en una célula vegetal. Específicamente, el vector puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico a partir de un plásmido Ti de un vector binario, y puede comprender también una secuencia vírica de plantas. Dicho vector, incluyendo los elementos de un plásmido Ti y un vector vírico, se denomina también un vector lanzadera. Este vector también se puede utilizar para la co-expresión de la proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, la proteína de la matriz y/o el polipéptido de superficie) con una proteína tal como un supresor de silenciamiento o una enzima de modificación post-traducciona tal como la PNGasaF, para modificar, afectar a la expresión y/o aumentar la producción de la proteína de interés, por ejemplo, facilitando la maduración o acumulación de la proteína.

Cada molécula de ácido nucleico se puede introducir en la célula vegetal, la planta o la parte de una planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, tejido floral, semillas o peciolas) utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se puede suministrar mediante infiltración, bombardeo de partículas, o inoculación. La molécula de ácido nucleico se podría utilizar como parte de un sistema inducible activado, por ejemplo, por agentes químicos, luz o choque térmico. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico se introduce en la célula vegetal mediante infiltración. La molécula de ácido nucleico puede introducirse de manera transitoria o estable.

Se proporciona una célula vegetal recombinante que comprende una o más moléculas de ácido nucleico. La una o más moléculas de ácido nucleico comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la matriz y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de superficie. Preferentemente, la primera y segunda secuencias de nucleótidos están en una molécula de ácido nucleico. La proteína de la matriz es de un primer rhabdovirus de plantas. El polipéptido de superficie comprende una parte expuesta a la superficie de un polipéptido diana, en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica, un domino transmembrana y una cola citosólica. La cola citosólica se deriva de una proteína transmembrana (por ejemplo, una glicoproteína) de un segundo rhabdovirus de plantas. El primer y segundo rhabdovirus de plantas puede ser en mismo o diferentes, preferentemente el mismo. El domino transmembrana se puede derivar o no del polipéptido diana. La cola citosólica es de una glicoproteína de un rhabdovirus de plantas. Por ejemplo, la cola citosólica se puede derivar de una glicoproteína de rhabdovirus. La primera o segunda secuencia de nucleótidos puede estar unida a un promotor capaz de activarse en la célula vegetal para la co-expresión de la proteína de la matriz o el polipéptido de superficie, respectivamente. También se proporciona una planta o una parte de la misma que comprende la célula vegetal de la presente invención.

Para la producción de las VLP de la presente invención, se puede mantener una célula vegetal, o una planta o una parte de la misma en condiciones que permitan la expresión de la proteína de la matriz y el polipéptido de superficie, dando como resultado la producción de las VLP. Dichas condiciones incluyen una temperatura, humedad, presión, ciclo de luz/oscuridad, e iluminación adecuadas. Preferentemente, la proteína de la matriz y el polipéptido de superficie se co-expresan en las mismas células vegetales.

El procedimiento de producción puede comprender adicionalmente la purificación de los VLP. Se puede utilizar técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, la VLP se puede purificar de la célula vegetal utilizando un anticuerpo o un receptor capaz de unirse al polipéptido de superficie. El procedimiento de purificación puede comprender la extracción de las VLP de la célula vegetal utilizando un tampón de extracción. Después de una centrifugación a baja velocidad, se puede clarificar el sobrenadante por filtración y utilizarse para la cromatografía. Las VLP purificadas pueden ser al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, preferentemente al menos aproximadamente un 50 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99 %, puras. Se pueden utilizar las VLP en un extracto de planta en bruto.

Se proporciona una composición inmunogénica. La composición comprende una cantidad de las VLP de la presente invención. Preferentemente, las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. La cantidad eficaz de las VLP es una cantidad de las VLP suficiente para hacer que la composición sea inmunogénica, es decir, capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se introduce en el sujeto. La composición puede comprender adicionalmente un adyuvante y/o un excipiente. Se pueden utilizar las composiciones inmunogénicas para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Se proporcionan varios procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria.

Se describe en el presente documento un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria del polipéptido diana en un sujeto. El procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. La composición inmunogénica se puede administrar en un número apropiado de dosis.

También se describe en el presente documento un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria protectora frente a un agente patógeno en un sujeto. El procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. El polipéptido diana se deriva del agente patógeno. Por ejemplo, el polipéptido diana puede ser una hemaglutinina y el agente patógeno es un virus de gripe.

El sujeto puede ser un animal, incluido un mamífero, por ejemplo, un ser humano, un ratón, una vaca, un caballo, un pollo, un perro, un gato, y un conejo. El animal puede ser un animal agrícola (por ejemplo, un caballo, vaca o pollo) o una mascota (por ejemplo, un perro y un gato). El sujeto es preferentemente un ser humano o un ratón, más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser masculino o femenino. El sujeto puede ser también un recién nacido, un niño o un adulto. El sujeto puede haber padecido o estar predispuesto a una enfermedad o afección médica, que puede ser causado o asociado con un agente patógeno.

La composición inmunogénica se puede formular, por ejemplo, para la administración oral, sublingual, intra-nasal, intraocular, rectal, transdérmica, mucosa, tópica o parenteral. La administración parenteral puede incluir la administración intradérmica, subcutánea (s.c., s.q., sub-Q, Hipo), intranasal, intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intra-arterial, intramedular, intracardiaca, intra-articular (articulaciones), intrasinovial (área de fluido articular), intracraneal, intra-espinal, e intratecal (fluidos espinales). Se puede utilizar cualquier dispositivo adecuado para la inyección parenteral de la composición para dicha administración.

La expresión “una cantidad eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para conseguir la meta establecida, y puede variar dependiendo de la meta establecida y otros factores. Por ejemplo, una cantidad eficaz de VLP es una composición inmunogénica o una cantidad eficaz de una composición inmunogénica que comprende VLP puede variar dependiendo de las características físicas del sujeto, la naturaleza y gravedad de la necesidad de las VLP, la existencia de afecciones médicas relacionadas o no relacionadas, la naturaleza de las VLP, los medios de administración de las VLP al sujeto, y la vía de administración. Una dosis específica para un sujeto determinado se puede ajustar en general por el juicio del médico. La composición inmunogénica se puede administrar al sujeto en una o múltiples dosis.

Se describen distintos documentos que comprenden las VLP de la presente invención en el presente documento. Las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme. Los medicamentos pueden comprender adyuvantes adecuados. En algunos ejemplos los medicamentos son útiles para inducir una respuesta inmunitaria contra el polipéptido diana en un sujeto, y comprenden una cantidad eficaz de VLP de la presente invención. En algunos otros ejemplos, los medicamentos son útiles para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra un agente patógeno en un sujeto, y comprende una cantidad eficaz de VLP de la presente invención, en el que el polipéptido diana se deriva del agente patógeno. Por ejemplo, el polipéptido diana puede ser una hemaglutinina y el agente patógeno es un virus de gripe.

Para cada medicamento descrito en el presente documento, se desvela un procedimiento para preparar el medicamento. El procedimiento de preparación comprende la mezcla de las VLP de la presente invención con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las VLP son de un tamaño sustancialmente uniforme.

El término “aproximadamente” como se utiliza en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, un porcentaje y similares, significa que engloba variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más

preferentemente ± 5 %, más preferentemente ± 1 % y aún más preferentemente $\pm 0,1$ % del valor especificado, según sean apropiadas dichas variaciones.

Ejemplo 1. Construcción de vectores mino-BYV

Para demostrar la fiabilidad del ensamblaje de VLP utilizando proteínas de la matriz (proteínas M) de diferentes virus encapsulados de plantas, se modificaron una proteína M rhabdovírica y un antígeno diana que contenía un dominio transmembrana (TM) y una cola citosólica de una glicoproteína LNYV (proteína G) para la co-expresión en células vegetales. Para la co-expresión de estas proteínas se utilizó un vector miniBYV (Fig. 2). El vector miniBYV contiene un mini-replicón derivado de un virus *Closteroviridae* (por ejemplo, virus de amarilleamiento de la remolacha), que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica solamente las proteínas necesarias para la replicación del virus *Closteroviridae*. Específicamente, la proteína M del LNYV o NCMV se co-expresaban con una hemaglutinina (HAi) del virus de gripe aviar H5N1 (A/Indonesia/05/2005).

En resumen, un gen que codifica la proteína HAI que tiene su dominio TM nativo (HAI-TM) se clonó en un vector miniBYV para generar el plásmido miniBYV-HAI-TM. La proteína HAI-TM (SEQ ID NO: 1) incluía un péptido de señal PR1a de *Nicotiana tabacum* (subrayado), un ectodominio HAI, un dominio transmembrana HAI nativo (en negrita), y una cola citosólica de HAI nativa (en cursiva) (Fig. 11A). Posteriormente, un gen que codifica la proteína M del LNYV (proteína M_{LNYV}) o NCMV (proteína M_{NCMV}) se introdujo en el plásmido miniBYV-HAI-TM bajo el control del promotor de la proteína homóloga de revestimiento closterovírica (CP) para generar un plásmido miniBYV-HAI-TM/ M_{LNYV} o miniBYV-HAI-TM M_{NCMV} (Fig. 3). Para la evaluación de la VLP, los clones positivos se transformaron en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y entonces se introdujo en plantas de *Nicotiana benthamiana* para producir las VLP.

En paralelo, se modificó el gen HAI para codificar una hemaglutinina proteica recombinante (HAI-TM(G)), en la que el TM nativo y la cola citosólica de HAI se sustituyen con un dominio transmembrana y cola citosólica de una glicoproteína de LNYV, respectivamente. Se introdujeron una secuencia de nucleótido que codifica la proteína HAI-TM(G) (SEQ ID NO: 2), que incluía un péptido de señal PR1a de *Nicotiana tabacum* (subrayado), un ectodominio HAI, un dominio proteico transmembrana de LNYV (en negrita), y una cola citosólica glicoproteica de LNYV (en cursiva) (Fig. 11B), en el vector miniBYV que contenía la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína M de LNYV (M_{LNYV}) (SEQ ID NO: 3) (Fig. 12A). La construcción resultante, miniBYV-HAI-TM(G)/ M_{LNYV} (Fig. 3), se secuenció, y los clones positivos se transformaron en *A. tumefaciens* y entonces se introdujeron en plantas de *Nicotiana benthamiana* para producir VLP HAI-TM(G)- M_{LNYV} .

Como control, se introdujo un gen que codifica la proteína de la matriz (proteína M1) del virus de gripe aviar H5N1 (A/Indonesia/05/2005) (SEQ ID NO: 4) (Fig. 12B) en el plásmido miniBYV-HAI-TM bajo el control del promotor closterovírico heterólogo de proteína de revestimiento (CP) para generar el plásmido miniBYV-HAI-TM/M1. Como se ha descrito anteriormente, se utilizó el PR1a como péptido de señal. Los clones positivos se transformaron en *A. tumefaciens* y entonces se introdujeron en plantas de *Nicotiana benthamiana* para producir VLP HAI-TM/M1.

Ejemplo 2. Optimización del procedimiento de infiltración

Para evaluar el nivel de expresión de HAI y desarrollar las condiciones de infiltración al vacío, se utilizaron plantas de *N. benthamiana* cultivadas hidropónicamente. Para analizar la expresión de HAI-TM, se llevaron a cabo la infiltración manual y la infiltración al vacío de miniBYV-HAI-TM utilizando el mismo tampón. Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de cinco semanas de edad cultivadas en lana mineral en envases bivalvos para la infiltración al vacío y manual. Se cultivaron las agrobacterias en medio LB, que se suplementó con 50 ng/ml de Kanamicina y 50 ng/ml de Higromicina. Se cultivaron los cultivos de un litro durante una noche a 28 °C, agitando a 220 rpm durante 18-24 horas.

Se determinó la concentración de una noche midiendo la DO_{600} de cada cultivo. Las agrobacterias se aglomeraron por centrifugación a 4000 g durante 15 min a 4 °C. Los aglomerados bacterianos se re-suspendieron en 100 ml de medio MMA reciente (10 nM de $MgCl_2$; 10 mM de MES, pH 5,85; y 20 mM de acetosiringona). La concentración final de cada cultivo se registró después de balancearlo durante 2 horas a temperatura ambiente. Los cultivos que contenían miniBYV y el supresor de silenciamiento P1/HcPro (el miniBYV necesita el uso de un supresor de silenciamiento para conseguir niveles de expresión de la diana buenos) se mezclaron a relaciones de DO_{600} 1,0:0,2, respectivamente. Para la infiltración al vacío se infiltraron los envases bivalvos con agrobacterias que contenían el miniBYV: P1/HcPro. Las plantas infiltradas se alimentaron con 50 ppm de hidrosol y se colocaron en una sala de cultivo durante 5-8 días.

Para la infiltración manual, se infiltraron manualmente 3-5 hojas de *Nicotiana benthamiana* cultivada hidropónicamente utilizando una jeringa de 10 cc sin aguja. Las plantas se alimentaron con 50 ppm de hidrosol y se mantuvieron en la sala de post infiltración durante 5-8 días.

Los niveles de expresión de HAI-TM se determinaron basándose en la cantidad de proteína HAI-TM detectada por un anticuerpo monoclonal anti-HAI- 5G6 en el análisis de transferencia de Western (Fig. 5). La expresión de HAI-TM era mayor en las hojas infiltradas al vacío a los 6 días después de las infiltraciones (dpi) y 7 dpi en comparación con las hojas infiltradas manualmente (Tabla 1). Por ejemplo, a los 6 dpi, la proteína HAI-TM se expresó a 249 mg/kg en

hojas infiltradas al vacío, que representaban un aumento del 43 % en la expresión en comparación con las hojas infiltradas manualmente.

Tabla 1. Transcurso de los niveles de expresión para HAI-TM

Días post infiltración	Infiltración manual (mg/kg)	Infiltración al vacío (mg/kg)
5	73	46
6	174	249
7	120	123
8	180	105

5 Ejemplo 3. VLP HAI-TM producidas en plantas

Para caracterizar la formación de VLP HAI-TM se clonaron en el vector miniBYV utilizando los sitios de restricción PacI/NheI. El plásmido resultante miniBYV-HAI-TM se transformó con la cepa GV3101 de *Agrobacterium*. Se recolectaron las hojas infiltradas de *Nicotiana benthamiana* a los 7 días después de la infiltración y se purificaron las VLP. La distribución de las VLP HAI-TM sin proteína de la matriz a lo largo de un gradiente de un 10 %-40 % de sacarosa detectándose los picos de las fracciones 9 y 10 por un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HAI 5G6 (desarrollado por el grupo de inmunología en Fraunhofer - USA Center for Molecular Biotechnology) (Fig. 6A). Para evaluar la morfología de las VLP-HAI en la fracción 10, se analizaron las VLP de esta fracción por tinción negativa utilizando microscopía de transmisión de electrones (TEM). Se observaron VLP HAI-TM con diferentes tamaños y formas (Fig. 6B).

Las VLP HAI-TM/M1 que tienen la proteína HAI con su dominio transmembrana nativo y la cola citosólica co-expresados con M1 del virus de la gripe A/05/05 se produjeron expresando el miniBYV-HAI-TM/M1 en plantas utilizando la infiltración al vacío como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se purificaron las VLP HAI-TM/M1 utilizando un gradiente de sacarosa, y se caracterizaron por análisis de transferencia de Western y microscopía electrónica utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HAI 5G6, y se descubrió que se distribuían a través del gradiente de sacarosa del 105-50 % con fracciones pico 9 y 10 (Fig. 7A). No se detectó la incorporación de la proteína M1 en las mismas VLP HAI-TM/M1 a través del gradiente de sacarosas 10-40 % (Fig. 8A) utilizando un anticuerpo policlonal anti-M1 de cabra de Meridian Life science, Inc. EE. UU. Entretanto, se confirmó la expresión de proteína M1 por transferencia de Western utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-proteína M1 (Fig. 8B). No se detectaron VLP uniformadas después de la co-expresión de HAI-TM y la proteína M1 de la matriz de gripe (Fig. 7B).

25 Ejemplo 4. VLP HAI-TM/M_{LNYV} producidas en plantas

Se produjeron VLP HAI-TM/M_{LNYV} que tiene la proteína HAI-TM (es decir, la proteína HAI con su dominio transmembrana y cola citosólica nativos) y la proteína M de LNYV (proteína M_{LNYV}) expresando el miniBYV-HAI-TM/M_{LNYV} en plantas utilizando la infiltración al vacío como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las VLP HAI-TM/M_{LNYV} se purificaron utilizando un gradiente de sacarosa 10 %-40 % y se caracterizaron por SDS-PAGE, análisis de transferencia de Western y microscopía electrónica. La presencia del determinante inmunológico HAI de la superficie de estas VLP se confirmó con marcado Inmunogold utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HAI 5G6 (Fig. 9B). También se utilizó este anticuerpo para detectar la distribución de las VLP en un gradiente de sacarosa 10 %-40 % con un pico en la fracción 10 (Fig. 9A). La distribución de las VLP HAI-TM/M_{LNYV} era similar a la observada en las VLP HAI-TM/M1 (Fig. 7A y 9A). No había una diferencia perceptible en la morfología de la VLP (por ejemplo, forma y tamaño) (Fig. 7B y 9B).

Ejemplo 5. VLP HAI-TM(G)/M_{LNYV} uniformes producidas en plantas

Se produjeron VLP HAI-TM(G)/M_{LNYV} que tenía la proteína HAI-TM(G) (es decir, la proteína HAI con un dominio transmembrana y una cola citosólica de una glicoproteína rhabdovírica (G)) y la proteína M de LNYV (proteína M_{LNYV}) expresando el miniBYV-HAI-TM(G)/M_{LNYV} en plantas utilizando la infiltración al vacío como se describe en el Ejemplo 2. Después de la separación de las VLP HAI-TM(G)/M_{LNYV} por un gradiente de sacarosa del 10 %-40 %, se recolectó 1 ml de las fracciones y se analizaron por análisis de transferencia de Western utilizando el anticuerpo monoclonal anti-HAI 5G6. Se observó un cambio en el pico de recolección diana. A diferencia de las VLP HAI-TM/M_{LNYV}, las VLP HAI-TM(G)/M_{LNYV} se detectaban en las fracciones 6, 7 y 8 con un pico agudo en la fracción 7 (Fig. 10A). El marcado Inmunogold después del TEM presentaba unas VLP HAI-TM(G)/M_{LNYV} redondeadas (Fig. 10B). El tamaño de las VLP HAI-TM(G)/M_{LNYV} determinado por el software ImageJ (NIH Bethesda, MD) será de 50,5615 nm. Las VLP HAI-TM(G)-M_{LNYV} tenían un tamaño y forma sustancialmente uniformes. Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica en consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención desvelada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solamente como ejemplos, estando indicados el ámbito real y el espíritu de la invención por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fraunhofer USA, Inc.

5 <120> PARTÍCULAS TIPO VIRUS ENCAPSULADAS Y USOS DE LAS MISMAS

 <130> FCMB-106WO

10 <150> US 61/614.141

 <151> 22-03-2012

 <160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1

 <211> 581

 <212> PRT

20 <213> Virus de gripe aviar

 <400> 1

ES 2 657 875 T3

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

ES 2 657 875 T3

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

Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu
420 425 430

Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu
435 440 445

Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu
450 455 460

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys
465 470 475 480

Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys
485 490 495

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Ile Arg
500 505 510

Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys
515 520 525

Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln
530 535 540

Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile
545 550 555 560

Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
565 570 575

Cys Arg Ile Cys Ile
580

<210> 2
<211> 594
<212> PRT
<213> *Virus de gripe aviar*

<400> 2

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val Ser
1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Asp Gln
20 25 30

Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp Thr
35 40 45

ES 2 657 875 T3

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

ES 2 657 875 T3

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

Val Ala Gly Ala Lys Val Trp Glu Ile Met Arg Lys Ala Asn Arg Lys
565 570 575

Ser Gln Tyr Lys Arg Thr Asn Thr Glu Pro His Asp Ser Gln Ala Thr
580 585 590

Trp Ile

<210> 3

<211> 176

<212> PRT

<213> Virus del amarilleamiento necrótico de la lechuga

<400> 3

Ser Ala Lys Leu Asn Trp Tyr Arg Ile Thr Phe Asn Asp Thr Val Trp
1 5 10 15

Arg Phe Asp Thr Ala Arg Gly Pro Lys Asp Gly Glu Thr Cys Pro Leu
20 25 30

Ile Ala Ser Glu Leu Phe Ser Ser Gly Leu Ser Glu Val Phe Lys Ser
35 40 45

Val Thr Ser Phe Ser Glu Ile Leu Arg Asn Met Glu Ser Arg Gly Tyr
50 55 60

Ile Thr Asn Ile Thr Leu Arg Ala Asp Ser Asp Ile Leu Gly Pro Gly
65 70 75 80

Ala Leu Arg Cys Glu Phe Leu Phe Pro Ser Glu Val Phe Ile Pro Thr
85 90 95

Ser His Thr Leu Lys Met Gly Arg Ser Ser Leu Ile Leu Glu Pro His
100 105 110

Leu Val Val Leu Lys Glu Cys Lys Tyr Ile Ser Ser Gly Lys Leu Asp
115 120 125

Ile Gly Ile Ser Ser Ile Glu Ala Thr Ser Val Ala Val Leu Arg Arg
130 135 140

Val Lys Gly Pro Ala Phe Ile Gly Cys Met Asp Asp Asn Pro Phe Gly
145 150 155 160

Val Leu Thr Lys Lys Pro Ser Asp Glu Lys Asn Val Leu Ala Ser Lys
165 170 175

5
<210> 4
<211> 252
<212> PRT
<213> Virus de gripe aviar

<400> 4

ES 2 657 875 T3

Met	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Tyr	Val	Leu	Ser	Ile	Val	Pro	1	5	10	15
Ser	Gly	Pro	Leu	Lys	Ala	Glu	Ile	Ala	Gln	Arg	Leu	Glu	Asp	Val	Phe	20	25	30	
Ala	Gly	Lys	Asn	Thr	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Met	Glu	Trp	Leu	Lys	Thr	35	40	45	
Arg	Pro	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Thr	Lys	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe	Val	Phe	50	55	60	
Thr	Leu	Thr	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Gly	Leu	Gln	Arg	Arg	Arg	Phe	Val	65	70	75	80
Gln	Asn	Ala	Leu	Asn	Gly	Asn	Gly	Asp	Pro	Asn	Asn	Met	Asp	Arg	Ala	85	90	95	
Val	Lys	Leu	Tyr	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Glu	Ile	Thr	Phe	His	Gly	Ala	100	105	110	
Lys	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Tyr	Ser	Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser	Cys	Met	115	120	125	
Gly	Leu	Ile	Tyr	Asn	Arg	Met	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Glu	Val	Ala	Phe	130	135	140	
Gly	Leu	Val	Cys	Ala	Thr	Cys	Glu	Gln	Ile	Ala	Asp	Ser	Gln	His	Arg	145	150	155	160
Ser	His	Arg	Gln	Met	Ala	Thr	Thr	Thr	Asn	Pro	Leu	Ile	Arg	His	Glu	165	170	175	
Asn	Arg	Met	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Lys	Ala	Met	Glu	Gln	Met	180	185	190	
Ala	Gly	Ser	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Glu	Ala	Met	Glu	Val	Ala	Ser	Gln	195	200	205	
Ala	Arg	Gln	Met	Val	Gln	Ala	Met	Arg	Thr	Ile	Gly	Thr	His	Pro	Ser	210	215	220	

ES 2 657 875 T3

Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ala	Tyr
225					230					235					240

Gln	Lys	Arg	Met	Gly	Val	Gln	Met	Gln	Arg	Phe	Lys
				245				250			

REIVINDICACIONES

1. Una partícula tipo virus que comprende una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus de plantas y un polipéptido de superficie, en la que el polipéptido de superficie comprende
 - (a) una parte expuesta a la superficie de un polipéptido diana, en la que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en la que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica
 - (b) un dominio transmembrana, y
 - (c) una cola citosólica de una proteína transmembrana de un segundo rhabdovirus de plantas.
2. La partícula tipo virus de la reivindicación 1, en la que el primer rhabdovirus de plantas y el segundo rhabdovirus de plantas son el mismo.
3. La partícula tipo virus de la reivindicación 1, en la que el rhabdovirus de plantas se selecciona de entre el grupo que consiste en el virus del amarilleamiento necrótico de la lechuga (LNYV), virus del mosaico del cereal norteño (NCMV), virus Sonhus(SonV), virus del amarilleamiento necrótico del brócoli (BNYV).
4. Un procedimiento de producción de partículas tipo virus en una célula vegetal, una planta o una parte de una planta, que comprende
 - (a) la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico en la célula vegetal, la planta o la parte de una planta, en el que la una o más moléculas de ácido nucleico comprenden una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus de plantas y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de superficie, en el que el polipéptido de superficie comprende
 - (i) una parte expuesta a la superficie de un polipéptido diana, en el que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica
 - (ii) un dominio transmembrana, y
 - (iii) una cola citosólica derivada de una proteína transmembrana de un segundo rhabdovirus de plantas; y
 - (b) el mantenimiento de la célula vegetal, la planta o la parte de una planta en condiciones que permitan la co-expresión de la proteína de la matriz y el polipéptido de superficie, de manera que se produzcan las partículas tipo virus.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el primer rhabdovirus de plantas y el segundo rhabdovirus de plantas son el mismo.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que al menos un 50 % de las partículas tipo virus tienen un diámetro con menos de un 50 % del diámetro medio de todas las partículas tipo virus.
7. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente (c) la purificación de las partículas tipo virus.
8. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad eficaz de las partículas tipo virus de la reivindicación 1, en la que al menos un 50 % de las partículas tipo virus tienen un diámetro con menos del 50 % del diámetro medio de todas las partículas tipo virus.
9. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad eficaz de las partículas tipo virus producidas por el procedimiento de la reivindicación 4, en la que al menos un 50 % de las partículas tipo virus tienen un diámetro con menos de un 50 % del diámetro medio de todas las partículas tipo virus.
10. La partícula tipo virus de la reivindicación 1 o la partícula tipo virus producida por el procedimiento de la reivindicación 4 para su uso como un medicamento, preferentemente para la inducción de una respuesta inmunitaria protectora frente a un agente patógeno en un sujeto.
11. Una célula vegetal recombinante que comprende una o más moléculas de ácido nucleico, en la que la una o más moléculas de ácido nucleico comprenden una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la matriz de un primer rhabdovirus y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de superficie, y en la que el polipéptido de superficie comprende
 - (a) una parte expuesta a la superficie de un polipéptido diana, en la que el polipéptido diana es de un virus animal, bacteria, parásito u hongo y en el que la parte expuesta a la superficie del polipéptido de superficie es antigénica
 - (b) un dominio transmembrana, y
 - (c) una cola citosólica de una glicoproteína de un segundo rhabdovirus de plantas.

12. La célula vegetal recombinante de la reivindicación 12, en la que el primer rhabdovirus de plantas y el segundo rhabdovirus de plantas son el mismo.

13. Una planta o una parte de la misma que comprende la célula vegetal de la reivindicación 11 o 12.

Figura 1

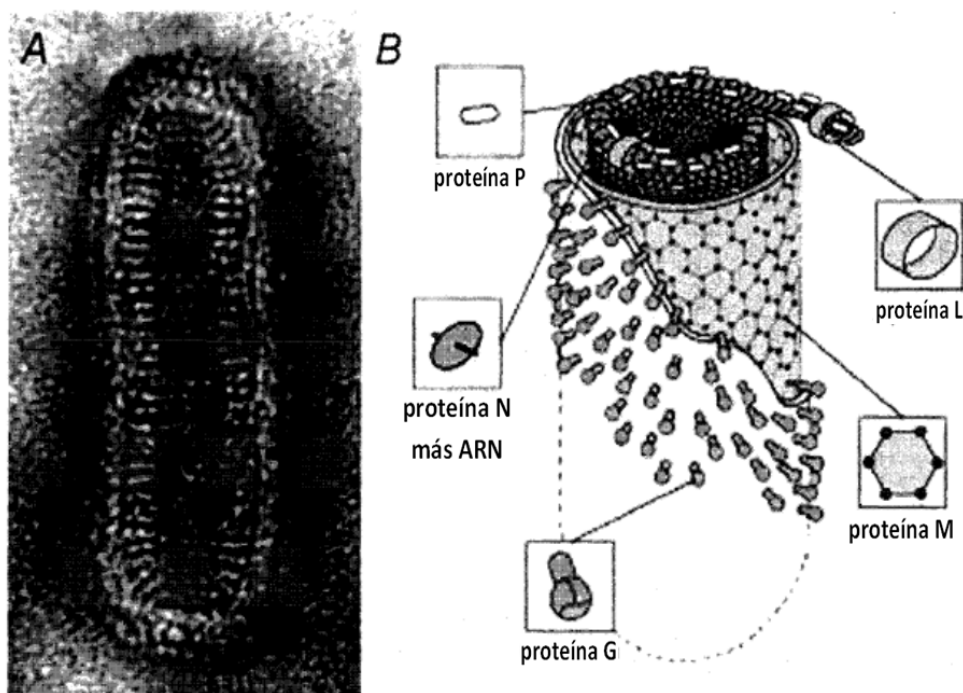


Figura 2

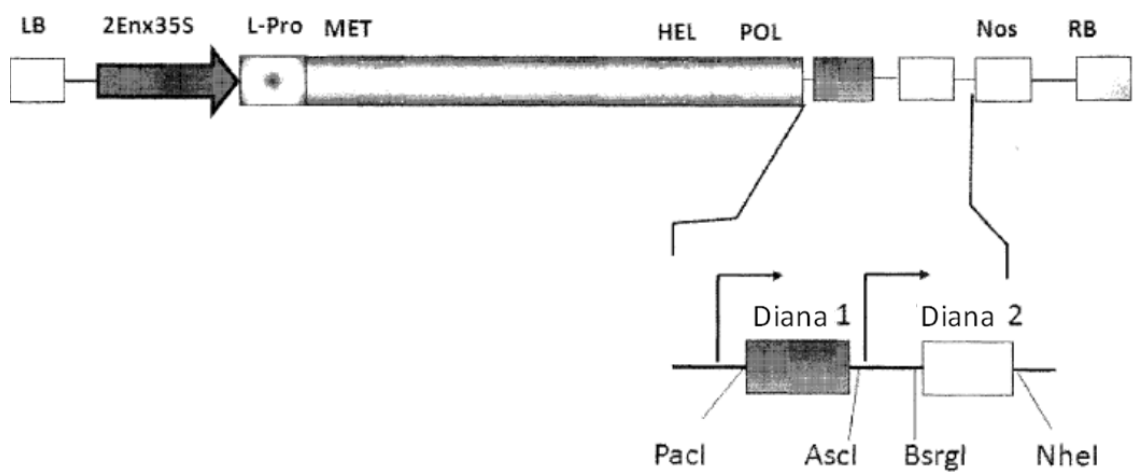


Figura 3

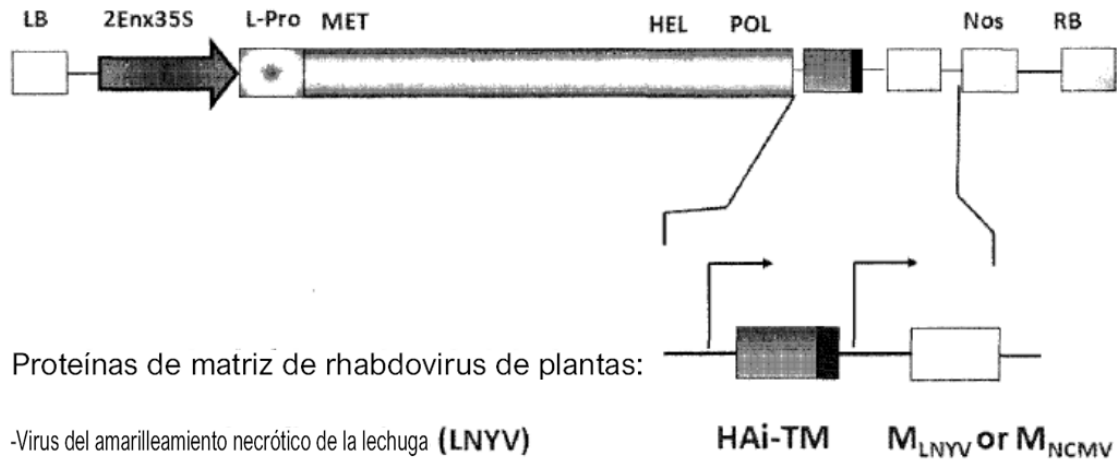


Figura 4

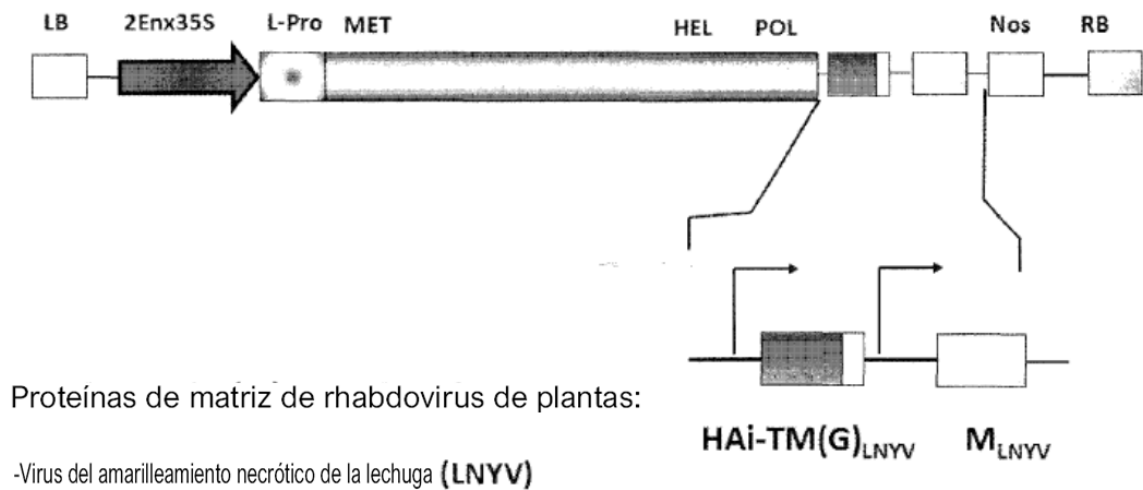


Figura 5

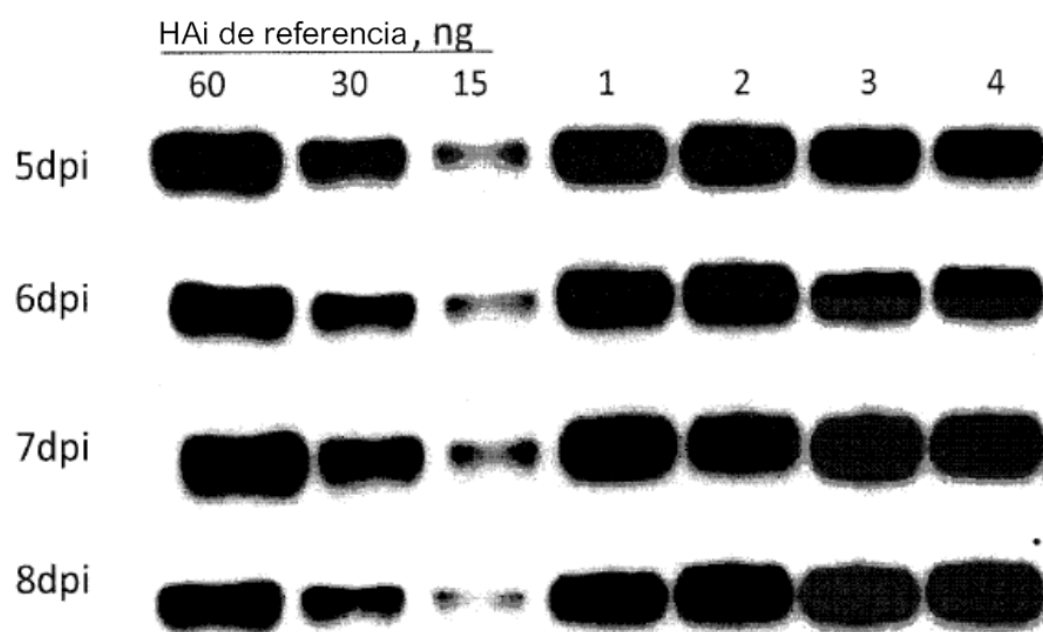
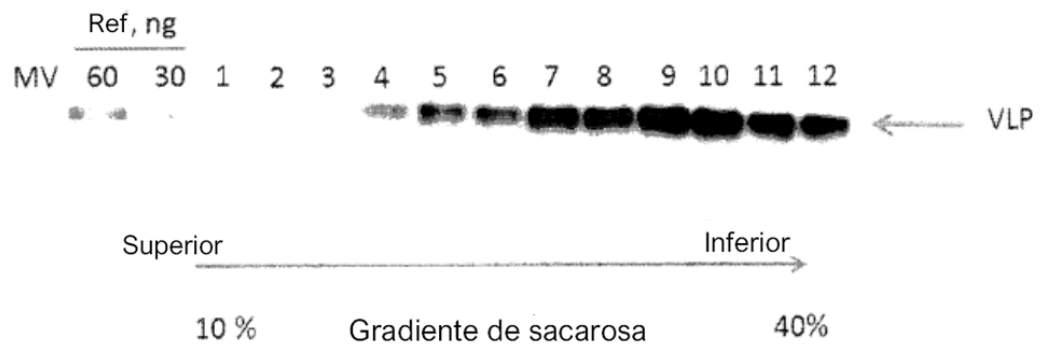


Figura 6

A



B

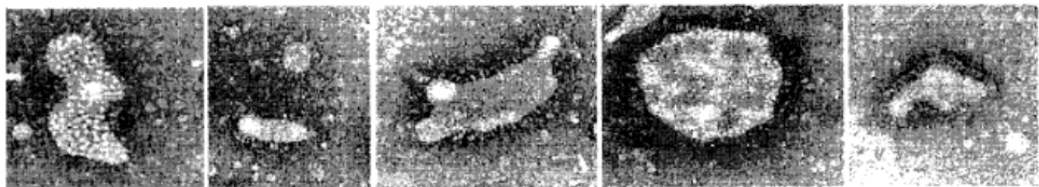
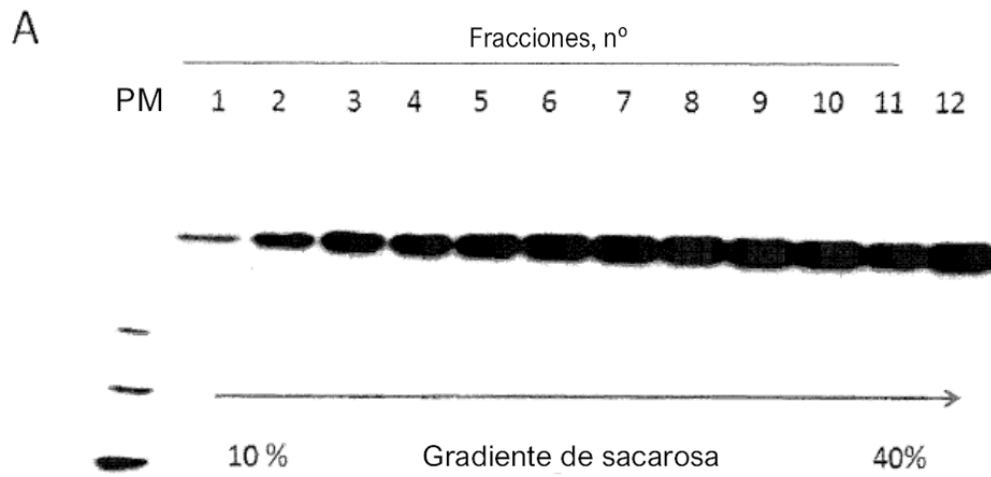


Figura 7



B



Figura 8

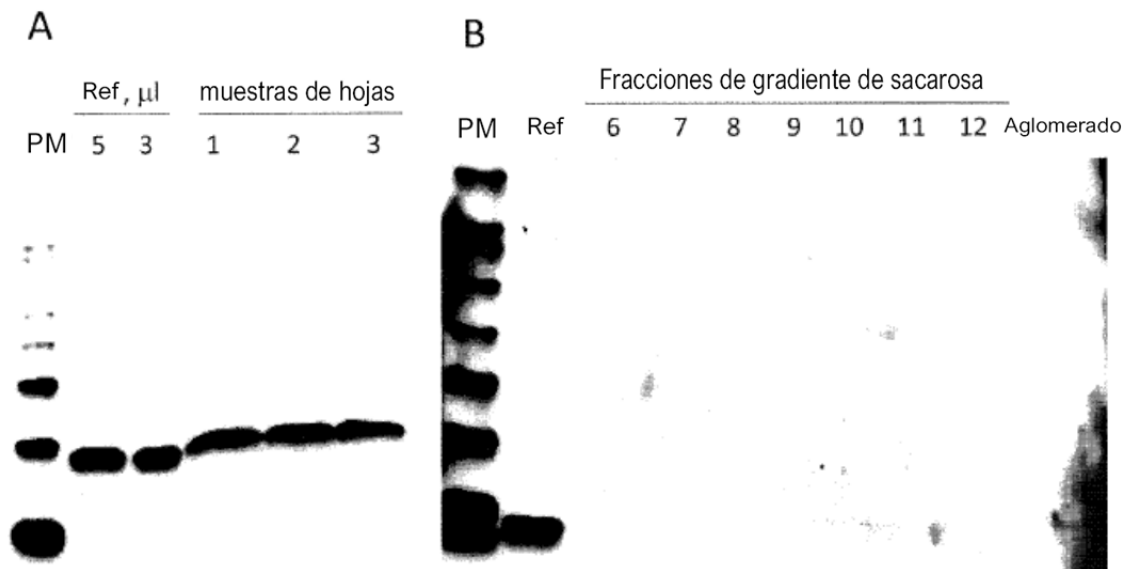


Figura 9

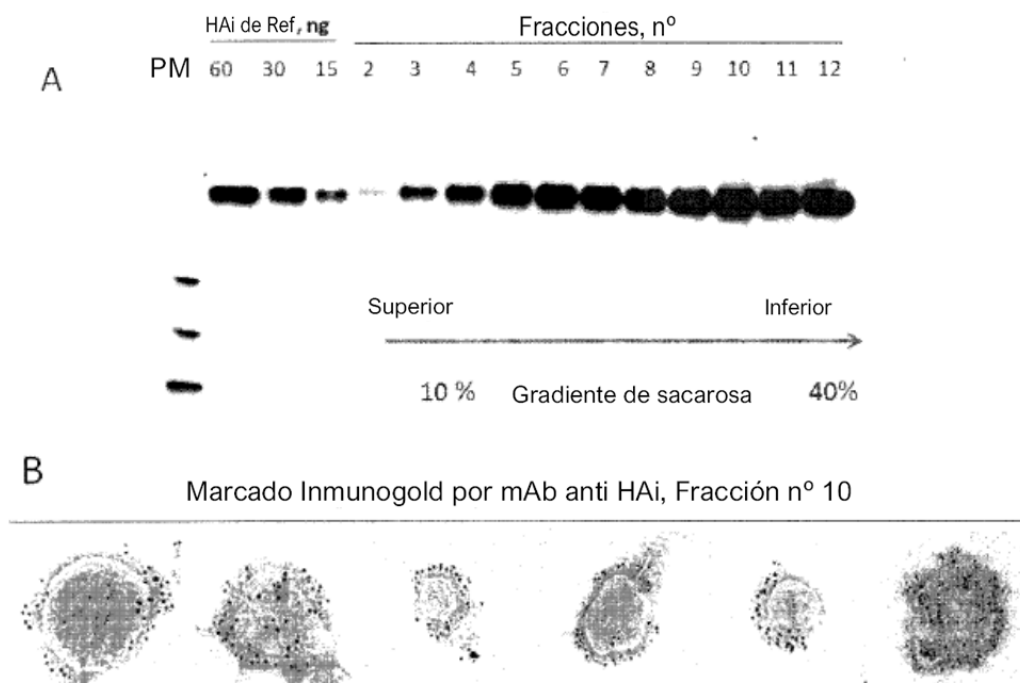
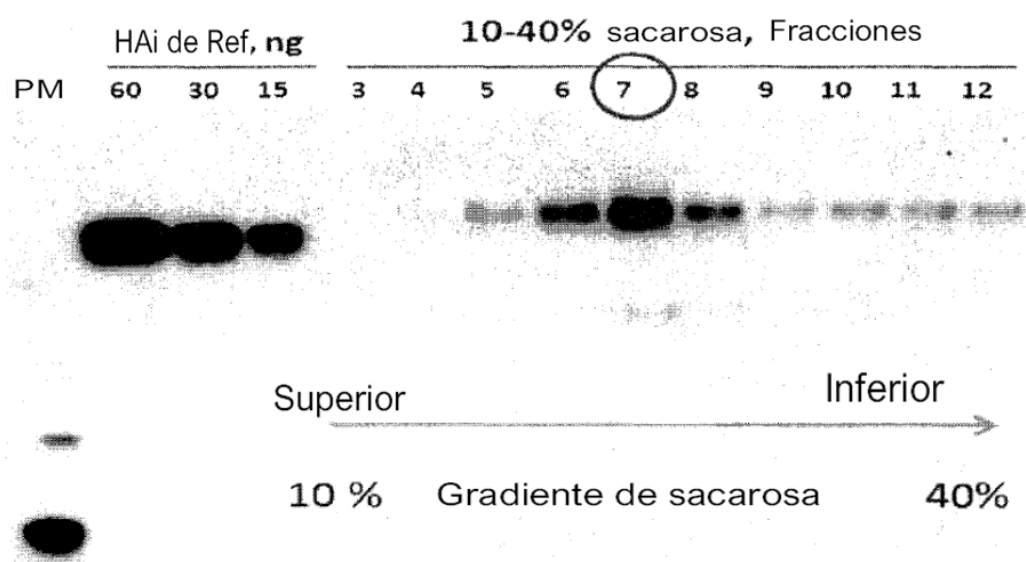


Figura 10

A



B

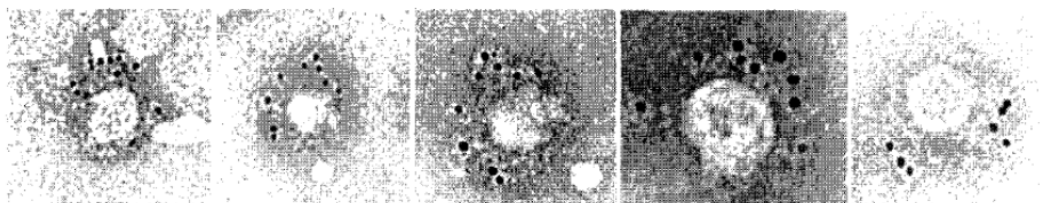


Figura 11

A. HAI-TM (SEQ ID NO: 1)

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRADQICIGYHANNSTEQVDTI
MEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPM
CDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEEKIL
IIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKS
YNNTNQEDLLVLWGIHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPK
IATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS
NRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGY
HHSNEQSGGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREF
NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKN
LYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSE
EARLKREEISGVKLESIGTYQI**LSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWM**
*CSNGSLQCRICI**

B. HAI-TM(G)_{LNIV} (SEQ ID NO: 2)

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRADQICIGYHANNSTEQVDTI
MEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPM
CDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEEKIL
IIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKS
YNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVP
KIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKK
GDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVK
SNRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGY
YHHSNEQSGGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREF
NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKN
LYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSE
EARLKREEISGVKLESIGTYQI**VTLWATVFLTLGALVAGAKVWEIM**
*RKANRKSQYKRTNTEPHDSQATWI**

Figura 12

A. M_{LNIV} (SEQ ID NO: 3)

SAKLNWYRITFNDTVWRFDTARGPKDGETCPLIASSELFSSGLSEVFKS
VTSFSEILRNMESRGYITNITLRADSDILGPGALRCEFLFPSEVFIPTSH
TLKMGRSSLILEPHLVVLKECKYISSGKLDIGISSIEATSVAVLRRVKGP
AFIGCMDNPFGLTKKPSDEKNVLASK*

B. Proteína M1 (SEQ ID NO: 4)

MSLLTEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTR
PILSPLTKGILGFVFTLTPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAV
KLYKKLKREITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFG
LVCATCEQIADSQHRSHRQMATTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQM
AGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSSAGLKDNLLNLQ
AYQKRMGVQMQRFK*