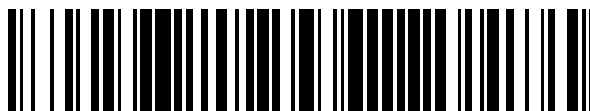


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 987**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04	(2006.01)
A61K 39/15	(2006.01)
A61P 31/14	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)
C07K 14/14	(2006.01)
C12N 15/46	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)
C12N 7/01	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2013 PCT/CA2013/050364**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13166609**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2013 E 13787880 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2847324**

54 Título: **Producción de partículas de tipo Rotavirus en plantas**

30 Prioridad:

11.05.2012 US 201261646058 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2018

73 Titular/es:

**MEDICAGO INC. (50.0%)
1020 route de l'Eglise, Suite 600
Québec, Québec G1V 3V9, CA y
MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**D'Aoust, Marc-André;
Landry, Nathalie;
Lavoie, Pierre-Olivier;
Arai, Masaaki;
Asahara, Naomi;
Mutepfa, David Levi Rutendo;
Hitzeroth, Inga Isabel y
Rybicki, Edward Peter**

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 658 987 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 de tipo Rotavirus en plantas

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a la producción de proteínas estructurales de rotavirus en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la producción de partículas pseudovíricas que comprenden proteínas estructurales de rotavirus en plantas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La infección por rotavirus es un problema global que afecta principalmente a niños menores de cinco años. Produce gastroenteritis grave y, en el peor de los casos, la muerte.

15

Los rotavirus son miembros de la familia de virus Reoviridae (género Rotavirus) que afectan el sistema gastrointestinal y el tracto respiratorio. El nombre se deriva de la apariencia de tipo rueda de los viriones cuando se observan mediante microscopía electrónica de contraste negativo (Figura 1a, técnica anterior). El rotavirus es generalmente de forma globular y se nombra después de las envolturas externas e internas o la estructura de la cápside de doble envoltura del mismo. La cápside externa es de aproximadamente 70 nm, y la cápside interna tiene aproximadamente 55 nm de diámetro, respectivamente. La cápside de doble envoltura del rotavirus rodea el núcleo, incluida la envoltura proteica interna y el genoma. El genoma del rotavirus consiste en segmentos de ARN bicatenario que codifican al menos 11 proteínas de rotavirus.

20

El ARNs codifica seis proteínas estructurales (VP) y seis proteínas no estructurales (NSP) (Figura 1c, técnica anterior). Las proteínas estructurales comprenden VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 (Figura 1b, técnica anterior). Tres capas concéntricas están formadas por el ensamblaje de VP2, VP6 y VP7 respectivamente, formando VP4 "picos" en la superficie de la estructura del virus. Las NSP se sintetizan en células infectadas y funcionan en diversas partes del ciclo de replicación o interactúan con algunas de las proteínas huésped para influir en la patogénesis o la respuesta inmune a la infección (Greenberg y Estes, 2009).

30

VP2 es una proteína de 102 kDa y es la proteína más abundante del núcleo viral. Forma la capa de proteína estructural más interna y proporciona un andamiaje para el ensamblaje correcto de los componentes y las enzimas de transcripción del núcleo viral (Lawton, 2000). VP1, la proteína viral más grande en 125 kDa, actúa como una polimerasa dependiente de ARN para rotavirus, creando un intermedio de replicación central, y se asocia con VP2 en sus vértices icosaédricos (Varani y Allain, 2002; Vende et al., 2002). La VP3, una proteína de 98 kDa, también está directamente asociada con el genoma viral, que actúa como una enzima que bloquea el ARNm y añade una estructura de protección de 5' a los ARNm virales. Juntas, VP1 y VP3 forman un complejo que está unido a los vértices exteriores de 5 veces de la capa de cápside VP2 (Angel, 2007). VP6 es una proteína de 42 kDa que forma la envoltura media del núcleo viral, es la principal proteína de la cápside y representa más del 50 % de la masa de proteína total del virión (Gonzalez et al., 2004; Estes, 1996). Es necesario para la transcripción génica y puede desempeñar un papel en la encapsulación del ARN del rotavirus mediante el anclaje de VP1 a VP2 en el núcleo, como se ve en el virus de la lengua azul, otro miembro de la familia Reoviridae. También determina la clasificación de los rotavirus en cinco grupos (A a E) afectando el grupo A con mayor frecuencia a los humanos (Palombo, 1999).

40

La VP6 en el grupo A de rotavirus tiene al menos cuatro subgrupos (SG), que dependen de la presencia o ausencia de epítomos específicos de SG: SG I, SG II, SG (I+II) y SG no (I+II). Los grupos B y C carecen de un antígeno común del grupo A, pero también se sabe que infectan a los humanos, mientras que el grupo D solo afecta a los animales, por ejemplo, pollos y vacas (Thongprachum, 2010).

45

Las dos proteínas de la cápside externa VP7, una glicoproteína de 37 kDa (G) y la VP4 (P) sensible a la proteasa de 87 kDa, definen los serotipos del virus. Estas dos proteínas inducen respuestas de anticuerpos neutralizantes y, por lo tanto, se usan para clasificar los serotipos de rotavirus en un sistema de nomenclatura dual, dependiendo de la combinación de antígeno GP (por ejemplo, G1 P[8] o G2 P[4]) (Sanchez-Padilla et al., 2009). La proteína VP4 se dimeriza para formar 60 picos en la envoltura externa del virus, que están directamente implicados en las fases iniciales de la entrada de la célula huésped. La proteína espicular contiene un sitio de escisión en la posición 248 de aminoácido (aa). Tras la infección, se escinde por la proteasa tripsina para producir VP5 (529 aa, 60 kDa) y VP8 (246 aa, 28 kDa) (Denisova et al., 1999). Este proceso mejora la infectividad del virus (unión de células e invasión de la célula huésped) y estabiliza la estructura espicular (Glass, 2006). La glucoproteína VP7 forma la tercera capa o capa externa del virus. En la actualidad, se conocen los genotipos 27 G y 35 P (Greenberg y Estes, 2009). VP4 y

50

55

VP7 son los principales antígenos involucrados en la neutralización vírica y son dianas importantes para el desarrollo de vacunas (Dennehy, 2007).

En células de mamífero infectadas, los rotavirus experimentan un modo único de morfogénesis para formar las partículas virales VP2/6/4/7 de triple capa completas (Lopez et al., 2005). La cápside de triple capa es un complejo muy estable que permite la transmisión fecal-oral y la administración del virus al intestino delgado, donde infecta enterocitos diferenciados no divisorios cerca de las puntas de las vellosidades (Greenberg y Estes, 2009). En primer lugar, el virus intacto se adhiere a los receptores independientes de ácido siálico a través de 60 picos diméricos de VP4 sobre la superficie del virus (Lundgren y Svensson, 2001). Los 60 picos diméricos de VP4 en la superficie del virus permiten que el virus se adhiera a estos receptores celulares. La VP4 es susceptible a la escisión proteolítica por la tripsina, lo que da como resultado un cambio conformacional que expone sitios de unión adicionales en la superficie de la glucoproteína para la interacción con una serie de correceptores.

Sin embargo, el proceso de adhesión y entrada multietapa no se entiende claramente, pero el virus se administra a través de la membrana plasmática huésped. La envoltura de la cápside externa de VP7 que también está involucrada en el proceso de entrada, se elimina en el proceso y las partículas de doble capa (DLP) se administran al citoplasma celular en vesículas (Figura 2; técnica anterior). La DLP escapa de la vesícula y entra en inclusiones citoplasmáticas no unidas a la membrana. La transcripción temprana del genoma por VP1 comienza en las partículas de manera que el ARNs nunca se expone al citoplasma. La replicación del ARN y la formación del núcleo tienen lugar en estas inclusiones citoplasmáticas no unidas a la membrana. Los ARN (+) nacientes se transportan luego al citoplasma y sirven como plantillas para la síntesis de proteínas virales. VP4 se produce en el citosol y se transporta al retículo endoplasmático rugoso (RER), y VP7 se secreta en el RER. VP2 y VP6 se producen y se ensamblan en el citosol en virosomas y posteriormente brotan en los compartimentos del RER, recibiendo una envoltura de membrana transitoria en el proceso (Lopez et al., 2005; Tian et al., 1996). En el RER, las envolturas transitorias de las partículas virales se eliminan y se reemplazan por los monómeros de proteínas VP4 y VP7, con participación crítica de la glucoproteína rotavírica NSP4 (Tian et al., 1996; Lopez et al., 2005; Gonzalez et al., 2000). NSP4 funciona como un receptor intracelular en la membrana del RE y se une a las partículas subvirales recién creadas y probablemente también a la proteína espicular VP4 (Tian et al., 1996). NSP4 también es tóxica para los seres humanos y es el agente causante de la diarrea. Las partículas maduras completas se transfieren posteriormente desde el RER a través del aparato de Golgi a la membrana plasmática para su secreción (Lopez et al., 2005).

Se han adoptado una diversidad de enfoques diferentes para generar una vacuna de rotavirus adecuada para proteger poblaciones humanas de los diversos serotipos de rotavirus. Estos enfoques incluyen diversos enfoques de Jenner, el uso de virus vivos atenuados, el uso de partículas pseudovíricas, vacunas de ácidos nucleicos y subunidades virales como inmunógenos. En la actualidad hay dos vacunas orales disponibles en el mercado, sin embargo, tienen una baja eficacia en algunos países en desarrollo debido a la variación de las cepas y la presencia de otros patógenos.

Las Pat. de Estados Unidos N.º 4.624.850, 4.636.385, 4.704.275, 4.751.080, 4.927.628, 5.474.773, y 5.695.767, describen cada una una diversidad de vacunas contra rotavirus y/o métodos para preparar las mismas. Una característica común compartida por los miembros de este grupo es que cada una de estas vacunas se basa en el uso de partículas virales completas para crear las últimas vacunas contra el rotavirus. Dada la necesidad de larga data de una vacuna multivalente eficaz, está claro que este trabajo ha sido solo parcialmente exitoso al abordar la necesidad de tal vacuna.

Partiendo de los métodos tradicionales de generación de vacunas, los avances en el campo de la biología molecular han permitido la expresión de proteínas de rotavirus individuales. Crawford et al. (J Virol. septiembre de 1994; 68(9): 5945-5952) clonaron la codificación de VP2, VP4, VP6 y VP7 para la proteína de la cápside principal en el sistema de expresión de baculovirus y expresaron cada proteína en células de insecto. La coexpresión de diferentes combinaciones de las principales proteínas estructurales de rotavirus dio como resultado la formación de partículas pseudovíricas (VLP) estables. La coexpresión de VP2 y VP6 en solitario o con VP4 dio como resultado la producción de las VLP VP2/6 o VP2/4/6, que eran similares a las partículas de rotavirus de doble capa. La coexpresión de VP2, VP6 y VP7, con o sin VP4, produjo VLP de tres capas VP2/6/7 o VP2/4/6/7, que eran similares a las partículas de rotavirus infecciosas nativas. Las VLP mantuvieron las características estructurales y funcionales de las partículas nativas, según se determinó por examen microscópico electrónico de las partículas, la presencia de epítopos no neutralizantes y neutralizantes en VP4 y VP7, y la actividad de hemaglutinación de las VLP VP2/4/6/7.

Los candidatos a vacuna generados a partir de partículas pseudovíricas de diferentes composiciones de proteínas

han demostrado ser potenciales como vacunas de subunidades. O'Neal et al. ("Rotavirus Virus-like Particles Administered Mucosally Induce Protective Immunity", *J. Virology*, 71(11):8707-8717 (1997)) demostraron que las VLP que contienen las VP 2 y 6 o VP 2, 6 y 7 cuando se administran a ratones con y sin la adición de toxina del cólera indujeron una inmunidad protectora en ratones inmunizados, aunque la protección fue más eficaz cuando las 5 VLP se administraron con toxina del cólera (CT).

También se han usado partículas tipo núcleo (CLP) y VLP para inmunizar vacas Fernandez, et al., ("Passive Immunity to Bovine Rotavirus in Newborn Calves Fed Colostrum Supplements From Cows Immunized with Recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines", *Vaccine*, 16(5):507-516 10 (1998)). En este estudio, se estudió la capacidad de las CLP y VLP para crear inmunidad pasiva. Este grupo concluyó que las VLP eran más eficaces que las CLP para inducir la inmunidad pasiva.

Se usan cada vez más plantas para la producción a gran escala de proteínas recombinantes. Por ejemplo, el documento US 2003/0175303 describe la expresión de la proteína estructural de rotavirus recombinante VP6, VP2, 15 VP4 o VP7 en plantas de tomate transformadas estables.

Saldana et al. expresaron VP2 y VP6 en el citoplasma de plantas de tomate utilizando un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y *A. tumefaciens* recombinante (Saldana et al., 2006). Los estudios de microscopía electrónica mostraron que una pequeña proporción de las partículas se había ensamblado en 2/6 VLP. Se detectó 20 una respuesta inmune protectora en ratones y esto puede haber sido contribuido hasta cierto punto por las VP no ensambladas. Se ha demostrado que las proteínas individuales provocan respuestas inmunes en ratones, como en el caso de VP8 y VP6 (Zhou et al., 2010).

Matsumura y col., (2002) fueron los primeros en informar sobre la expresión y el ensamblaje de VP6 de rotavirus A 25 bovino en plantas de patata transgénicas. En su estudio, usaron plantas de patata transgénicas reguladas por un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y *Agrobacterium tumefaciens* recombinante que portaban el gen VP6. La proteína se expresó, se purificó y se realizaron estudios inmunogénicos. La respuesta inmune en ratones adultos mostró presencia de anticuerpos VP6 en los sueros. Sin embargo, no mostraron evidencia de proteínas VP6 ensambladas. Pueden haber sido monómeros simples o trímeros lo que podrían provocar una 30 respuesta inmune en ratones. El trabajo de otro grupo mostró ensamblaje de VP6 en *Nicotiana benthamiana* utilizando un vector de virus de la patata X (PVX) (O'Brien et al., 2000). Cuando la proteína VP6 se expresó en plantas, se descubrió que solamente se ensamblaba cuando se fusionaba con las varillas de proteína PVX. Una vez que se produjo la escisión, la VP6 se ensambló en VLP icosaédricas como se vio en un estudio similar de HIV-PVX de Marusic et al., (2001). Este resultado sugiere probablemente que las proteínas del rotavirus pueden requerir un 35 factor o mejora adicional para formar VLP.

La producción de VLP es una tarea desafiante, ya que se requieren tanto la síntesis como el ensamblaje de una o más proteínas recombinantes. Este es el caso de la VLP de rotavirus que es un virus de ARN con una cápside formada por 1860 monómeros de cuatro proteínas diferentes. Para la producción de VLP, es necesaria la expresión 40 simultánea y el ensamblaje de dos a tres proteínas recombinantes. Estas comprenden 120 moléculas de VP2 (capa interna), 780 moléculas de VP6 (capa media) y 780 moléculas de la glucoproteína VP7 (capa externa), formando finalmente una partícula de doble o triple capa. Además, la producción de la mayoría de las VLP requiere la expresión simultánea y el ensamblaje de varias proteínas recombinantes, que, para el caso de la partícula de tipo rotavirus (RLP), debe producirse en una única célula huésped.

45 Un estudio más reciente mostró la expresión exitosa de VP6 de rotavirus humano optimizada por codones en *Chenopodium amaranticolor* usando un sistema de expresión mediado por el virus de la quemadura de ennegrecimiento de la remolacha (BBSV). La proteína se diseñó como un reemplazo del marco de lectura abierto de proteína de cubierta del BBSV. La inmunización oral de ratones hembra BALB/c con la proteína VP6 basada en 50 plantas indujo altos títulos de IgA de mucosa anti-VP6 e IgG sérica (Zhou et al., 2010). El grupo, sin embargo, no mencionó si las proteínas VP6 se ensamblaron en VLP o partículas.

El rotavirus VP7 también se ha expresado con éxito en plantas de tabaco y se ha demostrado que mantiene su respuesta inmune neutralizante en ratones (Yu y Langridge, 2001). Otro estudio que utilizó plantas de patata 55 transgénicas para expresar VP7 mostró que el gen VP7 fue estable durante 50 generaciones en las plantas transformadas. La proteína VP7 de la 50ª generación indujo anticuerpos tanto protectores como neutralizantes en ratones adultos (Li et al., 2006).

Yang et al. (Yang Y M, Li X, Yang H, et al. 2011) coexpresaron tres proteínas de la cápside del rotavirus VP2, VP6 y

VP7 del grupo A RV (P[8]G1) en las plantas de tabaco, se estudiaron los niveles de expresión de estas proteínas, así como la formación de partículas de tipo rotavirus y la inmunogenicidad. Las VLP se purificaron a partir de plantas de tabaco transgénicas y se analizaron mediante microscopía electrónica y transferencia Western. Los resultados de Yang et al. indican que la proteína VP2, VP6 y VP7 derivada de planta se autoensambló en 2/6 o 2/6/7 partículas de 5 tipo rotavirus con un diámetro de 60-80 nm.

El documento WO 01/59070A1 describe un método para producir proteínas estructurales de rotavirus recombinantes cultivando células vegetales transformadas, y una composición de vacuna que comprende las mismas como en el componente consecutivo. La publicación de S. Saldana et al "Production of rotavirus-like particles in tomato 10 (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies" describe la expresión de las proteínas de la cápside del rotavirus VP2 y VP6 en los frutos de plantas de tomate transgénicas. La publicación de S.D. Trask et al. "Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins" describe partículas de rotavirus de doble capa recubiertas con VP4 y VP7 recombinantes. La publicación de Y.M. Yang et al "Immunogenicity and virus-like particle formation of rotavirus 15 capsid proteins produced in transgenic plants" describe la expresión estable, extracción y purificación de proteínas de rotavirus de longitud completa VP2, VP6 y VP7 en plantas de tabaco de unidades que usan un promotor 35S del mosaico de la coliflor.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

20

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

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para producir una partícula de tipo rotavirus (RLP) en una planta de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

30

a) introducir un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7, un segundo ácido nucleico que comprende una segunda 30 región reguladora activa en la planta unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7, y un tercer ácido nucleico que comprende una tercera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus seleccionada de 35 VP2, VP6 y VP7 en la planta, parte de una planta o célula vegetal, en el que la primera, segunda o tercera secuencia de nucleótidos que codifica la VP7 comprende un péptido señal nativo truncado o un péptido señal no nativo de un polipéptido vegetal, y en el que la RLP comprende VP2, VP6 y VP7; o

35

40

a) proporcionar una planta, parte de una planta o célula vegetal que comprende un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una primera 40 secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína estructural de rotavirus, un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus y un tercer ácido nucleico que comprende una tercera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una 45 tercera secuencia de nucleótidos que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus en la planta, parte de una planta o célula vegetal; en el que la primera proteína estructural de rotavirus es VP2, la segunda proteína estructural de rotavirus es VP6 y la tercera proteína estructural de rotavirus es VP7, en la que VP7 comprende un péptido señal nativo truncado o un péptido señal no nativo de un polipéptido vegetal;

45

50

b) incubar la planta, parte de una planta o célula vegetal en condiciones que permitan la expresión transitoria del primer, segundo y tercer ácido nucleico, produciendo de este modo la RLP,

c) cultivar la planta, parte de la planta o célula vegetal, y

d) extraer y purificar las RLP de la planta, parte de la planta o célula vegetal, en presencia de calcio, en las 50 que la concentración de calcio está entre 1 mM y 1000 mM.

55 Además, un cuarto ácido nucleico que comprende una cuarta región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una cuarta secuencia de nucleótidos que codifica una cuarta proteína estructural de rotavirus puede introducirse en la planta, parte de una planta o célula vegetal en la etapa a), y se expresa al incubar la planta, parte de una planta o célula vegetal en la etapa b).

En el método descrito anteriormente, la primera proteína estructural de rotavirus puede ser VP2, la segunda proteína estructural de rotavirus puede ser VP6 y la tercera proteína estructural de rotavirus puede ser VP7. Además, la cuarta proteína estructural de rotavirus puede ser VP4. El VP4 puede procesarse o escindirse para producir VP5 y VP8. La escisión de VP4 puede realizarse usando una proteasa, por ejemplo, tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, o una subtilisina. La proteasa puede coexpresarse en la planta.

Además, en el método, se puede expresar un ácido nucleico adicional en la planta, porción de una planta o célula vegetal, y en el que el ácido nucleico adicional comprende una región reguladora activa en la planta unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un supresor de silenciamiento.

El uso de codones de la secuencia de nucleótidos se puede ajustar al uso de codones humanos preferidos, aumento del contenido de GC, o una combinación de los mismos.

15 La proteína estructural de rotavirus comprende un péptido señal truncado nativo o no nativo. El péptido señal no nativo puede ser un péptido señal de proteína disulfuro isomerasa (PDI).

La primera, segunda, tercera o cuarta secuencia de nucleótidos, o una combinación de las mismas, se pueden unir operativamente a una región reguladora del virus del mosaico del caupí (CPMV).

20 El método como se ha descrito anteriormente comprende las etapas de:

- c) cultivar la planta, parte de una planta o célula vegetal, y
- d) purificar las RLP de la planta, parte de una planta o célula vegetal.

25 Durante la etapa de recolección o purificación en el método, la VP4 puede procesarse o escindirse para producir VP5 y VP8 usando tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, y subtilisina.

30 Las RLP pueden tener un tamaño de 70-100 nm y se purifican en presencia de calcio.

La presente invención proporciona una RLP producida por el método como se ha descrito anteriormente. La RLP producida puede comprender al menos una proteína estructural de rotavirus VP4. La VP4 puede escindirse en VP5 y VP8 usando una proteasa, por ejemplo, tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, y subtilisina. La proteasa puede coexpresarse dentro de la planta o añadirse durante la recolección, purificación, o ambas. Además, la RLP producida por el método puede ser una RLP de doble capa y/o una RLP de triple capa.

Además, se proporcionan secuencias de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos que codifica VP2 puede comprender del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, o SEQ ID NO: 45. La secuencia de nucleótidos que codifica VP6 puede comprender del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:46. La secuencia de nucleótidos que codifica VP7 puede comprender del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO: 19, 20, 48, 49, 52, 53, 54 o 57. Y la secuencia de nucleótidos que codifica VP4 puede comprender del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO: 15, 16, 47, 50, o 51. Además, VP2 puede codificarse por una secuencia de aminoácidos que comprende del 80 % al 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 25. VP6 puede codificarse por una secuencia de aminoácidos que comprende del 80 % al 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 31. VP7 puede codificarse por una secuencia de aminoácidos que comprende del 80 % al 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 4, 39, 43 o 59. VP4 puede codificarse por una secuencia de aminoácidos que comprende del 80 % al 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 36. 33. La una o más proteínas estructuras de pueden ser VP2, VP4, VP6 y/o VP7. La VP4 puede procesarse para producir VP5 y VP8. La una o más proteínas estructurales de rotavirus pueden seleccionarse de la cepa de rotavirus G9 P[6], la cepa WA de rotavirus A, la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra rotavirus A, y la cepa SA11 de rotavirus.

En el método descrito anteriormente, la primera, segunda o tercera secuencia de ácidos nucleicos, o una combinación de las mismas, puede comprender una región reguladora activa en la planta unida operativamente a

uno o más de un potenciador de comovirus, a uno o más de un elemento de amplificación, y a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural de rotavirus, y en la que se puede introducir un cuarto ácido nucleico que codifica una replicasa en la planta, parte de una planta o célula vegetal.

5 La presente invención proporciona una RLP producida por el método como se ha descrito anteriormente. La RLP puede comprender tres o más proteínas estructurales de rotavirus que pueden comprender N-glicanos específicos de plantas o N-glicanos modificados.

10 La presente invención incluye una composición que comprende una dosis eficaz de la RLP preparada por el método, como se acaba de describir, para inducir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe adicionalmente, pero no dentro del alcance de las reivindicaciones, un método para inducir inmunidad a una infección por rotavirus en un sujeto, que comprende administrar la RLP tal como se acaba de describir, al sujeto. La RLP se puede administrar a un sujeto por vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, 15 intravenosa o subcutánea.

La presente descripción también proporciona una materia vegetal que comprende una RLP producida por el método (A), como se ha descrito anteriormente. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad a una infección por virus rotavirus en un sujeto. La materia vegetal también se puede mezclar como un complemento alimenticio. 20

En el método que se ha descrito anteriormente, a la planta o parte de la planta se le puede administrarse además, o puede comprender adicionalmente, otra secuencia de ácido nucleico que codifica un supresor de silenciamiento.

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 la estructura del rotavirus y la asignación de genes y proteínas. (A) Microscopía electrónica de transmisión de partículas de rotavirus (la barra representa 100 nm). (B) Organización de las proteínas de la cápside del virus que comprende el interior, la parte intermedia y el exterior. (C) Segmentos de ARNds de rotavirus dispuestos según tamaño y función. El ARNds se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida (D). Las proteínas en (C) están indicadas por segmentos de ARNds en (D). Imágenes de Crawford et al., 1997 (A), Swiss Institute of Bioinformatics, 2008 (B) y Greenberg y Estes, 2009 (D). 35

La **Figura 2** muestra la entrada y replicación de células de rotavirus. Cuando el rotavirus entra en una célula, VP4 y VP7 se pierden, formando una partícula de doble capa (DLP). La transcripción del ARNds comienza dando como resultado la traducción de VP2, VP4, VP6 y VP7. Los núcleos de progenie con actividad de replicasa se producen en fábricas de virus (también llamadas viroplasmatas). La transcripción tardía se produce en estos núcleos de progenie. En la periferia de las fábricas de virus, estos núcleos están recubiertos con VP6, formando DLP inmaduras que se extienden a través de la membrana del retículo endoplasmático, adquiriendo una membrana lipídica transitoria que se modifica con las glucoproteínas vivas residentes del RE. NSP4 y VP7; estas partículas envueltas también contienen VP4. A medida que las partículas se mueven hacia el interior de las cisternas del RE, la membrana lipídica transitoria y la proteína no estructural NSP4 se pierden, mientras que las proteínas VP4 y VP7 de la superficie del virus se reorganizan para formar la capa proteica del virus externa, produciendo partículas infecciosas maduras de triple capa (véase Swiss Institute of Bioinformatics (ViralZone): viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/107.html). 40 45

La **Figura 3** muestra los vectores de *Agrobacterium* pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP y pTRAc-ERH. P35SS, promotor CaMV 35S con potenciador transcripcional duplicado; CHS, región no traducida de chalcona sintasa 5'; pA35S, señal de poliadenilación CaMV 35S; SAR, región de unión del andamiaje del gen Rb7 del tabaco; LB y RB, los bordes izquierdo y derecho para la integración del ADN-T; ColE1ori, origen de replicación para *E. coli*; RK2ori, origen de replicación para *Agrobacterium*; bla, gen bla de resistencia a ampicilina/carbenicilina; LPH, secuencia del péptido señal de la cadena pesada de mAb24 murino; his6, 6 x secuencia His tag; SEKDEL, secuencia señal de retención del RE; rbcs1-cTP, secuencia peptídica del tránsito de cloroplastos de un gen de unidad pequeña Rubisco (rbcs1) de *Solanum tuberosum*; npt II, gen npt II de resistencia a la kanamicina; Pnos y pAnos, promotor y señal de poliadenilación del gen nopalina sintasa (Maclean et al., 2007). 50 55

La **Figura 4** muestra una descripción general de la clonación de rotavirus y el procedimiento de infiltración

La **Figura 5** muestra un procedimiento de extracción de proteína de apoplasto. (A) Ilustración de la célula vegetal y la ubicación del apoplasto. Las proteínas VP se expresan en el citosol y se dirigen al apoplasto (flecha roja). (B) - Después de la prueba de contrarrelaj, la hoja de la planta se infiltra al vacío con PBS (1) y se coloca en una columna de centrifugación perforada (2), después se centrifuga en un tubo Eppendorf de 2 ml para recoger la savia (3).

La **Figura 6** muestra una transferencia western de expresión de la proteína VP6 de rotavirus en compartimentos de células foliares de plantas durante 7 días. Se usó anticuerpo VP6 anti-rotavirus de ratón (1:5000) para sondear las membranas. (+) y (-) indican expresión con o sin supresor de silenciamiento respectivamente. Las líneas rojas indican la posición de las proteínas VP6 en las diversas muestras analizadas (~40 kDa). La eficacia de la expresión y extracción de VP6 fue mejor en el citoplasma.

La **Figura 7** muestra una transferencia Western que muestra la expresión individual de las proteínas del rotavirus marcadas en his el día 3 en el citoplasma de las hojas de la planta *N. benthamiana*. +ve - VP2 del rotavirus expresado en bacterias; M - marcador de peso molecular; VP - proteína de la cápside del rotavirus. La infiltración de VP7 dio como resultado el amarillamiento de las hojas (b).

La **Figura 8** muestra la expresión de VP2 (a) y VP4 (b) de rotavirus dirigida a diversos compartimentos de células foliares de la planta de *N. benthamiana* el día 3. Se usaron los respectivos sueros anti-rotavirus de pollo (1:2000) para VP2 y VP4 para sondear las proteínas. cTp - cloroplastos; RE - retículo endoplasmático; pTRAc - citoplasma; A - apoplasto; Control negativo (-ve) - plantas infiltradas solo con supresor de silenciamiento; Control positivo (+ ve) en (a) - VP2 expresada en bacterias, (b) - VP4 expresada en bacterias; (- y +) con o sin supresor de silenciamiento; M - marcador de peso molecular. Las flechas indican la posición de las bandas de proteína en cuestión.

La **Figura 9** muestra el análisis de transferencia Western de extractos del día 3 de VP2/6/4 coexpresada en el citoplasma de hojas de *N. benthamiana*. Las proteínas se probaron con una mezcla de suero anti-rotavirus de pollo (anti-VP2 (1/5000) y anti-VP4 (1/5000)) y anticuerpo anti-VP6 de ratón (1:5000). La infiltración de *Agrobacterium* recombinante se realizó con un supresor del silenciamiento. Control negativo (-ve) - plantas enteras infiltradas solo con supresor de silenciamiento; M - marcador de peso molecular.

La **Figura 10** muestra micrografías electrónicas de proteínas de rotavirus extraídas del citoplasma del día 3 teñidas con acetato de uranilo, (a) Extracto de muestra de proteína negativa con supresor de silenciamiento; (b) extracto de proteína VP6; (c) extracto de proteína VP2/6 y (d) extracto de proteína VP2/6/4. Barras = 200 nm. Todas las RLP detectadas tenían entre 70 y 100 nm de diámetro. La flecha en (b) indica la vaina/estera de VP6. La flecha en (c) indica un ejemplo de una RLP. Todas las proteínas se expresaron en presencia de un supresor de silenciamiento. Todas se capturaron con anticuerpo anti-VP6 de ratón (1:2000).

La **Figura 11** muestra la purificación en gradiente de sacarosa de VP2/6 y VP2/6/4 (a) coexpresadas. Dots blots de gradiente de sacarosa de VP2/6 (b) y VP2/6/4 (c) purificadas. Los extractos de proteínas se cargaron en un gradiente de sacarosa (10 - 60 %) y se ultracentrifugaron. Las fracciones se analizaron probando con (b) anticuerpo anti-VP6 de ratón (1:5000) y (c) suero anti-VP2 y VP4 de pollo (1:5000).

La **Figura 12** muestra el análisis de transferencia western de las fracciones VP2/6 (a), fotografía de gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE de las fracciones 16 y 17 (b) de VP2/6, y análisis de transferencia Western de las fracciones 16 y 17 (c). Se utilizó suero anti-VP6 de ratón (1:5000) y suero anti-VP2 de pollo (1:5000) en la transferencia Western (a) y solo anti-VP6 de ratón (1:5000) en (c). Control negativo (- ve) en (a) y (c) - VP4 expresada en bacterias, y en (b) - plantas infiltradas con supresor de silenciamiento y gradiente de sacarosa purificado; en bruto - extracto de VP2/6 no purificado; Control positivo (+ ve) en (a) - VP2 expresada en bacterias, (b) y (c) - VP6 expresada en plantas; VP6-SF9 - proteína VP6 de concentración conocida expresada en células de insecto SF9. Las flechas indican bandas de proteínas de interés.

La **Figura 13** muestra el ensayo de proteína soluble total en fracciones de VP2/6 purificada de gradiente de densidad de sacarosa. (a) - Curva estándar de IgG, (b) - lecturas de absorbancia de fracciones tomadas a 750 nm. Puntos de interés: fracciones 16 a 19.

La **Figura 14** muestra el análisis del gradiente de densidad de sacarosa de las fracciones de VP2/6/4 coexpresadas en el citoplasma. Se tomaron lecturas de absorbancia en bruto a 750 nm para verificar los picos de proteína detectados previamente en el dot blot de VP2/6/4.

La **Figura 15** muestra micrografías electrónicas de transmisión de partículas de VP2/6 purificadas en gradiente de densidad de sacarosa. Tanto (a) como (b) muestran dos secciones diferentes vistas sobre la rejilla de cobre. Todas las RLP detectadas tenían entre 70 y 100 nm de diámetro. Las muestras se capturaron con anticuerpo anti-VP6 de ratón (1:2000). Las barras representan 200 nm.

La **Figura 16a** muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1) y las secuencias de nucleótidos de VP2 de Rotavirus (SEQ ID NO:13 y 14). La **Figura 16b** muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) y las secuencias de nucleótidos de VP4 de Rotavirus (SEQ ID No: 15 y 16). La **Figura 16c** muestra

la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) y las secuencias de nucleótidos de VP6 de Rotavirus (SEQ ID NO: 17 y 18). La **Figura 16d** muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) y las secuencias de nucleótidos de VP7 de Rotavirus (SEQ ID NO: 19 y 20).

La **Figura 17A** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-WA_VP2(opt).s1+3c (SEQ ID NO: 21).

La **Figura 17B** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-WA_VP2(opt).s1-4r (SEQ ID NO: 22).

La **Figura 17C** muestra una representación esquemática de la construcción 1191. Los sitios de la enzima de restricción SacII y Stul usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación.

La **Figura 18** muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 23) de la construcción 1191 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina.

La **Figura 19** muestra la secuencia de nucleótidos que codifica VP2(opt) de la cepa WA de Rotavirus A (SEQ ID NO:45).

La **Figura 20** muestra la secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa WA de Rotavirus A (SEQ ID NO: 25).

La **Figura 21** muestra una representación esquemática de la construcción número 1710.

La **Figura 22A** muestra una representación esquemática de la construcción 193. Los sitios de la enzima de restricción SacII y Stul usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación. La

Figura 22B muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción 193 (SEQ ID NO: 26). Se muestra la construcción 193 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina.

La **Figura 23** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión 1710 (SEQ ID NO: 27). Se muestra el casete de expresión número 1710 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP2(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.

La **Figura 24** muestra una representación esquemática de la construcción número 1711.

La **Figura 25A** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-WA_VP6(opt).s1+3c (SEQ ID NO:28).

La **Figura 25B** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-WA_VP6(opt).s1-4r (SEQ ID NO: 29).

La **Figura 25c** muestra el casete de expresión número 1713 del promotor 2X35S al terminador NOS (SEQ ID NO: 30). Está subrayada la VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A. La **Figura 25d** muestra la secuencia de nucleótidos que codifica VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A (SEQ ID NO: 46)

La **Figura 26** muestra la secuencia de aminoácidos de VP6 de la cepa WA de Rotavirus A (SEQ ID NO: 31).

La **Figura 27** muestra la representación esquemática de la construcción número 1713.

La **Figura 28** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1714 del promotor 2X35S al terminador NOS (SEQ ID NO:32). Está subrayada la VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.

La **Figura 29** muestra una representación esquemática de la construcción número 1714.

La **Figura 30A** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-Rtx_VP4(opt).s1+3c (SEQ ID NO: 33).

La **Figura 30B** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-Rtx_VP4(opt).s1-4r (SEQ ID NO: 34).

La **Figura 31A** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1731 del promotor 2X35S al terminador NOS (SEQ ID NO: 35). Está subrayada la VP4(opt) de la cepa Rotarix de Rotavirus A.

La **Figura 31B** muestra la secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] (SEQ ID NO: 47). La **Figura 31C** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1730 del promotor 2X35S al terminador NOS (SEQ ID NO: 44). Está subrayada la VP4(opt) de la cepa Rotarix de Rotavirus A.

La **Figura 32** muestra la secuencia de aminoácidos de VP4 de la cepa Rotarix de Rotavirus A (SEQ ID NO: 36).

La **Figura 33A** muestra una representación esquemática de la construcción número 1730. La **Figura 33B** muestra una representación esquemática de la construcción número 1731.

La **Figura 34A** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1+3c (SEQ ID NO: 37).

La **Figura 34B** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r (SEQ ID NO: 38). La

Figura 34C muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1733 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 24). La **Figura 34D** muestra la secuencia de nucleótidos que codifica VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 48). La **Figura 34E** muestra la secuencia codificante optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa

RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] (SEQ ID NO 54). La **Figura 35** muestra la secuencia de aminoácidos de VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 39).

La **Figura 36** muestra una representación esquemática de la construcción número 1733.

La **Figura 37** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-Rtx_VP7(opt).s2+4c (SEQ ID NO: 40).

La **Figura 38** muestra una representación esquemática de la construcción 1192. Los sitios de la enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación.

La **Figura 39** muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción 1192 de los bordes izquierda a derecha de ADNt (subrayados) (SEQ ID NO: 41). Se muestran 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina.

La **Figura 40A** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1735 del promotor 2X35S al terminador NOS (SEQ ID NO: 42). Está subrayada la PDISP/VP7(opt) de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A. **Figura 40B** Secuencia de nucleótidos que codifica PDISP/VP7(opt) de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 49).

La **Figura 41** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 43).

La **Figura 42** muestra una representación esquemática de la construcción número 1735.

La **Figura 43A** muestra la secuencia codificante de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] (SEQ ID NO: 50). La **Figura 43B** muestra la secuencia codificante optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3PSB[2] (SEQ ID NO : 51). La **Figura 43C** muestra la secuencia codificante de VP7 de de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] (SEQ ID NO : 52). La **Figura 43D** muestra la secuencia codificante optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] (SEQ ID NO :53).

La **Figura 44A** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-TrSP+Rtx_VP7(opt).s1+3c (SEQ ID NP: 55). La **Figura 44B** muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r (SEQ ID NO: 56). La **Figura 44C** muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] (SEQ ID NO: 57). La **Figura 44D** muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1734 del promotor 2X35S al terminador NOS (SEQ ID NO 58). Está subrayada la VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A. La **Figura 44E** muestra la secuencia de aminoácidos de TrSp-VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 59). La **Figura 44F** muestra la representación esquemática de la construcción número 1734.

La **Figura 45** muestra la purificación de las partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2 y VP6 por centrifugación de gradiente de densidad de iodixanol. **Figura 45A** Análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie de la carga antes de la centrifugación y fracciones 1 a 10 (estando la fracción 1 en el fondo del tubo). Las posiciones de los antígenos de rotavirus se muestran mediante flechas. **Figura 45B** Análisis de transferencia Western de las mismas fracciones que en (A) usando un anticuerpo anti-rotavirus policlonal de conejo. **Figura 45C** Análisis de transferencia Western de las mismas fracciones que en (A) usando un anticuerpo anti-VP2 policlonal de conejo.

La **Figura 46** muestra la purificación de las partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2, VP6 y VP7 por centrifugación de gradiente de densidad de iodixanol. **Figura 46A** Análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie de la carga antes de la centrifugación y fracciones 1 a 10 (estando la fracción 1 en el fondo del tubo). Las posiciones de los antígenos de rotavirus se muestran mediante flechas. **Figura 46B** Análisis de transferencia Western de las mismas fracciones que en (A) usando un anticuerpo anti-rotavirus policlonal de conejo. **Figura 46C** Análisis de transferencia Western de las mismas fracciones que en (A) usando un anticuerpo anti-VP7 policlonal de conejo.

La **Figura 47** muestra la purificación de las partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2, VP4, VP6 y VP7 por centrifugación de gradiente de densidad de iodixanol. **Figura 47A** Análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie de la carga antes de la centrifugación y fracciones 1 a 10 (estando la fracción 1 en el fondo del tubo). Las posiciones de los antígenos de rotavirus se muestran mediante flechas. **Figura 47B** Análisis de transferencia Western de las mismas fracciones que en (A) usando un anticuerpo anti-rotavirus policlonal de conejo. **Figura 47C** Análisis de transferencia Western de las mismas fracciones que en (A) usando un anticuerpo anti-VP7 policlonal de conejo.

La **Figura 48** muestra la evaluación del contenido de VP4 en partículas de tipo rotavirus purificadas que comprenden VP2, VP4, VP6 y VP7 por ELISA específico para anti-VP4.

La **Figura 49** muestra una imagen por microscopía crioelectrónica de partículas de tipo rotavirus purificadas que comprenden VP2 y VP6 (panel izquierdo) y VP2, VP4, VP6 y VP7 (panel derecho).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La siguiente descripción es de una realización preferida.

La presente invención se refiere a partículas pseudovíricas (VLP) que comprenden una o más proteínas estructurales de rotavirus (es decir, una partícula de tipo rotavirus, VLP o RLP de rotavirus) y métodos para producir partículas de tipo rotavirus (RLP) en plantas. La partícula de tipo rotavirus (RLP) puede comprender, por lo tanto, una o más proteínas estructurales de rotavirus. La RLP puede ser de doble capa o de triple capa.

La presente invención en parte proporciona un método para producir una partícula de tipo rotavirus (RLP) en una planta de acuerdo con la reivindicación 1. El método comprende introducir un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7, un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7, y un tercer ácido nucleico que comprende una tercera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7 en la planta, parte de una planta o célula vegetal, en el que la primera, segunda o tercera secuencia de nucleótidos que codifica la VP7 comprende un péptido señal nativo truncado o un péptido señal no nativo de un polipéptido vegetal, y en el que la RLP comprende VP2, VP6 y VP7; o proporcionar una planta, parte de una planta o célula vegetal que comprende un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína estructural de rotavirus, un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus y un tercer ácido nucleico que comprende una tercera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus en la planta, parte de una planta o célula vegetal; en el que la primera proteína estructural de rotavirus es VP2, la segunda proteína estructural de rotavirus es VP6 y la tercera proteína estructural de rotavirus es VP7, en la que VP7 comprende un péptido señal nativo truncado o un péptido señal no nativo de un polipéptido vegetal; incubar la planta, parte de una planta o célula vegetal en condiciones que permitan la expresión transitoria del primer, segundo y tercer ácido nucleico, produciendo de este modo la RLP, cultivar la planta, parte de la planta o célula vegetal, y extraer y purificar las RLP de la planta, parte de la planta o célula vegetal, en presencia de calcio, en las que la concentración de calcio está entre 1 mM y 1000 mM.

La "proteína estructural de rotavirus" puede referirse a la totalidad o a una parte de una secuencia de proteína estructural de rotavirus aislada de rotavirus, presente en cualquier cepa o aislado de rotavirus de origen natural o variante. Por lo tanto, la expresión proteína estructural de rotavirus, y similares, incluye variantes de secuencias de proteínas estructurales de rotavirus de origen natural producidas por mutación durante el ciclo de vida del virus o producidas en respuesta a presión selectiva (por ejemplo, terapia farmacológica, expansión del tropismo o infectividad de la célula huésped, etc.) Como apreciará un experto en la técnica, dichas secuencias de proteínas estructurales de rotavirus y variantes de las mismas, también pueden producirse usando técnicas recombinantes.

Además, las proteínas estructurales pueden incluir proteínas de cápside tales como, por ejemplo, VP2 y VP6 y/o proteínas de superficie tal como, por ejemplo, VP4. La proteína estructural puede incluir además, por ejemplo, VP7.

Los ejemplos no limitantes de proteína estructural de rotavirus son la proteína de rotavirus VP2, VP4, VP6 y VP7, y un fragmento de VP2, VP4, VP6 y VP7. Los ejemplos no limitantes de VP2, VP4, VP6 y VP7, o fragmentos de proteína VP2, VP4, VP6 y VP7 que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen las proteínas VP2, VP4, VP6 y VP7 de la cepa de rotavirus G9 P[6], cepa WA de rotavirus A, cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] para la vacuna contra rotavirus A y cepa SA11 de rotavirus.

Un ejemplo de una proteína estructural VP2, que no se considerará limitante, se expone en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:25. Además, la proteína estructural VP2 puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:25, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma. Además, una proteína estructural VP2 puede codificarse por una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO:13, 14, 25, o 45 o una secuencia que tiene al menos aproximadamente el 80-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma.

Un ejemplo de una proteína estructural VP4, que no se considerará limitante, se expone en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 36. Además, la proteína estructural VP4 puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 36 o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 5 90-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma. Además, una proteína estructural VP4 puede codificarse por una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 15, 16, 47, 50 o 51 o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 10 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma.

Un ejemplo de una proteína estructural VP6, que no se considerará limitante, se expone en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 31. Además, la proteína estructural VP6 puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 31 o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 15 90-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma. Además, una proteína estructural VP6 puede codificarse por una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO:17, 18, o 46 o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 20 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma.

Un ejemplo de una proteína estructural VP7, que no se considerará limitante, se expone en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID NO: 47. Además, la proteína estructural VP7 puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 43, o una 25 secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90-100 % de similitud con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma. Además, una proteína estructural VP7 puede codificarse por una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO:19, 20, 48, 49, 52, 53 o 54 o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos 30 intervalos, tal como un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma.

La similitud o identidad de la secuencia de aminoácidos se puede calcular utilizando los programas BLASTP y TBLASTN que emplean el algoritmo 2.0 BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básico). Las 35 técnicas para calcular la similitud o identidad de la secuencia de aminoácidos se conocen bien por los expertos en la técnica, y el uso del algoritmo BLAST se describe en ALTSCHUL et al. (1990, J Mol. Biol. 215: 403-410) y ALTSCHUL et al. (1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402).

La expresión "partícula de tipo virus" (VLP), o "partículas pseudovíricas" o "VLP" se refiere a estructuras que se 40 autoensamblan y comprenden una o más proteínas estructurales tales como, por ejemplo, una proteína estructural de rotavirus, por ejemplo, pero sin limitación, la proteína estructural VP2, VP4, VP6 y/o VP7. Las VLP que comprenden una proteína estructural de rotavirus también pueden denominarse "VLP de rotavirus", "partícula de tipo rotavirus (RVLP)", "partícula de tipo rotavirus (RLP)", "partícula de tipo rotavirus", "RVLP" o "RLP". Las VLP o RLP generalmente son morfológica y antigénicamente similares a los viriones producidos en una infección, pero carecen 45 de información genética suficiente para replicarse y, por lo tanto, no son infecciosas. Las VLP 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 se pueden purificar como estructuras intactas. La RLP puede ser una RLP de una, dos o tres capas. Las RLP de una sola capa pueden obtenerse expresando una proteína estructural de rotavirus, tal como VP2 o VP6. Las RLP de doble capa pueden 50 obtenerse expresando dos proteínas estructurales de rotavirus, tal como, por ejemplo, coexpresando tanto VP2 como VP6, con o sin VP4. Las RLP de tres capas pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de al menos tres proteínas estructurales de rotavirus, por ejemplo, la coexpresión de VP2, VP6 y VP7, con o sin VP4. La coexpresión de VP4 da como resultado una partícula con picos que se parece al rotavirus nativo. VP4 puede procesarse o escindirarse para producir VP5 y VP8. Este procesamiento puede tener lugar dentro del huésped usando 55 proteasas endógenas, o coexpresando una proteasa adecuada, por ejemplo, tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, subtilisina. Como alternativa, VP4 puede procesarse para producir VP5 y VP8 mediante la adición de una proteasa adecuada, por ejemplo, tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, subtilisina durante cualquier etapa del procedimiento de extracción de RLP, o después de la purificación de RLP.

Cada una de las proteínas estructurales de rotavirus tiene diferentes características y tamaño, y se requiere en diferentes cantidades para ensamblarse en RLP. La expresión "VLP de rotavirus", "partícula pseudovírica de rotavirus (RVLP)", "partícula pseudovírica de rotavirus (RLP)", "partícula pseudovírica de rotavirus", "RVLP" o "RLP" se refiere a una partícula pseudovírica (VLP) que comprende una o más proteínas estructurales de rotavirus. Un ejemplo de proteínas estructurales de rotavirus puede incluir, pero sin limitación, una proteína estructural VP2, VP4 (o VP5 y VP8), VP6 y VP7.

En el método para producir las RLP en una planta de acuerdo con la invención, un primer ácido nucleico (un primer ácido nucleico) que codifica una primera proteína estructural de rotavirus, por ejemplo, una proteína VP2 o VP6, se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus, por ejemplo, una proteína VP6 o VP2. Además, un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus, por ejemplo VP7, se coexpresa con el primer y segundo ácido nucleico de manera que el primero, el segundo y el tercer ácidos nucleicos se coexpresan en la planta. El primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y el tercer ácido nucleico pueden introducirse en la planta en la misma etapa o pueden introducirse secuencialmente en la planta.

Además, una planta que expresa un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína estructural de rotavirus, un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus y un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus puede transformarse adicionalmente con un cuarto ácido nucleico que codifica una cuarta proteína estructural de rotavirus, por ejemplo una proteína VP7 o VP4, de manera que el primero, el segundo, el tercero y el cuarto ácido nucleico se coexpresan en la planta. La VP4 puede procesarse o escindir-se para producir VP5 y VP8 dentro del huésped mediante la coexpresión de un ácido nucleico que codifica una proteasa adecuada, por ejemplo, tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, subtilisina. Como alternativa, la VP4 puede procesarse durante cualquier etapa de la extracción de RLP, o después de la purificación de RLP mediante la adición de una proteasa adecuada, por ejemplo, tripsina, una proteasa de tipo tripsina, una serina proteasa, una proteasa de tipo quimotripsina, subtilisina.

Como se describe con más detalle a continuación, las RLP pueden producirse en una planta expresando un ácido nucleico (un primer ácido nucleico) que codifica una o más proteínas estructurales de rotavirus seleccionadas de VP2, VP6 o VP7. Un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP7, VP6 o VP2 se coexpresa en la planta. Además, un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP6, VP7 o VP2 se coexpresa en la planta. El primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y el tercer ácido nucleico pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse en la planta secuencialmente. El ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y el tercer ácido nucleico se pueden introducir en la planta de manera transitoria, o de una manera estable.

Además, una planta que expresa un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína estructural de rotavirus, por ejemplo una proteína VP2, se transforma con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus, por ejemplo, pero sin limitación, en VP6 o VP7, de manera que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresan en la planta. La planta se transforma adicionalmente con un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus, por ejemplo, pero sin limitación, VP7 o VP6.

Como alternativa, una planta que expresa una proteína VP6 o VP7, (segundo ácido nucleico) se transforma con el primer ácido nucleico que codifica la proteína VP2, de manera que tanto el primero como el segundo ácidos nucleicos se coexpresan en la planta. La planta se transforma adicionalmente con un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus, por ejemplo, pero sin limitación, VP7 o VP6.

Además, una planta que expresa un primer y un segundo ácido nucleico que codifica una primera y una segunda proteína estructural de rotavirus, por ejemplo una proteína VP2 y VP6, se transforma con un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus, por ejemplo VP7.

El método para producir RLP en una planta implica introducir tres o más ácidos nucleicos que codifican dichas tres o más proteínas estructurales de rotavirus unidas operativamente a una región reguladora activa en la planta, y una o más de una secuencia de direccionamiento de compartimento y/o un elemento de amplificación, en la planta, parte de la planta o célula vegetal. La planta, parte de la planta o célula vegetal se incuba a continuación en condiciones que permiten la expresión del uno o más ácidos nucleicos, produciendo de ese modo las RLP. La una o más proteínas estructurales de rotavirus pueden ser VP2, VP4 (o VP5 y VP8), VP6, VP7, un fragmento de VP2, VP4 (o VP5 y VP8), VP6, VP7 o una combinación de las mismas.

La presente descripción proporciona además una RLP que comprende tres o más proteínas estructurales de rotavirus, por ejemplo, pero sin limitación, VP2, VP4 (o VP5 y VP8), VP6, VP7 o una combinación de las mismas. La RLP puede producirse mediante uno o más de los métodos proporcionados por la presente invención.

5

La aparición de las RLP puede detectarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad o cromatografía de exclusión por tamaño. Las RLP pueden evaluarse para determinar la estructura y el tamaño mediante, por ejemplo, microscopía electrónica o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

10

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.

15

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, nanotubos, nanoesferas o partículas de mayor orden, de peso molecular más alto, tales como RLP monocapa (sl), bicapa (dl) o tricapa (tl).

20

La fracción separada puede procesarse adicionalmente para aislar, purificar, concentrar, o una combinación de los mismos, las proteínas, proteínas supraestructurales o partículas de mayor orden mediante, por ejemplo, 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, proteínas de supraestructurales o partículas de mayor orden, tales como RLP, 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.

25

30

Las RLP producidas de acuerdo con la presente invención se purifican, se purifican parcialmente a partir de una planta, parte de una planta o materia vegetal, o se pueden administrar como una vacuna oral, usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

35

La purificación de RLP puede implicar centrifugación en gradiente, por ejemplo, pueden usarse gradientes de densidad de sacarosa, iodixanol, OptiPrep™ o cloruro de cesio (CsCl) para purificar o purificar parcialmente las RLP de la biomasa vegetal transformada. Como se muestra, por ejemplo, en la Figura 45, se puede usar un gradiente gradual de iodixanol o un gradiente continuo de iodixanol para purificar la RLP y/o las proteínas estructurales de rotavirus expresadas.

40

Se ha demostrado que la concentración de calcio (Ca^{2+}) es importante para la transformación de partículas de triple capa (TLP) en partículas de doble capa (DLP) y depende de la cepa (véase, por ejemplo, Martin et al. Journal of Virology, Jan 2002). La pérdida completa de las proteínas de la cápside externa de las TLP (descapsidación de TLP) tiene lugar en el rango nanomolar de $[\text{Ca}^{2+}]$. Por lo tanto, la purificación y/o extracción de RLP se realiza en presencia de calcio, y la etapa de centrifugación en gradiente se realiza en presencia de calcio, por ejemplo en presencia de CaCl_2 . La concentración de CaCl_2 se encuentra entre 1 mM y 1000 mM, o cualquier cantidad entre las mismas, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 50, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 mM o cualquier cantidad entre las mismas.

50

Las plantas, o fragmentos de plantas pueden procesarse mínimamente. Con el término "procesamiento mínimo" se refiere a materia vegetal, por ejemplo, una planta o porción de la misma que comprende una proteína de interés y/o la RLP que se purifica parcialmente para producir un extracto vegetal, homogeneizado, fracción de homogeneizado vegetal, o similares (es decir, mínimamente procesado). La purificación parcial puede comprender, pero sin limitación, alterar estructuras celulares vegetales creando así una composición que comprende componentes vegetales solubles, y componentes vegetales insolubles que pueden separarse por ejemplo, pero sin limitación, por centrifugación, filtración o una combinación de los mismos. A este respecto, las proteínas secretadas dentro del espacio extracelular de la hoja u otros tejidos podrían obtenerse fácilmente mediante extracción al vacío o

55

- centrífuga, o los tejidos podrían extraerse a presión mediante el paso a través de rodillos o por trituración o similar para exprimir o liberar la proteína libre del interior del espacio extracelular. El procesamiento mínimo también podría implicar la preparación de extractos en bruto de proteínas solubles, ya que estas preparaciones tendrían una contaminación insignificante de los productos vegetales secundarios. Además, el procesamiento mínimo puede implicar la extracción acuosa de proteína soluble de las hojas, seguido de la precipitación con cualquier sal adecuada. Otros métodos pueden incluir maceración a gran escala y extracción de zumo para permitir el uso directo del extracto. Las RLP pueden purificarse o extraerse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, extracción mecánica o bioquímica.
- 10 La una o más proteínas estructurales de rotavirus se pueden sintetizar en una cantidad de hasta 2 g por kilogramo de peso en fresco de planta. Por ejemplo, la cantidad de proteína estructural sintetizada puede variar entre 1 y 2 g por kilogramos de peso en fresco, u cualquier cantidad entre las mismas, tales como 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 g por kilogramos de peso en fresco o cualquier cantidad entre las mismas. Por ejemplo, la proteína estructural se puede sintetizar en una cantidad de hasta 1,5 g por kilogramo de peso en fresco de planta.
- 15 Además, la RLP se puede sintetizar en una cantidad de hasta 1,5 g por kilogramo de peso en fresco de planta. Por ejemplo, la cantidad de RLP sintetizada puede variar entre 0,5 y 1,5 g por kilogramos de peso en fresco, u cualquier cantidad entre las mismas, tales como 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 g por kilogramos de peso en fresco. Por ejemplo, la RLP se puede sintetizar en una cantidad de hasta 1,1 g por kilogramo de peso en fresco de planta.
- 20 El tamaño (es decir, el diámetro) de las RLP definidas anteriormente, que puede medirse, por ejemplo, mediante técnicas de dispersión dinámica de la luz (DLS) o de microscopía electrónica (EM), está habitualmente entre 50 a 110 nm, o cualquier tamaño los mismos. Por ejemplo, el tamaño de la estructura de RLP intacta puede variar de
- 25 aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o cualquier tamaño entre los mismos, tal como 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm o cualquier tamaño entre los mismos.
- La presente invención proporciona además un método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal, que comprende introducir un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de
- 30 nucleótidos que codifica una o más proteínas estructurales de rotavirus operativamente unidas a una región reguladora activa en una planta. La secuencia de nucleótidos puede optimizarse, por ejemplo, para el uso de codones humanos o el uso de codones de plantas. Además, una o más proteínas estructurales de rotavirus pueden estar operativamente unidas a uno o más de un elemento de amplificación. Además, una o más proteínas estructurales de rotavirus pueden estar unidas operativamente a una o más secuencias de direccionamiento de un compartimento. La una o más proteínas estructurales de rotavirus codificadas por la secuencia de nucleótidos
- 35 pueden ser, por ejemplo, VP2, VP4, VP6 o VP7. Además, la una o más proteínas estructurales de rotavirus codificadas por la secuencia de nucleótidos pueden ser, por ejemplo, de cualquier grupo de rotavirus A a G, pero más preferiblemente, del grupo de rotavirus A. Además, la una o más proteínas estructurales de rotavirus codificadas por la secuencia de nucleótidos puede ser de cualquier cepa de rotavirus que tenga un genotipo de
- 40 cualquier combinación de los tipos G y P de G1 a G27 y de P1 a P34, y más preferiblemente, de G1 a G19 y de P1 a P27, incluyendo, pero sin limitación, G1P[8], G2P[4], G2P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[6], G9P[8], cepa WA de rotavirus A, cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] para vacuna contra rotavirus A o cepa SA11 de rotavirus.
- Una secuencia de ácido nucleico a la que se hace referencia en la presente invención, puede ser "sustancialmente
- 45 homóloga", "sustancialmente similar" o "sustancialmente idéntica" a una secuencia, o un complemento de la secuencia si la secuencia de ácido nucleico se hibrida con una o más de una secuencia de nucleótidos o un complemento de la secuencia de ácidos nucleicos como se define en el presente documento bajo condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias son "sustancialmente homólogas", "sustancialmente similares" o "sustancialmente idénticas" cuando al menos aproximadamente el 70 %, o entre el 70 al 100 %, o cualquier cantidad
- 50 entre las mismas, por ejemplo el 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100 %, o cualquier cantidad entre las mismas, de los nucleótidos coinciden en una longitud definida de la secuencia de nucleótidos, siempre que tales secuencias homólogas presenten una o más de las propiedades de la secuencia, o el producto codificado como se describe en el presente documento.
- 55 Por ejemplo, la presente invención proporciona un método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal, que comprende introducir un polinucleótido aislado, en el que el polinucleótido aislado comprende un ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales de rotavirus que es al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 100 % o cualquier cantidad entre las mismas idéntico a secuencias como se define, por ejemplo, en SEQ ID NO: 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54. El polinucleótido puede ser un codón humano optimizado por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Además, la presente invención proporciona un método para producir una RLP en una planta, porción de una planta o célula vegetal, que comprende introducir ácidos nucleicos, en el que los ácidos nucleicos son al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 100 % o cualquier cantidad entre las mismas, idénticos a las secuencias que se definen, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54.

- 10 Tal similitud o identidad 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 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 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).
- 15
- 20 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 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 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.

25

30

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido estructural de rotavirus se puede describir como un "ácido nucleico de rotavirus", una "secuencia de nucleótidos de rotavirus", un "ácido nucleico de rotavirus" o una "secuencia de nucleótidos de rotavirus". Por ejemplo, que no se debe considerar limitante, una partícula pseudovírica que comprende una o más proteínas estructurales de rotavirus o polipéptido estructural de rotavirus, se puede describir como una "VLP de rotavirus", "RVLP" o "RLP".

35

Muchos organismos muestran un sesgo para el uso de codones particulares para codificar la inserción de un aminoácido particular en una cadena peptídica en crecimiento. La preferencia de codones o el sesgo de codones, las diferencias en el uso de codones entre organismos, se proporcionan por la degeneración del código genético, y está bien documentada entre muchos organismos. El sesgo de codones a menudo se correlaciona con la eficacia de la traducción del ARN mensajero (ARNm), que a su vez se cree que depende de, entre otros, las propiedades de los codones que se traducen y la disponibilidad de las moléculas de ARN de transferencia particular (ARNt). El predominio de ARNt seleccionados en una célula generalmente es un reflejo de los codones utilizados con mayor frecuencia en la síntesis de péptidos. Por consiguiente, los genes se pueden adaptar para la expresión génica óptima en un organismo dado basándose en la optimización de codones. El proceso de optimización de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína expresada de forma heteróloga puede ser un paso importante para mejorar los rendimientos de expresión. Los requisitos de optimización pueden incluir etapas para mejorar la capacidad del huésped para producir la proteína extraña.

40

45

50

La "optimización de codones" se define como la modificación de una secuencia de ácido nucleico para una expresión potenciada en células de interés reemplazando al menos uno, más de uno, o un número significativo, de codones de la secuencia nativa con codones que pueden usarse más frecuentemente o mucho más en los genes de otro organismo o especie. Varias especies presentan un sesgo particular para ciertos codones de un aminoácido particular.

55

La presente invención incluye un método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal, que comprende introducir secuencias de polinucleótidos sintéticos, en el que las secuencias de polinucleótidos

5 sintéticas que se han optimizado en codones, por ejemplo, las secuencias se han optimizado para el uso de codones humanos o uso de codones de plantas. Las secuencias de polinucleótidos optimizadas en codones pueden expresarse entonces en plantas. Más específicamente, las secuencias optimizadas para el uso de codones humanos o el uso de codones vegetales pueden expresarse en plantas. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que las secuencias optimizadas para el codón humano aumentan el contenido de guanina-citosina (contenido de GC) de la secuencia y mejoran los rendimientos de expresión en las plantas.

10 Existen diferentes técnicas de optimización de codones conocidas en la técnica para mejorar la cinética de traducción de las regiones de codificación de proteínas ineficientes en la traducción. Estas técnicas se basan principalmente en la identificación del uso de codones para un determinado organismo huésped. Si un cierto gen o secuencia se debe expresar en este organismo, la secuencia codificante de dichos genes y secuencias se modificará entonces de modo que se reemplacen los codones de la secuencia de interés por los codones más frecuentemente utilizados del organismo huésped.

15 La proteína estructural de rotavirus o polipéptido 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.

20 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, Cheravirus 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 (n.º de acceso al GenBank 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).

35 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.

40 "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.

45 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.

50 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 o de repetición intergénica larga (LIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en el presente documento, "región intergénica larga" o "repetición 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 o región intergénica pequeña (SIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en el presente documento, la "región intergénica corta" o "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). Si se usa más de una LIR en la construcción, por ejemplo dos LIR, entonces el promotor, las regiones CMPV-HT y la secuencia de ácido nucleico de interés y el terminador están delimitadas por cada una de las dos LIR. Además, el elemento de amplificación podría, por ejemplo, originarse a partir de la secuencia como se describe en Halley-Stott et al. (2007) Archives of Virology 152: 1237-1240, depositado bajo el número de acceso de GenBank DQ458791. El segmento de ácido nucleico que comprende las LIR se une a los nucleótidos 2401 a 2566 y 1 a 128. El segmento de ácido nucleico que comprende las SIR son los nucleótidos 1154 a 1212.

Como se describe en el presente documento, la administración conjunta del vector derivado del virus del enanismo amarillo del frijol (BeYDV) y un vector que suministra Rep/RepA, por agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* da como resultado una amplificación de replicón eficaz y una producción de proteína robusta.

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

También se puede incluir una replicasa viral en el sistema de expresión como se describe en el presente documento para aumentar la expresión del ácido nucleico de interés. Un ejemplo no limitante de una replicasa es una replicasa BeYDV (pREP110) que codifica BeYDV Rep y RepA (C2/C1; Huang et al., 2009, *Biotechnol. Bioeng.* 103, 706-714). Otro ejemplo no limitante de una replicasa se describe en Halley-Stott et al. (2007) Archives of Virology 152: 1237-1240, depositado bajo el número de acceso de GenBank DQ458791. El segmento de ácido nucleico que comprende el gen C1:C2 son los nucleótidos 1310 a 2400.

Por "coexpresado" se entiende que dos o más de dos secuencias de nucleótidos se expresan aproximadamente al mismo tiempo dentro de la planta, y dentro del mismo tejido de la planta. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos no necesitan expresarse exactamente al mismo tiempo. Más bien, las dos o más secuencias de nucleótidos se expresan de una manera tal que los productos codificados tienen una oportunidad de interactuar. Las dos o más de dos secuencias de nucleótidos pueden coexpresarse usando un sistema de expresión transitoria, donde las dos o más secuencias se introducen dentro de la planta aproximadamente al mismo tiempo en condiciones en las que se expresan ambas secuencias. Como alternativa, una planta de plataforma que comprende una de las secuencias de nucleótidos puede transformarse de una manera estable, con una secuencia adicional que codifica la proteína de interés, por ejemplo, una o más proteínas estructurales de rotavirus, introducidas en la planta de plataforma de forma transitoria.

El plegamiento correcto de la proteína puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación de RLP 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 grado de aglomeración intracelular, la disponibilidad de cofactores que pueden unirse o estar asociados transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada. Además, el compartimento o subcompartimento dentro de la planta donde se expresa la proteína puede influir en los niveles de expresión y plegamiento de la proteína.

La expresión de una o más proteínas estructurales de rotavirus puede dirigirse a compartimentos y/o subcompartimentos de células vegetales específicas mediante agroinfiltración en plantas transgénicas. El compartimento o subcompartimentos pueden ser, por ejemplo, plástidos, retículo endoplasmático (RE), cloroplasto o apoplasto. Sin desear quedar ligado a la teoría, la selección de compartimentos o subcompartimentos puede aumentar la acumulación de proteínas en el compartimento o subcompartimentos seleccionados sobre la acumulación citoplásmica. La acumulación de compartimentos o subcompartimentos puede proteger a las proteínas de la degradación por proteasas presentes en el citoplasma y/o permitir que se acumule a una mayor concentración sin afectar a la función de la célula de la planta.

Por lo tanto, el casete o vector de expresión se puede adaptar para dirigir el vector o la proteína estructural de rotavirus o polipéptido expresados desde el vector al compartimento o subcompartimento deseado en la planta.

Por ejemplo, el casete o vector de expresión se puede adaptar a plástidos diana haciendo que una proteína estructural de rotavirus o polipéptido que se expresa incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoides de los plástidos, en particular, el mecanismo de transferencia de las membranas tilacoides. Esta interacción puede causar que la proteína estructural de rotavirus o polipéptido se importe al plástido del citoplasma donde se expresa. Sin desear quedar ligado a la teoría, el mecanismo de importación desde el citoplasma puede

ser importante para el correcto plegamiento de las proteínas. Se apreciará que el casete o vector de expresión puede estar adaptado para dirigir los propios plástidos a transformarse y la expresión de la proteína estructural de rotavirus o polipéptido puede ocurrir completamente dentro del plástido.

- 5 Por la expresión "secuencia de direccionamiento" se entiende que las secuencias de direccionamiento se pueden incluir en el vector o casete de expresión. Dichas secuencias de direccionamiento pueden traducirse en un péptido que dirige el vector o producto del mismo al compartimento o subcompartimento deseado en la planta, tal como un plástido. Por ejemplo, los péptidos señal de plástido (también denominados "péptidos de tránsito de plástido" en la técnica) para dirigir proteínas a plástidos son conocidos en la técnica. Un ejemplo no limitante de un péptido de tránsito de plástidos que puede usarse es el de *rbcS1-cTP*. Como ejemplo adecuado de una secuencia de péptido de tránsito de cloroplastos es el gen de la subunidad pequeña de Rubisco (*rbcS1*), por ejemplo, de *Solanum tuberosum*.

- 15 Por lo tanto, la proteína estructural de rotavirus o polipéptido incluye 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 endoplasmático 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 estructural de rotavirus.

- 25 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. Por ejemplo, el péptido señal nativo de la proteína estructural de rotavirus puede usarse para expresar la proteína estructural de rotavirus en un sistema vegetal.

- 30 Un péptido señal también puede ser no nativo, por ejemplo, de una proteína, proteína viral o proteína estructural nativa de un virus distinto de la proteína de rotavirus, 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 (PDISP) (nucleótidos 32-103 con n.º de Acceso Z11499). Además, el péptido señal puede ser completamente eliminado o estar truncado. Por truncamiento o truncado se entiende que el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o cualquier cantidad entre las mismas de los residuos de aminoácidos se eliminan del péptido señal. Preferiblemente, los residuos de aminoácidos truncados son continuos, y el truncamiento se produce desde la segunda metionina en adelante.

- 40 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal, que comprende introducir un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico codifica la proteína estructural de rotavirus VP7 y un péptido señal no nativo o péptido señal nativo truncado.

- 45 El método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula de planta puede comprender la expresión de construcciones genéticas en cualquier huésped de planta adecuado. Los ejemplos de huéspedes apropiados incluyen, pero sin limitación, cultivos agrícolas, incluyendo alfalfa, canola, *Brassica spp.*, maíz, *Nicotiana spp.*, patata, ginseng, guisante, avena, arroz, semilla de soja, trigo, cebada, girasol, algodón, y similares.

- 50 Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas estructurales de rotavirus pueden transferirse al huésped de la planta usando 1, 2, 3, 4 o 5 vectores plasmídicos binarios. Cada vector plasmídico binario puede, por lo tanto, contener 1, 2, 3, 4 o 5 secuencias de nucleótidos que codifican una proteína estructural de rotavirus.

- 55 El método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal puede comprender una o más construcciones genéticas que pueden comprender además una región 3' no traducida. Una región 3' no traducida 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; que se incorpora en el presente documento por referencia), el promotor usado en la expresión de plastocianina, descrito en el documento US 7.125.978.

- 5 El método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal puede comprender una o más construcciones genéticas que también pueden incluir potenciadores adicionales, potenciadores de la traducción o de la 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
10 lectura ("dentro del marco") de la secuencia codificante para proporcionar una traducción correcta de la secuencia transcrita.

El método para producir RLP en una planta, porción de una planta o célula vegetal puede comprender el uso de plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales, transformación de ADN directa, microinyección,
15 electroporación, etc. Para revisiones de dichas técnicas véanse, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, Nueva York VIII, págs. 421-463 (1988); Geierman y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed. (1988); y Miki e Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. Londres, págs. 561-579 (1997). Otros métodos incluyen la captación de ADN directa, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo, usando
20 protoplastos, microinyección, microproyectiles o triquitas, e infiltración al vacío. Véanse, por ejemplo, Bilang, et al. (*Gene* 100: 247-250 (1991), Scheid et al. (*Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (*Plant Science* 52: 111-116, 1987), Neuhauser et al. (*Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36, 1987), Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987); Howell et al. (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch et al. (*Science* 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., *Plant Physiology* 91: 694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach y Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988),
25 *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu y Lomonosoff (*J Virol Meth.* 105:343-348, 2002.), Pat. de Estados Unidos N.º 4.945.050; 5.036.006; y 5.100.792, patentes de Estados Unidos N.º 6.403.865 presentada el 10 de mayo de 1995, y 5.625.136, presentada el 25 de septiembre de 1992.

Expresión transitoria

30 Sin desear quedar ligado a la teoría, la concentración de proteína y la relación de las diferentes proteínas estructurales de rotavirus pueden ser importantes para la eficacia de ensamblaje de las RLP. Por lo tanto, la multiplicidad y el tiempo de infección pueden ser importantes para manipular la concentración de proteínas y la eficiencia general de ensamblaje de las RLP en las plantas.

35 El método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal puede comprender la expresión transitoria de una o más construcciones que codifican una proteína estructural de rotavirus. Puede usarse un sistema de expresión transitoria que se base en la expresión epicromosómica de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante en una planta, parte de una planta o célula vegetal para expresar la proteína estructural de rotavirus,
40 dirigida a diversos compartimentos o subcompartimentos celulares. Un sistema de expresión transitoria permite una alta velocidad de producción. Además, se pueden obtener grandes cantidades de proteína unos pocos días después de la infiltración de *Agrobacterium* recombinante en las plantas (Rybicki, 2010; Fischer et al., 1999). También es posible expresar largas secuencias de genes y tener más de un gen expresado simultáneamente en la misma célula, lo que permite un ensamblaje eficiente de proteínas multiméricas (Lombardi et al., 2009).

45 Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas estructurales de rotavirus pueden transferirse al huésped de planta en 1, 2, 3, 4 o 5 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas.

50 Sin embargo, durante la expresión transitoria, el silenciamiento génico postranscripcional puede limitar la expresión de las proteínas heterólogas en las plantas. La coexpresión de un supresor de silenciamiento, por ejemplo, pero sin limitación, Nss del virus de la marchitez manchada del tomate puede usarse para contrarrestar la degradación específica de ARNm de transgén (Brigneti et al., 1998). Los supresores alternos de silenciamiento se conocen bien en la técnica y se pueden usar como se describe en el presente documento (Chiba et al., 2006, *Virology* 346:7-14), por ejemplo, pero sin limitación, HcPro, TEV-p1/HC-Pro (Virus de grabado del Tabaco-p1/HC-Pro), BYV-p21, p19 de
55 virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV p19), proteína de cápside del virus de oruga de tomate (TCV-CP), 2b de virus de mosaico de pepino; CMV-2b), p25 del Virus de patata X (PVX-p25), p11 del virus de patata M (PVM-p11), p11 del virus de patata S (PVS-p11), p16 del virus de quemadura de arándano, (BScV-p16), p23 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV-p23), p24 del virus-2 asociado con el enrollamiento de parra, (GLRaV-2 p24), p10 del virus A de parra, (GVA-p10), p14 del virus B de parra (GVB-p14), p10 del virus latente de *Heracleum* (HLV-p10), o

p16 del virus latente común del ajo (GCLV-p16). Por lo tanto, un supresor de silenciamiento, por ejemplo HcPro, TEV -p1/HcPro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 o GVA-p10, puede coexpresarse junto con una o más proteínas estructurales de rotavirus, por ejemplo VP2, VP4, VP6, o una combinación de las mismas, para asegurar adicionalmente altos niveles de producción de proteínas dentro de una planta o parte de una planta.

La presente invención también proporciona un método como se ha descrito anteriormente, en el que una secuencia de nucleótidos adicional (cuarta, o quinta) se expresa dentro de la planta, la secuencia de nucleótidos adicional (cuarta o quinta) que codifica un supresor de silenciamiento se une operativamente con una región reguladora adicional (cuarta, o quinta) que está activa en la planta. La secuencia de nucleótidos que codifica un supresor de silenciamiento puede ser, por ejemplo, Nss, HcPro, TEV -p1/Hc-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 o GVA-p10.

Como se describe a continuación, los métodos de expresión transitoria pueden usarse para expresar una o más construcciones que codifican una proteína estructural de rotavirus (véase Liu y Lomonosoff, 2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348). Como 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 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 ADN-t se transfieren e infectan de Agrobacteria a las células. El ADN-t se transcribe de manera episomal y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en células infectadas, sin embargo, el pase de ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

Para ayudar en la identificación de células vegetales transformadas, el método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal puede comprender construcciones que incluyen marcadores seleccionables vegetales. 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 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.

El método para producir una RLP en una planta, parte de una planta o célula vegetal también puede comprender métodos para producir plantas transgénicas, células vegetales o semillas que expresan RLP. Los métodos para regenerar las plantas completas a 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 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.

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 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.

- 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 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 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.
- 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 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).
- 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 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 célula o la 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 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 citocina (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).
- 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), 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 una amplia gama de tipos de células 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, mediarse por proteínas que interactúan con las secuencias ligadas operativamente.

La RLP producida en una planta puede inducir una proteína estructural VP7 de rotavirus que comprende N-glicanos específicos de plantas. Por lo tanto, esta invención también proporciona una RLP que comprende VP7 que tienen N-glicanos específicos de plantas.

Además, se conoce la modificación de N-glicano en las plantas (véase, por ejemplo, el documento U.S. 2011/0008837; y puede producirse VP7 que con N-glicanos modificados. Puede obtenerse VP7 que comprende un patrón de glicosilación modificado, por ejemplo, N-glicanos fucosilados, xilosilados, o ambos, fucosilados y xilosilados reducidos, o puede obtenerse VP7 con un patrón de glicosilación modificado, en el que la proteína carece de fucosilación, xilosilación, o ambas, y comprende un aumento de la 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 la VP7 expresada en comparación con una planta de tipo silvestre que expresa VP7.

Por ejemplo, la síntesis de VP7 que tiene un patrón de glucosilación modificado se puede conseguir coexpresando VP7 junto con una secuencia de nucleótidos que codifica beta-1,4-galactosiltransferasa (GalT), por ejemplo, pero sin limitación, GalT de mamífero, 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 VP7. La VP7 también puede co-expresarse junto con una secuencia de nucleótidos que codifica N-acetilglucosaminil transferasa III (GnT-III), por ejemplo, pero sin 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.

Por lo tanto, la presente descripción también proporciona RLP que comprenden VP7 que tiene N-glicanos modificados.

Sin desear quedar ligado a la teoría, la presencia de N-glicanos vegetales en VP7 puede estimular la respuesta inmune promoviendo la unión de VP7 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).

La presente invención se ilustrará en los siguientes ejemplos.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión de proteínas de rotavirus y producción de VLP en hojas de la planta *N. benthamiana*

El siguiente análisis utilizó proteínas de la cápside de rotavirus de la cepa de rotavirus G9P[6], y evaluó si se formaron partículas de tipo rotavirus en los diversos compartimentos de las células de la hoja de *N. benthamiana* del tabaco. Se investigó la coexpresión de VP2 y VP6, así como varias combinaciones de VP2, VP6, VP7 y VP4 en hojas de plantas de tabaco.

50 Materiales y métodos

Construcción de plásmidos

Los ADNc de rotavirus optimizados para codones de plantas para VP2, VP4, VP6 y VP7 se suministraron por Geneart, Alemania. El ADN plasmídico se transformó en células de *E. coli* químicamente competentes DH5- α (*E. coli* cloni™, Lucigen) según las instrucciones del fabricante. Se usaron en este estudio nuevos vectores binarios de *Agrobacterium* pTRAc (citoplasma), pTRAc-rcs1-cTP (direccionamiento de cloroplastos) y pTRAc-ERH (direccionamiento del retículo endoplasmático) suministrados por Rainer Fischer (Fraunhofer Institute for Molecular

Biology and Applied Ecology, IME, Alemania). Un vector adicional, pTRAc-A (apoplasto), se derivó de la modificación de pTRAc-ERH por la digestión con enzimas de restricción (ER) en los sitios NcoI y XhoI en el sitio de clonación múltiple (Figura 3). Esto elimina la etiqueta de histidina y la secuencia KDEL que retienen proteínas en el RE. En su lugar, las proteínas están dirigidas al apoplasto.

- 5 El ADNc de VP2, VP4 y VP6 se digirió con enzimas de restricción (ER) con NcoI/XhoI mientras que VP7 se cortó con AfIII/XhoI. Las enzimas de restricción AfIII, NcoI y MluI tienen extremos adhesivos compatibles Para la clonación directa del ADN en pTRAc, pTRAc-rbcs-cTP y pTRAc-A, los vectores se digirieron con ER en los sitios AfIII/XhoI, MluI/XhoI y NcoI/XhoI, respectivamente. La clonación de ADN en los vectores se llevó a cabo según el protocolo estándar seguido de la transformación en células DH5- α de E. coli químicamente competentes (E. cloni™, Lucigen).
- 10 Las colonias recombinantes seleccionadas se verificaron mediante PCR de colonias. Para la clonación en pTRAc-ERH, se añadió un sitio de enzima de restricción NotI para reemplazar el codón de parada de cada uno de los cuatro ADNc de rotavirus por amplificación por PCR. El ADNc se amplificó con cebadores como se detalla en la Tabla 1. Las condiciones de la reacción de PCR incluyeron desnaturalización a 95 ° C durante 5 min, seguido de cinco ciclos
- 15 de desnaturalización a 95 ° C durante 30 segundos, hibridación a 52 ° C durante 1 min, y elongación a 72 ° C durante 1,5 min. Se realizaron 20 ciclos adicionales de la siguiente manera; 95 ° C durante 30 s, 57 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 1,5 min y 72 ° C durante 5 min. Los fragmentos amplificados se clonaron en pGEM-T-Easy (Promega) según las instrucciones del fabricante. La transformación se llevó a cabo en E. coli DH5- α químicamente competente (E. cloni™, Lucigen). La PCR de colonias se llevó a cabo en colonias seleccionadas como se hizo para las otras tres
- 20 construcciones.

Tabla 1: Cebadores de ADNc de rotavirus para clonación de vectores de RE

Cebador	Secuencia	Sitio del RE añadido	Orientación
VP2F	5'-TTCCATGGCTTACCGTAAAAGG-3'	-	SEQ ID NO: 5 Directo
VP2R	5'-ATGCGGCCGCAAGCTCGTTTCATAATCCTCATG-3'	NotI	SEQ ID NO: 6 Inverso
VP4F	5'-TTCCATGGCTTCCCTCATCTAC-3'	-	SEQ ID NO: 7 Directo
VP4R	5'-ATGCGGCCGCAAGACGGCACTGGAGAATGAG-3'	NotI	SEQ ID NO: 8 Inverso
VP6F	5'-TTCCATGGATGTGCTCTACTC-3'	-	SEQ ID NO: 9 Directo
VP6R	5'-ATGCGGCCGCTTACGAGCATGGAACG-3'	NotI	SEQ ID NO: 10 Inverso
VP7F	5'-GTACATGTACGGAATCGAGTAC-3'	-	SEQ ID NO: 11 Directo
VP7R	5'-ATGCGGCCGCCACACGGTAGTAAAGCAGC-3'	NotI	SEQ ID NO: 12 Inverso

- Los ADN de pGEM-VP de colonias positivas se secuenciaron para verificar la fidelidad de la PCR. El ADN se digirió
- 25 con NcoI/NotI y el fragmento de ADN apropiado se clonó en pTRAc-ERH en los sitios NcoI y NotI para formar pTRAc-ERH-VP. La transformación se llevó a cabo en células E. coli DH5- α como se hizo previamente. La PCR de colonias también se realizó para verificar el ADN de rotavirus en las colonias seleccionadas.

Transformación de Agrobacterium

- 30 La cepa GV3101 de Agrobacterium tumefaciens se proporcionó por el Profesor Rainer Fischer (Instituto Fraunhofer para Biología Molecular y Ecología Aplicada IME, Aachen, Alemania) y se hizo electrocompetente como se ha descrito previamente (Shen y Forde, 1989). Se mezclaron trescientos nanogramos de construcciones de pTRA-VP de rotavirus aisladas con 100 μ l de células GV3101 electrocompetentes en una cubeta de electrogap de 0,1 cm
- 35 (BioRad™) y luego se electroporaron en un GenePulser (BioRad) con los siguientes ajustes: 1,8 kV, 25 μ F y 200 Ω . La incubación se permitió durante 1 hora a 27 ° C en 900 μ l de LB antes de colocarlo en placas LA que contenían 50 μ g/ml de carbenicilina (carb), 30 μ g/ml de kanamicina (kan) y 50 μ g/ml de rifampicina (rif). Las placas se incubaron a 27 ° C durante 3 días. Para comprobar los transformantes positivos, se aisló ADN plasmídico de las colonias de Agrobacterium recombinante y se volvió a transformar en células DH5- α competentes de E. coli. Éstas se
- 40 seleccionaron luego en 100 μ g/ml de ampicilina (amp) LA. Se realizaron la PCR de colonias y digestiones de enzimas de restricción en ADNc para verificar los transformantes exitosos. Se prepararon reservas de glicerol de Agrobacterium recombinante relevante y se almacenaron a -70 ° C.

Infiltración de Agrobacterium recombinante

- 45 A. tumefaciens LBA 4404 (pBIN-NS) utilizado en este estudio se obtuvo por parte de Marcel Prins (Laboratory of Virology, Wageningen University, Binnenhaven, Países Bajos). Contiene el supresor de silenciamiento NSs encontrado en el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV). Se cultivaron Agrobacterium recombinante (pTRA-VP) de reservas de glicerol a 27 ° C durante la noche en LB con 50 μ g/ml de carb, 30 μ g/ml de kan y 50 μ g/ml
- 50 de rif. El Agrobacterium recombinante y LBA4404 (pBIN-NS) se inocularon cada uno en medio de inducción (LB,

ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico MES 10 mM, MgSO₄ 2 mM, acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de carb, 30 µg/ml de kan y 50 µg/ml de rif, y a pH 5,6).

Los cultivos se incubaron a 27 °C durante una noche. Las células de *Agrobacterium* se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C y luego se resuspendieron en 2 ml de medio de infiltración (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, sacarosa al 3 %, pH 5,6, acetosiringona 200 µM y agua estéril). La densidad óptica (DO₆₀₀) de las células se verificó y se diluyó con medio de infiltración para obtener una DO₆₀₀ de 0,25. Para cada construcción de pTRA-VP, se mezcló LBA4404 con *Agrobacterium* recombinante hasta una DO₆₀₀ final de 0,5. Para los estudios de coexpresión, cada construcción se añadió hasta un total de una DO₆₀₀ de 0,5, por ejemplo; VP2 - 0,25 y VP6 - 0,25, hasta que la DO₆₀₀ para la mezcla fue igual a 0,5. La acetosiringona utilizada en el medio de inducción e infiltración ayuda en la activación de genes vir en *Agrobacterium*.

Las células de plantas dañadas liberan compuestos fenólicos que son detectados por los genes Vir A y Vir G en *Agrobacterium* lo que posteriormente conduce a la inducción de la expresión de proteínas en las células huésped (Zupan, J. et al., 2000). Las células se incubaron luego a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir que la acetosiringona indujera los genes vir. Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* de tipo silvestre de tres semanas de edad con *Agrobacterium* recombinante que expresaba las proteínas VP. Esto implicó la infiltración al vacío de plantas enteras o la inyección de *Agrobacterium* recombinante (pTRA-VP) en los espacios aéreos abaxiales en el lado ventral de las hojas de las plantas. La agrobacteria recombinante se infiltró con o sin el supresor de silenciamiento LBA 4404 (pBIN-NS).

Inicialmente, se inyectaron 2 ml de suspensión de medio de infiltración de *Agrobacterium* en cada planta usando una jeringa por construcción. Se usó una planta por construcción en una prueba contrarreloj de siete días. También se llevó a cabo la coexpresión de proteínas de rotavirus en las que VP2, VP6 y VP4 se expresaron simultáneamente en el citoplasma de hojas de plantas de *N. benthamiana*. Las combinaciones investigadas fueron VP2/6 y VP2/6/4. La proteína "espicular" VP4 puede unirse a VP6 y, por lo tanto, existe la posibilidad de que puedan añadirse a las estructuras de RLP. Se intentó la clonación con VP7, pero los problemas de toxicidad para las células huésped demostraron ser un problema. *Agrobacterium* de VP7 recombinante eliminó las células de la hoja un día después de la infiltración. Se intentaron varios métodos para evitar esto, como infiltrar plantas a una temperatura baja de 17 °C e infiltrar después del día 3 y/o el día 5 de las pruebas de contrarreloj. Como tal, la VP7 se omitió en los estudios de coexpresión debido a su naturaleza tóxica en las plantas de tabaco.

Extracción de proteínas

Se recogieron hojas enteras o dos discos de hojas por construcción y se molieron en nitrógeno líquido. La materia de la hoja molida se resuspendió en PBS estéril que contenía el Inhibidor de Proteasa Completo (libre de EDTA, Roche). Esto se centrifugó entonces durante 5 minutos a 13000 rpm y los sedimentos (materia foliar vegetal) se descartaron. A continuación, se mezclaron 100 µl de cada construcción con tampón de carga de SDS-PAGE 5X y se hirvieron durante 2 min a 95 °C, listos para un análisis adicional en geles de SDS-PAGE y transferencias western. El resto de las muestras se almacenó a -20 °C para un uso futuro. La Figura 4 muestra una descripción general del procedimiento de clonación e infiltración para el ADNc de rotavirus.

Extracción de proteína de apoplasto

Se llevó a cabo un procedimiento de extracción adicional en las construcciones de apoplasto pTRAc-A. El apoplasto es el espacio difusional libre entre la membrana plasmática y las paredes celulares de las células vegetales (Figura 5a). Las proteínas expresadas en el citoplasma tienen una secuencia de exportación que las dirige al apoplasto, por lo que se acumulan aquí. En el procedimiento de extracción que siguió, las hojas enteras de cada día de extracción se infiltraron al vacío o por inyección con PBS estéril que contenía el inhibidor de proteasa completo. Para la infiltración al vacío, las hojas individuales de la planta se suspendieron en PBS y se pusieron al vacío a 100 mbar durante 10 min en un tanque de vacío. Después, las hojas se enrollaron y se colocaron suavemente en columnas de centrifugación (similares a las columnas de centrifugación de Qiagen) con un orificio en el fondo (Figura 5b2). Los orificios permiten un fácil paso del fluido desde las hojas sin permitir el paso de la material foliar sólido. Las columnas de centrifugación se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml y la centrifugación se llevó a cabo a 4000 rpm durante 15 minutos (Figura 5 b3). El filtrado se recogió y se añadió colorante de carga de proteínas para geles SDS-PAGE y se añadió análisis de transferencia Western a 100 µl de cada muestra de filtrado.

Transferencias Western y tinciones Coomassie

Se usaron transferencias Western y geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie como se ha descrito previamente. Se usaron anticuerpo VP6 anti-rotavirus de ratón (US Biologicals) (1:5000), anticuerpo histidina tag anti-ratón (Sigma®) (1:2000), y suero anti-VP2 de pollo y anti-VP4 de pollo (1:2000) para probar cada una de las proteínas respectivas en transferencias Western. Se usaron geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie para cuantificar proteínas mediante barrido de densidad de bandas usando un Sistema de Documentación de Gel Syngene.

10 Microscopía de electrones

Para determinar si las proteínas expresadas se ensamblaron en las RLP, se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) de partículas inmuno-atrapadas el día 3 de expresión de VP6, VP2/6 y VP2/6/4 expresadas en el citoplasma, todo en presencia de un supresor del silenciamiento Nss. Se colocaron rejillas de carbono/cobre de descarga luminiscente sobre 20 µl de anticuerpo VP6 anti-rotavirus de ratón (1:5000) durante 5 minutos y luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. A continuación, las rejillas se colocaron en 10 µl de los extractos proteicos y se dejaron durante 2 minutos antes de lavarse nuevamente 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las rejillas se hicieron flotar sobre 20 µl de acetato de uranilo al 2 % durante 1 minuto antes de visualizarse bajo un TEM (microscopio de electrones de transmisión con filtro de energía Zeiss 912 OMEGA, University of Cape Town).

Para muestras aisladas de gradientes de sacarosa, la sacarosa primero tuvo que ser eliminada por diálisis antes del atrapamiento inmunitario en las rejillas de cobre. Si no se elimina, los cristales de sacarosa inhiben la visión definitiva de las muestras bajo el TEM ya que forma cristales en las rejillas, lo que altera la estructura del carbono y el material unidos. Las fracciones de sacarosa se colocaron en casetes de diálisis de 10 000 MW y se dializaron en PBS estéril que contenía NaCl 0,4 M durante 4 horas antes de intercambiar el tampón y dejarlas durante una noche a 4 °C con agitación. Dado que el volumen aumenta con la diálisis, las muestras de proteína requieren concentración. Las muestras se liofilizaron al vacío durante 3 horas y se resuspendieron en 2 ml de PBS estéril, listas para análisis adicionales.

30

Purificación por gradiente de sacarosa de RLP

Los extractos de proteína vegetal se filtraron inicialmente a través de miracloth para eliminar la materia sólida de la planta. Se establecieron gradientes de sacarosa del 10 al 60 % de sacarosa en tubos de 40 ml creando cada uno seis capas de 5 ml de sacarosa disuelta en PBS estéril (pH 7,4). A continuación, se cargaron muestras de proteínas aclaradas en volúmenes de 5 a 10 ml en la parte superior de cada columna de gradiente.

35

Se llevó a cabo una ultracentrifugación a 150 000 g (rotor de cubeta oscilante SWTi28, Beckman Coulter) a 4 °C durante 1 h 30 min. Al final de la centrifugación, se recogieron fracciones de 2 ml del fondo de cada columna mediante punción de tubo. Se realizaron a continuación Dots blots para determinar fracciones con proteínas de interés. Para cada fracción, se cargó 1 µl de muestra en una rejilla sobre una membrana de nitrocelulosa, que luego se bloqueó con tampón de bloqueo BSA. El análisis de transferencia Western se realizó entonces como de costumbre. Las proteínas se probaron con anticuerpo anti-VP6 de ratón (1:5000) contra VP6 o suero de pollo anti-VP2 y VP4 (1:5000) para las otras dos proteínas.

40

Ensayo de proteína soluble total

La proteína soluble total (TSP) se determinó mediante ensayos de Bradford. Esto se llevó a cabo para comparar los niveles de proteínas acumuladas en la VP2/6 acumulada en el citoplasma. La proteína IgG (1,43 mg/ml de reserva) se usó en una serie de dilución como patrón. Se añadieron 5 µl de estándar y muestras a una placa de microtitulación limpia y seca. Los reactivos de proteína soluble total A y B se añadieron según las instrucciones del fabricante (ensayo de proteína Bio-Rad Dc). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las lecturas de absorbancia se registraron a 750 nm usando un lector de microplacas (Bio-tek PowerWave XS).

50

55 Resultados

Expresión de VP6 en compartimentos de células foliares vegetales

VP6 se expresó y se dirigió a todos los compartimentos celulares (Figura 6; (la línea marca VP6, a ~42 kDa)), con y

sin el supresor de silenciamiento. En el citoplasma, la proteína se expresó desde el primer día de la prueba de contrarreloj, con un aumento de la acumulación de proteínas en el citoplasma durante la prueba de una semana (Figura 6a). En el RE, la acumulación de proteínas se observó claramente en el día 3 solamente (Figura 6b). La proteína se procesó a un tamaño de banda mayor (aproximadamente 11 kDa más) que las otras proteínas. Esto puede ser resultado de la adición de la etiqueta 6 histidina al extremo C-terminal de la proteína, así como el sitio de escisión (véase la secuencia de vector pProEx)

La acumulación de proteína en los cloroplastos ocurrió entre los días 1 y 3 (Figura 6 "cloroplastos"). El supresor del silenciamiento tuvo un efecto sobre las proteínas ya que no se detectaron proteínas en su ausencia. No hubo expresión de proteína en los días 5 y 7. El apoplasto, al igual que en el RE, tuvo la mejor acumulación de proteína entre los días 3 y 5 de prueba de contrarreloj (Figura 6 "apoplasto") y ninguna el día 1 y día 7. El supresor de silenciamiento tuvo un efecto positivo especialmente el día 3, lo que dio como resultado niveles de detección de proteína más altos en comparación a cuando se omitió. También se puede observar que son visibles dos bandas en la marca ~40 kDa, probablemente como resultado de la escisión de la etiqueta de señalización en la proteína VP6.

El RE, los cloroplastos y el apoplasto mostraron la mayor expresión de proteína el día 3, acumulando la mayor cantidad de proteína en presencia del supresor de silenciamiento. El citoplasma fue el mejor en términos de acumulación de proteína, ya que mostró una alta y creciente expresión de proteínas a lo largo de la prueba de contrarreloj.

Expresión de proteínas de rotavirus marcadas con histidina en el citoplasma

Las cuatro VP de rotavirus se clonaron en un vector adicional, pTRAc-HT. Este vector incluye una etiqueta de 6-histidina para proteínas dirigidas al citoplasma y facilita la detección mediante el uso de un anticuerpo anti-histidina tag si los anticuerpos para las proteínas de interés no están disponibles. En este caso, solo VP6 tiene un anticuerpo comercialmente disponible y, por lo tanto, se probó este procedimiento para la detección temprana de todas las proteínas mientras se esperaba el suero. El citoplasma también funcionó bien para la expresión de VP6 y motivó la prueba de las demás proteínas.

Los resultados de transferencia Western de los extractos del día 3 de una prueba de contrarreloj de 7 días mostraron una expresión exitosa de VP2, VP4 y VP6 (Figura 7a). Para obtener la expresión de VP7 en plantas, se probaron varias técnicas. Sin embargo, las plantas infiltradas con VP7 mostraron hojas amarillentas desde el día 1 y se marchitaron durante el transcurso de la prueba de contrarreloj (Figura 7b). No se detectó expresión de proteína en estas condiciones, ni siquiera después del día 1 de infiltración cuando la planta aún parecía que estaba razonablemente bien.

Expresión de VP2 y VP4 en plantas

VP2 y VP4 se infiltraron en hojas de plantas de *N. benthamiana* y se dirigieron al RE, el cloroplasto, el citoplasma y el apoplasto. No se pudo expresar VP2 dirigido al vector apoplasto ya que no se pudo obtener ningún clon positivo en *E. coli*. Sin embargo, la proteína se expresó con éxito y se dirigió a los otros 3 compartimentos (Figura 8a). Se usó suero anti-VP2 y anti-VP4 de pollo (1:2000) en el análisis de transferencia Western de extractos. Las bandas VP2 y VP4 eran visibles justo debajo de la marca de 100 kDa (banda de proteína indicada por la flecha) como se en la Figura 8a y 8b, respectivamente. La expresión pareció ser la mejor en el citoplasma y el RE para VP2, mientras que para VP4, en el citoplasma y el apoplasto. El supresor de silenciamiento no tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión de proteínas. Solo aumentó ligeramente la expresión en la construcción de VP2 en el RE y no tanto en el resto, como se puede ver en la transferencia Western. Las construcciones de VP4 se expresaron todas en presencia del supresor del silenciamiento.

Coexpresión de VP2/6 y VP2/6/4 en el citoplasma

El citoplasma pareció ser el mejor para la expresión de la proteína de la cápside de rotavirus y mostró las mayores eficiencias de extracción. Por lo tanto, todos los trabajos de expresión adicionales se realizaron con proteínas dirigidas al citoplasma.

Se ha demostrado que VP2 y VP6 forman RLP con respuestas inmunogénicas protectoras en ratones y, por lo tanto, se investigó la coexpresión de VP2/6 y VP2/6/4 en el citoplasma. Los extractos del día 3 de VP2/6/4 coexpresado se detectaron mediante transferencia Western con suero anti-VP2 y VP4 (1/5000) y anticuerpo anti-VP6 de ratón (1:5000) (Figura 9). La expresión de VP6 fue muy alta como se determinó previamente, pero la expresión de VP2 y

VP4 fue muy baja, como puede verse en la banda muy débil en la marca de 100 kDa. Esto puede haberse atribuido a la coexpresión que dio lugar a que se utilizaran más recursos de células huésped en la sobreexpresión de VP6, dejando menos para VP2 y/o VP4. Tampoco fue fácil determinar si la banda detectada era tanto VP2 como VP4 o ninguna de las 2 proteínas. La banda muy visible que transcurre por encima de 130 kDa puede ser por proteínas
5 VP6 dimerizadas. La banda visible en la marca de 55 kDa es probablemente la abundante enzima vegetal Rubisco.

Se llevaron a cabo análisis por microscopía electrónica de transmisión en la VP6 expresada en citoplasma, así como en VP2/6 y VP2/6/4 co-expresadas, para verificar las partículas de proteína y las RLP ensambladas (Figura 10). Esto también determinó si VP2 y/o VP4 realmente se coexpresaron con éxito. VP6, cuando se expresa en solitario, se
10 ensambla para formar vainas de proteína según lo indicado por la flecha en la Figura 10b. En la adición VP2, las partículas se ensamblaron para formar RLP (Figura 10c). VP2 actúa como una proteína de andamiaje que permite que otras proteínas se ensamblen y finalmente formen una estructura completa de rotavirus. VP6 como tal estaba vinculado a VP2, pero aún no era fácil determinar estructuras de VP4 en VP2/6/4 coexpresado. La micrografía electrónica en la Figura 10d pueden ser partículas VP2/6 puramente ensambladas. Sin embargo, se ha demostrado
15 que VP4 se une a VP6 durante el ensamblaje de la proteína, y esto ocurre antes de que se una VP7. Es probable que estas estructuras de VP4 no sean estables y puedan caerse de la estructura de RLP durante los procedimientos de preparación para microscopía electrónica.

Purificación por gradiente de sacarosa de VP2/6 y VP2/6/4

20 Se purificaron VP2/6 y VP2/6/4 en un gradiente de sacarosa que variaba del 10 al 60 % de sacarosa (Figura 11a). Se recogieron fracciones de 2 ml del fondo de cada uno de los tubos y se probaron con anticuerpo anti-VP6 de ratón y/o suero anti-VP2 de pollo y VP4 para determinar qué fracciones contenían las proteínas. Para VP2/6, se encontraron proteínas en las fracciones 16 y 17 ya que éstas eran positivas para la proteína VP6 en la transferencia
25 (Figura 11b). El análisis de transferencia de VP2/6/4 con suero de pollo anti-VP2 y VP4 mostró resultados positivos en todas las fracciones. Esto puede haber sido como resultado de los altos niveles de detección de proteína de fondo por el suero de pollo. Sin embargo, la intensidad de los puntos fue mayor en las fracciones 17 y 18 como se ve en la Figura 11c, posiblemente debido a una mayor concentración de las proteínas de interés en estas fracciones.

30 Al juntar estos resultados (Figuras 11b y 11c), las proteínas de rotavirus estaban en fracciones que variaban de 16 a 20.

Transferencias Western y tinciones Coomassie de fracciones

35 Se realizó una transferencia Western y SDS-PAGE de VP2/6 coexpresada para verificar la presencia de proteínas VP2 y VP6 en las fracciones 13 a 20. El análisis de transferencia Western para la proteína VP6 probada con anticuerpo anti-VP6 de ratón fue positiva en las fracciones 16 hasta el 20 (Figura 12a, flecha inferior y Figura 12c). La proteína VP2 probada con suero anti-VP2 de pollo se detectó en las fracciones 17 a 20 (Figura 12a, flecha superior). Se ha demostrado que VP2 se expresa menos que VP6 en estudios de coexpresión anteriores y esto
40 también se mostró aquí Figura 12a en la que las bandas de proteína VP2 tienen una intensidad menor en comparación con VP6.

Las fracciones 16 y 17 de VP2/6 coexpresada que determinó previamente que contenía proteína VP6 por dot blots (Figura 11b) se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE. Se incluyó una proteína de concentración
45 conocida, VP6 expresada en células de insecto SF9 (0,91 µg/µl) para determinar la concentración de proteínas en bruto VP2/6 (Figuras 11b y c). Esto se hizo mediante el barrido de densidad de la banda de proteína en bruto (carril etiquetado como en bruto) usando un Sistema de Documentación de Gel Syngene y en consecuencia se pudo determinar la cantidad de VP2/6 por kilogramo de materia foliar. Se encontró que el rendimiento de proteína era de aproximadamente 1,54 g/kg de peso en fresco (FW). Se obtuvieron 1,1 mg de RLP purificadas a partir de 1 gramo
50 de material vegetal (1,1 g/kg).

Ensayo de proteína soluble total de VP2/6

La proteína soluble total (TSP) se determinó en las fracciones de VP2/6 coexpresadas para determinar las
55 cantidades relativas de proteína VP2/6 (Figura 13). Las concentraciones de proteína se calcularon como 0,538 mg/ml y 1,012 mg/ml para las fracciones 17 y 18 respectivamente con el uso de un estándar de IgG (Figura 13a). Las bandas de proteína correspondientes a VP2/6 en estas fracciones se calcularon por barrido de densidad en un Sistema de Documento de Gel Syngene y se encontró que eran aproximadamente 0,108 mg/ml y 0,202 mg/ml, respectivamente.

Por lo tanto, la TSP para VP2/6 en las fracciones 17 y 18 era en ambas TSP aproximadamente al 20 %. La mayoría de las RLP en la columna de sacarosa se encontraron entre el 15 y el 25 % de sacarosa, correspondiente con las fracciones 15 a aproximadamente 20, donde se observa que el gráfico de repente alcanza su punto máximo y luego disminuye. Las diferencias en la densidad de los diversos materiales en el extracto permitieron separar y, de este modo purificar las proteínas de interés. Los geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie mostraron solo una banda prominente que indicaba que las proteínas son relativamente puras (Figura 12b).

TEM de VP2/6 purificada

10

Las fracciones de VP2/6 purificadas se agruparon juntas y se dializaron en PBS con alto contenido de sal para eliminar la sacarosa antes de visualizarse en un microscopio electrónico de transmisión. Se realizó TEM para determinar la pureza y comprobar si las RLP se mantuvieron intactas después del procedimiento de purificación. Como se puede ver en la Figura 15, la mayor parte del material de fondo, que consistía principalmente en los productos de la célula huésped (Figura 10b, c y d), se eliminó, dejando atrás las RLP. La mayoría de las RLP permanecieron intactas, pero algunas parecían haber perdido forma probablemente como resultado de la deformación debido a las condiciones en la rejilla EM.

Análisis preliminar de la expresión de proteínas estructurales de rotavirus en hojas de *N. benthamiana*

20

Este análisis preliminar se centró en la expresión de las proteínas estructurales de rotavirus VP2 (SEQ ID NO: 1), VP4 (SEQ ID NO: 2), VP6 (SEQ ID NO: 3) y VP7 (SEQ ID NO: 4) en hojas de *N. benthamiana* como un ejemplo del sistema de expresión del huésped. La cepa de rotavirus seleccionada aquí fue una cepa G9 P[6] que circula predominantemente en Sudáfrica y otras regiones subsaharianas. Una vacuna RLP dirigida a esta cepa ayudaría a aliviar la carga de enfermedad en el África subsahariana.

25

Se usó un sistema de expresión transitoria mediado por *Agrobacterium* en este análisis. La expresión transitoria, a diferencia de la expresión transgénica, permite la expresión rápida de proteínas en un tiempo relativamente corto, sin la integración de los genes de la proteína de la cápside del rotavirus en el cromosoma del huésped. La mayoría de las proteínas se expresaron y se acumularon en cantidades detectables el día 3 de la infiltración de *Agrobacterium* recombinante en hojas de *N. benthamiana*. Como se muestra a continuación, se observó la expresión exitosa de varias proteínas estructurales de rotavirus que incluyen VP2, VP4 y VP6 en compartimentos de células foliares de plantas como se detalla en la tabla 2:

30

35

Tabla 2: Expresión de proteínas VP de rotavirus en varios compartimentos de células foliares

Proteína de cápside	Compartimento de célula foliar				0 = sin expresión 1 = expresión
	Apoplasto	Cloroplasto	Citoplasma	RE	
VP2	0	1	1	1	
VP4	1	0	1	1	
VP6	1	1	1	1	
VP7	0	0	0	0	

La expresión de la glucoproteína VP7 no se observó posiblemente debido a sus efectos tóxicos sobre las células vegetales. Cabe la pena señalar que para este estudio preliminar, se utilizó una VP7 que contenía su péptido señal nativo. La infiltración el día 3 durante los ensayos de coexpresión también se intentó. Esto se intentó para ver si la proteína se expresó y poco después se ensambló con VP2 y VP6 para formar RLP. La naturaleza tóxica de VP7 recombinante como se observó en este estudio se ha descrito previamente (Williams et al., 1995; McCorquodale, 1987; Arias et al., 1986).

40

Se han publicado estudios de expresión de VP7 anteriores en patatas transgénicas (Li et al., 2006; Choi y col., 2005; Wu et al., 2003). Choi et al. (2005) usaron una VP7 de rotavirus de simio, y Li et al. y Wu et al. (Li et al., 2006; Wu et al., 2003) utilizaron VP7 de G1 humano del grupo A. El resultado descrito en el presente documento usó VP7 de G9 de rotavirus humano.

45

VP2 se expresó y se dirigió a todos los compartimentos, excepto al apoplasto, ya que no se pudo clonar el ADNc apropiado, y las limitaciones de tiempo solo permitieron algunos intentos antes de continuar con las demás construcciones. Se observó que los niveles de expresión de VP2 eran significativamente bajos en todos los compartimentos. En un estudio anterior citado por Saldana et al. 2006, se concluyó que una VP2 que tiene su

50

secuencia optimizada para la expresión en la planta es imposible de expresar, a pesar de que se detecta ARNm en las células vegetales. Sin embargo, lograron expresarlo en las células de la planta del tomate con ADN sintético. La razón de la dificultad en la expresión de VP2 es muy probablemente como resultado de una traducción incorrecta de ARNm o porque el ARNm contiene algunos motivos de secuencia que desestabilizan las células de la planta (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2002). Se han observado pruebas de bajos niveles de expresión de VP2 en comparación con VP6 en estudios de expresión de plantas e insectos por Mena et al. (2006), Saldana et al. (2006), Vieira et al. (2005), y Labbé et al. (1991).

La proteína de la cápside externa, VP4, que forma picos en la superficie de la estructura del virión, se expresó y se dirigió para su acumulación en el citoplasma, RE y apoplasto. No se detectó acumulación de proteínas en los cloroplastos. Como se observó para VP2, los niveles de expresión de proteínas para VP4 fueron menores que los observados para VP6 en transferencias Western. La proteína tiene un sitio de escisión de tripsina que da como resultado dos proteínas, VP5 y VP8. Es posible que la tripsina local en hojas de *N. benthamiana* escinda algunas de las proteínas a medida que se producen, dando como resultado niveles de concentración más bajos de VP4 intacta y acumulada en los compartimentos designados. Se ha demostrado que la proteína es un antígeno neutralizante principal pero ha habido algunos intentos de clonar la proteína completa para el desarrollo de vacunas (Khodabandehloo et al., 2009; Mahajan et al., 1995; Nishikawa et al., 1989). Sin embargo, se han realizado varios estudios en el sistema de expresión de células de insectos y levaduras que muestran la expresión de las subunidades VP5 o VP8 de VP4 (Andrés et al., 2006; Favacho et al., 2006; Kovacs-Nolan et al., 2001). Hasta la fecha, el presente estudio representa el primer estudio que muestra la expresión de la proteína completa en un sistema de expresión vegetal.

Se expresó VP6 en todos los compartimentos observándose una sobreexpresión en el citoplasma con acumulación de proteínas observada desde el día 1 al día 7 en este compartimento. Esto es contrario a determinada bibliografía, que sugiere que la actividad de la proteasa y el silenciamiento génico reducen o dificultan la acumulación de proteína extraña en el citoplasma (Fischer et al., 2004). Además, dadas las condiciones correctas de pH, se sabe que VP6 se autoensambla en partículas tubulares o helicoidales, al igual que las partículas observadas en este estudio (Figura 9b) (Estes et al., 1987). La VP6 constituye aproximadamente el 50 % del núcleo viral y, por lo tanto, es un antígeno principal en el desarrollo de una vacuna contra rotavirus. El resultado obtenido anteriormente permitió investigar más a fondo la coexpresión de VP2, VP6 y VP4 en el citoplasma.

Cuando se coexpresan en el citoplasma, VP2 y VP6 se ensamblan para formar RLP. Se observaron rendimientos proteicos muy altos del sistema de expresión transitoria de entre 1,27 - 1,54 g/kg de FW. Cuando se purificó en una columna de sacarosa, la cantidad de VP retenida fue de 1,1 g/kg de peso corporal. Este rendimiento es comparable al obtenido para la producción de un anticuerpo, IgG, usando un sistema de expresión transitoria en *N. benthamiana*, con un rendimiento de hasta 1,5 g/kg de FW (Vézina et al., 2009). Saldana et al. (2006) fueron hasta ahora el único grupo que se sabe que han co-expresado con éxito VP2 y VP6 de rotavirus en plantas de tomate transgénicas y con niveles de aproximadamente el 1 % de proteína soluble total. El ensamblaje de VP2/6 en el sistema de expresión de células de insectos ha sido bien documentado (Vieira et al., 2005; O'Brien et al., 2000). También se ha demostrado que estas RLP VP2/6 proporcionan inmunidad protectora contra la infección por rotavirus (Zhou et al., 2011, Saldana et al., 2006). Por lo tanto, las RLP VP2/6 que se produjeron en el sistema de expresión vegetal son candidatas adecuadas para el desarrollo de una subunidad de vacuna contra rotavirus.

VP2/6/4 también se coexpresaron y se detectaron. El primer pico visible (Figura 14, fracción 16) en la lectura de absorbancia de proteína total de las proteínas coexpresadas podría ser VP2/6/4 ensamblado, pero al examinar esta fracción bajo un TEM, no se detectaron RLP. El pico de proteína observado puede ser resultado una acumulación de monómeros de VP4 o sus respectivas subunidades VP5 y VP8. El segundo pico (fracción 18), cuando se examinó bajo un TEM, mostró estructuras de RLP muy similares a las observadas en la muestra de VP2/6. Sin embargo, Crawford et al han informado previamente que VP4 no se podía ver bajo TEM, y que las partículas VP2/6/4 y VP2/6/4/7 tenían una estructura y diámetro similares bajo TEM (Crawford 1994). Se hizo la misma observación para las RLP VP2/6/7, RLP VP 2/6/4/7 y RLP VP2/6, que parecían todas similares bajo un TEM estándar.

Ejemplo 2

55 Construcciones

A-2X35S/CPMV-HT/ RVA(WA) VP2(opt)/ NOS (Construcción número 1710)

Una secuencia optimizada que codifica VP 2 de la cepa WA de Rotavirus A se clonó en un sistema de expresión

2X35S-CPMV-HT-NOS en un plásmido que contenía casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP2 se amplificó usando los cebadores IF-WA_VP2(opt).s1+3c (Figura 17A, SEQ ID NO: 21) e IF-WA_VP2(opt).s1-4r (Figura 17B, SEQ ID NO: 22), usando una secuencia génica de VP2 optimizada (Figura 19, SEQ ID NO: 45) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP2 (número de acceso de Genbank CAA33074) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 1191 (Figura 17C) se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 18 (SEQ ID NO: 23). A la construcción resultante se le da el número 1710 (Figura 23, SEQ ID NO: 27). La secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa WA de Rotavirus A se presenta en la Figura 20 (SEQ ID NO: 25). Una representación del plásmido 1710 se presenta en la Figura 21.

B-2X35S/CPMV-HT/RVA(WA) VP2(opt)/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1711)

Una secuencia optimizada que codifica VP 2 de la cepa WA de Rotavirus A se clonó en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprendía el sistema de amplificación BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP2 se amplificó usando los cebadores IF-WA_VP2(opt).s1+3c (Figura 17A, SEQ ID NO: 21) e IF-WA_VP2(opt).s1-4r (Figura 17B, SEQ ID NO: 22), usando una secuencia génica de VP2 optimizada (SEQ ID NO: 45) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP2 (número de acceso de Genbank CAA33074) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m) usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 193 (Figura 22A) se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV(m). También incorpora 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 22B (SEQ ID NO: 23). 26). A la construcción resultante se le da el número 1711 (Figura 23, SEQ ID NO: 27). La secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa WA de Rotavirus A se presenta en la Figura 20 (SEQ ID NO: 25). Una representación del plásmido 1711 se presenta en la Figura 24. C-2X35S/CPMV-HT/RVA(WA) VP6(opt)/NOS (Construcción número 1713)

Una secuencia optimizada que codifica VP6 de la cepa WA de Rotavirus A se clonó en un sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP6 se amplificó usando los cebadores IF-WA_VP6(opt).s1+3c (Figura 25a, SEQ ID NO: 28) e IF-WA_VP6(opt).s1-4r (Figura 25b, SEQ ID NO: 29), usando una secuencia génica de VP6 optimizada (SEQ ID NO: 46) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP6 (número de acceso de Genbank AAA47311) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 1191 (Figura 17c) se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 18 (SEQ ID NO: 23). A la construcción resultante se le da el número 1713 (Figura 25c, SEQ ID NO: 30). La secuencia de aminoácidos de VP6 de la cepa WA de Rotavirus A se presenta en la Figura 26 (SEQ ID NO: 31). Una representación del plásmido 1713 se presenta en la Figura 27.

D-2X35S/CPMV-HT/RVA(WA) VP6(opt)/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1714)

Una secuencia optimizada que codifica VP6 de la cepa WA de Rotavirus A se clonó en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprendía el sistema de amplificación BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP6 se amplificó usando los cebadores IF-WA_VP6(opt).s1+3c (Figura 25a, SEQ ID NO: 28) e IF-WA_VP6(opt).s1-4r (Figura 25b, SEQ ID NO: 29), usando una secuencia génica de VP6 optimizada (SEQ ID NO: 46) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP6 (número de acceso de Genbank AAA47311) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m) usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 193 (Figura 22A) se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV(m). También incorpora 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 22B (SEQ ID NO: 23). 26). A la construcción resultante se le da el número 1714 (Figura 28, SEQ ID NO: 32).

La secuencia de aminoácidos de VP6 de la cepa WA de Rotavirus A se presenta en la Figura 26 (SEQ ID NO: 31). Una representación del plásmido 1714 se presenta en la Figura 29.

C-2X35S/CPMV-HT/RVA(Rtx) VP4(opt)/NOS (Construcción número 1730)

Una secuencia optimizada que codifica VP 4 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se clonó en 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP4 se amplificó usando los cebadores IF-Rtx_VP4(opt).s1+3c (Figura 30A, SEQ ID NO: 33) e IF-Rtx_VP4(opt).s1-4r (Figura 30B, SEQ ID NO: 34), usando la secuencia génica optimizada de VP4 (Figura 31B, (SEQ ID NO: 47) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP4 (número de acceso de Genbank AEX30660) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 1191 (Figura 18, SEQ ID NO: se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la (Figura 18, SEQ ID NO: 23). A la construcción resultante se le da el número 1730 (Figura 31C, SEQ ID NO: 50). La secuencia de aminoácidos de VP4 de USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se presenta en la Figura 32 (SEQ ID NO: 36). Una representación del plásmido 1730 se presenta en la Figura 33A.

E-2X35S/CPMV-HT/RVA(Rtx) VP4(opt)/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1731)

Una secuencia optimizada que codifica VP 4 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se clonó en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprendía el sistema de amplificación BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP4 se amplificó usando los cebadores IF-Rtx_VP4(opt).s1+3c (Figura 30A, SEQ ID NO: 33) e IF-Rtx_VP4(opt).s1-4r (Figura 30B, SEQ ID NO: 34), usando una secuencia génica de VP4 optimizada (SEQ ID NO: 47) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP4 (número de acceso de Genbank AEX30660) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m) usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 193 (Figura 22A) se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV(m). También incorpora 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 22B (SEQ ID NO: 23). 26). A la construcción resultante se le da el número 1731 (Figura 31, SEQ ID NO: 35). La secuencia de aminoácidos de VP4 de USA/Rotari-
5 A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se presenta en la Figura 32 (SEQ ID NO: 36). Una representación del plásmido 1731 se presenta en la Figura 33B.

F-2X35S/CPMV-HT/RVA(Rtx) VP7(opt)/NOS (Construcción número 1733)

10 Una secuencia optimizada que codifica VP 7 con su péptido señal nativo de la cepa USA/Rotari-
A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se clonó en un sistema de expresión 2X35S-CPMV-
HT-NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método
basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP7 se amplificó usando los cebadores IF-
Rtx_VP7(opt).s1+3c (Figura 34A, SEQ ID NO: 37) e IF-Rtx_VP7(opt).sl-4r (Figura 34B, SEQ ID NO: 38), usando una
15 secuencia génica de VP7 optimizada (SEQ ID NO: 54) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la
secuencia de la proteína VP7 (número de acceso de Genbank AEX30682) se tradujo de nuevo y se optimizó para el
uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un sistema de
expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La
construcción número 1191 (Figura 17C) se digirió con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado
20 se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a
la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora
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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia
de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 18 (SEQ ID NO: 23). A la construcción
25 resultante se le da el número 1733 (Figura 34C, SEQ ID NO: 24). La secuencia de aminoácidos de VP7 con su
péptido señal nativo de la cepa USA/Rotari-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se
presenta en la Figura 35 (SEQ ID NO: 39). Una representación del plásmido 1733 se presenta en la Figura 36.

D-2X35S/CPMV-HT/TrSp-RVA(Rtx) VP7(opt)/NOS (Construcción número 1734)

30 Una secuencia optimizada que codifica VP 7 con una versión truncada del péptido señal nativo de la cepa
USA/Rotari-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se clonó en un sistema de expresión
2X35S-CPMV-HT-NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el
siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de VP7 se amplificó usando
35 los cebadores IF-TrSP+Rtx_VP7(opt).s1+3c (Figura 44A, SEQ ID NO: 55) e IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r (Figura 44B, SEQ
ID NO: 56), usando la secuencia génica de VP7 optimizada (correspondiente a nt 88-981 de la Figura 44C, SEQ ID
NO: 57) como plantilla. Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la proteína VP7 (número de acceso de
Genbank AEX30682) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la
estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el
40 sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 1191 (Figura 17C) se digirió
con la enzima de restricción SacII y Stul y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion.
La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un
casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora 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. La
45 cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha
se presenta en la Figura 18 (SEQ ID NO: 23). A la construcción resultante se le da el número 1734 (Figura 44D,
SEQ ID NO: 58). La secuencia de aminoácidos de VP7 con el péptido señal truncado de la cepa USA/Rotari-
A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se presenta en la Figura 44E (SEQ ID NO: 59). Una
representación del plásmido 1734 se presenta en la Figura 44F.

50 **G-2X35S/CPMV-HT/PDISP/RVA(WA) VP7(opt)/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa
(Construcción número 1735)**

Una VP7 codificante de secuencia de la cepa USA/Rotari-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra
55 Rotavirus A se clonó en un sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en un plásmido que contenía el
casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que
contenía la secuencia codificante de VP7 sin su péptido señal de tipo silvestre se amplificó usando los cebadores IF-
Rtx_VP7(opt).s2+4c (Figura 37A, SEQ ID NO: 40) e IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r (Figura 34B, SEQ ID NO: 38), usando
una secuencia génica de VP7 optimizada (SEQ ID NO: 54). Para la optimización de la secuencia, la secuencia de la

proteína VP7 (número de acceso de Genbank AEX30682) se tradujo de nuevo y se optimizó para el uso del codón humano, el contenido de GC y la estructura del ARNm. El producto de PCR se clonó en marco con el péptido señal PDI de la alfalfa en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1192 (Figura 38) se digirió con la enzima de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1192 es un plásmido aceptor diseñado para la clonación "In Fusion" 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. La cadena principal es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 39 (SEQ ID NO: 41). A la construcción resultante se le da el número 1735 (Figura 40, SEQ ID NO: 42). La secuencia de aminoácidos de PDISP/VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A se presenta en la Figura 41 (SEQ ID NO: 43). Una representación del plásmido 1735 se presenta en la Figura 42.

15 Tabla 3. Descripción de genes sintetizados para la producción de RLP

SEQ ID No	Antígeno	Cepa de origen	Tipo de secuencia*	Figura en la descripción
45	VP2	WA	Optimizada	19B
46	VP6	WA	Optimizada	25D
47	VP4	Rotarix	Optimizada	31B
50	VP4	SA11	Tipo silvestre	43A
51	VP4	SA11	Optimizada	43B
54	VP7	Rotarix	Optimizada	34E
53	VP7	SA11	Tipo silvestre	43D
52	VP7	SA11	Optimizada	43C

* Las secuencias optimizadas se modificaron para favorecer el uso de codones humanos preferidos y aumentar el contenido de GC.

Tabla 4. Descripción de la construcción ensamblada y ensayada para la producción de RLP.

Sistema de expresión	Sistema de amplificación	Péptido señal [†]	Antígeno (cepa) ^{*‡}	SEQ ID del gen usada para PCR	Construcción número
CPMV HT	-	-	RVA(WA) VP2 [optimizado]	SEQ ID NO: 45	1710
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	-	RVA(WA) VP2 [optimizado]	SEQ ID NO: 45	1711
CPMV HT	-	-	RVA(WA) VP6 [optimizado]	SEQ ID NO: 46	1713
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	-	RVA(WA) VP6 [optimizado]	SEQ ID NO: 46	1714
CPMV HT	-	-	RVA(Rtx) VP4 [optimizado]	SEQ ID NO: 47	1730
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	-	RVA(Rtx) VP4 [optimizado]	SEQ ID NO: 47	1731
CPMV HT	-	WtSp	RVA(Rtx) VP7 [optimizado]	SEQ ID NO: 54	1733
CPMV HT	-	TrSp	RVA(Rtx) VP7 [optimizado]	SEQ ID NO: 54	1734
CPMV HT	-	SpPDI	RVA(Rtx) VP7 [optimizado]	SEQ ID NO: 54	1735
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	WtSp	RVA(Rtx)VP7 [optimizado]	SEQ ID NO: 54	1736
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	TrSp	RVA(Rtx)VP7 [optimizado]	SEQ ID NO: 54	1737
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	SpPDI	RVA(Rtx) VP7 [optimizado]	SEQ ID NO: 54	1738
CPMV HT	-	-	RVA(SA11) VP4	SEQ ID NO: 50	1760
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	-	RVA(SA11) VP4	SEQ ID NO: 50	1761
CPMV HT	-	-	RVA(SA11) VP4	SEQ ID NO: 51	1770

CPMV HT	BeYDV(m)+rep	-	[optimizado] RVA(SA11) VP4	SEQ ID NO: 51	1771
CPMV HT	-	WtSp	[optimizado] RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 53	1763
CPMV HT	-	TrSp	RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 53	1764
CPMV HT	-	SpPDI	RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 53	1765
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	WtSp	RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 53	1766
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	TrSp	RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 53	1767
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	SpPDI	RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 53	1768
CPMV HT	-	WtSp	RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 52	1773
CPMV HT	-	TrSp	[optimizado] RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 52	1774
CPMV HT	-	SpPDI	[optimizado] RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 52	1775
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	WtSp	[optimizado] RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 52	1776
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	TrSp	[optimizado] RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 52	1777
CPMV HT	BeYDV(m)+rep	SpPDI	[optimizado] RVA(SA11) VP7	SEQ ID NO: 52	1778

† WtSp: Péptido señal de tipo salvaje, SpPDI: Péptido señal de origen vegetal, clonado a partir del gen disulfuro de isomerasa de proteína de alfalfa, TrSp: péptido señal truncado de tipo silvestre, TrSp comienza en 2º Met en WtSp (M30).

* [optimizada] significa que la secuencia se ha optimizado en función del uso de codones, contenido de GC y estructura del ARN.

Ejemplo 3

Ensamblaje de construcciones génicas y transformación de *Agrobacterium*

5

Se usaron todos los plásmidos, incluyendo los plásmidos 1710, 1713, 1730 y 1734, para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, Estados Unidos) por electroporación (Mattanovich et al., 1989, Nucleic Acid Res. 17:6747), como alternativa, puede usarse choque térmico usando células competentes preparadas con CaCl₂ (XU et al., 2008, Plant Methods 4). La integridad de los plásmidos en las cepas de *A. tumefaciens* creadas se confirmó por mapeo de restricción. La cepa de *A. tumefaciens* transformada con un plásmido binario dado se denomina AGL1/"número de plásmido". Por ejemplo, la cepa de *A. tumefaciens* transformada con el número de construcción 1710 se denomina "AGL1/1710".

10

Preparación de biomasa, inóculo, agroinfiltración, y cosecha de la planta

15

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.

20

Las *Agrobacteria* tranfectadas con cada construcción se cultivaron en un medio LB de origen vegetal y complementado con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 10 mM (MES) y 50 µg/ml de kanamicina a pH 5,6 hasta que alcanzaron una DO600 entre 0,6 y 2,5. Las suspensiones de *Agrobacterium* se mezclaron para alcanzar la relación apropiada para cada construcción y se llevaron a 2,5X DO600 con medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6). Las suspensiones de *A. tumefaciens* se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron con medio de filtración en 2,5 volúmenes de suspensión y se dejaron calentar antes de su 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. Tras la infiltración, las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 3-12 días hasta la cosecha. La biomasa cosechada se mantuvo congelada (-80 °C) hasta su uso para la purificación de partículas.

25

30

Extracción y purificación de partículas de tipo rotavirus

Las proteínas se extrajeron de biomasa congelada mediante extracción mecánica en un mezclador con 3 volúmenes de tampón de extracción (TNC: Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 10 mM). La suspensión se filtró a través de un filtro de nylon de poros grandes para eliminar los residuos grandes y se centrifugó 5000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se centrifugó de nuevo a 5000 g durante 30 minutos (4 °C) para eliminar restos adicionales. El sobrenadante se filtró en profundidad y se ultrafiltró, y el filtrado se centrifugó a 75000 g durante 20 min (4 °C) para concentrar las partículas de tipo rotavirus. El sedimento que contenía las partículas se resuspendió en 1/12 de volumen de TNC y los productos insolubles se eliminaron con una centrifugación a 5000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró en Miracloth antes de cargarse en gradientes de densidad de iodixanol.

La centrifugación en gradiente de densidad se realizó de la siguiente manera. Se prepararon tubos que contenían gradientes escalonados del 5 % al 45 % de iodixanol y se superpusieron con los extractos filtrados que contenían las partículas de tipo rotavirus. Los gradientes se centrifugaron a 120000 g durante 4 horas (4 °C). Después de la centrifugación, se recogieron fracciones de 1 ml desde el fondo hasta la parte superior y se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie y transferencia Western. Para eliminar el iodixanol para las fracciones seleccionadas para un análisis adicional, las fracciones seleccionadas se centrifugaron a 75000 g durante 20 minutos (4 °C) y las partículas sedimentadas se resuspendieron en tampón TNC recién preparado.

20 SDS-PAGE e inmunotransferencia

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo de proteínas BCA (Pierce Biochemicals, Rockport IL). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras y se tiñeron con azul de Coomassie. Se escanearon los geles teñidos y se realizó un análisis de densitometría usando ImageJ Software (NIH).

Para la inmunotransferencia, las proteínas sometidas a electroforesis se electrotransfirieron en membranas de difluoruro de polivinileno (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN). 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 adecuado (Tabla 5), en 2 µg/ml en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los anticuerpos secundarios usados para la detección de quimioluminiscencia fueron los indicados en la Tabla 5, diluidos como se indica en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunoreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation). La conjugación de enzima peroxidasa de rábano picante de anticuerpo IgG humano se llevó a cabo utilizando el kit de conjugación de peroxidasa activada EZ-Link Plus® (Pierce, Rockford, IL).

40 Tabla 5: Condiciones de electroforesis, anticuerpos y diluciones para la inmunotransferencia de antígenos de rotavirus.

Antígeno de rotavirus	Condición de electroforesis	Anticuerpo principal	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
VP2	Reductora	anti-VP2 policlonal de conejo (amablemente proporcionado por el profesor Koki Taniguchi)	1 µg/ml	Anti-conejo de cabra (JIR 111-035-144)	1:10000
VP6	Reductora	ABIN 308233	1:20000	Anti-conejo de cabra (JIR 111-035-144)	1:10000
VP7	No reductora	anti-VP7 policlonal de conejo (amablemente proporcionado por el profesor Koki Taniguchi)	1:2000	Anti-conejo de cabra (JIR 111-035-144)	1:10000

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de anti-VP4

45 Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VP4 (amablemente proporcionado por el Profesor Koki Taniguchi) diluido 1:100000 en PBS 10 mM pH 7,4 (solución salina tamponada con fosfato), NaCl 150 mM durante 16-18 horas a 4 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS 10 mM pH 7,4, NaCl 1 M que contenía Tween-20 al 0,1 % y se bloquearon con BSA al 5

% en PBS 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM que contenía Tween-20 al 0,1 % durante 1 hora a 37 °C. Después de la etapa de bloqueo, las placas se lavaron tres veces con PBS 10 mM pH 7,4, NaCl 1 M que contenía Tween-20 al 0,1 %. Se añadieron muestras y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después, la placa se lavó 3 veces con PBS 10 mM pH 7,4, NaCl 1 M, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM que contenía Tween-20 al 0,1 %. Para todas las etapas de lavado restantes, el tampón de lavado sigue siendo el mismo y durante el tercer lavado, las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de eliminar completamente la solución de lavado. Se añadió anticuerpo policlonal de conejo producido contra Rotavirus (amablemente proporcionado por el Profesor Koki Taniguchi) diluido 1:10000 con BSA al 3 % en PBS 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM que contenía Tween-20 al 0,1 % y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después, las placas se lavaron 3 veces y se añadió anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (111-035-144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluido 1:5000 con BSA al 3 % en PBS 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM que contenía Tween-20 al 0,1 % y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron 3 veces. Después de los lavados finales, las placas se incubaron con sustrato de peroxidasa SureBlue TMB (KPL, Gaithersburg, MD) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y los valores A₄₅₀ se midieron usando un lector de placas (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Producción de partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2 y VP6.

20 Las partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2 y VP6 se produjeron por expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Las plantas se agroinfiltraron con un inóculo de *Agrobacteria* que contenía una mezcla de AGL1/1710 y AGL1/1713 en una proporción 1:1 y se incubaron durante 7 días antes de la cosecha. Las partículas de tipo rotavirus se purificaron a partir de la biomasa usando la metodología descrita en la sección de materiales y métodos. Después de la centrifugación de los extractos aclarados sobre el gradiente de densidad de iodixanol, las primeras diez fracciones del fondo del tubo se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie. Como se muestra en la Figura 45A, los antígenos de rotavirus (VP2 y VP6) se encontraron principalmente en las fracciones 2 y 3 del gradiente de densidad donde la concentración de iodixanol es de aproximadamente el 35 %, una concentración donde se espera que se encuentren partículas de tipo rotavirus. Se encontró muy poca contaminación por proteínas vegetales en estas fracciones. El análisis de transferencia Western de las fracciones con suero de conejo hiperinmune anti-rotavirus y anticuerpos policlonales de conejo anti-VP2 confirmó la identidad de VP2 y VP6 en las fracciones de gradiente de densidad (Figuras 45B y 45C). Las fracciones 2 y 3 se combinaron y el iodixanol se eliminó mediante centrifugación a alta velocidad y resuspensión, y las partículas purificadas se enviaron para su análisis por microscopía crioelectrónica (Nanolmaging Services Inc., La Jolla, CA) para confirmar el ensamblaje de VP2 y VP6 en partículas que se parecen a la partícula de rotavirus. Como se muestra en la Figura 49 (panel izquierdo), las imágenes de microscopía crio-electrónica de las partículas VP2/VP6 confirmaron el ensamblaje correcto de los antígenos en partículas de tipo rotavirus.

Producción de partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2, VP6 y VP7.

40 Las partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2, VP6 y VP7 se produjeron por expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Las plantas se agroinfiltraron con un inóculo de *Agrobacteria* que contenía una mezcla de AGL1/1710, AGL1/1713, AGL1/1734 en una proporción 1:1:1 y se incubaron durante 7 días antes de la cosecha. Las partículas de tipo rotavirus se purificaron a partir de la biomasa usando la metodología descrita en la sección de materiales y métodos. Después de la centrifugación de los extractos aclarados sobre el gradiente de densidad de iodixanol, las primeras diez fracciones del fondo del tubo se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie. Como se muestra en la Figura 46A, los antígenos de rotavirus (VP2, VP6 y VP7) se encontraron principalmente en las fracciones 2 y 3 del gradiente de densidad donde la concentración de iodixanol es de aproximadamente el 35 %, una concentración donde se espera que se encuentren partículas de tipo rotavirus. Se encontró muy poca contaminación por proteínas vegetales en estas fracciones. El análisis de transferencia Western de las fracciones con suero de conejo hiperinmune anti-rotavirus y anticuerpos policlonales de conejo anti-VP7 confirmó la identidad de VP6 y VP7 en las fracciones de gradiente de densidad (Figuras 46B y 46C).

Producción de partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2, VP4, VP6 y VP7.

55 Las partículas de tipo rotavirus que comprenden VP2, VP4, VP6 y VP7 se produjeron por expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Las plantas se agroinfiltraron con un inóculo de *Agrobacteria* que contenía una mezcla de AGL1/1710, AGL1/1730, AGL1/1713, AGL1/1734 en una proporción 1:1:1:1 y se incubaron durante 7 días antes de la cosecha. Las partículas de tipo rotavirus se purificaron a partir de la biomasa usando la metodología descrita en la sección de materiales y métodos. Después de la centrifugación de los extractos aclarados sobre el gradiente de

densidad de iodixanol, las primeras diez fracciones del fondo del tubo se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie. Como se muestra en la Figura 47A, 3 de los 4 antígenos de rotavirus (VP2, VP6 y VP7) fueron visibles y se encontraron principalmente en la fracción 3 del gradiente de densidad donde la concentración de iodixanol es de aproximadamente el 35 %, una concentración donde se espera que se encuentren partículas de tipo rotavirus. Se encontró muy poca contaminación por proteínas vegetales en estas fracciones. Se esperaba la ausencia de un nivel detectable de VP4 en el gel de tinción Coomassie, ya que no se puede observar la VP4 cuando se realiza el mismo análisis en el virión de rotavirus humano purificado. El análisis de transferencia Western de las fracciones con suero de conejo hiperinmune anti-rotavirus y anticuerpos policlonales de conejo anti-VP7 confirmó la identidad de VP6 y VP7 en las fracciones de gradiente de densidad (Figuras 47B y 47C). El iodixanol se eliminó de la fracción 3 mediante centrifugación a alta velocidad y resuspensión, y las partículas purificadas se analizaron por ELISA para confirmar la presencia de VP4. Los resultados presentados en la Figura 48 muestran claramente que el ELISA reconoce específicamente VP4, ya que las partículas de control negativo que comprenden VP2/VP6 y VP7 solo dieron como resultado un nivel de señal de fondo. Por el contrario, el análisis de 3 lotes diferentes de partículas purificadas que comprenden los antígenos VP2, VP4, VP6 y VP7 mostró señales fuertes y uniformes cuando se analizaron en las mismas condiciones. Se enviaron RLP VP2/VP4/VP6/VP7 purificadas para el análisis por microscopía crioelectrónica (Nanolmaging Services Inc., La Jolla, CA) para confirmar el ensamblaje de los cuatro antígenos en partículas que se asemejan a la partícula de rotavirus. Como se muestra en la Figura 49 (panel derecho), las imágenes de microscopía crio-electrónica de las partículas VP2/VP4/VP6/VP7 confirmaron el ensamblaje correcto de los antígenos en partículas de tipo rotavirus.

20

La tabla 6 enumera las secuencias proporcionadas en diversas realizaciones de la invención.

Tabla 6: Descripción de secuencias para identificadores de secuencia.

SEQ ID NO	Descripción	Página/Figura
1	Secuencia de aminoácidos de G9P6_VP2 optimizada	Figura 16A
2	Secuencia de aminoácidos de G9P6_VP4 optimizada	Figura 16B
3	Secuencia de aminoácidos de G9P6_VP6 optimizada	Figura 16C
4	Aminoácido de G9P6_VP7 optimizada	Figura 16D
5	Cebador VP2F	Tabla 1
6	Cebador VP2R	Tabla 1
7	Cebador VP4F	Tabla 1
8	Cebador VP4R	Tabla 1
9	Cebador VP6F	Tabla 1
10	Cebador VP6R	Tabla 1
11	Cebador VP7F	Tabla 1
12	Cebador VP7R	Tabla 1
13	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP2	Figura 16A
14	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP2 optimizada	Figura 16A
15	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP4	Figura 16B
16	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP4	Figura 16B
17	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP6	Figura 16C
18	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP6 optimizada	Figura 16C
19	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP7	Figura 16D
20	Secuencia de nucleótidos de G9P6_VP7	Figura 16D
21	Cebador IF-WA_VP2(opt).s1+3c	Figura 17A
22	Cebador IF-WA_VP2(opt).s1-4r	Figura 17B
23	Construcción 1191 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina	Figura 18
24	Casete de expresión número 1733 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A.	Figura 34C
25	Secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa WA de Rotavirus A	Figura 20
26	Construcción 193 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina	Figura 22B

SEQ ID NO	Descripción	Página/Figura
27	Casete de expresión número 1710 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP2(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.	Figura 23
28	Cebador IF-WA_VP6(opt).s1+3c	Figura 25a
29	Cebador IF-WA_VP6(opt).s1-4r	Figura 25b
30	Casete de expresión número 1713 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.	Figura 25c
31	Secuencia de aminoácidos de VP6 de la cepa WA de Rotavirus A	Figura 26
32	Casete de expresión número 1714 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.	Figura 28
33	Cebador IF-Rtx_VP4(opt).s1+3c	Figura 30A
34	Cebador IF-Rtx_VP4(opt).s1-4r	Figura 30B
35	Casete de expresión número 1731 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP4(opt) de la cepa Rotarix de Rotavirus A.	Figura 31A
36	Secuencia de aminoácidos de VP4 de la cepa Rotarix de rotavirus A	Figura 32
37	Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1+3c	Figura 34A
38	Cebador IF-Rtx_P7(opt).s1-4r	Figura 34B
39	Secuencia de aminoácidos de VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A	Figura 35
40	Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s2+4c	Figura 37A
41	Construcción 1192 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina	Figura 39
42	Casete de expresión número 1735 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la PDISP/VP7(opt) de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A.	Figura 40A
43	Secuencia de aminoácidos de PDISP/VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A	41
44	Casete de expresión número 1730 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP4(opt) de la cepa Rotarix de Rotavirus A.	Figura 31C
45	Secuencia de nucleótidos que codifica VP2(opt) de la cepa WA de Rotavirus A	Figura 19
46	Secuencia de nucleótidos que codifica VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A	Figura 25d
47	Secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8]	Figura 31 B
48	Secuencia de nucleótidos que codifica VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A	Figura 34D
49	Secuencia de nucleótidos que codifica PDISP/VP7(opt) de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A	Figura 40B
50	Secuencia de codificación de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2]	Figura 43A
51	Secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2]	Figura 43B
52	Secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2]	Figura 43C
53	Secuencia de codificación de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA 11-H96/195 8/G3P5B [2]	Figura 43D
54	Secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8]	Figura 34E
55	Cebador IF-TrSP+Rtx_VP7(opt).s1+3c	Figura 44A
56	Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r	Figura 44B
57	Secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P 1A[8]	Figura 44C
58	Casete de expresión número 1734 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A.	Figura 44D

SEQ ID NO	Descripción	Página/Figura
59	Secuencia de aminoácidos de TrSp-VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/11988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A	Figura 44E

Bibliografía

- 5 Yang Y M, Li X, Yang H, et al. Immunogenicity and virus-like particle formation of rotavirus capsid produced in transgenic plants. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 82-89
- Angel, J., Franco, M.A. and Greenberg, H.B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature reviews: Microbiology* 5, 529-539
- Araujo, I.T., Ferreira, M.S.R. and Failho, A.M. (2001). Rotavirus genotypes [4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 39 1999-2001.
- 10 Arias, C.F., Ballado, T. and Plebafiski, M. (1986). Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene* 47, 211-219
- Au K.S., Mattion N.M., Estes M.K., (1993). A Subviral Particle Binding Domain on the Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NS28. *Virology* 194, 665-67
- 15 Balen B, Krsnik-Rasol M, (2007). N-glycosylation of recombinant therapeutic glycoproteins in plant systems. *Food Technology and Biotechnology* 45 1-10.
- Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L. and Lerouge P. (2003). Immunoreactivity in mammals of two typical plant glycoepitopes, core alpha (1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* 13 427-434
- 20 Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D. and Cohen, J. (2003). Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2. *Journal of virology* 77, 1757
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S.E., Conner, M.E. and Estes, M.K. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21, 3885-3900
- 25 Chen, J.Z., Settembre, E.C., Aoki, A.T., Zhang, X., Bellamy, A.R., Dormitzer, P.R., Harrison, S.C. and Grigorieff, N. (2009). Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *PNAS* 106, 10644-10648
- Crawford, S.E., Estes, M.K., Ciarlet, M., Barone, C., O'Neal, C.M., Cohen, J. and Conner, M.E. (1999). Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *Journal of Virology* 73, 4813- 4822
- 30 Crawford, S.E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M.H., Zhou, Y.J. and Estes, M.K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of virology* 68, 5945-5952
- Denisova, E.R., Dowling, W., LaMonica, R., Shaw, R., Scarlata, S., Ruggeri, F. and Mackow, E.R. (1999). Rotavirus Capsid Protein VP5* Permeabilizes Membranes. *Journal of Virology* 73 3147-3153
- 35 Dennehy, P.H. (2007). Rotavirus vaccines - An update. *Vaccine* 25, 3137-3141
- Estes M.K (1996). Rotavirus and their replication. *Fields Virology* 2, 1625-1655 Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. and Burrone, O.R. (1999). Two nonstructural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 333-9.
- 40 Favacho, A.R., Kurtenbach, E., Sardi, S.I. and Gouvea, V.S. (2006). Cloning, expression, and purification of recombinant bovine rotavirus hemagglutinin, VP8*, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 46, 196-203
- Gentsch, J.R., Laird, A.R., Bielfelt, B., Griffin, D.D., Bányai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., Kirkwood, C.D., Fischer, T.K., Parashar, U.D., Bresee, J.S., Jiang, B. and Glass, R.I. (2005). Serotype Diversity and Reassortment between Human and Animal Rotavirus Strains: Implications for Rotavirus Vaccine Programs *J Infect Dis*. 192 , S146-59
- 45 Glass, R.I., Parashar, U.D., Bresee, J.S., Turcios, R., Fischer, T.K., Widdowson, MA., Jiang, B. and Gentsch, J.R. (2006). Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet* 368, 323-32
- Gonzalez, A.M., Nguyen, T.V., Azevedo, M.S. P., Jeong, K., Agarib, F., Iosef, C., Chang, K., Lovgren-Bengtsson, K., Morein, B. and Saif, L.J. (2004). Antibody responses to human rotavirus (HRV) in gnotobiotic pigs following a new prime/boost vaccine strategy using oral attenuated HRV priming and intranasal VP2/6 rotavirus-like particle (VLP) boosting with ISCOM. *Clinical & Experimental Immunology* 135 361-372
- 50 Gonzalez, R.A., Espinosa, R., Romero, P., López, S. and Arias C.F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Archives of Virology* 145, 1963-1973
- 55 Greenberg, H.B. and Estes, M.K. (2009). Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*

136, 1939-1951

Hoshino, Y., Jones, R.W. and Kapikian, A.Z. (1998). Serotypic characterization of outer capsid spike protein VP4 of vervet monkey rotavirus SA11 strain. *Archives of Virology* 143, 1233-1244

5 Istrate, C., Hinkula, J., Charpilienne, A., Poncet, D., Cohen, J., Svensson, L. and Johansen, K. (2008). Parenteral administration of RF 8-2/6/7 rotavirus-like particles in a one-dose regimen induce protective immunity in mice. *Vaccine* 26, 4594-4601

Khodabandehloo, M., Shamsi, S.M., Shahrabadi, Keyvani, H. and Bambai, B. (2009). Cloning and Expression of Simian Rotavirus Spike Protein (VP4) in Insect Cells by Baculovirus Expression System. *Iranian Biomedical Journal* 13 9-18

10 Kim, Y., Nielsen, P.R., Hodgins, D., Chang, K.O. and Saif, L.J. (2002). Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. *Vaccine* 20, 1248-1258

Kovacs-Nolan J., Erika Sasaki, Dongwan Yoo, Yoshinori Mine, Cloning and Expression of Human Rotavirus Spike Protein, VP8*, in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1183-1188

15 Lawton, J.A., Estes, M.K. and Venkataram, P.B.V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Advances in Virus Research* 55, 185-214

Lopez, T., Camacho M., Zayas M., Najera R., Sanchez R., Arias C. F. and Lopez S. (2005). Silencing the Morphogenesis of Rotavirus. *Journal of Virology* 79, 184-92

20 Lundgren, O. and Svensson, L. (2001). Pathogenesis of Rotavirus diarrhoea. *Microbes and Infection* 3 1145-1156

Madore, H.P., Estes, M.K., Zarley, C.D., Hu, B., Parsons, S., Digravio, D., Greiner, S., Smith, R., Jiang, B., Corsaro, B., Barniak, V., Crawford, S. and Conner, M.E. (1999). Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for a rotavirus subunit vaccine. *Vaccine* 17, 2461-2471

25 Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., Benvenuto, E. and Capone, I. (2001). Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 75, 8434-8439.

Matsumura, T., Itchoda, N. and Tsunemitsu, H. (2002). Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Archives of Virology* 147, 1263-1270

30 Mena, J.A., Ramírez, O.T. and Palomares, L.A. (2006). Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cellbaculovirus system. *Journal of Biotechnology* 122, 443-452

Meyer, J.C., Bergmann, C.C. and Bellamy, A.R. (1989). Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 171, 98-107

35 Molinari, P., Peralta, A. and Taboga, O. (2008). Production of rotavirus-like particles in *Spodoptera frugiperda* larvae. *Journal of Virological Methods* 147, 364-367

Nilsson, M., von Bonsdorff, C.H., Weclawicz, K., Cohen, J. and Svensson, L. (1998). Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon. *Virology* 242, 255-265

40 Nishikawa, K., Fukuhara, N., Liprandi, F., Green, K., Kapikian, A., Chanock, R. and Gorziglia, M. (1989). VP4 protein of porcine rotavirus strain OSU expressed by a baculovirus recombinant induces neutralizing antibodies. *Virology* 173, 631-637

O'Brien, G.J., Bryant, C.J., Voogd, C., Greenberg, H.B., Gardner, R.C. and Bellamy, A.R. (2000). Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus-like particles. *Virology* 270, 444-453

45 Palombo, E.A. (1999). Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on the success of candidate vaccines. *FEMS Microbiology Letters* 181, 1-8

Palomares, L.A. and Ramirez, O.T. (2009). Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. *BiochemicalEngineering Journal* 45(3), 158-167

50 Peralta, A., Molinari, P. and Taboga, O. (2009). Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes. *Virology Journal* 6, 192

Ramachandran, M., Kirkwood, C.D., Unicomb, L., Cunliffe, N.A., Ward, R.L., Bhan, M.K., Clark, H.F., Glass, R.I. and Gentsch, J.R. (2000). Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology* 278, 436-444

55 Ribes, J.M., Ortego, J., Ceriani, J., Montava, R., Enjuanes, L. and Buesa, J. (2011). Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)-based vectors with engineered murine tropism express the rotavirus VP7 protein and immunize mice against rotavirus. *Virology* 410 107-118

Rodriguez-Limas, W.A., Tyo, K.E.J., Nielsen, J., Ramírez, O.T. and Palomares, L.A. (2011). Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 10, 33

Saldana, S., Esquivel Guadarrama, F., Olivera Flores Tde, J., Arias, N., Lopez, S., Arias, C., Ruiz-Medrano,

R., Mason, H., Mor, T., Richter, L., Arntzen, C.J. and Gomez Lim, M.A. (2006). Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunology* 19, 42-53

5 Sanchez-Padilla, E., Grais, R.F., Guerin, P.J., Steele, A.D., Burny, M.E. and Luquero, F.J. (2009). Burden of disease and circulating serotypes of rotavirus infection in sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* 9, 567-576.

Steele, A.D., Ivanoff, B. and African Rotavirus Network (2003). Rotavirus strains circulating in Africa during 1996-1999: emergence of G9 strains and P[6] strains. *Vaccine* 21, 361-367

10 Tian, P., Ball, J.M., Zeng, C.Q.Y. and Estes, M.K. (1996). The Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4 Possesses Membrane Destabilization Activity. *Journal of Virology* 70, 6973-6981

Thongprachum, A., Chaimongkol, N., Khamrin, P., Pantip, C., Mizuguchi, M., Ushijima, H. and Maneekarn, N. (2010). A novel multiplex RT-PCR for identification of VP6 subgroups of human and porcine rotaviruses, *Journal of Virological Methods*, 168, 191-196

15 Trabelsi, A., Peenze, I., Pager, C., Jeddi, M. and Steele, D. (2000). Distribution of Rotavirus VP7 Serotypes and VP4 Genotypes Circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 to 1999: Emergence of Natural Human Reassortants. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3415-3419

Varani, G. and Allain, F.H-T. (2002). How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nature Structural Biology* 9, 158 _ 160.

Vende, P., Taraporewala, Z.F. and Patton, J.T. (2002). RNA-Binding Activity of the Rotavirus Phosphoprotein NSP5 Includes Affinity for Double-Stranded RNA. *Journal of Virology* 76, 5291-5299.

20 Vesikari, T., Karvonen, A., Korhonen, T., Espo, M., Lebacqz, E., Forster, J., Zepp, F., Delem, A. and De Vos, B. (2004). Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. *Vaccine* 22, 2836-2842

Vézina, L.-P., Faye, L., Lerouge, P., D'Aoust, M.-A., Marquet-Blouin, E., Burel, C., Lavoie, P.-O., Bardor, M. and Gomord, V. (2009), Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7, 442-455.

25 Zhou, B., Zhang, Y., Wang, X., Dong, J., Wang, B., Han, C., Yu, J., Li, D. (2010). Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice. *Vaccine* 28, 6021-6027

30 Zhou, H., Guo, L., Wang, M., Qu, J., Zhao, Z., Wang, J. and Hung, T. (2011). Prime immunization with rotavirus VLP 2/6 followed by boosting with an adenovirus expressing VP6 induces protective immunization against rotavirus in mice. *Virology Journal* 8, 3

LISTA DE SECUENCIAS

- 35 <110> Medicago Inc. Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation
- <120> Producción de partículas de tipo Rotavirus en plantas
- 40 <130> V84653WO
- <150> US 61/646.058
- <151> 11-05-2012
- 45 <160> 59
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 50 <211> 884
- <212> PRT
- <213> *Nicotiana tabacum*
- <400> 1

ES 2 658 987 T3

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

ES 2 658 987 T3

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

ES 2 658 987 T3

Val Val Pro Asn Asp Met Phe Ile Arg Glu Ser Leu Val Ala Cys Gln
 420 425 430

Leu Ala Ile Val Asn Thr Ile Ile Tyr Pro Ala Phe Gly Met Gln Arg
 435 440 445

Met His Tyr Arg Asn Gly Asp Pro Gln Thr Pro Phe Gln Ile Ala Glu
 450 455 460

Gln Gln Ile Gln Asn Phe Gln Val Ala Asn Trp Leu His Phe Val Asn
 465 470 475 480

Asn Asn Gln Phe Arg Gln Ala Val Ile Asp Gly Val Leu Asn Gln Val
 485 490 495

Leu Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly His Val Ile Asn Gln Leu Met Glu
 500 505 510

Ala Leu Met Gln Leu Ser Arg Gln Gln Phe Pro Thr Met Pro Ile Asp
 515 520 525

Tyr Lys Arg Ser Ile Gln Arg Gly Ile Leu Leu Leu Ser Asn Arg Leu
 530 535 540

Gly Gln Leu Val Asp Leu Thr Arg Leu Leu Ala Tyr Asn Tyr Glu Thr
 545 550 555 560

Leu Met Ala Cys Ile Thr Met Asn Met Gln His Val Gln Thr Leu Thr
 565 570 575

Thr Glu Lys Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Ser Leu Cys Met Leu Ile
 580 585 590

Gly Asn Ala Thr Val Ile Pro Ser Pro Gln Thr Leu Phe His Tyr Tyr
 595 600 605

Asn Val Asn Val Asn Phe His Ser Asn Tyr Asn Glu Arg Ile Asn Asp
 610 615 620

Ala Val Ala Ile Ile Thr Ala Ala Asn Arg Leu Asn Leu Tyr Gln Lys
 625 630 635 640

Lys Met Lys Ala Ile Val Glu Asp Phe Leu Lys Arg Leu Tyr Ile Phe
 645 650 655

Asp Val Ser Arg Val Pro Asp Asp Gln Met Tyr Arg Leu Arg Asp Arg
 660 665 670

ES 2 658 987 T3

Leu Arg Leu Leu Pro Val Glu Ile Arg Arg Leu Asp Ile Phe Asn Leu
675 680 685

Ile Leu Met Asn Met Asp Gln Ile Glu Arg Ala Ser Asp Lys Ile Ala
690 695 700

Gln Gly Val Ile Ile Ala Tyr Arg Asp Met His Leu Glu Arg Asp Glu
705 710 715 720

Met Tyr Gly Tyr Val Asn Ile Ala Arg Asn Leu Glu Gly Phe Gln Gln
725 730 735

Ile Asn Leu Glu Glu Leu Met Arg Ser Gly Asp Tyr Ala Gln Ile Thr
740 745 750

Asn Met Leu Leu Asn Asn Gln Pro Val Ala Leu Val Gly Ala Leu Pro
755 760 765

Phe Ile Thr Asp Ser Ser Val Ile Ser Leu Ile Ala Lys Leu Asp Ala
770 775 780

Thr Val Phe Ala Gln Ile Val Lys Leu Arg Lys Val Asp Thr Leu Lys
785 790 795 800

Pro Ile Leu Tyr Lys Ile Asn Ser Asp Ser Asn Asp Phe Tyr Leu Val
805 810 815

Ala Asn Tyr Asp Trp Val Pro Thr Ser Thr Thr Lys Val Tyr Lys Gln
820 825 830

Val Pro Gln Gln Phe Asp Phe Arg Asn Ser Met His Met Leu Thr Ser
835 840 845

Asn Leu Thr Phe Thr Val Tyr Ser Asp Leu Leu Ala Phe Val Ser Ala
850 855 860

Asp Thr Val Glu Pro Ile Asn Ala Val Ala Phe Asp Asn Met Arg Ile
865 870 875 880

Met Asn Glu Leu

<210> 2

<211> 380

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

5

ES 2 658 987 T3

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

ES 2 658 987 T3

245

250

255

Phe Asn Pro Asn Asn Gly His Glu Tyr Tyr Glu Ile Ala Gly Arg Phe
 260 270

Ser Leu Ile Ser Leu Val Pro Ser Asn Asp Asp Tyr Gln Thr Pro Ile
 275 285

Met Asn Ser Val Thr Val Arg Gln Asp Leu Glu Arg Gln Leu Gly Asp
 290 300

Leu Arg Glu Glu Phe Asn Ser Leu Ser Gln Glu Ile Ala Met Thr Gln
 305 310 315 320

Leu Ile Asp Leu Ala Leu Leu Pro Leu Asp Met Phe Ser Met Phe Ser
 325 330 335

Asn Tyr Gly Ile Thr Arg Ser Gln Ala Leu Asp Leu Ile Arg Ser Asp
 340 345 350

Pro Arg Val Leu Arg Asp Phe Ile Asn Gln Asn Asn Pro Ile Ile Lys
 355 360 365

Asn Arg Ile Glu Gln Leu Ile Leu Gln Cys Arg Leu
 370 375 380

<210> 3
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

5

<400> 3
 Gly Arg Val Arg Ser Met Asp Val Leu Tyr Ser Leu Ser Lys Thr Leu
 1 5 10 15

Lys Asp Ala Arg Asp Lys Ile Val Glu Gly Thr Leu Tyr Ser Asn Val
 20 25 30

Ser Asp Leu Ile Gln Gln Phe Asn Gln Met Ile Ile Thr Met Asn Gly
 35 40 45

Asn Glu Phe Gln Thr Gly Gly Ile Gly Asn Leu Pro Ile Arg Asn Trp
 50 55 60

Asn Phe Asp Phe Gly Leu Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Ala
 65 70 75 80

Asn Tyr Val Glu Thr Ala Arg Asn Thr Ile Asp Tyr Phe Val Asp Phe

ES 2 658 987 T3

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

ES 2 658 987 T3

Glu Ser Val Leu Ala Asp Ala Ser Glu Thr Met Leu Ala Asn Val Thr
 340 345 350

Ser Val Arg Gln Glu Tyr Ala Ile Pro Val Gly Pro Val Phe Pro Pro
 355 360 365

Gly Met Asn Trp Thr Asp Leu Ile Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Arg Glu
 370 375 380

Asp Asn Leu Gln Arg Val Phe Thr Val Ala Ser Ile Arg Ser Met Leu
 385 390 395 400

Val Lys

<210> 4

<211> 331

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 4

Gly Arg Val Arg Cys Met Tyr Gly Ile Glu Tyr Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Phe Leu Ile Ser Ile Val Leu Leu Asn Tyr Ile Leu Lys Ser Leu Thr
 20 25 30

Ser Ala Met Asp Phe Ile Ile Tyr Arg Phe Leu Leu Leu Ile Val Ile
 35 40 45

Ala Ser Pro Phe Val Lys Thr Gln Asn Tyr Gly Ile Asn Leu Pro Ile
 50 55 60

Thr Gly Ser Met Asp Thr Ala Tyr Ala Asn Ser Ser Gln Gln Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Ser Thr Leu Cys Leu Tyr Tyr Pro Thr Glu Ala Ser Thr
 85 90 95

Gln Ile Gly Asp Thr Glu Trp Lys Asp Thr Leu Ser Gln Leu Phe Leu
 100 105 110

Thr Lys Gly Trp Pro Thr Gly Ser Val Tyr Phe Lys Glu Tyr Thr Asp
 115 120 125

Ile Ala Ser Phe Ser Ile Asp Pro Gln Leu Tyr Cys Asp Tyr Asn Val
 130 135 140

5

ES 2 658 987 T3

Val Leu Met Lys Tyr Asp Ser Thr Leu Glu Leu Asp Met Ser Glu Leu
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Ile Leu Asn Glu Trp Leu Cys Asn Pro Met Asp Ile Thr
 165 170 175

Leu Tyr Tyr Tyr Gln Gln Thr Asp Glu Ala Asn Lys Trp Ile Ser Met
 180 185 190

Gly Gln Ser Cys Thr Ile Lys Val Cys Pro Leu Asn Thr Gln Thr Leu
 195 200 205

Gly Ile Gly Cys Ile Thr Thr Asn Thr Ala Thr Phe Glu Glu Val Ala
 210 215 220

Thr Ser Glu Lys Leu Val Ile Thr Asp Val Val Asp Gly Val Asn His
 225 230 235 240

Lys Leu Asp Val Thr Thr Asn Thr Cys Thr Ile Arg Asn Cys Lys Lys
 245 250 255

Leu Gly Pro Arg Glu Asn Val Ala Ile Ile Gln Val Gly Gly Ser Asp
 260 265 270

Val Leu Asp Ile Thr Ala Asp Pro Thr Thr Ala Pro Gln Thr Glu Arg
 275 280 285

Met Met Arg Val Asn Trp Lys Lys Trp Trp Gln Val Phe Tyr Thr Val
 290 295 300

Val Asp Tyr Ile Asn Gln Ile Val Gln Val Met Ser Lys Arg Ser Arg
 305 310 315 320

Ser Leu Asn Ser Ala Ala Phe Tyr Tyr Arg Val
 325 330

5 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador VP2F
 <400> 5

ttccatggct taccgtaaaa gg 22

15 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador VP2R

 <400> 6
 5 atgCGGCCGC aagctcgTTC ataatcctca TG 32

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador VP4F

 <400> 7
 15 ttccatggct tccctcatct ac 22

 <210> 8
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador VP4R

 <400> 8
 25 atgCGGCCGC aagacggcac Tggagaatga G 31

 <210> 9
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador VP6F

 <400> 9
 35 ttccatggat gTgcttact c 21

 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador VP6R

 <400> 10
 50 atgCGGCCGC cTtcacgagc atggaacg 28

 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador VP7F

 <400> 11

ES 2 658 987 T3

gtacatgtac ggaatcgagt ac 22

5 <210> 12
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador VP7R

<400> 12
 atgCGGCCGC cacacggtag tagaaagcag c 31

15 <210> 13
 <211> 2700
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 13
 ggtaccgaat tcggacgcgt tcgttccatg gcttaccgta aaaggggtgc taggcgtgaa 60
 gctaacctca acaacaacga taggatgcaa gagaagatcg atgagaagca ggattccaac 120
 aagatccagc tctccgataa ggtgctctcc aagaaagaag agatcgttac tgattcccac 180
 gaagaggtga aggtgacaga tgagcttaag aagtccacaa aagaagagtc caagcagctc 240
 cttgaggtgc tcaagacaaa agaggaacac cagaaagaga tccagtacga gatcctccaa 300
 aagactatcc caactttcga gccaaaagag actatcctca ggaagcttga ggatatccag 360
 ccagagcttg ctaagaagca gactaagctc ttcaggatct tcgagccaaa gcagctccca 420
 atctaccgtg ctaacggtga aaggaactt aggaacaggt ggtactggaa gctcaagaag 480
 gatactctcc cagacggtga ttacgatgtg agagagtact tcctcaacct ctacgatcag 540
 gtgctcactg agatgccaga ttacctctc ctcaaggata tggctgtgga gaacaagaac 600
 tccagggatg ctggaaaggt ggtggattcc gagactgctt ccatctgtga tgctatcttc 660
 caggatgaag agactgagg tgctgtgagg cgtttcattg ctgagatgag gcagagggtt 720
 caggctgata ggaacgtggt gaactacca tccatcctcc acccaatcga ttacgctttc 780
 aacgagtact tccttcagca ccagcttgtg gagccactca acaacgatat catcttcaac 840
 tacatcccag agaggattag gaacgacggt aactacatcc tcaacatgga taggaacctc 900
 ccatccactg ctogttacat caggccaaac ctctccagg ataggctcaa cctccacgat 960
 aacttcgagt ccctctggga tacaactact acttccaact acattctcgc tcgttccgtg 1020
 gtgccagatc tcaaagaact cgtgtccact gaggctcaga tccagaagat gtcccaggat 1080
 ctccagcttg aggctctcac tatccagtcc gagactcagt tcctcactgg tatcaactcc 1140
 20 caggctgcta acgattgctt caagactctc attgctgcta tgctctcca gaggactatg 1200

ES 2 658 987 T3

tccctcgatt tcgtgactac taactatatg tccctcatct ccggaatgtg gctcttgact 1260
 gtggtgccaa acgatatggt catccgtgag tcccttgtgg cttgccagct cgctatcgtg 1320
 aacctatca tctaccagc tttcggaatg caaaggatgc actaccgtaa cggatgatcca 1380
 cagactccat tccagatcgc agagcagcag atccagaact tccaggtggc aaactggctc 1440
 cacttcgtga acaacaacca gttcaggcag gctgtgatcg atggtgtggt gaaccagggtg 1500
 ctcaacgata acatccgtaa cggtcacgtg atcaaccagc tcatggaagc tctcatgcaa 1560
 ctctccaggc agcagttccc aactatgcct atcgattaca agcgttccat ccagagggga 1620
 atcctcctcc tttccaacag gcttgacag ctcgtggatc tcaactaggct cctcgttac 1680
 aactacgaga ctctcatggc ttgcatcact atgaacatgc agcacgttca gactctcact 1740
 actgagaagc tccagctcac ttccgtgact tccctctgca tgetcatcgg aaacgctact 1800
 gtgatcccat cccacagac actcttccac tactacaacg tgaacgtgaa cttccactcc 1860
 aactacaacg agaggatcaa cgatgctgtg gctatcatca ctgctgctaa caggcttaac 1920
 ctctaccaa aagaatgaa ggctatcgtt gaggatttcc tcaagaggct ctacatcttc 1980
 gatgtgtcca ggtgcccaga tgatcagatg taccgtctta gggataggct taggctcctc 2040
 ccagtggaga tcagaaggct cgatatcttc aacctcatcc ttatgaacat ggatcagatc 2100
 gagagggctt ccgataagat cgctcagggt gttattatcg cttaccgtga tatgcacctt 2160
 gagagggatg agatgtacgg atacgtgaac attgctagga accttgaggg attccagcag 2220
 atcaaccttg aagagcttat gcgttccggt gattacgctc agatcactaa catgctcctc 2280
 aacaaccagc cagtggctct tggtggtgct ctcccattca tcaactgattc ctccgtgatc 2340
 tccctcattg ctaagttgga tgctactgtg ttcgctcaga tcgtgaagct caggaaagtg 2400
 gatactctca agccaatcct ctacaagatc aactccgatt ccaacgattt ctacctcgtg 2460
 gctaactacg attgggtgcc aacttccact acaaagggtg acaagcaggt gccacagcag 2520
 ttcgatttcc gtaactccat gcacatgctc acttccaacc tcactttcac tgtgtactcc 2580
 gatctcctcg ctttcgtgct cgctgatact gtggagccta tcaacgctgt ggctttcgat 2640
 aacatgagga ttatgaacga gctttgatga ctcgagggat cctctagaga attcgagctc 2700

<210> 14
 <211> 2700
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 14
 ccattggctta agcctgcgca agcaaggtag cgaatggcat tttcccacg atccgcactt 60
 cgattggagt tggtgttgc atcctacgtt ctcttctagc tactcttctg cctaagggtg 120
 ttctaggtcg agaggctatt ccacgagagg ttctttcttc tctagcaatg actaagggtg 180

5

ES 2 658 987 T3

cttctccact tccactgtct actcgaattc ttcaggtggt ttcttctcag gttcgtcgag 240
 gaactccacg agttctgttt tctccttgtg gtctttctct aggtcatgct ctaggaggtt 300
 ttctgatagg gttgaaagct cggttttctc tgataggagt ccttcgaact cctataggtc 360
 ggtctcgaac gattcttcgt ctgattcgag aagtcctaga agctcggttt cgtcaggggt 420
 tagatggcac gattgccact ttccttgaa tccttgtcca ccatgacctt cgagttcttc 480
 ctatgagagg gtctgccact aatgctacac tctctcatga aggagttgga gatgctagtc 540
 cacgagtgc tctacggtct aatggaggag gagttcctat accgacacct cttgttcttg 600
 aggtccctac gacctttcca ccacctaagg ctctgacgaa ggtagacact acgatagaag 660
 gtcctacttc tctgactccc acgacactcc gcaaagtaac gactctactc cgtctcccaa 720
 gtccgactat ccttgcacca cttgatgggt aggtaggagg tgggttagct aatgcgaaag 780
 ttgctcatga aggaagtcgt ggtcgaacac ctccggtgagt tgttgctata gtagaagttg 840
 atgtagggtc tctcctaata cttgctgcaa ttgatgtagg agttgtacct atccttgagg 900
 ggtaggtgac gagcaatgta gtccggtttg gaggaggtcc tatccgagtt ggaggtgcta 960
 ttgaagctca gggagaccct atgttagtga tgaaggttga tgtaagagcg agcaaggcac 1020
 cacggtctag agtttcttga gcacaggtga ctccgagtct aggtcttcta cagggtccta 1080
 gaggtcgaac tccgagagtg ataggtcagg ctctgagtca aggagtgacc atagttgagg 1140
 gtccgacgat tgctaacgaa gttctgagag taacgacgat acgagaggggt ctctgatac 1200
 agggagctaa agcactgatg attgatatac agggagtaga ggccttacac cgagaactga 1260
 caccacggtt tgctatacaa gtaggcactc agggaaacacc gaacggtcga gcgatagcac 1320
 ttgtgatagt agatgggtcg aaagccttac gtttctctacg tgatggcatt gccactaggt 1380
 gtctgaggta aggtctagcg tctcgtcgtc taggtcttga aggtccaccg tttgaccgag 1440
 gtgaagcact tgttgttggt caagtccgtc cgacactagc taccacacaa cttggtccac 1500
 gagttgctat tgtaggcatt gccagtgcac tagttggtcg agtaccttcg agagtacgtt 1560
 gagaggtccg tcgtcaaggg ttgatacggga tagctaattgt tcgcaaggta ggtctccoct 1620
 taggaggagg aaaggttgtc cgaacctgtc gagcacctag agtgatccga ggagcgaatg 1680
 ttgatgctct gagagtaccg aacgtagtga tacttgtacg tcgtgcaagt ctgagagtga 1740
 tgactcttcg aggtcgagtg aaggcactga agggagacgt acgagtagcc tttgcatga 1800
 cactagggta ggggtgtctg tgagaagggt atgatgttgc acttgactt gaaggtgagg 1860
 ttgatgttgc tctcctagtt gctacgacac cgatagtagt gacgacgatt gtccgaattg 1920
 gagatggttt tcttctactt ccgatagcaa ctccctaaagg agttctccga gatgtagaag 1980
 ctacacaggt cccacggtct actagtctac atggcagaat ccctatccga atccgaggag 2040

ES 2 658 987 T3

ggtcacctct agtcttccga gctatagaag ttggagtagg aatacttgta cctagctctag 2100
ctctcccga ggctattcta gcgagtccca caataatagc gaatggcact atacgtggaa 2160
ctctccctac tctacatgcc tatgcacttg taacgatcct tggaactccc taaggtcgtc 2220
tagttggaac ttctcgaata cgcaaggcca ctaatgcgag tctagtgatt gtacgaggag 2280
ttgttggtcg gtcaccgaga acaaccacga gagggtaagt agtgactaag gaggcactag 2340
agggagtaac gattcaacct acgatgacac aagcgagtct agcacttcga gtcctttcac 2400
ctatgagagt tccggttagga gatgttctag ttgaggctaa ggttgctaaa gatggagcac 2460
cgattgatgc taaccacagg ttgaagggtga tgtttccaca tgttcgtcca cgggtcgtc 2520
aagctaaagg cattgaggta cgtgtacgag tgaagggtgg agtgaaagtg acacatgagg 2580
ctagaggagc gaaagcacag gcgactatga cacctcggat agttgcgaca ccgaaagcta 2640
ttgtactcct aatacttgct cgaaactact gagctcccta ggagatctct taagctcgag 2700

<210> 15
<211> 2388
<212> **ADN**
<213> Rotavirus

5

<400> 15
ggtagcgaat tcggacgcgt tcgttccatg gcttccctca tctaccgtca gttgctcact 60
aactcctaca ctgtggagct ttccgatgag atcaacacta tcggttccga gaagtcccag 120
aacgtgacta tcaaccacag accattcgtc cagactaact acgctccagt gacttggtca 180
cacggtgaag tgaacgattc cactactatc gagccagtgc tcgatggacc ataccagcca 240
actaacttca agccaccaa cgattactgg atttctctca acccaactaa ccagcaggtg 300
gtgcttgagg gaactaaca gactgatatc tgggtggcac tccttcttgt ggagccaaac 360
gtgactaacc agtccaggca gtacactctc ttcggagaga ctaagcagat cactgtggag 420
aacaacacta acaagtggaa gttcttcgag atgttcaggt ccaacgtgaa cgctgagttc 480
cagcacaaga ggactctcac ttccgataca aagctcgtcg gttttatgaa gttctacaac 540
tctgtgtgga ctttccacgg tgaactcca cacgctacta ctgattactc ctccacttcc 600
aacctttccg aggtggagac tgtgatccac gtggagttct acatcatccc aaggtcccaa 660
gagtctaagt gctccgagta catcaacact ggactcccac caatgcaaaa cactaggaac 720
atcgtgccag tggctttgtc ctctcgttcc gtgacttacc agagggctca ggtgaacgag 780
gatatcatca tctccaagac ttccctctgg aaagagatgc agtacaacag ggatattatc 840
atcaggttca agttcaaca ctccatcgtg aagctcggag gactcggata caagtggagt 900
gagatctcct tcaaggctgc taactaccag tactcctacc tcagggatgg tgaacaggtg 960
acagctcaca ctacttctc cgtagaacgg gttaacaact tctcctacaa cgggtggttcc 1020

ES 2 658 987 T3

ctcccaactg atttctccgt gtcccgttac gaggtgatca aagagaactc ctacgtttac 1080
 gtggattact gggatgattc ccaggctttc aggaacatgg tgtatgtag atccctcgct 1140
 gctaacctca actccgtgaa gtgctccggg ggaaactaca acttccagat cccagtggga 1200
 gcttggccag tgatgtctgg tggagctgtg tctctccact tcgctggtgt tacactctcc 1260
 actcagttca ctgatttcgt gtccctcaac tccctcaggt tcaggttctc cctcactgtg 1320
 gaagagccac cattctccat cctcaggact aggggtgtccg gactttacgg actcccagct 1380
 ttcaacccea acaacggaca cgagtactac gagatcgctg gacgtttctc ccttatctcc 1440
 ctcgtgccat ccaacgatga ttaccagact ccaattatga actccgtgac tgtgaggcag 1500
 gatcttgaga ggcagctcgg agatctcagg gaagagttca actccctctc ccaagagatc 1560
 gctatgactc agctcatcga tctcgtctc ctcccactcg atatgttctc catgttctct 1620
 ggtatcaagt ccactatcga tgtggctaag tctatggtga ctaaggatgat gaagaagttc 1680
 aagaagtccg gactcgtac ttccatctcc gagcttactg gatctctctc caacgctgct 1740
 tcttctgtgt ctaggtcctc ctccatcagg tccaacatct cctccatctc agtgtggact 1800
 gatgtgtccg agcagatcgc tggatcttcc gattccgtgc gtaacatctc cactcagact 1860
 tccgctatct ccaagaggct taggctcaga gagatcacta ctcagactga gggaatgaac 1920
 ttcgatgata tctccgctgc tgtgctcaag actaagatcg ataggtccac tcacatctcc 1980
 ccagatactc tcccagatat catcactgag tcctccgaga agttcatccc aaagcgtgct 2040
 taccgtgttc tcaaggatga tgaggatgat gaagctgatg tggatggaaa gttcttcgct 2100
 tacaaagtgg gaactttcga agaggtgccca ttcgatgtgg ataagttcgt ggatctcgtg 2160
 actgattccc cagtgatctc cgctatcatc gatttcaaga ctctcaagaa cctcaacgat 2220
 aactacggaa tcaactaggtc ccaggctctc gatctcatcc gttccgatcc aagggtgctc 2280
 agggatttca tcaaccagaa caaccatc atcaagaaca ggatcgagca gctcattctc 2340
 cagtgcgctc tttgatgact cgagggatcc tctagagaat tcgagctc 2388

<210> 16
 <211> 2388
 <212> ADN
 <213> Rotavirus

5

<400> 16
 ccatggctta agcctgcgca agcaagggtac cgaagggagt agatggcagt caacgagtga 60
 ttgaggatgt gacacctcga aaggctactc tagttgtgat agccaaggct cttcagggtc 120
 ttgcaactgat agttgggtcc tggtaaagcga gtctgattga tgcgaggtca ctgaaccagt 180
 gtgccacttc acttgctaag gtgatgatag ctcggtcacg agctacctgg tatggtcggt 240
 tgattgaagt tcggtggttt gctaatagacc taagaggagt tgggttgatt ggctcgtccac 300

ES 2 658 987 T3

cacgaactcc cttgattggt ctgactatag acccaccgtg aggaagaaca cctcggtttg 360
 cactgattgg tcaggtccgt catgtgagag aagcctctct gattcgtcta gtgacacctc 420
 ttgttgtgat tgttcacctt caagaagctc tacaagtcca ggttgcaactt gcgactcaag 480
 gtcgtgttct cctgagagtg aaggctatgt ttcgagcgac caaaatactt caagatgttg 540
 agacacacct gaaaggtgcc actttgaggt gtgcgatgat gactaatgag gaggtgaagg 600
 ttggaaaggc tccacctctg aactaggtg cacctcaaga tgtagtaggg ttccagggtt 660
 ctcagattca cgaggctcat gtagttgtga cctgaggggtg gttacgtttt gtgatccttg 720
 tagcacggtc accgaaacag gagagcaagg cactgaatgg tctcccaggt ccacttgctc 780
 ctatagtagt agaggttctg aaggagacc tttctctacg tcatgttgtc cctataatag 840
 tagtccaagt tcaagttggt gaggtagcac ttcgagcctc ctgagcctat gttcacctca 900
 ctctagagga agttccgacg attgatggtc atgaggatgg agtccctacc acttgtccac 960
 tgtcgagtgt gatgaacgag gcacttgcca caattgttga agaggatggt gccaccaagg 1020
 gagggttgac taaagaggca cagggcaatg ctccactagt ttctcttgag gatgcaaatg 1080
 cacctaataa ccctactaag ggtccgaaag tccttgtacc acatacaatc tagggagcga 1140
 cgattggagt tgaggcactt cacgaggcca cctttgatgt tgaaggtcta gggtcaccct 1200
 cgaaccggtc actacagacc acctcgacac agagaggtga agcgaccaca atgtgagagg 1260
 tgagtcaagt gactaaagca cagggagttg agggagtcca agtccaagag ggagtgacac 1320
 cttctcgggtg gtaagaggta ggagtcctga tcccacaggc ctgaaatgcc tgagggtcga 1380
 aagttggggt tgttgccctgt gctcatgatg ctctagcgac ctgcaaagag ggaatagagg 1440
 gagcacggta ggttgctact aatggtctga ggttaatact tgaggcactg aactccgctc 1500
 ctagaactct ccgtcgagcc tctagagtcc cttctcaagt tgagggagag ggttctctag 1560
 cgatactgag tcgagtagct agagcgagag gagggtagac tatacaagag gtacaagaga 1620
 ccatagttca ggtgatagct acaccgattc agataccact gattccacta cttcttcaag 1680
 ttcttcaggc ctgagcgatg aaggtagagg ctcgaaatgac ctgagagag gttgcgacga 1740
 agaagacaca gatccaggag gaggtagtcc aggtttaga ggaggtagag tcacacctga 1800
 ctacacaggc tcgtctagcg acctagaagg ctaaggcacg cattgtagag gtgagtctga 1860
 aggcgataga ggttctccga atccgagtct ctctagtgat gagtctgact cccttacttg 1920
 aagctactat agaggcgacg acacgagttc tgattctagc tatccagggt agtgtagagg 1980
 ggtctatgag agggcttata gtagtgactc agggagctct tcaagtaggg ttctgcacga 2040
 atggcacaag agttcctact actccactac cttcgactac acctaccttt caagaagcga 2100
 atgtttcacc cttgaaagct tctccacggg aagctacacc tattcaagca cctagagcac 2160
 tgactaaggg gtcactagag gcgatagtag ctaaagttct gagagttctt ggagttgcta 2220

ES 2 658 987 T3

ttgatgcctt agtgatccag ggtccgagag ctagagtagg caaggctagg ttcccacgag 2280
 tccctaaagt agttggctct gttgggtag tagttcttgt cctagctcgt cgagtaagag 2340
 gtcacggcag aaactactga gctccctagg agatctctta agctcgag 2388

<210> 17
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

5

<400> 17
 ggtaccgaat tcggacgcgt tcgttccatg gatgtgctct actccctctc caagactctc 60
 aaggatgcta gggataagat cgtggaggga actctctact ccaacgtttc cgatctcatc 120
 cagcagttca accagatgat catcactatg aacggaaacg agttccagac tggtggaatc 180
 ggaaacctcc caatcaggaa ctggaacttc gatttcggac tcctcggaac tactctcctc 240
 aacctcgatg ctaactacgt ggagactgct aggaacacta tcgattactt cgttgatttc 300
 gtggataatg tgtgcatgga tgagatgggt cgtgagtcct agaggaacgg aattgctcca 360
 cagtccgatt ccctcaggaa gctctccggt atcaagttca agaggatcaa cttcgataac 420
 tcctccgagt acatcgagaa ctggaacctc cagaacagaa ggcagaggac tggattcact 480
 ttccacaagc caaacatctt cccatactcc gcttccttca ctctcaacag gtcccagcca 540
 gctcacgata acctcatggg aactatgtgg ctcaacgctg gttctgagat ccaggtggca 600
 ggattcgatt actcctgctc tatcaacgct ccagctaaca ctcagcagtt cgagcacatc 660
 gttcagctca gaaggggtct cactactgct actatcactc tcctccaga tgctgagagg 720
 ttctccttcc caaggggat caactccgct gatggtgcta ctacttggtta cttcaacca 780
 gtgatcctca ggccaaacaa cgtggagggtg gagttccttc tcaacggaca gatcatcaac 840
 acttaccagg ctcgtttcgg aactatcgtg gctaggaact tcgatacaat caggctctcc 900
 ttccagctta tgaggccacc aaacatgact ccatccgtgg ctgcactctt cccaaacgca 960
 cagccattcg agcaccacgc tactgtggga ctcaactca agatcgagtc cgctgtgtgc 1020
 gagtctgtgc tcgctgatgc ttccgagact atgctcgtca acgtgacttc tgtgaggcaa 1080
 gagtacgcta tcccagtggt accagtgttt ccaccaggaa tgaactggac tgatctcatc 1140
 actaactact ccccatccag agaggataac ctccagaggg tgttcaactgt ggcttccatc 1200
 cgttccatgc tcgtgaagtg atgactcgag ggatcctcta gagaattcga gctc 1254

10

<210> 18
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

15

<400> 18

ES 2 658 987 T3

ccatggctta agcctgcgca agcaaggtac ctacacgaga tgagggagag gttctgagag 60
 ttcctacgat ccctattcta gcacctcct tgagagatga ggttgcaaag gctagagtag 120
 gtcgtcaagt tggctacta gtagtgatac ttgcctttgc tcaaggtctg accaccttag 180
 cctttggagg gttagtcctt gaccttgaag ctaaagcctg aggagccttg atgagaggag 240
 ttggagctac gattgatgca cctctgacga tccttgtgat agctaataa gcaactaaag 300
 cacctattac acacgtacct actctaccaa gcactcaggg tctccttgcc ttaacgaggt 360
 gtcaggctaa gggagtcctt cgagaggcca tagttcaagt tctcctagtt gaagctattg 420
 aggaggetca tgtagctctt gaccttggag gtcttgtctt ccgtctcctg acctaagtga 480
 aaggtgttcg gttttagtaa gggatgagg cgaaggaagt gagagttgtc cagggtcggt 540
 cgagtgcctat tggagtaccc ttgatacacc gagttgcgac caagactcta ggtccaccgt 600
 cctaagctaa tgaggacgcg atagttgcga ggtcgattgt gagtcgtcaa gctcgtgtag 660
 caagtcgagt cttcccacga gtgatgacga tgatagttag aggaggtct acgactctcc 720
 aagaggaagg gttcccacta gttgaggcga ctaccacgat gatgaacat gaagttgggt 780
 cactaggagt ccggtttggt gcacctccac ctcaaggaag agttgcctgt ctagtagttg 840
 tgaatggtcc gagcaaagcc ttgatagcac cgatccttga agctatgta gtccgagagg 900
 aaggtcgaat actccggtgg tttgtactga ggtaggcacc gacgtgagaa gggtttgcgt 960
 gtcggtaaag tcgtggtgcg atgacaccct gagtgagagt tctagctcag gcgacacacg 1020
 ctgagacacg agcgactacg aaggctctga tacgagcgat tgactgaag acactccggt 1080
 ctcatcgcat agggtcaccc tggtcacaaa ggtggtcctt acttgacctg actagagtag 1140
 tgattgatga gggtaggtc tctcctattg gaggtctccc acaagtgaca ccgaaggtag 1200
 gcaaggtacg agcacttcac tactgagctc cctaggagat ctcttaagct cgag 1254

<210> 19
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 19
 ggtaccgaat tcggacgcgt tcgttgcctg tacggaatcg agtacactac taccctcact 60
 ttcctcatct ccacgtgctt cctcaactac atcctcaagt ccctcacttc cgctatggat 120
 ttcctcatct accggttctt cctcctcatc gtgatcgctt cccattcgt taagactcag 180
 aactacggta tcaacctccc aatcactgga tctatggata ctgcttacgc taactcctcc 240
 cagcaagaga ctttcctcac ttccacactc tgcctctact acccaactga ggcattccaca 300
 cagatcggag atacagagtg gaaggatact ctctcccagc tcttcctcac taaggatgg 360
 ccaactgggt ccgtgtactt caaagagtac actgatatcg cttccttctc catcgatcca 420

5

10

ES 2 658 987 T3

cagctctact gcgattacaa cgtggtgctt atgaagtacg attccactct tgagcttgat 480
atgtccgagc ttgctgatct catcctcaac gagtggctct gcaaccaat ggatatcact 540
ctctactact accagcagac tgatgaggct aacaagtgga tctctatggg acagtcctgc 600
actatcaaag tgtgccact caacactcag actctcggaa tcggatgcat cactactaac 660
actgctactt tcgaggaagt ggctacttcc gagaagctcg tgatcactga tgtggtggat 720
gggtttaacc acaagctcga tgtgactact aacacatgca caatcaggaa ctgcaagaag 780
ctcggaccaa gggaaaacgt ggctatcatc caagtgggag gttccgatgt gctcgatc 840
actgctgac caactactgc tccacagact gagaggatga tgagggtgaa ctggaagaag 900
tggtggcagg ttttctacac tgtggtggat tacatcaacc agatcgttca ggtgatgtcc 960
aagaggtccc gttctctcaa ctccgctgct ttctactacc gtgtgtgatg actcgaggga 1020
tcctctagag aattcgagct c 1041

<210> 20
<211> 1041
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

5

<400> 20
ccatggctta agcctgcgca agcaacgtac atgccttagc tcatgtgatg ataggagtga 60
aaggagttaga ggtagcacga ggagttgatg taggagtcca gggagtgaag gcgataccta 120
aagtagtaga tggcaaagga ggaggagtag cactagcga ggggtaagca attctgagtc 180
ttgatgccat agttggaggg ttagtgacct agatacctat gacgaatgcg attgaggagg 240
gtcgttctct gaaaggagtg aaggtgtgag acggagatga tgggttgact ccgtaggtgt 300
gtctagcctc tatgtctcac ctctctatga gagagggtcg agaaggagtg attccctacc 360
ggttgaccaa ggcacatgaa gtttctcatg tgactatagc gaaggaagag gtagctaggt 420
gtcgagatga cgctaattgt gcaccacgaa tacttcatgc taaggtgaga actcgaacta 480
tacaggctcg aacgactaga gtaggagttg ctaccgaga cgttgggtta cctatagtga 540
gagatgatga tggtcgtctg actactccga ttgttcacct agagataccc tgtcaggacg 600
tgatagtttc acacgggtga gttgtgagtc tgagagcctt agcctacgta gtgatgattg 660
tgacgatgaa agctcctca ccgatgaagg ctcttcgagc actagtgact acaccaccta 720
ccacaattgg tgttcgagct aactgatga ttgtgtacgt gttagtcctt gacgttcttc 780
gagcctgggt cccttttgca ccgatagtag gttcacctc caaggctaca cgagctatag 840
tgacgactag gttgatgacg aggtgtctga ctctcctact actcccactt gacctcttc 900
accaccgtcc aaaagatgtg acaccaccta atgtagttgg tctagcaagt ccactacagg 960
ttctccaggg caagagagtt gaggcgacga aagatgatgg cacacactac tgagctccct 1020
aggagatctc ttaagctcga g 1041

10

<210> 21

ES 2 658 987 T3

<211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador IF-WA_VP2(opt).s1+3c

<400> 21
 aaattgtcg ggccatggc ataccggaag agaggagcaa agcgcgaa 48

10

<210> 22
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador IF-WA_VP2(opt).s1-4r

<400> 22
 actaaagaaa ataggccttt aaagctcgtt cattattcgc atattgtcga 50

20

<210> 23
 <211> 4903
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Construcción 1191

30

<400> 23
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60
 gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgtttgca 120
 aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacatTTTTta cttgaacaaa 180
 aatattcacc tactactggt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240
 ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caatTTTgtt gcaacatttg agaaaTTTT 300
 gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360
 aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
 aatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa 480
 taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540
 aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
 atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660
 taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgcccatag agtcagtaa ctcattTTTta 720
 tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctocaaaa aaaaaaacg 780
 gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggagata 840

ES 2 658 987 T3

acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttaa gcccacgcat 900
 ctgtggcaca tctacattat ctaaatacaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960
 accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
 gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
 aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacggttg 1140
 gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
 actgagtgcc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
 aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta ttttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
 gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcgggtta ctatgcagca 1380
 tctcagatctt tcgggtttcga ccagatcggg tgtacctata gtattcgggt tcgaggagtt 1440
 agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
 tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
 tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt 1620
 ctctatttta taatatggtt tgttattggt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
 tcggtggtgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
 ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
 cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
 gtggttaata tagctcaaat ataggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
 tctcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatccct 1980
 ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
 ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
 cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgcatg ccggtcaaca tgggtggagca 2160
 cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat 2220
 tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gccagctat 2280
 ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg 2340
 cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc 2400
 cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 2460
 ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacactgtc tactccaaaa atatcaaga 2520
 tacagtctca gaagacccaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtta tatccggaaa 2580
 cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga 2640
 aggtggctcc tacaatgcc atcattgcca taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc 2700

ES 2 658 987 T3

tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga 2760
 cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga 2820
 tgacgcacaa tcccactatc cttcgaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca 2880
 tttggagagg tattaataatc ttaataggtt ttgataaaag cgaacgtggg gaaaccgaa 2940
 ccaaaccttc ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc 3000
 ttgcgtgagc gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt 3060
 tcaactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg 3120
 tgtacttgtc ctattcttgt cgggtgggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct 3180
 gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct 3240
 acttctgctt gacgaggat tgttgccctg acttctttct tcttcttctt gctgattggt 3300
 tctataagaa atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttggg 3360
 gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggcccgcg gatggcgaaa 3420
 aacgttgcca ttttcggctt attgttttct cttcttgtgt tggttccttc tcagatcttc 3480
 gcctgcaggc tcctcagcca aaacgacacc cccatctgtc tatccactgg ccctggatc 3540
 tgctgcccaa actaactcca tggtagccct gggatgcctg gtcaagggtt atttccctga 3600
 gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc ggtgtgcaca ccttcccagc 3660
 tgtcctgcag tctgacctct aactctgag cagctcagtg actgtcccct ccagcacctg 3720
 gcccagcgag accgtcacct gcaacgttgc ccaccggcc agcagcacca aggtggacaa 3780
 gaaaattgtg cccagggatt gtggttghaa gccttgcata tgtacagtcc cagaagatc 3840
 atctgtcttc atcttcccc caaagccaa ggatgtgctc accattactc tgactcctaa 3900
 ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc gaggtccagt tcagctggtt 3960
 tgtagatgat gtggagggtc acacagctca gacgcaacc cgggaggagc agttcaacag 4020
 cactttccgc tcagtcaagt aacttccat catgcaccag gactggctca atggcaagga 4080
 gcgatcgctc accatcacca tcaccatcac catcaccatt aaaggcctat tttctttagt 4140
 ttgaatttac tgttattcgg tgtgcatttc tatgtttggt gagcggtttt ctgtgctcag 4200
 agtgtgttta ttttatghaa ttttaatttct ttgtgagctc ctgttttagca ggtcgtccct 4260
 tcagcaagga cacaaaaaga ttttaatttt attaaaaaaa aaaaaaaaaa agaccgggaa 4320
 ttcgatatca agcttatcga octgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa 4380
 gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta 4440
 agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatztat gagatgggtt tttatgatta 4500
 gagtcccga attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg 4560
 ataaattatc gcgcggggtg tcactatagt tactagatct ctagagtctc aagcttggcg 4620

ES 2 658 987 T3

cgccccacgtg actagtgcca ctggccgctg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg 4680
 gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg 4740
 aagaggcccc caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgctaga 4800
 gcagcttgag cttggatcag attgtcgttt cccgccttca gtttaaacta tcagtgtttg 4860
 acaggatata ttggcgggta aacctaagag aaaagagcgt tta 4903

<210> 24
 <211> 2721
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete de expresión número 1733

<400> 24
 gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60
 gaagacccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
 tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
 ggtcccaaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300
 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
 tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420
 agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg 480
 aagatagtgg aaaaggaagg tggctoctac aatgccatc attgogataa aggaaaggcc 540
 atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
 atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
 tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata 720
 taaggaagtt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
 acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
 cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
 cagtacaacg ttttctttca ctgaagcga atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
 ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttcttgcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
 gcttgctgga ggctgctggt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
 gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttcttct 1140
 tcttcttgct gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200
 tggttttcga acttgagaaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg 1260

ES 2 658 987 T3

gccatgtac ggcatcgagt atacaacaat tttaattttc ctgatttcca tcattctggt 1320
 aaactacatc cttaagtccg tgaccagaat tatggattat attatctatc gtagcctcct 1380
 catctacgtg gccctttttg ccctgaccag ggcccagaac tatggcctga acttaccaat 1440
 caccggttca atggataccg tttacgctaa ttccactcaa gaggggatat ttctgacaag 1500
 taccctgtgc ctgtattatc caacagaagc ctctaccag atcaatgatg gggagtggaa 1560
 ggatagtctc tcacagatgt tcctaaccaa gggctggccc accggttccg tctacttcaa 1620
 ggaatactct agtattgtcg acttctcagt tgacccccag ctttattgcg actacaacct 1680
 ggtacttatg aaatacgacc agaactgga gctggatatg tccgagctgg ctgacctgat 1740
 cctcaatgag tggctgtgca accccatgga catcacatta tattactacc agcagtctgg 1800
 agaatccaac aagtggatca gtatgggctc aagtgcacc gtgaagggtg gtcccttgaa 1860
 caccctaatg ctgggcattg gttgtcagac aactaatgtg gattcgtttg aaatggtagc 1920
 cgaaaacgag aagctggcta tagtggacgt agtcgatggg attaaccaca agatcaatct 1980
 gactaccacc acttgtacca tcagaaactg taaaagctc ggccccggg agaactcgc 2040
 cgtgatccag gtggggggga gcaatgtgct cgacattact gccgacccta ccaccaatcc 2100
 acagacggaa cggatgatga gactcaactg gaagaaatgg tggcaggtct ttataccat 2160
 tgtggactac attaaccaga ttgtgcaagt catgagtaaa cgggccagat ccctgaactc 2220
 agcagccttc tattatcgcg tttagaggcc tattttcttt agtttgaatt tactgttatt 2280
 cgggtgtgcat ttctatgttt ggtgagcggg tttctgtgct cagagtgtgt ttattttatg 2340
 taatttaatt tctttgtgag ctctgttta gcaggtcgtc ccttcagcaa ggacacaaaa 2400
 agattttaat ttattaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg gaattcgata tcaagcttat 2460
 cgacctgcag atcgttcaaa catttgcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc 2520
 ggtcttgoga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac 2580
 atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac 2640
 atttaatacg cgatagaaaa caaatatag cgcgcaaacct aggataaatt atcgcgcgcg 2700
 gtgtcatcta tgttactaga t 2721

<210> 25
 <211> 890
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

<400> 25
 Met Ala Tyr Arg Lys Arg Gly Ala Lys Arg Glu Asn Leu Pro Gln Gln
 1 5 10 15

Asn Glu Arg Leu Gln Glu Lys Glu Ile Glu Lys Asp Val Asp Val Thr

5

ES 2 658 987 T3

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

ES 2 658 987 T3

Leu Asn Asn Glu Ile Ile Phe Asn Tyr Ile Pro Glu Arg Ile Arg Asn
 275 280 285
 Asp Val Asn Tyr Ile Leu Asn Met Asp Met Asn Leu Pro Ser Thr Ala
 290 295 300
 Arg Tyr Ile Arg Pro Asn Leu Leu Gln Asp Arg Leu Asn Leu His Asp
 305 310 315 320
 Asn Phe Glu Ser Leu Trp Asp Thr Ile Thr Thr Ser Asn Tyr Ile Leu
 325 330 335
 Ala Arg Ser Val Val Pro Asp Leu Lys Glu Lys Glu Leu Val Ser Thr
 340 345 350
 Glu Ala Gln Ile Gln Lys Met Ser Gln Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu
 355 360 365
 Thr Ile Gln Ser Glu Thr Gln Phe Leu Ala Gly Ile Asn Ser Gln Ala
 370 375 380
 Ala Asn Asp Cys Phe Lys Thr Leu Ile Ala Ala Met Leu Ser Gln Arg
 385 390 395 400
 Thr Met Ser Leu Asp Phe Val Thr Thr Asn Tyr Met Ser Leu Ile Ser
 405 410 415
 Gly Met Trp Leu Leu Thr Val Ile Pro Asn Asp Met Phe Leu Arg Glu
 420 425 430
 Ser Leu Val Ala Cys Glu Leu Ala Ile Ile Asn Thr Ile Val Tyr Pro
 435 440 445
 Ala Phe Gly Met Gln Arg Met His Tyr Arg Asn Gly Asp Pro Gln Thr
 450 455 460
 Pro Phe Gln Ile Ala Glu Gln Gln Ile Gln Asn Phe Gln Val Ala Asn
 465 470 475 480
 Trp Leu His Phe Ile Asn Asn Asn Arg Phe Arg Gln Val Val Ile Asp
 485 490 495
 Gly Val Leu Asn Gln Thr Leu Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Gln Val
 500 505 510
 Ile Asn Gln Leu Met Glu Ala Leu Met Gln Leu Ser Arg Gln Gln Phe
 515 520 525

ES 2 658 987 T3

Pro Thr Met Pro Val Asp Tyr Lys Arg Ser Ile Gln Arg Gly Ile Leu
 530 535 540

Leu Leu Ser Asn Arg Leu Gly Gln Leu Val Asp Leu Thr Arg Leu Val
 545 550 555 560

Ser Tyr Asn Tyr Glu Thr Leu Met Ala Cys Val Thr Met Asn Met Gln
 565 570 575

His Val Gln Thr Leu Thr Thr Glu Lys Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr
 580 585 590

Ser Leu Cys Met Leu Ile Gly Asn Thr Thr Val Ile Pro Ser Pro Gln
 595 600 605

Thr Leu Phe His Tyr Tyr Asn Ile Asn Val Asn Phe His Ser Asn Tyr
 610 615 620

Asn Glu Arg Ile Asn Asp Ala Val Ala Ile Ile Thr Ala Ala Asn Arg
 625 630 635 640

Leu Asn Leu Tyr Gln Lys Lys Met Lys Ser Ile Val Glu Asp Phe Leu
 645 650 655

Lys Arg Leu Gln Ile Phe Asp Val Pro Arg Val Pro Asp Asp Gln Met
 660 665 670

Tyr Arg Leu Arg Asp Arg Leu Arg Leu Leu Pro Val Glu Arg Arg Arg
 675 680 685

Leu Asp Ile Phe Asn Leu Ile Leu Met Asn Met Glu Gln Ile Glu Arg
 690 695 700

Ala Ser Asp Lys Ile Ala Gln Gly Val Ile Ile Ala Tyr Arg Asp Met
 705 710 715 720

Gln Leu Glu Arg Asp Glu Met Tyr Gly Tyr Val Asn Ile Ala Arg Asn
 725 730 735

Leu Asp Gly Tyr Gln Gln Ile Asn Leu Glu Glu Leu Met Arg Thr Gly
 740 745 750

Asp Tyr Gly Gln Ile Thr Asn Met Leu Leu Asn Asn Gln Pro Val Ala
 755 760 765

Leu Val Gly Ala Leu Pro Phe Val Thr Asp Ser Ser Val Ile Ser Leu
 770 775 780

ES 2 658 987 T3

Ile Ala Lys Leu Asp Ala Thr Val Phe Ala Gln Ile Val Lys Leu Arg
785 790 795 800

Lys Val Asp Thr Leu Lys Pro Ile Leu Tyr Lys Ile Asn Ser Asp Ser
805 810 815

Asn Asp Phe Tyr Leu Val Ala Asn Tyr Asp Trp Ile Pro Thr Ser Thr
820 825 830

Thr Lys Val Tyr Lys Gln Val Pro Gln Pro Phe Asp Phe Arg Ala Ser
835 840 845

Met His Met Leu Thr Ser Asn Leu Thr Phe Thr Val Tyr Ser Asp Leu
850 855 860

Leu Ser Phe Val Ser Ala Asp Thr Val Glu Pro Ile Asn Ala Val Ala
865 870 875 880

Phe Asp Asn Met Arg Ile Met Asn Glu Leu
885 890

<210> 26
<211> 6745
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción 193

<400> 26
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgttgatca 120
aataactcaa aaaccataaa agttaaagtt agcaagtgtg tacatattta cttgaacaaa 180
aatattcacc tactactggt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatattgatg 240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttggt gcaacatttg agaaaatttt 300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag aggagaata 360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
aatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa 480
taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaga 540
aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaat 660
taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgcccatag agtcagttaa ctcattttta 720

ES 2 658 987 T3

tatttcatag atcaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaa aaaaaaacg 780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatcccc taggagata 840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccacttta gccacgcat 900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatacaca cattctcca cacatctgag ccacacaaaa 960
accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
aaaatggaac gagctatatac aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttg 1140
gatggaggat caggaggtag cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcggtaa ctatgcagca 1380
tctcgatttt tccgtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tccgaggatt 1440
agtatcccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
tgcctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcagat aagttaaat gcttctcgt 1620
ctcctattta taatatggtt tgttattggt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
tcgttgttgt tatgaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccc 1800
cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
gtggttaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccc tgtagccaat acgcaaaccg cctctcccgg 2100
cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaga cgcgttgttg ttgtgactcc gaggggttgc 2160
ctcaaactct atcttataac cggcgtggag gcatggaggc aggggtatth ttgtcatttt 2220
aatagatagt ggaaaatgac gtggaattta cttaaagacg aagtctttgc gacaaggggg 2280
ggcccacgcc gaatttaata ttaccggcgt ggccccccct tatcgcgagt gctttagcac 2340
gagcggcca gatttaaagt agaaaatttc ccgcccacta gggttaaagg tgttcacact 2400
ataaaagcat atacgatgtg atggtatthg gtcgacaagc ttgcatgccg gtcaacatgg 2460
tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca gaagaccaa 2520
gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccgaaa cctcctcgga ttccattgcc 2580
cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc taaaaatgcc 2640

ES 2 658 987 T3

atcattgCGa taaaggaaG gccatCGttg aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag 2700
atggaccccc acccacgagG agcatCGtgG aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa 2760
agcaagtGga ttgatgtgat aacatggTgG agcacgacac acttgtctac tccaaaaata 2820
tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggG caattgagac ttttcaacaa agggtaatat 2880
ccgGaaacct cctCGgattc cattGCCcag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg 2940
aaaaggaagG tggctcctac aaatgccatc attgcgataa agGaaaggcc atcgttgaag 3000
atgcctctgc cgacagtggT cccaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtgGaaa 3060
aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg 3120
taagggatga cgcaacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata taaggaaGtt 3180
catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga acgtgggGaa 3240
accGaaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaa cttctctctt 3300
gtcctttctg cgtgagcgat cttcaacgtt gtcagatcgt gcttcggcac cagtacaacg 3360
ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc ggcGccatta 3420
aataacgtgt acttgtccta ttcttgtcgg tgtggctctg gGaaaagaaa gcttgtcGga 3480
ggctgctgtt cagccccata cattaactgt tacgattctg ctgactttcg gcgggtGcaa 3540
tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttctctc tcttcttgct 3600
gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg tggttttoga 3660
acttgagGaa agattgttaa gcttctgtat attctGCCa aatttgtcgg gccGcggat 3720
ggcGaaaaac gttgcgattt tcggcttatt gttttctctt cttgtgttgg ttccttctca 3780
gatcttGccc tgcaggctcc tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc 3840
ctggatctgc tgcccaaact aactccatgg tgaccctggg atgctgtGtc aagggtatt 3900
tccctgagcc agtgacagtG acctggaact ctggatccct gtccagcggT gtgcacacct 3960
tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ctctgagcag ctcaGtgact gtcccctcca 4020
gcacctggcc cagcgagacc gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagG 4080
tgGacaagaa aattgtGccc agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcCCag 4140
aagtatcatc tgtcttcatc ttcccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga 4200
ctcctaaggT cacgtgtgtt gtggtagaca tcagcaagga tgatcccgag gtccagttca 4260
gctggtttgt agatgatgtg gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgG gaggagcagt 4320
tcaacagcac tttccgctca gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac tggctcaatG 4380
gcaaggagcg atcGctcacc atcaccatca ccatcaccat caccataaa ggcctatttt 4440
ctttagtttg aatttactgt tattcgggtg gcatttctat gtttggTgag cggttttctg 4500

ES 2 658 987 T3

tgctcagagt gtgtttatth tatgtaatth aatttctttg tgagctcctg tttagcaggt 4560
 cgtcccttca gcaaggacac aaaaagatth taatthtatt aaaaaaaaa aaaaaaaga 4620
 ccggaattc gatatacagc ttatcgacct gcagatcgtt caaacatttg gcaataaagt 4680
 ttcttaagat tgaatcctgt tgccggtcct gcgatgatta tcatataatt tctggtgaat 4740
 tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt 4800
 atgattagag tcccgcatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaat atagcgcgca 4860
 aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatctcta gactctcaag 4920
 cttggcgcgc cataaatga ttatthtatg aatataatthc attgtgcaag tagatagaaa 4980
 ttacatatgt tacataacac acgaaataaa caaaaaaga caatccaaa acaaacaccc 5040
 caaaaaaat aatcacttha gataaactcg tatgaggaga ggcacgttca gtgactcgcg 5100
 gattcccag caaaaaagt cccccgtca cacatatagt ggggtgacgca attatcttha 5160
 aagtaatcct tctggtgact tgtcattgat aacatccagt cttcgtcagg attgcaaaga 5220
 attatagaag ggatcccacc thttatthtc thctththtc catatthagg gttgacagtg 5280
 aatcagact ggcaacctat taattgcttc cacaatggga cgaactgaa ggggatgtcg 5340
 tcgatgatat tataggtggc gtgttcacgc tagttggtga aatcgatggt accgttccaa 5400
 tagttgtgtc gtccgagact tctagcccag gtggtctthc cggtagcagt tggtagcag 5460
 atgtagaggc tggggtgtcg gattccattc thccattgt cctggttaa tcggccatcc 5520
 attcaaggtc agattgagct tgttggtatg agacaggatg tatgtaagta taagcgtcta 5580
 tgcttacatg gtatagatgg gthtccctcc aggagtgtag atcttcgtgg cagcgaagat 5640
 ctgattctgt gaagggcgc acatacggth caggthgtgg agggaataat thgttgctg 5700
 aatattccag ccattgaagt thtgtgccc atthcatgagg gaattctthc thgatcatgt 5760
 caagatattc thccttagac gthgcagthc ggataatagt thccatcgt gcgtcagatt 5820
 tgcgaggaga gaccttatga thcgcgaaat thcctcgtgt thtaatatct ccgtcctthg 5880
 atatgtaatc aaggacttht thtagatthc tagctggctg gatattaggg tgattthcct 5940
 caaaatcgaa aaaagaagga thcctaatac aaggththth atcaagctgg agaagagcat 6000
 gatagtgggt agtgccatct tgatgaagct cagaagcaac accaaggaag aaaaataaga 6060
 aagggtgtgag thtctcccag agaaactgga ataaatcath ththtgatg gacactthg 6120
 gataggtaag gaaaacatat thtagattgga gtctgaagth ththctagca gaaggcatgt 6180
 tgttggtgact ccgaggggth gcctcaact ththctata accggcgtgg aggcattggg 6240
 gcaggggtat thtggthcatt thaatagata gtgaaaaatg acgtggaatt ththtaaga 6300
 cgaagtctth gcgacaaggg ggggcccacg ccgaatthaa ththaccggc gtggcccccc 6360
 ththctcgcg gtgctthtag acgagcggthc cagatthaaa gtagaaaatt thccgcccac 6420

ES 2 658 987 T3

tagggttaaa ggtgttcaca ctataaaagc atatacgatg tgatgggtatt tgactagtgg 6480
 cactggccgt cgtttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc 6540
 gccttgcaagc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc 6600
 gcccttocca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatgcta gagcagcttg agcttggatc 6660
 agattgtcgt ttcccgcctt cagtttaaac tatcagtgtt tgacaggata tattggcggg 6720
 taaacctaag agaaaagagc gttta 6745

<210> 27
 <211> 4413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Casete de expresión número 1710

10

<400> 27
 gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactcctaaa atatcaaaga tacagtctca 60
 gaagacccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
 tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
 ggtcccaaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300
 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
 tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420
 agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg 480
 aagatagtgg aaaaggaagg tggctoctac aaatgccatc attgogataa aggaaaggcc 540
 atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
 atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
 tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata 720
 taaggaagtt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
 acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
 cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
 cagtacaacg ttttcttca ctgaagcga atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
 ggcgccatta aataacgtgt actgtccta ttcttgcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
 gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cttacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
 gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttcttct 1140
 tcttcttgcg gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200

ES 2 658 987 T3

tggttttcga acttgagaa agattgtaa gcttctgtat attctgccca aatttgtcgg 1260
 gcccatggca taccggaaga gaggagcaaa gcgcgaaaac ctgccgcaac agaacgagag 1320
 actgcaagaa aaagagatag agaaagatgt cgacgtaaca atggaaaaca agaataacaa 1380
 taggaaacaa cagctgtccg acaaagtctt gtcccagaag gaggaaatta tcaactgacgc 1440
 ccaggacgat attaaaattg ccggagaaat aaagaagagc tcgaaagaag aatctaaca 1500
 gctgctcgaa attctgaaaa caaaagaaga ccatcagaaa gagattcaat atgaaatfff 1560
 gcaaaaaaca atacctacat ttgagtccaa agaaagtatc ctcaagaagc ttgaagacat 1620
 aagaccggag caggcaaaaa aacagatgaa actctttcgc attttcgagc caaacagct 1680
 ccctatatat cgcgccaatg gcgagaagga gctacgcaac cgggtgtact ggaagttgaa 1740
 aaaagacacc ctgccagatg gagattatga cgtccgggag tatttcctca atctctatga 1800
 tcagatcctc atcgaaatgc cggactatct gctcctcaag gacatggccg tggagaacaa 1860
 aaatagcaga gacgcgggca aagttgtcga ctctgagact gccaatattt gtgatgcat 1920
 cttccaggat gaggagaccg agggagtcgt ccgtagattc atcgctgata tgcggcaaca 1980
 ggtccaggct gatcgtaaaca ttgtcaatta cccttccatc cttcacccca ttgatcatgc 2040
 attcaatgag tattttctta accaccagtt ggtggagccg ctgaacaatg agataatctt 2100
 caattacata ccagagagga taaggatga cgtgaattac atcctgaaca tggatatgaa 2160
 tctgccatct acagccaggt atatcaggcc aaacttggtg caggatagac tgaatcttca 2220
 cgataatfff gagtccctgt gggataccat cacaacatcc aactacattc tggccaggtc 2280
 cgtcgttccc gatttgaagg agaaggagct ggtctccacc gaagcacaga tccagaaaat 2340
 gagccaggac ctgcagctgg aggcctcac tattcagagc gagacacagt ttttagccgg 2400
 gattaacagt caggctgcca atgattgttt caagaccctc atagccgcca tgctgtctca 2460
 aagaaccatg tctttggact ttgtgaccac gaactatatg agcctaactc ccggaatgtg 2520
 gctacttaca gtgattccca acgatatggt cctccgggag tcaactagtgg cctgtgagct 2580
 ggcgatcatc aacaccatcg tgtatccagc attcggaatg cagagaatgc attaccggaa 2640
 tggcgaccct cagacaccct tccagatcgc agaacagcag atccagaatt tccagggtgc 2700
 gaactggctc cattttatta acaataacag attcagycaa gttgtgattg atggagttct 2760
 gaatcagact ctgaacgaca atatacggaa tggacaggtc atcaaccagc tgatggaagc 2820
 attgatgcaa ctcagcagac agcagttccc cacgatgcct gtggattaca aacggagcat 2880
 ccaacggggc attctgcttc tctccaatag gctggggcag cttgtcgact taaccgact 2940
 ggtctcctat aactacgaga cgctaattggc ttgtgtgacc atgaacatgc agcacgtgca 3000
 aacctgaca actgagaagt tgcagctcac ttctgtgact tcgctttgta tgtaattgg 3060
 taacacaacc gtgattccgt cccacagac actgttccac tactacaaca tcaacgtgaa 3120

ES 2 658 987 T3

tttccactcc aattataatg agcggatcaa cgacgccgtc gccataatta ccgcagcaaa 3180
taggctgaat ctttatcaga aaaaaatgaa gtccatagtg gaagactttc tgaaacggct 3240
ccagattttc gacgtaccac gagtgcctga cgaccaaatag tacaggctga gggatcgctc 3300
tcggctctta cccggttgaac ggagacggct tgacatattc aacttgatcc tgatgaatat 3360
ggagcagatc gaacgcgctt ctgataagat tgctcagggg gttatcatcg cataccgaga 3420
tatgcagctg gaacgcgacg agatgtacgg atatgttaat attgcacgga atcttgatgg 3480
ctaccagcaa attaacttgg aggaactcat gcgcaccggt gattacggac aaattacgaa 3540
catgcttctc aacaatcaac ccgttgccct tgtgggtgca ttgcccttcg ttacggactc 3600
atccgtgatc agtctaactg ccaagctcga cgcaaccgtc ttcgctcaga tagtgaagct 3660
caggaaggtt gacacactga agccatact gtacaaaata aactcggatt ccaatgactt 3720
ttaccttggtg gccaaactag actggatccc cacaaagta actaaggctc acaaacaggt 3780
gccacaacca ttcgacttta gagccagcat gcacatgctg acttctaacc ttacgtttac 3840
cgtctactct gacctactgt catttgtttc agcggacacg gtagagccca ttaacgcagt 3900
cgcattogac aatatgcgaa taatgaacga gctttaaagg cctatcttct ttagtttgaa 3960
tttactgtta ttcgggtgtgc atttctatgt ttggtgagcg gttttctgtg ctcagagtgt 4020
gtttatttta tgtaatttaa tttctttgtg agctcctgtt tagcaggtcg tcccttcagc 4080
aaggacacaa aaagatttta atttattaa aaaaaaaaa aaaaaagacc gggattcga 4140
tatcaagctt atcgacctgc agatcgttca aacatttggc aataaagttt cttaagattg 4200
aatcctggtg ccggtcttgc gatgattatc atataatctc tgttgaatta cgttaagcat 4260
gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc 4320
ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa 4380
ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttacta gat 4413

5 <210> 28
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador IF-WA_VP6(opt).s1+3c

<400> 28
aaattgtcg ggccatgga ggtcctttat agtctctcca aaacgctga 49

15 <210> 29
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador IF-WA_VP6(opt).s1-4r

ES 2 658 987 T3

<400> 29
actaaagaaa ataggcctct acttgatcaa catactccgg atagaggcca ca 52

5 <210> 30
<211> 2934
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Casete de expresión número 1713

<400> 30
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60
gaagacccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
tacaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
ggccccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcaogacac acttgtctac 360
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacia 420
agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg 480
aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
tccactgacg taagggatga cgacaaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata 720
taaggaaagt catttcattt ggagaggat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcga atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
ggcgccatta aataacgtgt acttgccta ttcttgcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
gcttgctgga ggctgctggt cagccccata cactacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
gcggttgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttcttct 1140
tcttcttgct gattggttct ataagaaatc tagtatcttc tttgaaacag agttttcccg 1200
tggttttcga acttgagaaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg 1260
gccccatggag gtcctttata gtctctccaa aacgctgaag gacgctaggg acaagatcgt 1320
ggagggtaca ctttatagca atgtcagcga cctaatacag cagtttaatc aaatgatcgt 1380
tacaatgaat gggaatgatt tccaaactgg cggatttggg aatctgcccg tgaggaactg 1440

ES 2 658 987 T3

gacattcgat ttcggcctgc tgggcacgac tctccttaat ctcgatgcaa attatgtaga 1500
 aaacgccaga acgattatcg agtactttat cgatttcatt gataacgttt gtatggatga 1560
 gatggcccgc gagtcacaac ggaacggagt tgctccacag tccgaggccc ttcggaaact 1620
 cgccggcatt aagttcaagc gtattaatth cgacaactcc tccgaatata tagagaactg 1680
 gaacttgacag aatcgtcgac agagaaccgg ctctcgtgttc cataaaccta atatctttcc 1740
 gtatagcgcc tcattcacc tgaataggag tcagcccatg cacgacaacc tcatgggtac 1800
 aatgtggctg aatgcgggga gtgaaataca ggtcgcggg ttcgattact cctgtgccat 1860
 taatgcaacc gcaaacatcc agcagttcga acatcctgag caactaagac gggctctcac 1920
 gaccgcgaca attacactcc tgcccgcgac cgagcgttc tcctttcccc gcgtaatcaa 1980
 ctgagctgat ggcgccacca ctgggttctt caaccctggt atattgcgcc ctaacaacgt 2040
 agaggtggag tttctcttaa acggacagat catcaatacc taccaagcca ggttcggcac 2100
 gattattgca agaaatttcg acgctatcag gctgctcttc caactgatga ggccccccaa 2160
 tatgactccc gctgtgaacg ctttgtttcc gcaggtcag cctttccagc accacgccac 2220
 cgtcggcttg actcttcgaa tagagagcgc ggtctgcgaa tcagtgtgag cagacgcaa 2280
 cgagacgctg ctggcaaacg ttaccgccgt gcgcaagag tatgccatcc cagtagggcc 2340
 tgtgtttcca cccggcatga actggactga actaattact aactatagcc catccagaga 2400
 agacaacttg cagcgggtct tcaactgtgg ctctatccgg agtatgttga tcaagtagag 2460
 gcctatthtc ttagtttga atthactgtt attcggtgtg catttctatg tttggtgagc 2520
 ggttttctgt gctcagagtg tgthtatttt atgtaattta atthctttgt gagctcctgt 2580
 ttagcaggtc gtccttcag caaggacaca aaaagatttt aattttatta aaaaaaaaaa 2640
 aaaaaagac cgggaattcg atatcaagct tatcgacctg cagatcgttc aacatttgg 2700
 caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat catataatth 2760
 ctgthgaatt acgthaaaca tgtaataatt aacatgthaa gcatgacctt atthtagaga 2820
 tgggtthtth tgattagagt cccgcaatta tacatthaat acgcataga aaacaaaata 2880
 tagcgcgcaa actaggataa atthctcgcg gccggtgcat ctatgthact agat 2934

<210> 31
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

<400> 31
 Met Glu Val Leu Tyr Ser Leu Ser Lys Thr Leu Lys Asp Ala Arg Asp
 1 5 10 15

5

ES 2 658 987 T3

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

ES 2 658 987 T3

Tyr Gln Ala Arg Phe Gly Thr Ile Ile Ala Arg Asn Phe Asp Ala Ile
 275 280 285

Arg Leu Leu Phe Gln Leu Met Arg Pro Pro Asn Met Thr Pro Ala Val
 290 295 300

Asn Ala Leu Phe Pro Gln Ala Gln Pro Phe Gln His His Ala Thr Val
 305 310 315 320

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

Asp Ala Asn Glu Thr Leu Leu Ala Asn Val Thr Ala Val Arg Gln Glu
 340 345 350

Tyr Ala Ile Pro Val Gly Pro Val Phe Pro Pro Gly Met Asn Trp Thr
 355 360 365

Glu Leu Ile Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Arg Glu Asp Asn Leu Gln Arg
 370 375 380

Val Phe Thr Val Ala Ser Ile Arg Ser Met Leu Ile Lys
 385 390 395

<210> 32

<211> 2934

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión número 1714

<400> 32

gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactcctaaa atatcaaaga tacagtctca 60

gaagacccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120

ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180

tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240

ggccccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgttg aaaaagaaga cgttccaacc 300

acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360

tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420

agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg 480

aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540

atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600

atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660

ES 2 658 987 T3

tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata 720
taaggaagtt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
acgtggggaa acccgaaacca aaccttcttc taaactctct ctcactctctc ttaaagcaaa 840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttcttgcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cactacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
gcggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttcttct 1140
tcttcttctt gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200
tggttttcga acttgagaaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg 1260
gcccatggag gtcctttata gtctctcaa aacgctgaag gacgctaggg acaagatcgt 1320
ggaggttaca ctttatagca atgtcagcga cctaatacag cagtttaatc aatgatcgt 1380
tacaatgaat gggaatgatt tccaaactgg cggatttggg aatctgcccg tgaggaactg 1440
gacattogat ttggcctgc tgggcacgac tctcctaat ctcgatgcaa attatgtaga 1500
aaacgccaga acgattatcg agtactttat cgatttcatt gataacgttt gtatggatga 1560
gatggcccgc gagtcacaac ggaacggagt tgctccacag tccgaggccc ttcggaaact 1620
cgccggcatt aagttcaagc gtattaattt cgacaactcc tccgaatata tagagaactg 1680
gaacttgca aatcgtcagc agagaaccgg cttcgtgttc cataaaccta atatctttcc 1740
gtatagcgcc tcattcacc tgaataggag tcagcccatg cacgacaacc tcatgggtac 1800
aatgtggctg aatgcgggga gtgaaataca ggtcgccggg ttcgattact cctgtgccat 1860
taatgcaccc gaaacatcc agcagttcga acatctcgtg caactaagac gggctctcac 1920
gaccgcgaca attacactcc tgcccagcgc cgagcgcttc tcctttcccc gcgtaatcaa 1980
ctcagctgat ggccacacca cttggttctt caaccctgtt atattgcgcc ctacaacgt 2040
agagtgagag tttctcttaa acggacagat catcaatacc taccaagcca ggttcggcac 2100
gattattgca agaaatctg acgctatcag gctgctcttc caactgatga ggcccccaa 2160
tatgactccc gctgtgaacg ctttgtttcc gcaggctcag cctttccagc accacgccac 2220
cgtcggttg actcttcgaa tagagagcgc ggtctcgaa tcagtgtgag cagacgcaa 2280
cgagacgctg ctggcaaacg ttaccgccgt gcggcaagag tatgccatcc cagtagggcc 2340
tgtgtttcca cccggcatga actggactga actaattact aactatagcc catccagaga 2400
agacaacttg cagcgggtct tcaactgtgc ctctatccgg agtatgttga tcaagtagag 2460
gcctattttc ttagtttga attactgtt attcgggtg catttctatg tttggtgagc 2520

ES 2 658 987 T3

ggttttctgt gctcagagtg tgtttatttt atgtaattta atttctttgt gagctcctgt 2580
 ttagcaggtc gtcccttcag caaggacaca aaaagatttt aattttatta aaaaaaaaaa 2640
 aaaaaaagac cgggaattcg atatcaagct tatcgacctg cagatcgttc aaacatttgg 2700
 caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat catataattt 2760
 ctggtgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga 2820
 tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcataga aaacaaaata 2880
 tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gccggtgcat ctatgttact agat 2934

 <210> 33
 <211> 53
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador IF-Rtx_VP4(opt).s1+3c
 10

 <400> 33
 aaattgtcg ggccatggc tagcctgatc tacagacaac tctgaccaa ttc 53

 <210> 34
 15 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador IF-Rtx_VP4(opt).s1-4r

 <400> 34
 actaaagaaa ataggccttc agagtttaca tgcaggatt aattgctcaa tccta 55

 <210> 35
 25 <211> 4068
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Casete de expresión número 1731

 <400> 35
 gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactcctaaa atatcaaaga tacagtctca 60
 gaagacccaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
 tacaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
 ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgtag aaaaagaaga cgttccaacc 300
 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
 tccaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420
 agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg 480

ES 2 658 987 T3

aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata 720
taaggaagtt catttcattt ggagaggat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcga atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
ggcgccatta aataacgtgt acttgcctta ttcttgcgg tgtggcttg ggaaaagaaa 1020
gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
gcggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttcttct 1140
tcttctgtct gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200
tggttttcga acttgagaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg 1260
gccatggct agcctgatct acagacaact cttgaccaat tcatattctg tggatcttca 1320
tgacgaaatc gagcagattg ggtccgagaa gacccagaac gtgaccatca accctggacc 1380
ttttgctcag acccgctatg cccctgtgaa ttgggatcac ggagaaatca acgacagtac 1440
gaccgtcga cccattctgg acgggccata ccaaccacc accttcacc cacctaataga 1500
ttattggatt ttaatcaact ccaacacaaa cggagtggc tacgagtcca ctaataactc 1560
cgatttttg accgccgtt tagccatcga gccacacgct aatcctgtcg atcgccagta 1620
tatgatattc ggcgagtcca aacagtttaa cgtttccaat gacagcaaca aatggaagtt 1680
tctggagatg tttcgagct cctctcagaa cgaattctat aatagacgga cccttacctc 1740
cgatacacga ctcgtgggta tttttaagta cggcggcagg gtgtggacat ttcacggtga 1800
aaccctcga gcaaccactg actccagtag cactgcaaac ctgaacaata tatctattac 1860
catccacagc gaattctaca taatccaag atctcaggaa agtaagtgta acgaatatat 1920
caacaacgga ctcccccaa ttcagaatac acggaacgtg gtgcctctcc cactcagttc 1980
tcggtctatc cagtataaga gagcacaagt gaatgaggac attattgtga gcaagactag 2040
cctttggaaa gaaatgcagt acaacagaga cattatcatc cggtttaagt ttgggaactc 2100
tatcgtgaag atgggcggcc tgggttacia atggtcagaa atctcatata aagccgcaa 2160
ctatcagtat aactactga gagacggcga gcaggtaac gccacacaa catgctctgt 2220
caacggcgtt aataacttta gctacaacgg aggcttcctt cccaccgact tcggtatcag 2280
ccggtatgaa gtcacaaag aaaattctta tgtgtacgta gattactggg atgatagcaa 2340

ES 2 658 987 T3

agcgttccgc aacatggtgt atgtaggag cctggctgct aatctcaatt ctgtgaagtg 2400
 tactggtgga tcatattatt totcaattcc cgtgggggct tggccagtca tgaatggcgg 2460
 ggcagtctcc ctccatthttg ctggcgtgac gttgagcact cagtttaccg atttcgtgtc 2520
 tctgaaactcc ctgaggttcc ggthttccct tactgtcgac gagccccat tcagcattct 2580
 gcgtacaaga actgtcaacc tctacgggtt acctgccgcg aatccaaaca acggcaatga 2640
 atactatgaa atttcgggcc gcttctcttt gataagtctg gtaccaacta atgacgacta 2700
 tcagacaccc atcatgaaca gcgtgactgt cagacaggac ctggaaagac aacttacaga 2760
 tctgcgggaa gaattcaatt ctctcagtca ggagattgca atggccaat tgatagatct 2820
 tgcctactg cctctcgata tgtttagtat gttctccggc atcaaatcaa ctatagatct 2880
 gacaaagagc atggctactt ctgtgatgaa gaagttcagg aatcaaaaac ttgccacgag 2940
 catatcagaa atgacgaact ctctgagtga tgcagcatca tcagcgtcac gcaacgtttc 3000
 cattcggtcg aatctcagcg ccatcagcaa ctggacaaaac gtgtccaacg acgtcagcaa 3060
 cgtgaccaac tccttgaacg atatttctac ccagacgtca acgatcagta agaaactccg 3120
 cttgaaagaa atgatcacc agactgaggg aatgtctttc gacgacattt ccgccgccgt 3180
 gctaaaaacc aaaatcgata tgttactca gatcggcaag aacactctgc cggatatcgt 3240
 aaccgaagcc tccgaaaagt ttatccctaa gcgcagctac agaatttga aagatgacga 3300
 ggtcatggag atcaacacag aagggaagt cttcgttat aagatcaaca cctttgacga 3360
 ggttccgttt gacgtcaata agtttgaga gctcgtgaca gatagtccag tgatttctgc 3420
 catcattgac ttaagactt tgaagaacct gaacgacaac tatggaataa cacggaccga 3480
 agcgttgaac ctcatthaagt ccaatcccaa tatgttgcgc aatttcatta accagaacaa 3540
 tccaatcata agaaatagga ttgagcaatt aatcctgcaa tgtaactct gaaggcctat 3600
 tttctttagt ttgaatttac tgttattcgg tgtgcatttc tatgtttggt gagcgtttt 3660
 ctgtgctcag agtgtgttta ttttatgtaa ttttaatttct ttgtgagctc ctgtttagca 3720
 ggtcgtccct tcagcaagga cacaaaaaga ttttaatttt attaaaaaaa aaaaaaaaaa 3780
 agaccgggaa ttcgatatca agcttatcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa 3840
 agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 3900
 aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 3960
 tttatgatta gagtccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 4020
 gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagat 4068

<210> 36
 <211> 775
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

<400> 36

ES 2 658 987 T3

Met Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Gln Leu Leu Thr Asn Ser Tyr Ser Val
1 5 10 15

Asp Leu His Asp Glu Ile Glu Gln Ile Gly Ser Glu Lys Thr Gln Asn
20 25 30

Val Thr Ile Asn Pro Gly Pro Phe Ala Gln Thr Arg Tyr Ala Pro Val
35 40 45

Asn Trp Asp His Gly Glu Ile Asn Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Ile
50 55 60

Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Thr Pro Pro Asn Asp Tyr
65 70 75 80

Trp Ile Leu Ile Asn Ser Asn Thr Asn Gly Val Val Tyr Glu Ser Thr
85 90 95

Asn Asn Ser Asp Phe Trp Thr Ala Val Val Ala Ile Glu Pro His Val
100 105 110

Asn Pro Val Asp Arg Gln Tyr Met Ile Phe Gly Glu Ser Lys Gln Phe
115 120 125

Asn Val Ser Asn Asp Ser Asn Lys Trp Lys Phe Leu Glu Met Phe Arg
130 135 140

Ser Ser Ser Gln Asn Glu Phe Tyr Asn Arg Arg Thr Leu Thr Ser Asp
145 150 155 160

Thr Arg Leu Val Gly Ile Phe Lys Tyr Gly Gly Arg Val Trp Thr Phe
165 170 175

His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Ala Asn
180 185 190

Leu Asn Asn Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile Ile Pro
195 200 205

Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly Leu Pro
210 215 220

Pro Ile Gln Asn Thr Arg Asn Val Val Pro Leu Pro Leu Ser Ser Arg
225 230 235 240

ES 2 658 987 T3

Ser Ile Gln Tyr Lys Arg Ala Gln Val Asn Glu Asp Ile Ile Val Ser
 245 250 255

Lys Thr Ser Leu Trp Lys Glu Met Gln Tyr Asn Arg Asp Ile Ile Ile
 260 265 270

Arg Phe Lys Phe Gly Asn Ser Ile Val Lys Met Gly Gly Leu Gly Tyr
 275 280 285

Lys Trp Ser Glu Ile Ser Tyr Lys Ala Ala Asn Tyr Gln Tyr Asn Tyr
 290 295 300

Leu Arg Asp Gly Glu Gln Val Thr Ala His Thr Thr Cys Ser Val Asn
 305 310 315 320

Gly Val Asn Asn Phe Ser Tyr Asn Gly Gly Phe Leu Pro Thr Asp Phe
 325 330 335

Gly Ile Ser Arg Tyr Glu Val Ile Lys Glu Asn Ser Tyr Val Tyr Val
 340 345 350

Asp Tyr Trp Asp Asp Ser Lys Ala Phe Arg Asn Met Val Tyr Val Arg
 355 360 365

Ser Leu Ala Ala Asn Leu Asn Ser Val Lys Cys Thr Gly Gly Ser Tyr
 370 375 380

Tyr Phe Ser Ile Pro Val Gly Ala Trp Pro Val Met Asn Gly Gly Ala
 385 390 395 400

Val Ser Leu His Phe Ala Gly Val Thr Leu Ser Thr Gln Phe Thr Asp
 405 410 415

Phe Val Ser Leu Asn Ser Leu Arg Phe Arg Phe Ser Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Glu Pro Pro Phe Ser Ile Leu Arg Thr Arg Thr Val Asn Leu Tyr Gly
 435 440 445

Leu Pro Ala Ala Asn Pro Asn Asn Gly Asn Glu Tyr Tyr Glu Ile Ser
 450 455 460

Gly Arg Phe Ser Leu Ile Ser Leu Val Pro Thr Asn Asp Asp Tyr Gln
 465 470 475 480

Thr Pro Ile Met Asn Ser Val Thr Val Arg Gln Asp Leu Glu Arg Gln
 485 490 495

ES 2 658 987 T3

Leu Thr Asp Leu Arg Glu Glu Phe Asn Ser Leu Ser Gln Glu Ile Ala
 500 505 510

Met Ala Gln Leu Ile Asp Leu Ala Leu Leu Pro Leu Asp Met Phe Ser
 515 520 525

Met Phe Ser Gly Ile Lys Ser Thr Ile Asp Leu Thr Lys Ser Met Ala
 530 535 540

Thr Ser Val Met Lys Lys Phe Arg Lys Ser Lys Leu Ala Thr Ser Ile
 545 550 555 560

Ser Glu Met Thr Asn Ser Leu Ser Asp Ala Ala Ser Ser Ala Ser Arg
 565 570 575

Asn Val Ser Ile Arg Ser Asn Leu Ser Ala Ile Ser Asn Trp Thr Asn
 580 585 590

Val Ser Asn Asp Val Ser Asn Val Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ile Ser
 595 600 605

Thr Gln Thr Ser Thr Ile Ser Lys Lys Leu Arg Leu Lys Glu Met Ile
 610 615 620

Thr Gln Thr Glu Gly Met Ser Phe Asp Asp Ile Ser Ala Ala Val Leu
 625 630 635 640

Lys Thr Lys Ile Asp Met Ser Thr Gln Ile Gly Lys Asn Thr Leu Pro
 645 650 655

Asp Ile Val Thr Glu Ala Ser Glu Lys Phe Ile Pro Lys Arg Ser Tyr
 660 665 670

Arg Ile Leu Lys Asp Asp Glu Val Met Glu Ile Asn Thr Glu Gly Lys
 675 680 685

Phe Phe Ala Tyr Lys Ile Asn Thr Phe Asp Glu Val Pro Phe Asp Val
 690 695 700

Asn Lys Phe Ala Glu Leu Val Thr Asp Ser Pro Val Ile Ser Ala Ile
 705 710 715 720

Ile Asp Phe Lys Thr Leu Lys Asn Leu Asn Asp Asn Tyr Gly Ile Thr
 725 730 735

Arg Thr Glu Ala Leu Asn Leu Ile Lys Ser Asn Pro Asn Met Leu Arg
 740 745 750

ES 2 658 987 T3

Asn Phe Ile Asn Gln Asn Asn Pro Ile Ile Arg Asn Arg Ile Glu Gln
 755 760 765

Leu Ile Leu Gln Cys Lys Leu
 770 775

5 <210> 37
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1+3c

<400> 37
 aaattgtcg ggcccatgta cggcacgag tatacaaca ttttaattt c 51

15 <210> 38
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r

<400> 38
 actaaagaaa ataggcctct aaacgcgata atagaaggct gctgagtca ggga 54

25 <210> 39
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

30 <400> 39
 Met Tyr Gly Ile Glu Tyr Thr Thr Ile Leu Ile Phe Leu Ile Ser Ile
 1 5 10 15
 Ile Leu Leu Asn Tyr Ile Leu Lys Ser Val Thr Arg Ile Met Asp Tyr
 20 25 30
 Ile Ile Tyr Arg Ser Leu Leu Ile Tyr Val Ala Leu Phe Ala Leu Thr
 35 40 45
 Arg Ala Gln Asn Tyr Gly Leu Asn Leu Pro Ile Thr Gly Ser Met Asp
 50 55 60
 Thr Val Tyr Ala Asn Ser Thr Gln Glu Gly Ile Phe Leu Thr Ser Thr
 65 70 75 80
 Leu Cys Leu Tyr Tyr Pro Thr Glu Ala Ser Thr Gln Ile Asn Asp Gly
 85 90 95

ES 2 658 987 T3

Glu Trp Lys Asp Ser Leu Ser Gln Met Phe Leu Thr Lys Gly Trp Pro
 100 105 110
 Thr Gly Ser Val Tyr Phe Lys Glu Tyr Ser Ser Ile Val Asp Phe Ser
 115 120 125
 Val Asp Pro Gln Leu Tyr Cys Asp Tyr Asn Leu Val Leu Met Lys Tyr
 130 135 140
 Asp Gln Asn Leu Glu Leu Asp Met Ser Glu Leu Ala Asp Leu Ile Leu
 145 150 155 160
 Asn Glu Trp Leu Cys Asn Pro Met Asp Ile Thr Leu Tyr Tyr Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Ser Gly Glu Ser Asn Lys Trp Ile Ser Met Gly Ser Ser Cys Thr
 180 185 190
 Val Lys Val Cys Pro Leu Asn Thr Gln Met Leu Gly Ile Gly Cys Gln
 195 200 205
 Thr Thr Asn Val Asp Ser Phe Glu Met Val Ala Glu Asn Glu Lys Leu
 210 215 220
 Ala Ile Val Asp Val Val Asp Gly Ile Asn His Lys Ile Asn Leu Thr
 225 230 235 240
 Thr Thr Thr Cys Thr Ile Arg Asn Cys Lys Lys Leu Gly Pro Arg Glu
 245 250 255
 Asn Val Ala Val Ile Gln Val Gly Gly Ser Asn Val Leu Asp Ile Thr
 260 265 270
 Ala Asp Pro Thr Thr Asn Pro Gln Thr Glu Arg Met Met Arg Val Asn
 275 280 285
 Trp Lys Lys Trp Trp Gln Val Phe Tyr Thr Ile Val Asp Tyr Ile Asn
 290 295 300
 Gln Ile Val Gln Val Met Ser Lys Arg Ser Arg Ser Leu Asn Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Phe Tyr Tyr Arg Val
 325

<210> 40

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 658 987 T3

<220>
<223> Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s2+4c

5 <400> 40
tctcagatct tcgccagaa ctatggcctg aacttaccaa tcaccggttc aatggatacc 60

10 <210> 41
<211> 4897
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción 1192

15 <400> 41
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgtttgtca 120
aataactcaa aaaccataaa agttaaagtt agcaagtgtg tacatattta cttgaacaaa 180
aatattcacc tactactggt ataatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttggt gcaacatttg agaaaatttt 300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa 480
taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540
aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660
taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcatattta 720
tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctocaaaa aaaaaaacg 780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccacttta gccacgcat 900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatacaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960
accaatcac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140
gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta ttaagagat atctcagata cgacagagcg 1320

ES 2 658 987 T3

gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcgggtaa ctatgcagca 1380
 tctcgaatctt tccggtttcga ccagatcggg tgtacctata gtattcgggt tccgaggagt 1440
 agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
 tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
 tgcctcgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttctcgt 1620
 ctcctattta taatatggtt tgttattggt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
 tcggtgtgtg tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
 ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
 cgtacaattg tcttatatct gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
 gtggtaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
 tatcgaatc cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
 ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
 ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
 cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgcagc ccggtcaaca tgggtggagca 2160
 cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat 2220
 tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gccagctat 2280
 ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg 2340
 cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc 2400
 cccaccacag aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 2460
 ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacactgtgc tactcraaaa atatcaaga 2520
 tacagtctca gaagaccaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa 2580
 cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga 2640
 aggtggtcct tacaatgcc atcattgcca taaaggaag gccatcgttg aagatgcctc 2700
 tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccagagg agcatcgttg aaaaagaaga 2760
 cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaagga 2820
 tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca 2880
 tttggagagg tattaatac ttaaatagggt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaaccgaa 2940
 ccaaaccttc ttctaaactc tctctcatct ctcttaagc aaacttctct cttgtcttcc 3000
 ttgcgtgagc gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt 3060
 tcaactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg 3120
 tgtactgtgc ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct 3180

ES 2 658 987 T3

gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcggtg caatatctct 3240
acttctgctt gacgaggtat tgttgcctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt 3300
tctataagaa atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtgggttt cgaacttggga 3360
gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggcccatg gcgaaaaacg 3420
ttgcgatttt cggttattg ttttctcttc ttgtgttggg tccttctcag atcttcgccg 3480
cggctcctca gccaaaacga caccctcatc tgtctatcca ctggcccctg gatctgctgc 3540
ccaaactaac tccatggtga ccctgggatg cctggtcaag ggctatttcc ctgagccagt 3600
gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcgggtg cacaccttc cagctgtcct 3660
gcagtctgac ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag 3720
cgagaccgtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaa 3780
tgtgcccagg gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt 3840
cttcatcttc ccccaaacg ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac 3900
gtgtgttgtg gtgagacatca gcaaggatga tcccagggtc cagttcagct ggtttgtaga 3960
tgatgtggag gtgcacacag ctcagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt 4020
ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagcgatc 4080
gctcaccatc accatcacca tcaccatcac cattaagggc ctatcttctt tagtttgaat 4140
ttactgttat tcggtgtgca tttctatggt tgggtgagcgg ttttctgtgc tcagagtgtg 4200
tttattttat gtaatttaat ttctttgtga gctcctgttt agcaggctcgt cccttcagca 4260
aggacacaaa aagattttaa ttttattaaa aaaaaaaaa aaaaagaccg ggaattcgat 4320
atcaagctta tcgacctgca gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga 4380
atcctgttgc cggcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg 4440
taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc 4500
cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat 4560
tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag atctctagag tctcaagctt ggcgcgccc 4620
cgtgactagt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaaac cctggcgтта 4680
cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 4740
cccgaccgca tcgccccttc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgc tagagcagct 4800
tgagcttggga tcagattgtc gtttcccgcc ttcagtttaa actatcagtg tttgacagga 4860
tatattggcg ggtaaaccta agagaaaaga gcgttta 4897

<210> 42
<211> 2643
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

5

ES 2 658 987 T3

<223> Casete de expresión número 1735

<400> 42

gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca	60
gaagaccaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga	120
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc	180
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt	240
ggccccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtag aaaaagaaga cgttccaacc	300
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtag agcacgacac acttgtctac	360
tccaaaaata tcaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaaaa	420
agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg	480
aagatagtag aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaagggc	540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaagatg gacccccacc cacgaggagc	600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc	660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata	720
taaggaagt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga	780
acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa	840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgt cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac	900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcga atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc	960
ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttctgtcgg tgtggctctg ggaaaagaaa	1020
gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg	1080
gcggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttctct	1140
tcttctgtc gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg	1200
tggttttoga acttgagaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg	1260
gccccatggc aaaaacgttg cgattttcgg cttattgttt tctcttcttg tgttggttcc	1320
ttctcagatc ttgcgccaga actatggcct gaacttacc atcaccggtt caatggatac	1380
cgtttacgct aattccactc aagaggggat atttctgaca agtaccctgt gcctgtatta	1440
tccaacagaa gcctctacc agatcaatga tggggagtgg aaggatagtc tctcacagat	1500
gttctaacc aagggctggc ccaccggtc cgtctacttc aaggaatact ctagtattgt	1560
cgacttctca gttgaccccc agctttattg cgactacaac ctggtactta tgaatacga	1620
ccagaacctg gagctggata tgtccgagct ggctgacctg atcctcaatg agtggctgtg	1680
caaccccatg gacatcacat tatattacta ccagcagtct ggagaatcca acaagtggat	1740

ES 2 658 987 T3

cagtatgggc tcaagttgca ccgtgaaggt gtgtcccttg aacacccaaa tgctgggcat 1800
 tggttgtcag acaactaatg tggattcggt tgaaatggta gccgaaaacg agaagctggc 1860
 tatagtggac gtagtcgatg ggattaacca caagatcaat ctgactacca ccacttgtag 1920
 catcagaaac tgtaaaaagc tcggcccccg ggagaacgtc gccgtgatcc aggtgggggg 1980
 gagcaatgtg ctgcacatta ctgccgaccc taccaccaat ccacagacgg aacggatgat 2040
 gagagtcaac tggaagaaat ggtggcaggt cttttatacc attgtggact acattaacca 2100
 gattgtgcaa gtcatgagta aacggtccag atccctgaac tcagcagcct tctattatcg 2160
 cgtttagagg cctatcttct ttagtttgaa tttactgtta ttcgggtgtgc atttctatgt 2220
 ttggtgagcg gttttctgtg ctccagagtgt gtttatttta tgtaatttaa tttctttgtg 2280
 agctcctggt tagcaggtcg tcccttcagc aaggacacaa aaagatttta atttattaa 2340
 aaaaaaaaa aaaaaagacc ggaattcga tatcaagctt atcgacctgc agatcgttca 2400
 aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc 2460
 atataatttc tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta 2520
 tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa 2580
 aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta 2640
 gat 2643

<210> 43
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

5

<400> 43
 Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Gln Asn Tyr Gly Leu Asn Leu Pro
 20 25 30
 Ile Thr Gly Ser Met Asp Thr Val Tyr Ala Asn Ser Thr Gln Glu Gly
 35 40 45
 Ile Phe Leu Thr Ser Thr Leu Cys Leu Tyr Tyr Pro Thr Glu Ala Ser
 50 55 60
 Thr Gln Ile Asn Asp Gly Glu Trp Lys Asp Ser Leu Ser Gln Met Phe
 65 70 75 80
 Leu Thr Lys Gly Trp Pro Thr Gly Ser Val Tyr Phe Lys Glu Tyr Ser
 85 90 95

ES 2 658 987 T3

Ser Ile Val Asp Phe Ser Val Asp Pro Gln Leu Tyr Cys Asp Tyr Asn
 100 105 110

Leu Val Leu Met Lys Tyr Asp Gln Asn Leu Glu Leu Asp Met Ser Glu
 115 120 125

Leu Ala Asp Leu Ile Leu Asn Glu Trp Leu Cys Asn Pro Met Asp Ile
 130 135 140

Thr Leu Tyr Tyr Tyr Gln Gln Ser Gly Glu Ser Asn Lys Trp Ile Ser
 145 150 155 160

Met Gly Ser Ser Cys Thr Val Lys Val Cys Pro Leu Asn Thr Gln Met
 165 170 175

Leu Gly Ile Gly Cys Gln Thr Thr Asn Val Asp Ser Phe Glu Met Val
 180 185 190

Ala Glu Asn Glu Lys Leu Ala Ile Val Asp Val Val Asp Gly Ile Asn
 195 200 205

His Lys Ile Asn Leu Thr Thr Thr Thr Cys Thr Ile Arg Asn Cys Lys
 210 215 220

Lys Leu Gly Pro Arg Glu Asn Val Ala Val Ile Gln Val Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Asn Val Leu Asp Ile Thr Ala Asp Pro Thr Thr Asn Pro Gln Thr Glu
 245 250 255

Arg Met Met Arg Val Asn Trp Lys Lys Trp Trp Gln Val Phe Tyr Thr
 260 265 270

Ile Val Asp Tyr Ile Asn Gln Ile Val Gln Val Met Ser Lys Arg Ser
 275 280 285

Arg Ser Leu Asn Ser Ala Ala Phe Tyr Tyr Arg Val
 290 295 300

<210> 44
 <211> 4068
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223>
 Casete de expresión número 1730

10

<400> 44

ES 2 658 987 T3

gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60
 gaagacccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
 taaaaatgcc atcattgcca taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
 ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300
 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
 tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420
 agggaatat ccggaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg 480
 aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540
 atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
 atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
 tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttctctata 720
 taaggaagt catttcattt ggagaggat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
 acgtgggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
 cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
 cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
 ggcgccatta aataacgtgt acttgcctta ttcttgcgg tgtggctctg ggaaaagaaa 1020
 gcttgctgga ggctgctggt cagccccata cactacttgt tacgattctg ctgactttog 1080
 gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttctct 1140
 tcttctgct gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200
 tggttttcga acttgagaaa agattgtaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg 1260
 gccatggct agcctgatct acagacaact cttgaccaat tcatattctg tggatcttca 1320
 tgacgaaatc gagcagattg ggtccgagaa gaccagaac gtgaccatca accctggacc 1380
 ttttgctcag acccgctatg ccctgtgaa ttgggatcac ggagaaatca acgacagtac 1440
 gaccgtcga cccattctgg acgggccata ccaaccacc accttcccc cacctaataga 1500
 ttattggatt ttaatcaact ccaacacaaa cggagtggc tacgagtcca ctaataactc 1560
 cgatttttg accgctgtg tagccatcga gccacacgtc aatcctgtcg atgccagta 1620
 tatgatattc ggcgagtcca aacagtttaa cgtttccaat gacagcaaca aatggaagtt 1680
 tctggagatg tttcgcagct cctctcagaa cgaattctat aatagacgga cccttacctc 1740
 cgatacacga ctctgggta tttttaagta cggcggcagg gtgtggacat ttcacggtga 1800
 aaccctcga gcaaccactg actccagtag cactgcaaac ctgaacaata tatctattac 1860
 catccacagc gaattctaca taatcccaag atctcaggaa agtaagtgta acgaatatat 1920

ES 2 658 987 T3

caacaacgga ctcccccaa ttcagaatac acggaacgtg gtgcctctcc cactcagttc 1980
tcggtctatc cagtataaga gagcacaagt gaatgaggac attattgtga gcaagactag 2040
cctttgaaa gaaatgcagt acaacagaga cattatcatc cggtttaagt ttgggaactc 2100
tatcgtgaag atgggcggcc tgggttacia atggtcagaa atctcatata aagccgcaa 2160
ctatcagtat aactacttga gagacggcga gcaggtaacc gcccacacia catgctctgt 2220
caacggcgtt aataacttta gctacaacgg aggcttcctt cccaccgact tcggtatcag 2280
ccggtatgaa gtcatacaagg aaaattctta tgtgtacgta gattactggg atgatagcaa 2340
agcgttccgc aacatggtgt atgttaggag cctggctgct aatctcaatt ctgtgaagtg 2400
tactggtgga tcatattatt tctcaattcc cgtgggggct tggccagtca tgaatggcgg 2460
ggcagtctcc ctccattttg ctggcgtgac gttgagcact cagtttaccg atttcgtgtc 2520
tctgaaactcc ctgaggttcc ggttttcctt tactgtcgac gagccccat tcagcattct 2580
gcgtaacaaga actgtcaacc tctacgggtt acctgccgg aatccaaaca acggcaatga 2640
atactatgaa atttcgggcc gcttctcttt gataagtctg gtaccaacta atgacgacta 2700
tcagacaccc atcatgaaca gcgtgactgt cagacaggac ctggaaagac aacttacaga 2760
tctgcgggaa gaattcaatt ctctcagtca ggagattgca atggcccaat tgatagatct 2820
tgccctactg cctctcgata tgtttagtat gttctccggc atcaaatcaa ctatagatct 2880
gacaaagagc atggctactt ctgtgatgaa gaagttcagg aaatcaaac ttgccacgag 2940
catatcagaa atgacgaact ctctgagtga tgcagcatca tcagcgtcac gcaacgtttc 3000
cattcggtcg aatctcagcg ccatcagcaa ctggacaaac gtgtccaacg acgtcagcaa 3060
cgtgaccaac tcttgaacg atatttctac ccagacgtca acgatcagta agaaactccg 3120
cttgaagaa atgatcacc agactgaggg aatgtctttc gacgacattt ccgccgccgt 3180
gctaaaaacc aaaatcgata tgtctactca gatcggcaag aacactctgc cggatatcgt 3240
aaccgaagcc tccgaaaagt ttatccctaa gcgcagctac agaatttga aagatgacga 3300
ggatcatggag atcaacacag aagggaagtt cttcgttat aagatcaaca cctttgacga 3360
ggttccgttt gacgtcaata agtttgaga gctcgtgaca gatagtccag tgatttctgc 3420
catcattgac ttttaagact tgaagaacct gaacgacaa tatggaataa cacggaccga 3480
agcgttgaac ctcatthaag ccaatcccaa tatgttgccg aatttcatta accagaacia 3540
tccaatcata agaaatagga ttgagcaatt aatcctgcaa tgtaaactct gaaggcctat 3600
tttcttagt ttgaatttac tgttattcgg tgtgcatctc tatgtttggt gagcggtttt 3660
ctgtgctcag agtgtgttta ttttatgtaa ttttaattct ttgtgagctc ctgtttagca 3720
ggcgtccct tcagcaagga cacaaaaaga ttttaatttt attaaaaaa aaaaaaaaa 3780

ES 2 658 987 T3

agaccgggaa ttcgatatca agcttatcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa 3840
 agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 3900
 aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatggggtt 3960
 tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 4020
 gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagat 4068

<210> 45
 <211> 2673
 <212> ADN
 <213> Rotavirus

5

<400> 45
 atggcatacc ggaagagagg agcaaagcgc gaaaacctgc cgcaacagaa cgagagactg 60
 caagaaaaag agatagagaa agatgtcgac gtaacaatgg aaaacaagaa taacaatagg 120
 aaacaacagc tgtccgacaa agttctgtcc cagaaggagg aaattatcac tgacgcccag 180
 gacgatatta aaattgccgg agaaataaag aagagctcga aagaagaatc taaacagctg 240
 ctcgaaattc tgaaaaacaa agaagacat cagaaagaga ttcaatatga aattttgcaa 300
 aaaacaatac ctacatttga gtccaaagaa agtatcctca agaagcttga agacataaga 360
 cgggagcagg caaaaaaaca gatgaaactc tttcgcattt tcgagccaaa acagctccct 420
 atatatcgcg ccaatggcga gaaggagcta cgcaaccggt ggtactggaa gttgaaaaaa 480
 gacaccctgc cagatggaga ttatgacgtc cgggagtatt tcctcaatct ctatgatcag 540
 atcctcatcg aaatgccgga ctatctgtc ctcaaggaca tggccgtgga gaacaaaaat 600
 agcagagacg ccggcaaaagt tgtcgactct gagactgcca atatttgtga tgccatcttc 660
 caggatgagg agaccgagg agtcgtccgt agattcatcg ctgatatcg gcaacaggtc 720
 caggctgac gtaacattgt caattaccct tccatccttc accctattga tcatgcatc 780
 aatgagtatt ttcttaacca ccagttggtg gagccgctga acaatgagat aatcttcaat 840
 tacataccag agaggataag gaatgacgtg aattacatcc tgaacatgga tatgaatctg 900
 ccctctacag ccaggtatat caggccaaac ttgttgcagg atagactgaa tcttcacgat 960
 aattttgagt ccctgtggga taccatcaca acatccaact acattctggc caggctccgtc 1020
 gttcccgatt tgaaggagaa ggagctggtc tccaccgaag cacagatcca gaaaatgagc 1080
 caggacctgc agctggaggc cctcactatt cagagcgaga cacagttttt agccgggatt 1140
 aacagtcagg ctgccaatga ttgtttcaag accctcatag ccgccatgct gtctcaaaga 1200
 accatgtcct tggactttgt gaccacgaac tatatgagcc taatctccgg aatgtggcta 1260
 cttacagtga ttcccaacga tatgttcctc cgggagtcac tagtggcctg tgagctggcg 1320
 atcatcaaca ccactcgtgta tccagcattc ggaatgcaga gaatgcatta ccggaatggc 1380

ES 2 658 987 T3

gaccctcaga cacccttcca gatcgcagaa cagcagatcc agaatttcca ggtggcgaac 1440
 tggtccatt ttattaacaa taacagattc aggcaagttg tgattgatgg agttctgaat 1500
 cagactctga acgacaatat acggaatgga caggctcatca accagctgat ggaagcattg 1560
 atgcaactca gcagacagca gttccccacg atgcctgtgg attacaaacg gagcatccaa 1620
 cggggcattc tgcttctctc caataggctg gggcagcttg tcgacttaac cggactggtc 1680
 tcctataact acgagacgct aatggcttgt gtgaccatga acatgcagca cgtgcaaacc 1740
 ctgacaactg agaagttgca gctcacttct gtgacttcgc tttgtatggt aattggtaac 1800
 acaaccgtga ttccgtcccc acagacactg ttccactact acaacatcaa cgtgaatttc 1860
 cactccaatt ataatgagcg gatcaacgac gccgtcgcca taattaccgc agcaaatagg 1920
 ctgaatcttt atcagaaaaa aatgaagtcc atagtggag actttctgaa acggctccag 1980
 atttctgacg taccacgagt gcctgacgac caaatgtaca ggctgaggga tcgccttogg 2040
 ctcttaccgg ttgaacggag acggcttgac atattcaact tgatcctgat gaatatggag 2100
 cagatcgaac gcgcttctga taagattgct cagggggtta tcatcgcata ccgagatatg 2160
 cagctggaac gcgacgagat gtacggatat gttaatattg cacggaatct tgatggctac 2220
 cagcaaatta acttgaggga actcatgctc accggtgatt acggacaaat tacgaacatg 2280
 cttctcaaca atcaaccctg tgccttctgt ggtgcattgc ccttcgttac ggactcatcc 2340
 gtgatcagtc taatcgccaa gctcgcagca accgtcttcg ctccagatagt gaagctcagg 2400
 aaagttgaca cactgaagcc catactgtac aaaataaact cggattccaa tgacttttac 2460
 cttgtggcca actacgactg gatccccaca agtacaacta aggtctacaa acaggtgcca 2520
 caaccattcg acttttagagc cagcatgcac atgctgactt ctaaccttac gtttacgctc 2580
 tactctgacc tactgtcatt tgtttcagcg gacacggtag agcccattaa cgcagctcgca 2640
 ttcgacaata tgcaataat gaacgagctt taa 2673

<210> 46
 <211> 1194
 <212> ADN
 <213> Rotavirus

<400> 46
 atggaggctc tttatagtct ctccaaaacg ctgaaggacg ctagggacaa gatcgtggag 60
 ggtacacttt atagcaatgt cagcgcaccta atacagcagt ttaatcaaat gatcgttaca 120
 atgaatggga atgatttcca aactggcggg attggtaatc tgcccgtagg gaactggaca 180
 ttcgatctcg gcctgctggg cagcactctc cttaatctcg atgcaaatta tgtagaaaac 240
 gccagaacga ttatcgagta cttatcagat ttcatgata acgtttgtat ggatgagatg 300
 gccgcgaggt cacaacggaa cggagttgct ccacagtcgg aggcccttcg gaaactcgcc 360

5

ES 2 658 987 T3

ggcattaagt tcaagcgtat taatttcgac aactcctccg aatatataga gaactggaac 420
 ttgcagaatc gtcgacagag aaccggcttc gtgttcata aacctaatat ctttccgtat 480
 agcgcctcat tcaccctgaa taggagtcag cccatgcaag acaacctcat gggtagaatg 540
 tggctgaatg cggggagtga aatacaggtc gccgggttcg attactcctg tgccattaat 600
 gcacccgcaa acatccagca gttcgaacat atcgtgcaac taagacgggc tctcacgacc 660
 gcgacaatta cactcctgcc cgacgccgag cgcttctcct tcccccgct aatcaactca 720
 gctgatggcg ccaccacttg gttcttcaac cctgttata tgcgccctaa caacgtagag 780
 gtggagtttc tcttaaacgg acagatcatc aatacctacc aagccaggtt cggcacgatt 840
 attgcaagaa atttcgacgc tatcaggctg ctcttccaac tgatgaggcc cccaatatg 900
 actcccgctg tgaacgcttt gtttccgag gctcagcctt tccagacca cgccacgctc 960
 ggcttgactc ttcgaataga gagcgggtc tgcaatcag tgctggcaga cgccaacgag 1020
 acgctgctgg caaacgttac cgccgtgctg caagagtatg ccatcccagt agggcctgtg 1080
 tttccaaccg gcatgaactg gactgaacta attactaact atagccatc cagagaagac 1140
 aactgcagc ggtcttcac tgtggcctct atccggagta tgttgatcaa gtag 1194

<210> 47
 <211> 2328
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-
 A41CB052A/1988/G1P1A[8]

10

<400> 47
 atggctagcc tgatctacag acaactcttg accaattcat attctgtgga tcttcatgac 60
 gaaatcgagc agattgggtc cgagaagacc cagaacgtga ccatcaacc tggacctttt 120
 gctcagacc gctatgcccc tgtgaattgg gatcacggag aatcaacga cagtacgacc 180
 gtcgaacca ttctggacgg gccataccea cccaccact tcacccacc taatgattat 240
 tggattttaa tcaactcaa cacaacgga gtggctacg agtccactaa taactccgat 300
 ttttgaccg ccggtgtagc catcgagcca cagctcaatc ctgtcgatcg ccagtatatg 360
 atattcggcg agtccaaaca gtttaacgtt tccaatgaca gcaacaaatg gaagtttctg 420
 gagatgtttc gcagctcctc tcagaacgaa ttctataata gacggaccct tacctccgat 480
 acacgactcg tgggtatfff taagtacggc ggcaggggtg ggacatttca cggtgaaacc 540
 cctcgagcaa ccaactgactc cagtagcact gcaaacctga acaatatatc tattaccatc 600
 cacagcgaat tctacataat cccaagatct caggaaagta agtgaacga atatatcaac 660
 aacggactcc cccaattca gaatacacgg aacgtggtgc ctctcccact cagttctcgg 720

ES 2 658 987 T3

tctatccagt ataagagagc acaagtgaat gaggacatta ttgtgagcaa gactagcctt 780
 tggaaagaaa tgcagtacaa cagagacatt atcatccggg ttaagtttgg gaactctatc 840
 gtgaagatgg gcggcctggg gtacaaatgg tcagaaatct catataaagc cgccaactat 900
 cagtataact acttgagaga cggcgagcag gtaaccgccc acacaacatg ctctgtcaac 960
 ggcgttaata actttagcta caacggaggc ttccttccca cggacttcgg tatcagccgg 1020
 tatgaagtca tcaaggaaaa ttcttatgtg tacgtagatt actgggatga tagcaaagcg 1080
 ttccgcaaca tgggtgatgt taggagcctg gctgctaatac tcaattctgt gaagtgtact 1140
 ggtgatcat attatctctc aattcccgtg ggggcttggc cagtcatgaa tggcggggca 1200
 gtctccctcc attttgctgg cgtgacgttg agcactcagt ttaccgattt cgtgtctctg 1260
 aactccctga ggttccgggtt ttcccttact gtcgacgagc cccattcag cattctcggt 1320
 acaagaactg tcaacctcta cgggttacct gccgcgaatc caaacaacgg caatgaatac 1380
 tatgaaattt cgggccgctt ctctttgata agtctgggtac caactaatga cgactatcag 1440
 acaccatca tgaacagcgt gactgtcaga caggacctgg aaagacaact tacagatctg 1500
 cgggaagaat tcaattctct cagtcaggag attgcaatgg cccaattgat agatcttgcc 1560
 ctactgcctc tcgatatggt tagtatgttc tccggcatca aatcaactat agatctgaca 1620
 aagagcatgg ctacttctgt gatgaagaag ttcaggaaat caaaacttgc cacgagcata 1680
 tcagaaatga cgaactctct gagtgatgca gcatcatcag cgtcacgcaa cgtttccatt 1740
 cggtcgaatc tcagcgccat cagcaactgg acaaacgtgt ccaacgacgt cagcaacgtg 1800
 accaactcct tgaacgatat ttctaccag acgtcaacga tcagtaagaa actccgcttg 1860
 aaagaaatga tcaccagac tgagggaatg tctttogacg acatttccgc cgccgtgcta 1920
 aaaacaaaa tcgatatgtc tactcagatc ggcaagaaca ctctgccgga tatcgtaacc 1980
 gaagcctccg aaaagtttat ccctaagcgc agctacagaa tattgaaaga tgacgaggtc 2040
 atggagatca acacagaagg gaagttcttc gcttataaga tcaacacctt tgacgaggtt 2100
 ccgtttgacg tcaataagtt tgcagagctc gtgacagata gtccagtgat ttctgccatc 2160
 attgacttta agactttgaa gaacctgaac gacaactatg gaataacacg gaccgaagcg 2220
 ttgaacctca ttaagtccaa tcccaatatg ttgcgcaatt tcattaacca gaacaatcca 2280
 atcataagaa ataggattga gcaattaatc ctgcaatgta aactctga 2328

<210> 48
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Rotavirus

<400> 48
 atgtacggca tcgagtatac aacaatttta attttctga tttccatcat tctgttaaac 60

5

ES 2 658 987 T3

tacatcctta agtccgtgac cagaattatg gattatatta tctatcgtag ctcctcatc 120
 tacgtggccc tttttgcctt gaccagggcc cagaactatg gcctgaactt accaatcacc 180
 ggttcaatgg ataccgttta cgctaattcc actcaagagg ggatatttct gacaagtacc 240
 ctgtgcctgt attatccaac agaagcctct acccagatca atgatgggga gtggaaggat 300
 agtctctcac agatgttcct aaccaagggc tggcccaccg gttccgtcta cttcaaggaa 360
 tactctagta ttgtcgactt ctcagttgac ccccagcttt attgcgacta caacctggta 420
 cttatgaaat acgaccagaa cctggagctg gatatgtccg agctggctga cctgatcctc 480
 aatgagtggc tgtgcaaccc catggacatc acattatatt actaccagca gtctggagaa 540
 tccaacaagt ggatcagtat gggctcaagt tgcaccgtga aggtgtgtcc cttgaacacc 600
 caaatgctgg gcattggttg tcagacaact aatgtggatt cgtttgaaat ggtagccgaa 660
 aacgagaagc tggctatagt ggacgtagtc gatgggatta accacaagat caatctgact 720
 accaccactt gtaccatcag aaactgtaaa aagctcggcc cccgggagaa cgtcgcctgtg 780
 atccaggtgg gggggagcaa tgtgctcgac attactgccc accctaccac caatccacag 840
 acggaacgga tgatgagagt caactggaag aaatggtggc aggtctttta taccattgtg 900
 gactacatta accagattgt gcaagtcatg agtaaacggt ccagatccct gaactcagca 960
 gccttctatt atcgcgttta g 981

<210> 49
 <211> 903
 <212> ADN
 <213> Rotavirus

5

<400> 49
 atggcgaaaa acgttgcgat tttcggctta ttgttttctc ttcttgtgtt ggttccttct 60
 cagatcttcg cccagaacta tggcctgaac ttaccaatca ccggttcaat ggataccggt 120
 tacgctaatt ccaactcaaga ggggatattt ctgacaagta ccctgtgcct gtattatcca 180
 acagaagcct ctaccagat caatgatggg gagtgaagg atagtctctc acagatgttc 240
 ctaaccaagg gctggcccac cggttccgtc tacttcaagg aatactctag tattgtcgac 300
 ttctcagttg acccccagct ttattgcgac tacaacctgg tacttatgaa atacgaccag 360
 aacctggagc tggatatgtc cgagctggct gacctgatcc tcaatgagtg gctgtgcaac 420
 cccatggaca tcacattata ttactaccag cagtctggag aatccaacaa gtggatcagt 480
 atgggctcaa gttgcaccgt gaaggtgtgt cccttgaaca cccaaatgct gggcattggt 540
 tgtcagacaa ctaatgtgga ttcgtttgaa atggtagccg aaaacgagaa gctggctata 600
 gtggacgtag tcgatgggat taaccacaag atcaatctga ctaccaccac ttgtaccatc 660
 agaaaactgta aaaagctcgg cccccgggag aacgtcgcgg tgatccaggt ggggggggagc 720

ES 2 658 987 T3

aatgtgctcg acattactgc cgaccctacc accaatccac agacggaacg gatgatgaga 780
 gtcaactgga agaaatgggtg gcaggtcttt tataccattg tggactacat taaccagatt 840
 gtgcaagtca tgagtaaacg gtccagatcc ctgaactcag cagccttcta ttatcgcggt 900
 tag 903

<210> 50
 <211> 2331
 <212> ADN
 <213> Rotavirus

5

<400> 50
 atggcttcgc tcatttatag acaattgctc acgaattctt atacagtaga tttatccgat 60
 gagatacaag agattggatc aactaaatca caaaatgtca caattaatcc tggaccattt 120
 gcgcaaacag gttatgctcc agttaactgg ggacctggag aaattaatga ttctacgaca 180
 gttgaacctt tgctggatgg gccttatcaa ccaacgacat tcaatccacc agtcgattat 240
 tggatgttac tggctccaac gacacctggc gtaattgttg aaggtacaaa taatacagat 300
 agatggttag ccacaatfff aatcgagcca aatgttcagt ctgaaaatag aacttacct 360
 atatttggtt ttcaagaaca attaacggta tccaatactt cacaagacca gtggaaatff 420
 attgatgtcg taaaaacaac tgcaaatgga agtataggac aatatggacc attactatcc 480
 agtccgaaat tatatgcagt tatgaagcat aatgaaaaat tatatacata tgaaggacag 540
 acacctaacg ctaggacagc acattattca acaacgaatt atgattctgt taatatgact 600
 gctttttgtg actttttatat aattcctaga tctgaagagt ctaaatgtac ggaatacatt 660
 aataatggat taccaccaat acaaaaact agaaatgttg taccattatc gttgactgct 720
 agagatgtaa tacactatag agctcaagct aatgaagata ttgtgatatc caagacatca 780
 ttgtgaaag aaatgcaata taatagagat ataactatta gatttaaatt tgcaaataca 840
 attataaaat caggagggct gggatataag tggtcagaaa tatcatttaa gccagcgaat 900
 tatcaataca catatactcg tgatggtgaa gaagttaccg cacatactac ttgttcagtg 960
 aatggcgtta atgacttcag ttttaatgga ggatatttac caactgattt tgttgtatct 1020
 aaatttgaag taattaaaga gaattcatac gtctatatcg attactggga tgattcacia 1080
 gcatttctga acgtgggtgta tgtccgatcg ttagcagcaa acttgaattc agttatgtgt 1140
 actggaggca gctataatff tagtctacca gttggacaat ggcctgtfff aactggggga 1200
 gcagtttctt tacattcagc tgggtgaaca ctatctactc aatttacaga tttcgtatca 1260
 ttaaattcat taagatttag atttagacta gctgtcgaag aaccacactt taaactgact 1320
 agaactagat tagatagatt gtatggtctg cctgctgcag atccaaataa tggtaaagaa 1380
 tattatgaaa ttgctggacg attttactt atatcattag tgccatcaaa tgatgactat 1440

ES 2 658 987 T3

cagactccta tagcaaactc agttactgta cgacaagatt tagaaaggca gttaggagaa 1500
 ctaagagaag agtttaacgc tttgtctcaa gaaattgcaa tgtcgcagtt aatcgattta 1560
 gcgcttctac cattagatat gttctcaatg ttttctggca ttaaaagtac tattgatgct 1620
 gcaaaatcaa tggctactaa tgttatgaaa aaattcaaaa agtcaggatt agcgaattca 1680
 gtttcaacac tgacagattc tttatcagac gcagcatcat caatatcaag aggttcatct 1740
 atacgttcga ttggatcttc agcatcagca tggacggatg tatcaacaca aataactgat 1800
 atatcgatcat cagtaagtcc agtttcgaca caaacgtcaa ctatcagtag aagattgaga 1860
 ctaaaggaaa tggcaacaca aactgagggt atgaattttg atgatataatc agcggctggt 1920
 ttgaagacta agatagataa atcgactcaa ataccaccaa acacaatacc tgacattggt 1980
 actgaagcat cggaaaaatt cataccaaact agggcttacc gtgttataaa caacgatgat 2040
 gtggttgaag ctggaattga tggaaaattt tttgcttata aagtggatac atttgaggaa 2100
 ataccatttg atgtacaaaa attcgtgac ttagttacag attctccagt aatatccgct 2160
 ataattgatt ttaaaacact taaaatttg aacgataatt acggcattac taagcaacaa 2220
 gcatttaatc ttttaagatc tgacccaaga gttttacgtg aattcattaa tcaggacaat 2280
 cctataatta gaaatagaat tgaacaactg attatgcaat gcaggttgtg a 2331

<210> 51
 <211> 2331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-
 H96/1958/G3P5B[2]

10

<400> 51
 atggcttcat tgatataatc ccagttgctg actaatagct atactgtgga tttgtcagac 60
 gaaatccagg aaatagatc cacaagagt cagaacgtga ccataaaccc cggaccgttc 120
 gccagactg ggtatgcccc cgtaaactgg ggccccggcg agattaacga cagcaccacc 180
 gtggagccac tgctggatgg accctaccaa cccactactt ttaatcctcc agtggactac 240
 tggatgttgt tggctcccac gacacctggt gtaattgtag agggcaccaa caataccgat 300
 cgctggctgg cgacaatact gatagaacct aacgtgcagt ccgagaacag aacctatacc 360
 attttcggca tccaggaaca gctaaccgtg agcaatacga gccaggacca gtggaagttt 420
 atcgatgtag tgaaaactac ggccaatgga tctatcgggc aatacgggcc gctgctgtcc 480
 tcacctaagc tctacgccgt gatgaaacat aatgagaaac tgtacactta cgagggccaa 540
 accccaatg ccagaactgc cactacagt acaaccaact atgactcggg gaacatgaca 600
 gcgttctgtg atttttatat tattccaaga tcagaagaat ccaagtgtac tgagtacatc 660

ES 2 658 987 T3

aacaatggac ttccacccat ccagaacact cgaaatgtcg tcccactgtc tctaactgct 720
 cgggatgtga tccactatcg cgcccaagct aatgaggata tagtcatttc aaagacgagc 780
 ttatggaagg aaatgcagta taacagagac atcacaatca ggttcaagtt cgccaatact 840
 attattaagt ccgggggact ggggtacaaa tggagtgaga tcagttttaa gcccgctaac 900
 tatcagtaca cctatactcg cgacggcgaa gaggtaaccg cccacacaac ttgctcggtt 960
 aatggcgtga acgattttag cttcaacggg ggctacctgc ctactgattt cgtggtgagc 1020
 aagtttgaag tcatcaagga aaattcctac gtgtatattg actactggga tgatagccag 1080
 gccttccgaa atgtttgtga tgttagatca ctggccgcaa accttaattc agtcatgtgc 1140
 acaggaggtt cttacaattt tagtcttccc gtcgggcagt ggccagtgct cacagggggc 1200
 gctgtgagct tgcattccgc cggagtcaac ttgagtactc agttcacaga ctttgtgtct 1260
 ctgaatagcc taaggttcag gtttagactt gcagtagaag agcctcactt taagctcact 1320
 cgtacgagggc tggatcggct gtacggcctg ccggccgctg atcccaataa cggcaaggaa 1380
 tattacgaga tagccgggag attttcgctg atcagtctgg tgccgtcaaa cgatgattac 1440
 cagaccccaa ttgccaacag tgtcactgtc aggcaagatc tggagagaca acttggcgag 1500
 ctgagagagg agttcaacgc cctgtctcaa gagatcgcaa tgtctcagct cattgacctg 1560
 gccctgttac ccctcgacat gttctcaatg ttctccggca taaaatccac tatcgacgct 1620
 gcaaagtcca tggccacaaa tgtgatgaag aagttaaga agagcggctc ggcaaatagc 1680
 gtgtctacgc tgaccgatag tttgtcggat gccgccagtt ccattagccg tggatccagc 1740
 attaggtcca ttggctcttc cgcctctgct tggactgacg tgagtacaca gataactgac 1800
 atttcctctt ctgtctccag tgtgagcaca caaacttcca cgatatcaag acgactgagg 1860
 ctcaaagaga tggcaacgca aacggaaggc atgaattttg atgacatcag cgccgcagtt 1920
 ttgaagacaa agatcgataa aagcactcaa attagcccca atacgatccc tgacattgtg 1980
 actgaggcat ctgaaaagtt cattcccaac cgtgcttacc gggtcattaa caatgatgat 2040
 gtcttcgagg ccggcatcga tggcaagttt tttgcttata aagtggatac cttcgaggag 2100
 attcctttcg atgtacagaa gtttgctgac ctcgtaacgg atagcccagt gataagcgcc 2160
 attatagact tcaaaacatt gaaaaatttg aacgataatt atggtattac caagcagcag 2220
 gcttttaact tgttaagatc tgaccctcgc gtgctcagag agtttattaa ccaggacaac 2280
 cccatcatca gaaacaggat cgagcagctg attatgcagt gtcgcctgta a 2331

<210> 52
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-
 H96/1958/G3P5B[2]

5

10

ES 2 658 987 T3

<400> 52
atgtatggta ttgaatatac cacagttcta acctttctga tatecgattat tctactaaat 60
tacataactta aatcattaac tagaataatg gactttataa tttatagatt tctttttata 120
attgtgatat tgtcaccatt tctcagagca caaaattatg gtattaatct tccaatcaca 180
ggctccatgg aactgcata cgctaattca acgcaagaag aaacattcct cacttctaca 240
ctttgcctat attatccgac tgaggctgag actgaaataa acgataattc atggaaagac 300
aactgtcac aactatttct tacgaaaggg tggccaactg gatccgtata ttttaaagaa 360
tatactaaca ttgcatcggt ttctgttgat cgcagttgt attgtgatta taacgtagta 420
ctaatgaaat atgacgcgac gttgcaattg gatatgtcag aacttgcgga tctaataatta 480
aacgaatggt tgtgtaatcc aatggatatt actctgtatt attatcagca aactgacgaa 540
gcgaataaat ggatatcaat gggctcatca tgtacaatta aagtatgtcc acttaataca 600
caaaccttg gaattggatg cttgacaact gatgctacaa cttttgaaga agttgagaca 660
gctgaaaagt tggtaattac tgacgtgggt gatggcgta atcataagct ggatgtcaca 720
acagcaacgt gtactattag aaactgtaag aaattgggac caagagaaaa cgtagccggt 780
atacaagttg tggtttctga catcctcgat ataactgctg atccaactac tgcaccacag 840
acagaacgga tgatgcgaat taactggaaa aatggtggc aagttttta tactgtagta 900
gactatgtag atcagataat acaagttatg tccaaaagat caagatcact aaattcagca 960
gcattttatt acagagtgtg g 981

5 <210> 53
<211> 981
<212> **ADN**
<213> Rotavirus

10 <400> 53
atgtacggaa togagtatac caccgttctg acatttctta ttagtattat cctcttgaac 60
tatattctga agtcacttac ccgataatg gattttatta tatatagggt tctgttcac 120
attgtaattc tgagcccttt cctgagggcc cagaattacg gcataaacct accaatcacc 180
ggttctatgg ataccgctta tgctaactct acacaagagg agacattcct cacatcaacc 240
ctatgcctgt actatccgac tgaagcagcc acagagataa acgataactc ttggaaagat 300
acattgagcc agctcttcct gactaaggga tggcccacog gatcgggtcta cttaaggag 360
tacacaaaca tcgcaagttt cagcgtggat cccagctgt attgtgatta taacgttggt 420
ctgatgaaat acgacgcaac cctccagctt gacatgagcg agttggcaga cctaactctc 480
aatgagtggt tgtgtaaccc aatggatata aactgtact attatcagca gaccgatgaa 540

ES 2 658 987 T3

gcaaacaaat ggatttcaat ggaagcagc tgtaccatca aagtttgtcc tctcaacacc 600
 caaactctcg gcataggggtg tctgaccaca gacgctacta cctttgaaga agttgcgacc 660
 gcggaaaagc tggttatcac agatgtggta gatggcgta accacaaatt ggacgtaacc 720
 acagcaacat gcacaattag gaactgcaag aagctaggac ccagggaaaa cgtagccgtc 780
 atccaagtgg gcggcagtga catcctagac atcaccgcag acccaacaac agcaccacaa 840
 accgagagga tgatgcgcat taattggaag aaatggtggc aggtgtttta cactgtcggt 900
 gactatgtgg accagatcat tcaggtgatg agcaagcggg gtcgctcatt gaatagtgtc 960
 gccttttatt acagagtcta a 981

<210> 54

<211> 981

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<400> 54

atgtacggca tcgagtatac aacaatttta attttcctga tttccatcat tctgttaaac 60
 tacatcctta agtccgtgac cagaattatg gattatatta tctatcgtag cctcctcacc 120
 tacgtggccc tttttgccct gaccagggcc cagaactatg gcctgaactt accaatcacc 180
 ggttcaatgg ataccgttta cgctaattcc actcaagagg ggatatttct gacaagtacc 240
 ctgtgcctgt attatccaac agaagcctct accagatca atgatgggga gtggaaggat 300
 agtctctcac agatgttcct aaccaagggc tggcccaccg gttcogtcta cttcaaggaa 360
 tactctagta ttgtcgactt ctcagttgac cccagcttt attgogacta caacctggta 420
 cttatgaaat acgaccagaa cctggagctg gatatgtccg agctggctga cctgatcctc 480
 aatgagtggc tgtgcaaccc catggacatc acattatatt actaccagca gtctggagaa 540
 tccaacaagt ggatcagtat gggctcaagt tgcaccgtga aggtgtgtcc cttgaacacc 600
 caaatgctgg gcattggttg tcagacaact aatgtggatt cgtttgaaat ggtagccgaa 660
 aacgagaagc tggctatagt ggacgtagtc gatgggatta accacaagat caatctgact 720
 accaccactt gtaccatcag aaactgtaaa aagctcggcc cccgggagaa cgtcgccgtg 780
 atccaggtgg gggggagcaa tgtgctcgac attactgccg accctaccac caatccacag 840
 acggaacgga tgatgagagt caactggaag aaatggtggc aggtctttta taccattgtg 900
 gactacatta accagattgt gcaagtcatg agtaaacggg ccagatccct gaactcagca 960
 gccttctatt atcgcgttta g 981

10

<210> 55

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador IF-TrSP+Rtx_VP7(opt).s1+3c

ES 2 658 987 T3

<400> 55
aaattgtcg ggccatgga ttatattatc tatcgtagcc tcctcatcta 50

5 <210> 56
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r

<400> 56
actaaagaaa ataggcctct aaacgcgata atagaaggct gctgagtca gggg 54

15 <210> 57
<211> 981
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8]

<400> 57
atgtacggca tcgagtatac aacaatttta attttcctga tttccatcat tctgttaaac 60
tacatcotta agtccgtgac cagaattatg gattatatta tctatcgtag cctcctcacc 120
tacgtggccc tttttgccct gaccagggcc cagaactatg gcctgaactt accaatcacc 180
ggttcaatgg ataccgttta cgctaattcc actcaagagg ggatatttct gacaagtacc 240
ctgtgcctgt attatccaac agaagcctct acccagatca atgatgggga gtggaaggat 300
agtctctcac agatgttcct aaccaagggc tggcccaccg gttccgtcta cttcaaggaa 360
tactctagta ttgtcgactt ctcagttgac cccagcttt attgcgacta caacctggta 420
cttatgaaat acgaccagaa cctggagctg gatatgtccg agctggctga cctgatcctc 480
aatgagtggc tgtgcaaccc catggacatc acattatatt actaccagca gtctggagaa 540
tccaacaagt ggatcagtat gggctcaagt tgcaccgtga aggtgtgtcc cttgaacacc 600
caaatgctgg gcattggttg tcagacaact aatgtggatt cgtttgaaat ggtagccgaa 660
aacgagaagc tggctatagt ggacgtagtc gatgggatta accacaagat caatctgact 720
accaccactt gtaccatcag aaactgtaaa aagctcggcc cccgggagaa cgtcgcccgtg 780
atccaggtgg gggggagcaa tgtgctcgac attactgccg accctaccac caatccacag 840
acggaacgga tgatgagagt caactggaag aatggtggc aggtctttta taccattgtg 900
gactacatta accagattgt gcaagtcatg agtaaacggt ccagatccct gaactcagca 960

25 gccttctatt atcgcgttta g 981

30 <210> 58
<211> 2634
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión número 1734

5

<400> 58

```

gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca      60
gaagacccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccgaaa cctcctcgga      120
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc      180
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt      240
ggccccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc      300
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatgggtg agcacgacac acttgtctac      360
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa      420
agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg      480
aagatagtgg aaaaggaag tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc      540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc ccaaagatg gacccccacc cacgaggagc      600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc      660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata      720
taaggaagtt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga      780
acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa      840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac      900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc      960
ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttcttgtcgg tgtggctctg ggaaaagaaa     1020
gcttgctgga ggctgctggt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg     1080
gcggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgctgtact tctttcttct     1140
tcttctgct gattggttct ataagaaatc tagtatcttc tttgaaacag agttttcccg     1200
tggttttcga acttgagaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aatttgcgg     1260
gcccattgat tatattatct atcgtagcct cctcatctac gtggcccttt ttgccctgac     1320
cagggcccag aactatggcc tgaacttacc aatcacgggt tcaatggata ccgtttacgc     1380
taattccact caagagggga tatttctgac aagtaccctg tgctgtatt atccaacaga     1440
agcctctacc cagatcaatg atggggagtg gaaggatagt ctctcacaga tgttcctaac     1500
caagggctgg cccaccggtt ccgtctactt caaggaatac tctagtattg tcgacttctc     1560
agttgacccc cagctttatt gcgactacaa cctggtactt atgaaatacg accagaacct     1620

```

ES 2 658 987 T3

ggagctggat atgtccgagc tggctgacct gatcctcaat gaggctgtgt gcaaccccat 1680
 ggacatcaca ttatattact accagcagtc tggagaatcc aacaagtga tcagtatggg 1740
 ctcaagttgc accgtgaagg tgtgtccctt gaacacccaa atgctgggca ttggttgtca 1800
 gacaactaat gtggattcgt ttgaaatggt agccgaaaac gagaagctgg ctatagtgga 1860
 cgtagtogat gggattaacc acaagatcaa tctgactacc accacttcta ccatcagaaa 1920
 ctgtaaaaag ctccggcccc gggagaacgt cgccgtgatc cagggtgggg ggagcaatgt 1980
 gctcgacatt actgccgacc ctaccaccaa tccacagacg gaacggatga tgagagtcaa 2040
 ctggaagaaa tgggtggcagg tcttttatac cattgtggac tacattaacc agattgtgca 2100
 agtcatgagt aaacggcca gatccctgaa ctcagcagcc ttctattatc gcgttagag 2160
 gcctattttc tttagttga atttactggt attcgggtgt catttctatg tttggtgagc 2220
 ggtttctgt gctcagagt tgtttatctt atgtaattta atttcttctg gagctcctgt 2280
 ttagcaggtc gtcccttcag caaggacaca aaaagatttt aattttatta aaaaaaaaa 2340
 aaaaaagac cgggaattcg atatcaagct tatcgacctg cagatcgttc aaacatttgg 2400
 caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt gccggctctg cgatgattat catataattt 2460
 ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga 2520
 tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcataga aaacaaaata 2580
 tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcgggtgcat ctatgttact agat 2634

<210> 59
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

5

<400> 59
 Met Asp Tyr Ile Ile Tyr Arg Ser Leu Leu Ile Tyr Val Ala Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Arg Ala Gln Asn Tyr Gly Leu Asn Leu Pro Ile Thr Gly
 20 25 30
 Ser Met Asp Thr Val Tyr Ala Asn Ser Thr Gln Glu Gly Ile Phe Leu
 35 40 45
 Thr Ser Thr Leu Cys Leu Tyr Tyr Pro Thr Glu Ala Ser Thr Gln Ile
 50 55 60
 Asn Asp Gly Glu Trp Lys Asp Ser Leu Ser Gln Met Phe Leu Thr Lys
 65 70 75 80

ES 2 658 987 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula de tipo rotavirus (RLP) en una planta, porción de una planta o célula vegetal, que comprende:
- 5
- a) introducir un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7, un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7, y un tercer ácido nucleico que comprende una tercera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus seleccionada de VP2, VP6 y VP7 en la planta, parte de una planta o célula vegetal, en el que la primera, segunda o tercera secuencia de nucleótidos que codifica la VP7 comprende un péptido señal nativo truncado o un péptido señal no nativo de un polipéptido vegetal, y en el que la RLP comprende VP2, VP6 y VP7; o
- 10
- a) proporcionar una planta, parte de una planta o célula vegetal que comprende un primer ácido nucleico que comprende una primera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína estructural de rotavirus, un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína estructural de rotavirus y un tercer ácido nucleico que comprende una tercera región reguladora activa en la planta unida operativamente a una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una tercera proteína estructural de rotavirus en la planta, parte de una planta o célula vegetal; en el que la primera proteína estructural de rotavirus es VP2, la segunda proteína estructural de rotavirus es VP6 y la tercera proteína estructural de rotavirus es VP7, en la que VP7 comprende un péptido señal nativo truncado o un péptido señal no nativo de un polipéptido vegetal;
- 15
- b) incubar la planta, parte de una planta o célula vegetal en condiciones que permitan la expresión transitoria del primer, segundo y tercer ácido nucleico, produciendo de este modo la RLP,
- 20
- c) cultivar la planta, parte de la planta o célula vegetal, y
- 25
- d) extraer y purificar las RLP de la planta, parte de la planta o célula vegetal, en presencia de calcio, en las que la concentración de calcio está entre 1 mM y 1000 mM.
- 30
2. El método de la reivindicación 1, en el que un cuarto ácido nucleico que comprende una cuarta región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una cuarta secuencia de nucleótidos que codifica una cuarta proteína estructural de rotavirus se introduce en la planta, parte de una planta o célula vegetal en la etapa a), y se expresa al incubar la planta, parte de una planta o célula vegetal en la etapa b), en el que la cuarta proteína estructural de rotavirus es VP4.
- 35
3. El método de la reivindicación 1, en el que la primera proteína estructural de rotavirus es VP2, la segunda proteína estructural de rotavirus es VP6 y la tercera proteína estructural de rotavirus es VP7.
- 40
4. El método de la reivindicación 1, en el que la planta, parte de una planta o célula vegetal está dotada de un cuarto ácido nucleico que comprende una cuarta región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una cuarta secuencia de nucleótidos que codifica una cuarta proteína estructural de rotavirus, en el que la cuarta proteína estructural de rotavirus es VP4.
- 45
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la primera, segunda, tercera o cuarta secuencia de nucleótidos, o una combinación de las mismas, está operativamente unida a una región reguladora del virus del mosaico del caupí (CPMV).
- 50
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica VP2 comprende del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, o SEQ ID NO: 45, la secuencia de nucleótidos que codifica VP6 comprende del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 o SEQ ID NO:46, la secuencia de nucleótidos que codifica VP7 comprende del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO: 19, 20, 48, 49, 52, 53, 54 o 57, la VP4 comprende del 80 % al 100 % de identidad con una secuencia de nucleótidos como se define por la SEQ ID NO: 15, 16, 47, 50, o 51.
- 55

7. El método de la reivindicación 1, en el que el primer, segundo y tercer ácido nucleico se introducen en la planta, parte de la planta o célula vegetal por agroinfiltración con un inóculo de *Agrobacteria* que comprende una mezcla del primer, segundo y tercer ácido nucleico en una relación de 1:1:1, en el que el primer, segundo y tercer ácido nucleico se expresan transitoriamente en la planta, y la planta es *Nicotiana benthamiana*.
- 5
8. El método de la reivindicación 2, en el que el primer, segundo, tercer y cuarto ácido nucleico se introducen en la planta, parte de la planta o célula vegetal por agroinfiltración con un inóculo de *Agrobacteria* que comprende una mezcla del primer, segundo, tercer y cuarto ácido nucleico en una relación de 1:1:1, en el que el primer, segundo, tercer y cuarto ácido nucleico se expresan transitoriamente en la planta, y la planta es *Nicotiana benthamiana*.
- 10
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el uso de codones de la secuencia de nucleótidos se ajusta al uso de codones humanos preferidos, aumento del contenido de GC, o una combinación de los mismos.
- 15
10. El método de la reivindicación 1 o 4, en el que la primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos están operativamente unidas a un elemento potenciador de la traducción.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el péptido señal no nativo es un péptido señal de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) de la alfalfa.
- 20

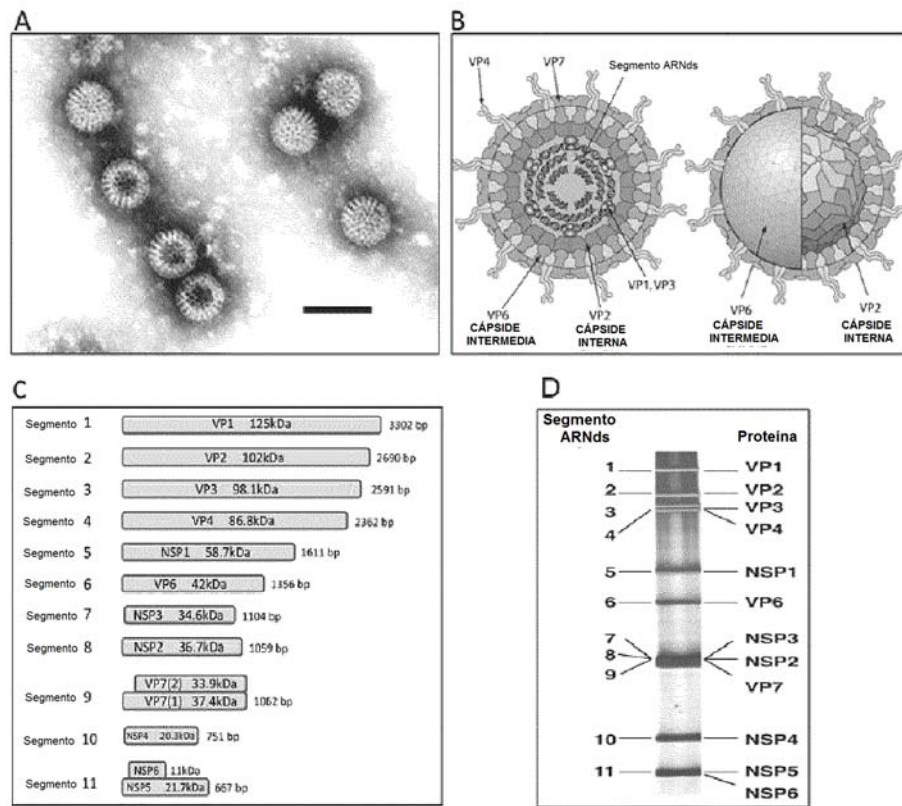


Figura 1

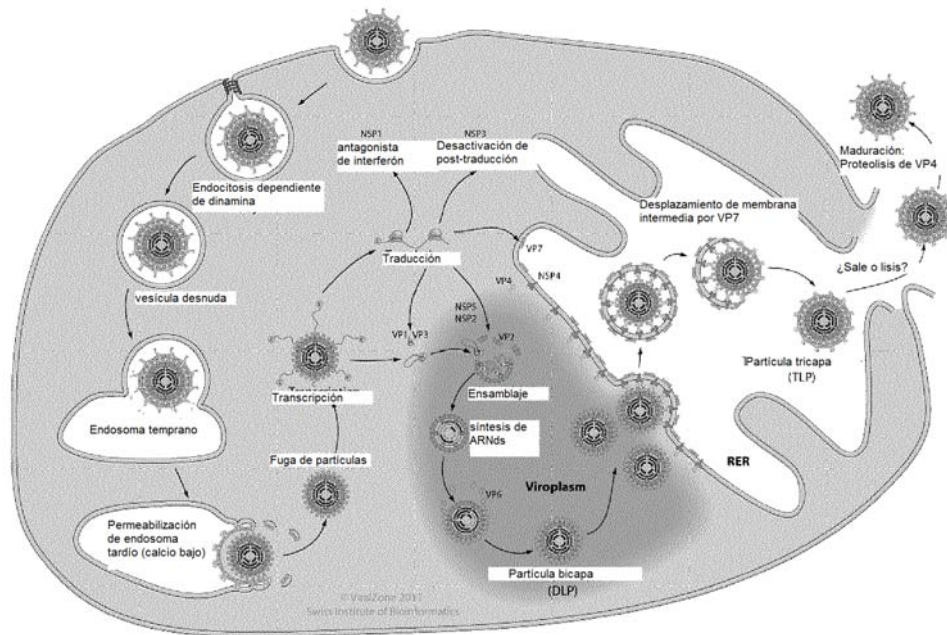


Figura 2

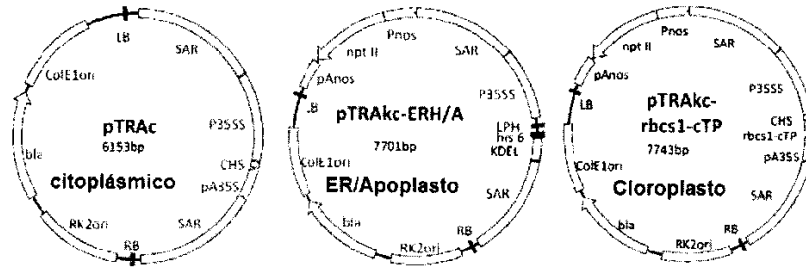


Figura 3

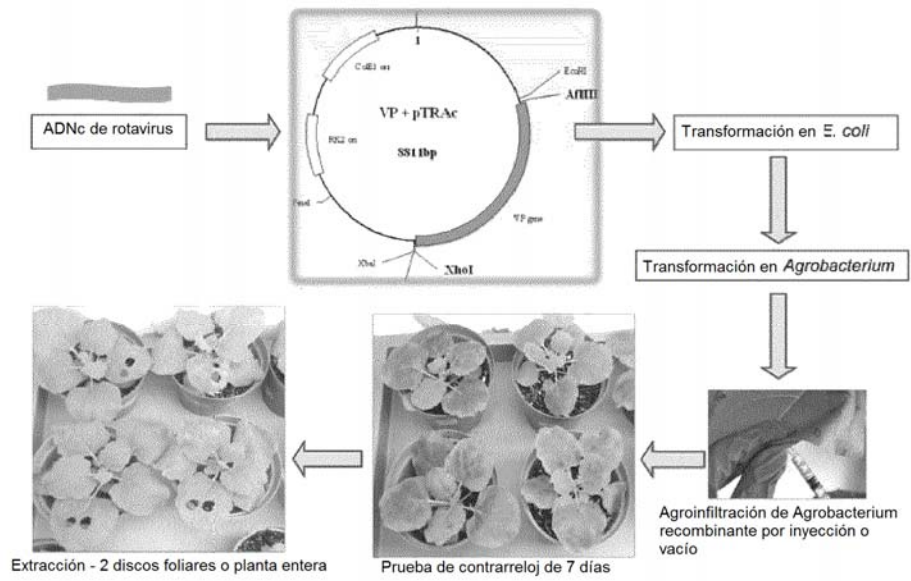


Figura 4

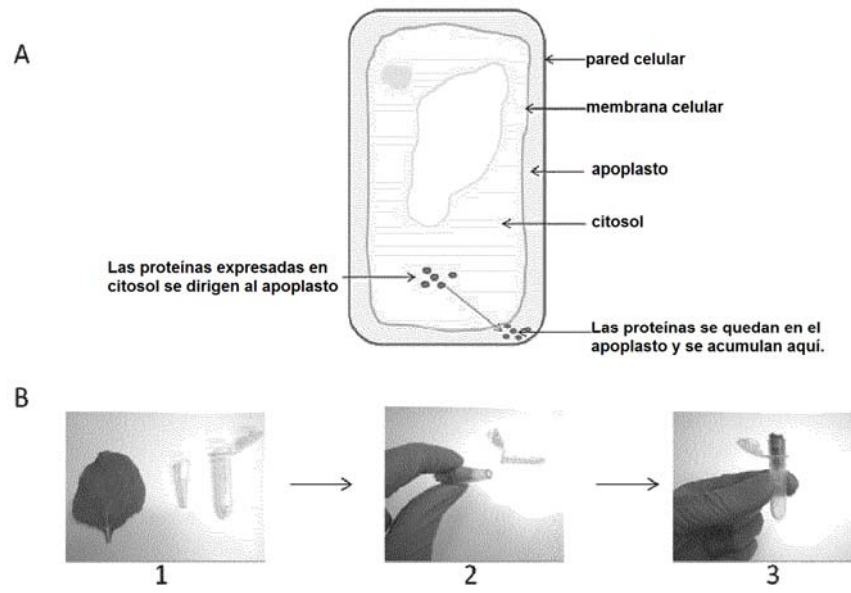


Figura 5

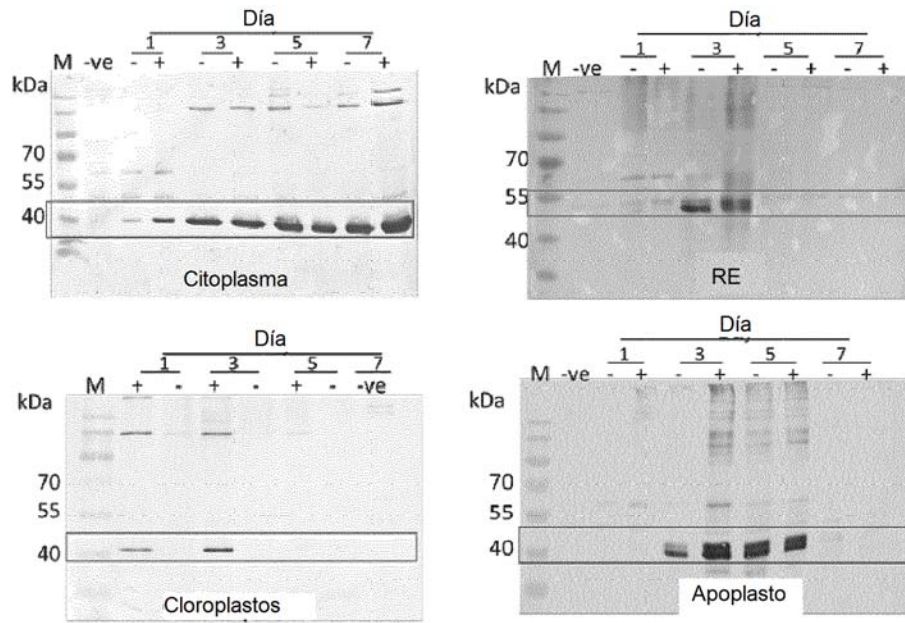


Figura 6

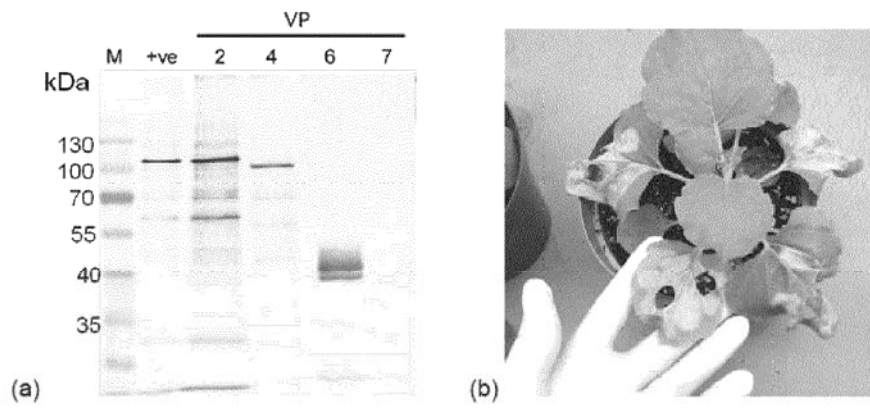


Figura 7

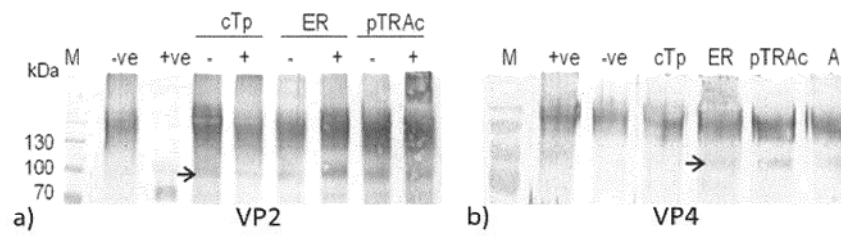


Figura 8

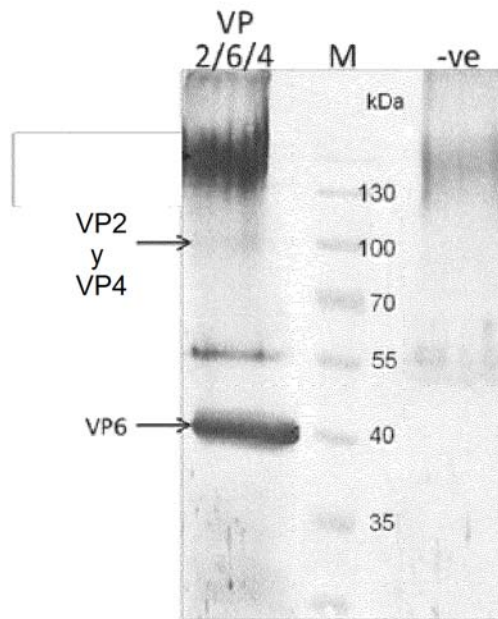


Figura 9

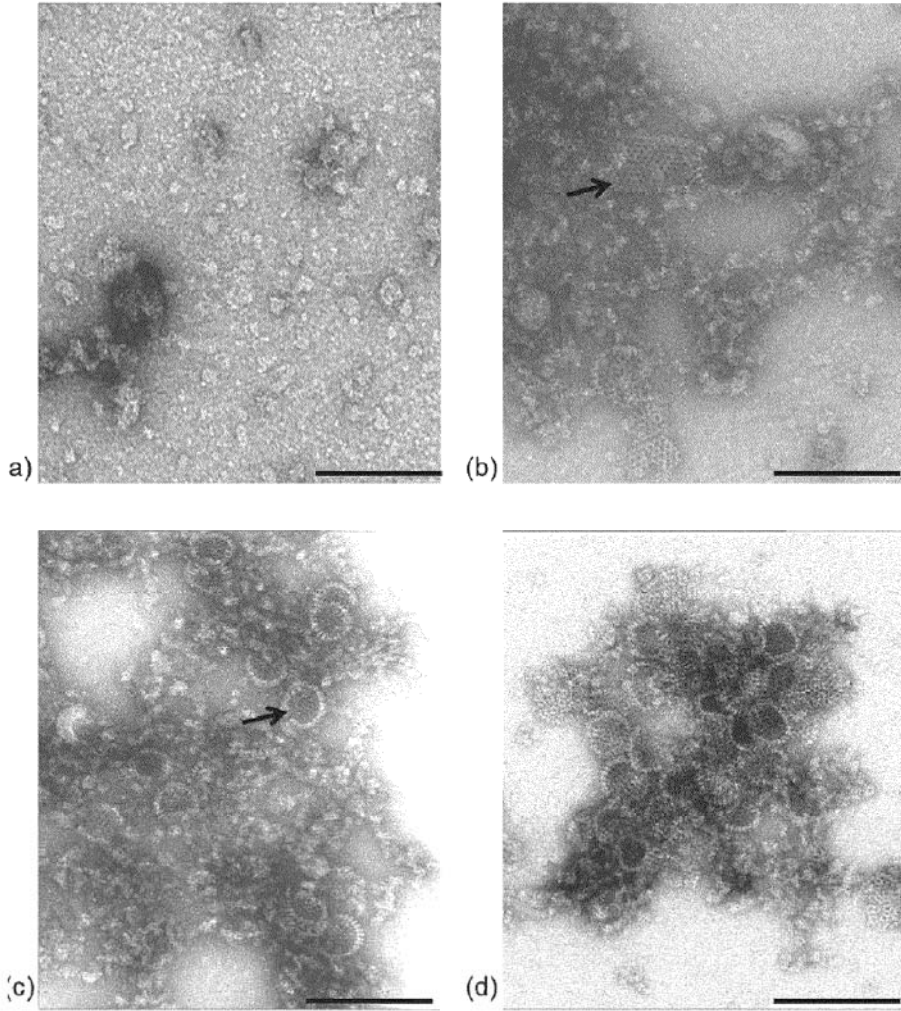


Figura 10

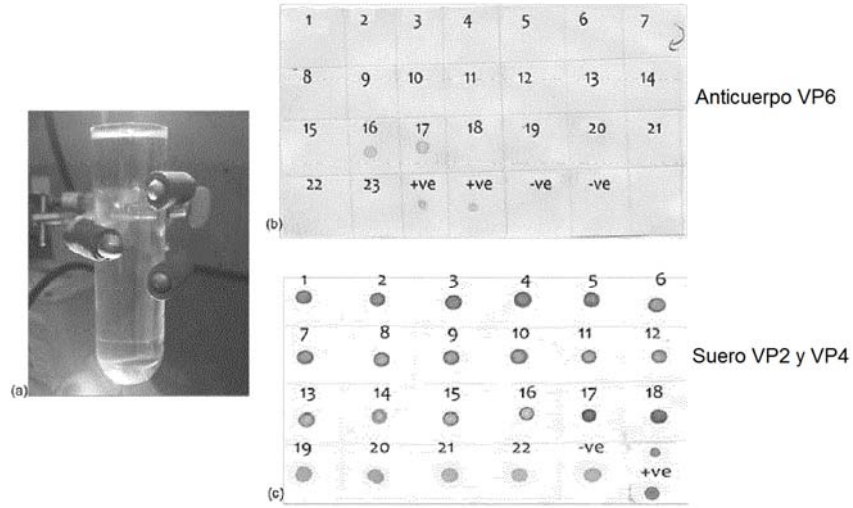


Figura 11

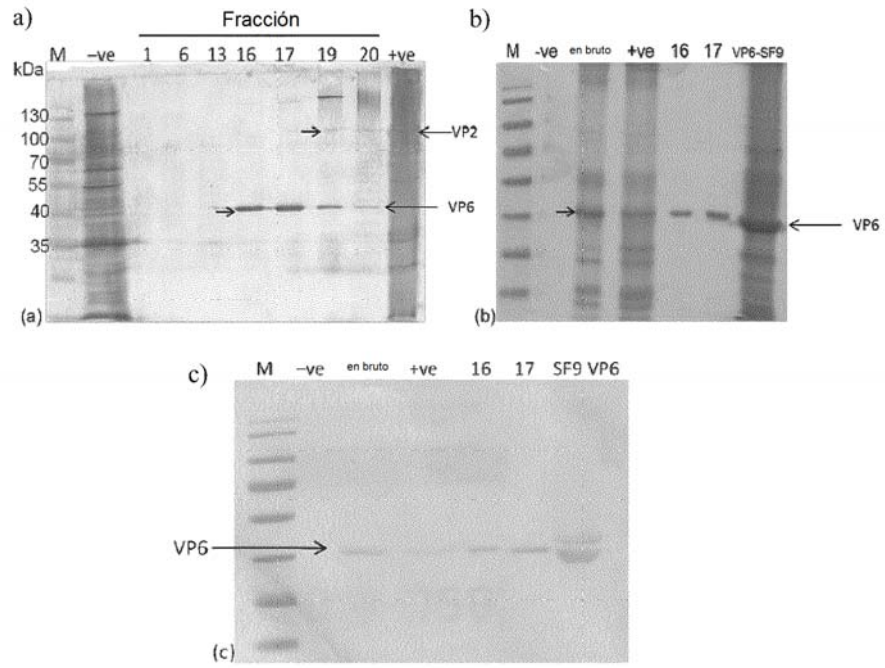


Figura 12

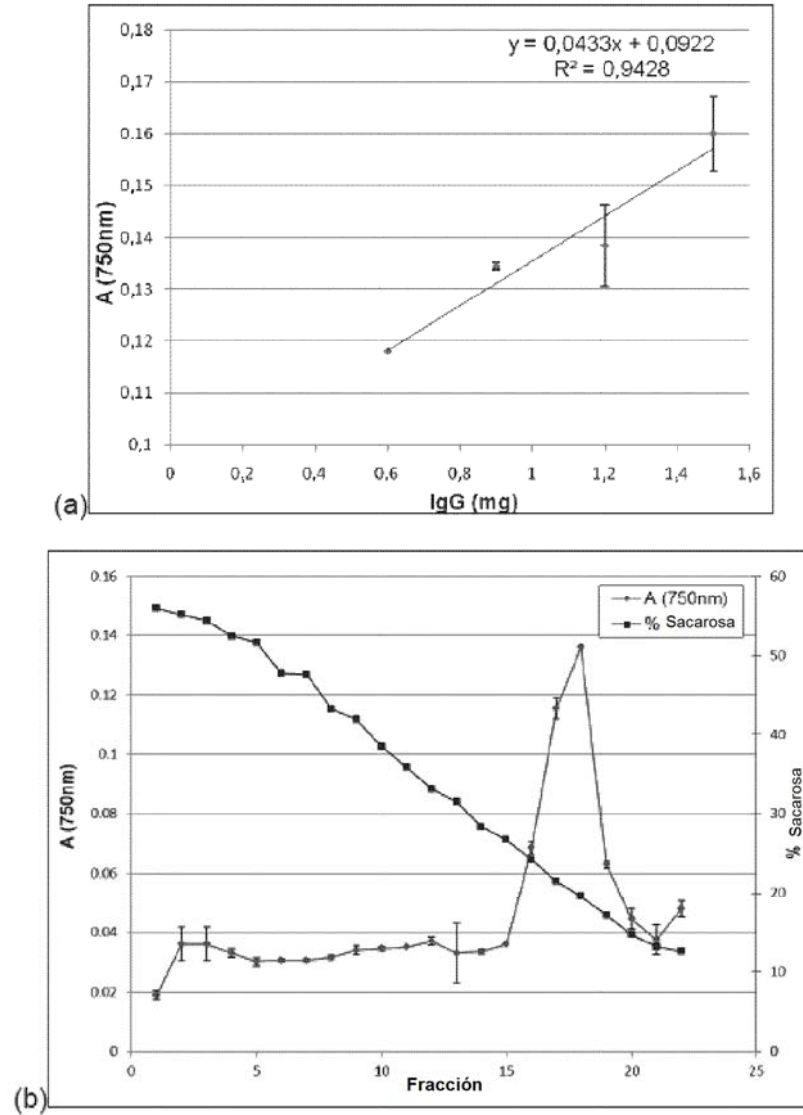


Figura 13

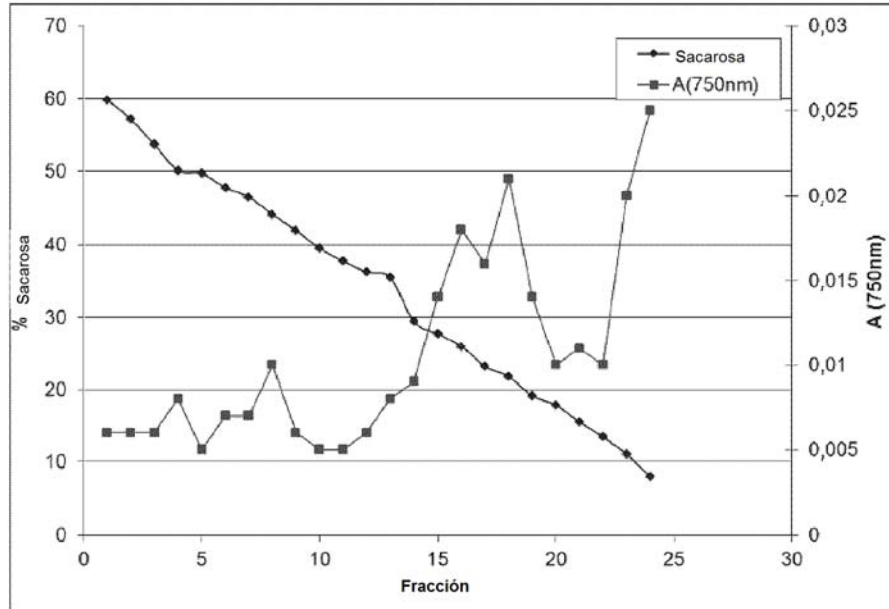


Figura 14

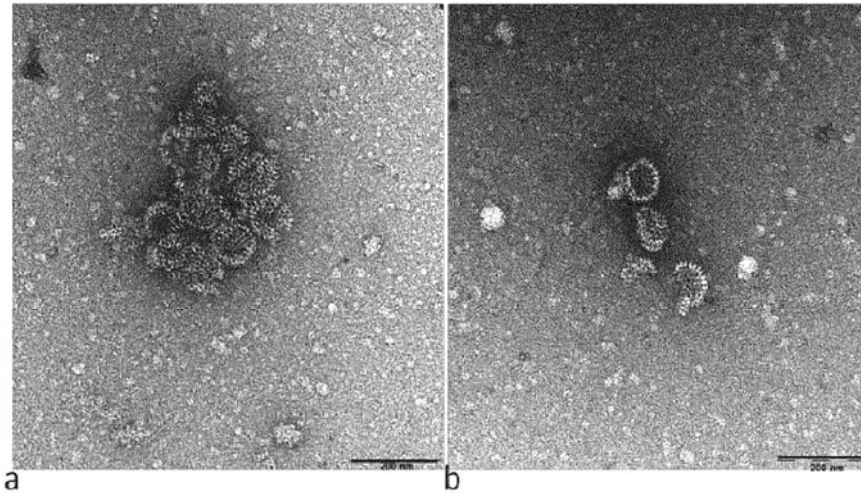


Figura 15

Figura 16A-1

Vp2 de Rotavirus

Nombre del Gen: **G9P6_VP2**
 Longitud del Gen: 2700 bp
 Optimizado para la expresión en:

Nicotiana tabacum

```

1  GGTACCGAATTTCGGACGCGTTCGTTCCATGGCTTACCGTAAAAGGGGTGCTAGGCGTGAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCATGGCTTAAGCCTGCGCAAGCAAGGTACCGAATGGCATTTC CCCACGATCCGCACTT
   SEQ ID NO:1 G_R_V_R_S_M_A_Y_R_K_R_G_A_R_R_E

61  GCTAACCTCAACAACAACGATAGGATGCAAGAGAAGATCGATGAGAAGCAGGATTCCAAC
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CGATTGGAGTTGTTGTGCTATCCTACGTTCTCTTCTAGCTACTCTTCGTCCTAAGGTTG
   A_N_L_N_N_N_D_R_M_Q_E_K_I_D_E_K_Q_D_S_N

121  AAGATCCAGCTCTCCGATAAGGTGCTCTCCAAGAAAGAAGAGATCGTTACTGATCCCAC
   -----+-----+-----+-----+-----+
   TTCTAGGTCGAGAGGCTATTCCACGAGAGGTTCTTTCTCTCTAGCAATGACTAAGGGTG
   K_I_Q_L_S_D_K_V_L_S_K_K_E_E_I_V_T_D_S_H

181  GAAGAGGTGAAGGTGACAGATGAGCTTAAGAAGTCCACAAAAGAAGAGTCCAAGCAGCTC
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CTTCTCCACTTCCACTGTCTACTCGAATTCTTCAGGTGTTTCTTCTCAGGTTTCGTCGAG
   E_E_V_K_V_T_D_E_L_K_K_S_T_K_E_E_S_K_Q_L

241  CTTGAGGTGCTCAAGACAAAAGAGGAACACCAGAAAGAGATCCAGTACGAGATCCTCCAA
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GAACTCCACGAGTTCTGTTTTCTCCTTGTGGTCTTTCTCTAGGTCATGCTCTAGGAGGTT
   L_E_V_L_K_T_K_E_E_H_Q_K_E_I_Q_Y_E_I_L_Q
    
```

Figura 16A-2

```

AAGACTATCCCAACTTTCGAGCCAAAAGAGACTATCCTCAGGAAGCTTGAGGATATCCAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTGATAGGGTTGAAAGCTCGGTTTCTCTGATAGGAGTCCTTCGAACCTATAGGTC
K T I P T F E P K E T I L R K L E D I Q

CCAGAGCTTGCTAAGAAGCAGACTAAGCTCTTCAGGATCTTCGAGCCAAAGCAGCTCCCA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCTCGAACGATTCTTCGTCTGATTCGAGAAGTCCTAGAAGCTCGGTTTCGTCGAGGGT
P E L A K K Q T K L F R I F E P K Q L P

ATCTACCGTGCTAACGGTGAAAGGGAACCTAGGAACAGGTGGTACTGGAAGCTCAAGAAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGATGGCAGGATTGCCACTTCCCTTGAATCCTTGTCACCATGACCTTCGAGTCTTTC
I Y R A N G E R E L R N R W Y W K L K K

GATACCTCCCAGACGGTGATTACGATGTGAGAGAGTACTTCCTCAACCTCTACGATCAG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTATGAGAGGGTCTGCCACTAATGCTACACTCTCTCATGAAGGAGTTGGAGATGCTAGTC
D T L P D G D Y D V R E Y F L N L Y D Q

GTGCTCACTGAGATGCCAGATTACCTCCTCCTCAAGGATATGGCTGTGGAGAACAAGAAC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGAGTGACTCTACGGTCTAATGGAGGAGGAGTTCCTATAACCGACACCTCTTGTCTTG
V L T E M P D Y L L L K D M A V E N K N

TCCAGGGATGCTGGAAAGGTGGTGGATCCGAGACTGCTTCCATCTGTGATGCTATCTTC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGTCCCTACGACCTTCCACCACCTAAGGCTCTGACGAAGGTAGACACTACGATAGAAG
S R D A G K V V D S E T A S I C D A I F

CAGGATGAAGAGACTGAGGGTGCTGTGAGGCGTTTCATTGCTGAGATGAGGCAGAGGGTT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCTACTTCTCTGACTCCCACGACTCCGCAAAGTAACGACTCTACTCCGTCTCCCAA
Q D E E T E G A V R R F I A E M R Q R V

CAGGCTGATAGGAACGTGGTGAACATCCCATCCCTCCACCCAATCGATTACGCTTTC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCGACTATCCTTGCACCCTTGTGAGGTAGGTAGGAGTGGGTAGCTAATGCGAAAG
Q A D R N V V N Y P S I L H P I D Y A F

AACGAGTACTTCCTTCAGCACCAGCTTGTGGAGCCACTCAACAACGATATCATCTTCAAC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGCTCATGAAGGAAGTCGTGGTCTGAACACCTCGGTGAGTGTGCTATAGTAGAAGTTG
N E Y F L Q H Q L V E P L N N D I I F N

```

Figura 16A-3

```

841 TACATCCCAGAGAGGATTAGGAACGACGTTAACTACATCCTCAACATGGATAGGAACCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTAGGGTCTCTCCTAATCCTTGCTGCAATGATGTAGGAGTTGTACCTATCCTTGGAG
Y I P E R I R N D V N Y I L N M D R N L

901 CCATCCACTGCTCGTTACATCAGGCCAAACCTCCTCCAGGATAGGCTCAACCTCCACGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTAGGTGACGAGCAATGTAGTCCGGTTTGGAGGAGGTCCTATCCGAGTTGGAGGTGCTA
P S T A R Y I R P N L L Q D R L N L H D

961 AACTTCGAGTCCCTCTGGGATACAATCACTACTTCCAACACATTCCTCGCTCGTCCCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGAAGCTCAGGGAGACCCTATGTTAGTGATGAAGGTTGATGTAAGAGCGGACCAAGGCAC
N F E S L W D T I T T S N Y I L A R S V

1021 GTGCCAGATCTCAAAGAACCGTGTCCACTGAGGCTCAGATCCAGAAGATGTCCCAGGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGGTCTAGAGTTTCTTGAGCACAGGTGACTCCGAGTCTAGGTCTTCTACAGGGTCTTA
V P D L K E L V S T E A Q I Q K M S Q D

1081 CTCCAGCTTGAGGCTCTCACTATCCAGTCCGAGACTCAGTTCCTCACTGGTATCAACTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGGTGCAACTCCGAGAGTGATAGGTGAGGCTCTGAGTCAAGGAGTGACCATAGTTGAGG
L Q L E A L T I Q S E T Q F L T G I N S

1141 CAGGCTGCTAACGATTGCTTCAAGACTCTCATTGCTGCTATGCTCTCCAGAGGACTATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCGACGATTGCTAACGAAGTTCTGAGAGTAACGACGATACGAGAGGGTCTCCTGATAC
Q A A N D C F K T L I A A M L S Q R T M

1201 TCCCTCGATTTGCTGACTACTAATAATATGTCCTCATCTCCGGAATGTGGCTCTGACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGGAGCTAAAGCACTGATGATTGATATACAGGGAGTAGAGGCCTTACACCGAGAAGTGA
S L D F V T T N Y M S L I S G M W L L T

1261 GTGGTGCCAAACGATATGTTTCATCCGTGAGTCCCTTGTGGCTTGCCAGCTCGCTATCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCACGGTTTGCATACAAGTAGGCACTCAGGGAACACCGAACGGTCGAGCGATAGCAC
V V P N D M F I R E S L V A C Q L A I V

1321 AACACTATCATCTACCCAGCTTTCGGAATGCAAAGGATGCACTACCGTAACGGTGATCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTGATAGTAGATGGGTCGAAAGCCTTACGTTTCTACGTGATGGCATGGCCACTAGGT
N T I I Y P A F G M Q R M H Y R N G D P

```

Figura 16A -4

1381 CAGACTCCATTCCAGATCGCAGAGCAGCAGATCCAGAACTTCCAGGTGGCAAACCTGGCTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCTGAGGTAAGGTCTAGCGTCTCGTCTAGGTCTTGAAGGTCCACCGTTTGACCGAG
Q T P F Q I A E Q Q I Q N F Q V A N W L

1441 CACTTCGTGAACAACAACCAGTTCAGGCAGGCTGTGATCGATGGTGTGTTGAACCAGGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGAAGCACTTGTGTTGGTCAAGTCCGTCCGACACTAGCTACCACACAACCTGGTCCAC
H F V N N N N Q F R Q A V I D G V L N Q V

1501 CTCAACGATAACATCCGTAACGGTCACGTGATCAACCAGCTCATGGAAGCTCTCATGCAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAGTTGCTATTGTAGGCATTGCCAGTGCCTAGTTGGTTCGAGTACCTTCGAGAGTACGTT
L N D N I R N G H V I N Q L M E A L M Q

1561 CTCTCCAGGCAGCAGTCCCAACTATGCCTATCGATTACAAGCGTTCATCCAGAGGGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAGAGGTCCGTCGTCGAAGGTTGATACGGATAGCTAATGTTGCAAGGTAGGTCTCCCT
L S R Q Q F P T M P I D Y K R S I Q R G

1621 ATCCTCCTCCTTTCCAACAGGCTTGGACAGCTCGTGGATCTCACTAGGCTCCTCGCTTAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGGAGGAGGAAAGGTTGTCCGAACCTGTGAGCACCTAGAGTGATCCGAGGAGCGAATG
I L L L S N R L G Q L V D L T R L L A Y

1681 AACTACGAGACTCTCATGGCTTGCATCACTATGAACATGCAGCACGTTCAGACTCTCACT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGATGCTCTGAGAGTACCGAACGTAGTGATACTTGTACGTCGTGCAAGTCTGAGAGTGA
N Y E T L M A C I T M N M Q H V Q T L T

1741 ACTGAGAAGCTCCAGCTCACTTCCGTGACTTCCCTCTGCATGCTCATCGAAACGCTACT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGACTCTTCGAGGTCGAGTGAAGGCACTGAAGGGAGACGTACGAGTAGCCTTTGCGATGA
T E K L Q L T S V T S L C M L I G N A T

1801 GTGATCCCATCCCCACAGACACTCTCCACTACTACAACGTGAACGTGAACCTCCACTCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTAGGGTAGGGTGTCTGTGAGAAGGTGATGATGTTGCAC TTGCAC TTGAAGGTGAGG
V I P S P Q T L F H Y Y N V N V N F H S

1861 AACTACAACGAGAGGATCAACGATGCTGTGGCTATCATCACTGCTGCTAACAGGCTTAAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGATGTTGCTCTCCTAGTTGCTACGACACCGATAGTAGTGACGACGATTGTCCGAATTG
N Y N E R I N D A V A I I T A A N R L N

Figura 16A -5

```

CTCTACCAAAGAAGATGAAGGCTATCGTTGAGGATTTCCCAAGAGGCTACATCTTC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGATGGTTTTCTTCTACTTCCGATAGCAACTCCTAAAGGAGTTCTCCGAGATGTAGAAG
L Y Q K K M K A I V E D F L K R L Y I F

GATGTGTCCAGGGTGCCAGATGATCAGATGTACCGTCTTAGGGATAGGCTTAGGCTCCTC
1981 -----+-----+-----+-----+-----+
CTACACAGGTCCCACGGTCTACTAGTCTACATGGCAGAATCCCTATCCGAATCCGAGGAG
D V S R V P D D Q M Y R L R D R L R L L

CCAGTGGAGATCAGAAGGCTCGATATCTTCAACCTCATCCTTATGAACATGGATCAGATC
2041 -----+-----+-----+-----+-----+
GGTCACCTCTAGTCTTCCGAGCTATAGAAGTTGGAGTAGGAATACTTGTACCTAGTCTAG
P V E I R R L D I F N L I L M N M D Q I

GAGAGGGCTCCGATAAGATCGCTCAGGGTGTATTATCGCTTACCGTGATATGCACCTT
2101 -----+-----+-----+-----+-----+
CTCTCCCGAAGGCTATCTAGCGAGTCCCACAATAATAGCGAATGGCACTATAACGTGGAA
E R A S D K I A Q G V I I A Y R D M H L

GAGAGGGATGAGATGTACGGATACGTGAACATTGCTAGGAACCTTGAGGGATTCCAGCAG
2161 -----+-----+-----+-----+-----+
CTCTCCCTACTCTACATGCCTATGCACTTGTAAACGATCCTTGGAACCTCCCTAAGGTCGTC
E R D E M Y G Y V N I A R N L E G F Q Q

ATCAACCTGAAGAGCTTATGCGTTCCGGTGATTACGCTCAGATCACTAACATGCTCCTC
2221 -----+-----+-----+-----+-----+
TAGTTGGAACCTCTCGAATACGCAAGGCCACTAATGCGAGTCTAGTGATTGTACGAGGAG
I N L E E L M R S G D Y A Q I T N M L L

AACAAACCAGCCAGTGGCTCTTGTGGTGTCTCCCATTCATCACTGATTCTCCGTGATC
2281 -----+-----+-----+-----+-----+
TTGTTGGTCCGGTCACCGAGAACAACCACGAGAGGGTAAGTAGTACTAAGGAGGCACTAG
N N Q P V A L V G A L P F I T D S S V I

TCCCTCATTGCTAAGTTGGATGCTACTGTGTTGCTCAGATCGTGAAGCTCAGGAAAGTG
2341 -----+-----+-----+-----+-----+
AGGGAGTAACGATTCAACCTACGATGACACAAGCGAGTCTAGCACTTCGAGTCCCTTCAC
S L I A K L D A T V F A Q I V K L R K V

GATACTCTCAAGCCAATCCTCTACAAGATCAACTCCGATTCCAACGATTCTACCTCGTG
2401 -----+-----+-----+-----+-----+
CTATGAGAGTTCGGTTAGGAGATGTTCTAGTTGAGGCTAAGGTTGCTAAAGATGGAGCAC
D T L K P I L Y K I N S D S N D F Y L V

```

Figura 16A -6

```

2461 GCTAACTACGATTGGGTGCCAACTTCCACTACAAAGGTGTACAAGCAGGTGCCACAGCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGATTGATGCTAACCCACGGTTGAAGGTGATGTTTCCACATGTTTCGTCCACGGTGTCGTC
A N Y D W V P T S T T K V Y K Q V P Q Q

TTCGATTTCGTAACCTCCATGCACATGCTCACTTCCAACCTCACTTTCCTGTGTACTCC
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGCTAAAGGCATTGAGGTACGTGTACGAGTGAAGGTTGGAGTGAAAGTGACACATGAGG
F D F R N S M H M L T S N L T F T V Y S

GATCTCCTCGCTTTCGTGTCGCTGATACTGTGGAGCCTATCAACGCTGTGGCTTTCGAT
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGAGGAGCGAAAGCACAGGCGACTATGACACCTCGGATAGTTGCGACACCGAAAGCTA
D L L A F V S A D T V E P I N A V A F D

AACATGAGGATTATGAACGAGCTTTGATGACTCGAGGGATCCTCTAGAGAA
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTACTCCTAATACTTGCTCGAAACTACTGAGCTCCCTAGGAGATCTCTT
N M R I M N E L * * SEQ ID NO: 1

TTCGAGCTC SEQ ID NO: 13
-----+
AAGCTCGAG SEQ ID NO: 14

```

Figura 16B-1

VP4 de Rotavirus

Nombre del gen: **G9P6_VP4**

Longitud del gen: 2388 pb

Optimizado para la expresión en: ***Nicotiana tabacum***

```

GGTACCGAATTCGGACGCGTTCGGTCCATGGCTTCCCTCATCTACCGTCAGTTGCTCACT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATGGCTTAAGCCTGCGCAAGCAAGGTACCGAAGGGAGTAGATGGCAGTCAACGAGTGA
SEQ ID NO 2 G R V R S M A S L I Y R Q L L T

AACCTCTACACTGTGGAGCTTTCGGATGAGATCAACACTATCGGTTCCGAGAAGTCCCAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGAGGATGTGACACCTCGAAAGGCTACTCTAGTTGTGATAGCCAAGGCTCTTCAGGGTC
N S Y T V E L S D E I N T I G S E K S Q

AACGTGACTATCAACCCAGGACCATTCGCTCAGACTAACTACGCTCCAGTACTTGGTCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGCACTGATAGTTGGGTCTTGGTAAGCGAGTCTGATTGATGCGAGGTCACCTGAACCCAGT
N V T I N P G P F A Q T N Y A P V T W S

CACGGTGAAGTGAACGATTCCACTACTATCGAGCCAGTGCCTCGATGGACCATAACAGCCA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGCCACTTCACTTGCTAAGGTGATGATAGCTCGGTCACGAGCTACCTGGTATGGTCGGT
H G E V N D S T T I E P V L D G P Y Q P

ACTAACTTCAAGCCACCAACGATTACTGGATTCTCCTCAACCCAACTAACCAGCAGGTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGATTGAAGTTCGGTGGTTTGCTAATGACCTAAGAGGAGTTGGGTTGATTGGTCGTCCAC
T N F K P P N D Y W I L L N P T N Q Q V

GTGCTTGAGGGAACAAACAAGACTGATATCTGGGTGGCACTCCTTCTTGTGGAGCCAAAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACGAACTCCCTTGATTGTTCTGACTATAGACCCACCGTGAGGAAGAACACCTCGGTTTG
V L E G T N K T D I W V A L L L V E P N

GTGACTAACCAGTCCAGGCAGTACACTCTCTTCGGAGAGACTAAGCAGATCACTGTGGAG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACTGATTGGTCAGGTCCGTCATGTGAGAGAAGCCTCTCTGATTCTGCTAGTGACACCTC
V T N Q S R Q Y T L F G E T K Q I T V E

```

Figura 16B -2

```

AACAACTAACAAGTGAAGTTCTTCGAGATGTTTCAGGTCCAACGTGAACGCTGAGTTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTTGTGATTGTTACCTTCAAGAAGCTCTACAAGTCCAGGTTGCACTTGGCACTCAAG
N_N_T_N_K_W_K_F_F_E_M_F_R_S_N_V_N_A_E_F_

CAGCACAAAGAGGACTCTCACTTCCGATACAAAGCTCGCTGGTTTTATGAAGTCTACAAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGTGTTCTCCTGAGAGTGAAGGCTATGTTTCGAGCGACCAAAATACTTCAAGATGTTG
Q_H_K_R_T_L_T_S_D_T_K_L_A_G_F_M_K_F_Y_N_

TCTGTGTGGACTTTCCACGGTGAACCTCCACACGCTACTACTGATTACTCCTCCACTTCC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACACACCTGAAAGGTGCCACTTTGAGGTGTGCGATGATGACTAATGAGGAGGTGAAGG
S_V_W_T_F_H_G_E_T_P_H_A_T_T_D_Y_S_S_T_S_

AACCTTCCGAGGTGGAGACTGTGATCCACGTGGAGTCTACATCATCCAAGGTCCCAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGAAAGGCTCCACCTCTGACACTAGGTGCACCTCAAGATGTAGTAGGTTCCAGGGTT
N_L_S_E_V_E_T_V_I_H_V_E_F_Y_I_I_P_R_S_Q_

GAGTCTAAGTGCTCCGAGTACATCAACACTGGACTCCCACCAATGCAAAACTAGGAAC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCAGATTCACGAGGCTCATGTAGTTGTGACCTGAGGGTGGTTACGTTTTGTGATCCTTG
E_S_K_C_S_E_Y_I_N_T_G_L_P_P_M_Q_N_T_R_N_

ATCGTGCCAGTGGCTTTGTCTCTCGTTCGGTGACTTACCAGAGGGCTCAGGTGAACGAG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGCACGGTCACCGAAACAGGAGAGCAAGGCACTGAATGGTCTCCCGAGTCCACTTGCTC
I_V_P_V_A_L_S_S_R_S_V_T_Y_Q_R_A_Q_V_N_E_

GATATCATCATCTCCAAGACTTCCCCTCGGAAAGAGATGCAGTACAACAGGGATATTATC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTATAGTAGTAGAGGTTCTGAAGGGAGACCTTCTCTACGTATGTTGTCCCTATAATAG
D_I_I_I_S_K_T_S_L_W_K_E_M_Q_Y_N_R_D_I_I_

ATCAGGTTCAAGTTCAACAACCTCCATCGTGAAGCTCGGAGGACTCGGATACAAGTGGAGT
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGTCCAAGTTCAAGTTGTTGAGGTAGCACTTCGAGCCTCCTGAGCCTATGTTACCTCA
I_R_F_K_F_N_N_S_I_V_K_L_G_G_L_G_Y_K_W_S_

GAGATCTCCTTCAAGGCTGCTAACTACCAGTACTCCTACCTCAGGGATGGTGAACAGGTTG
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTAGAGGAAGTTCGACGATTGATGGTCAAGGATGAGTCCCTACCACTTGTCCAC
E_I_S_F_K_A_A_N_Y_Q_Y_S_Y_L_R_D_G_E_Q_V_

```

Figura 16B-3

```

ACAGCTCACACTACTTGGCTCCGTGAACGGTGTAAACAACCTCTCCTACAACGGTGGTTCC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTCGAGTGTGATGAACGAGGCACTTGCCACAATTGTTGAAGAGGATGTGCCACCAAGG
T A H T T C S V N G V N N F S Y N G G S

CTCCAACCTGATTTCTCCGTGTCCCCTTACGAGGTGATCAAAGAGAACTCCTACGTTTAC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGGGTTGACTAAAGAGGCACAGGGCAATGCCTCACTAGTTTCTCTTGAGGATGCAAATG
L P T D F S V S R Y E V I K E N S Y V Y

GTGGATTACTGGGATGATTTCCAGGCTTTCAGGAACATGGTGTATGTTAGATCCCTCGCT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCTAATGACCCCTACTAAGGGTCCGAAAGTCTTGTACCACATACAATCTAGGGAGCGA
V D Y W D D S Q A F R N M V Y V R S L A

GCTAACCTCAACTCCGTGAAGTGTCCGGTGGAACTACAACCTCCAGATCCAGTGGGA
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGATTGGAGTTGAGGCACTTCACGAGGCCACCTTTGATGTTGAAGGCTTAGGGTCACCCCT
A N L N S V K C S G G N Y N F Q I P V G

GCTTGGCCAGTGTCTGGTGGAGCTGTGTCTCTCCACTTCGCTGGTGTACACTCTCC
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAACCGGTCACTACAGACCCTCGACACAGAGAGGTGAAGCGACCACAATGTGAGAGG
A W P V M S G G A V S L H F A G V T L S

ACTCAGTTCAGTATTTCTCGTGTCCCTCAACTCCCTCAGGTTCCAGTTCTCCCTCACTGTG
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGAGTCAAGTGACTAAAGCACAGGGAGTTGAGGGAGTCCAAGTCCAAGAGGGAGTGACAC
T Q F T D F V S L N S L R F R F S L T V

GAAGAGCCACCATTCTCCATCCTCAGGACTAGGGTGTCCGGACTTTACGGACTCCCAGCT
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTCTCGGTGGTAAGAGGTAGGAGTCTGATCCCACAGGCCTGAAATGCCTGAGGGTCTGA
E E P P F S I L R T R V S G L Y G L P A

TTCAACCCAAACAACGGACACGAGTACTACGAGATCGCTGGACGTTTCTCCCTTATCTCC
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTTGGGTTTGTGCTGTGCTCATGATGCCTAGCGACCTGCAAAGAGGGAATAGAGG
F N P N N G H E Y Y E I A G R F S L I S

CTCGTGCCATCCAACGATGATTACCAGACTCCAATTATGAACTCCGTGACTGTGAGGCAG
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGCACGGTAGGTTGCTACTAATGGTCTGAGGTTAATACTTGAGGCACTGACACTCCGTC
L V P S N D D Y Q T P I M N S V T V R Q
    
```

Figura 16B-4

```

GATCTTGAGAGGCAGCTCGGAGATCTCAGGGAAGAGTTCAACTCCCTCTCCCAAGAGATC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGAACTCTCCGTCGAGCCTCTAGAGTCCCTTCTCAAGTTGAGGGAGAGGGTTCTCTAG
D L E R Q L G D L R E E F N S L S Q E I

GCTATGACTCAGCTCATCGATCTCGCTCTCCTCCCACTCGATATGTTCTCCATGTTCTCT
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGATACTGAGTCGAGTAGCTAGAGCGAGAGGAGGGTGAGCTATACAAGAGGTACAAGAGA
A M T Q L I D L A L L P L D M F S M F S

GGTATCAAGTCCACTATCGATGTGGCTAAGTCTATGGTGACTAAGGTGATGAAGAAGTTC
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATAGTTCAGGTGATAGCTACACCGATTACAGATACCCTGATTCCACTACTTCTTCAAG
G I K S T I D V A K S M V T K V M K K F

AAGAAGTCCGACTCGCTACTTCCATCTCCGAGCTTACTGGATCTCTCTCCAACGCTGCT
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTTCAGGCCTGAGCGATGAAGGTAGAGGCTCGAATGACCTAGAGAGAGGTTGCGACGA
K K S G L A T S I S E L T G S L S N A A

TCTTCTGTGTCTAGGTCTCCTCCATCAGGTCCAACATCTCCTCCATCTCAGTGTGGACT
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAAGACACAGATCCAGGAGGAGGTAGTCCAGGTTGTAGAGGAGGTAGAGTCACACCTGA
S S V S R S S S I R S N I S S I S V W T

GATGTGTCCGAGCAGATCGCTGGATCTTCCGATPCCGTGCGTAACATCTCCACTCAGACT
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACACAGGCTCGTCTAGCGACCTAGAAGGCTAAGGCACGCATTGTAGAGGTGAGTCTGA
D V S E Q I A G S S D S V R N I S T Q T

TCCGCTATCTCCAAGAGGCTTAGGCTCAGAGAGATCACTACTCAGACTGAGGGAATGAAC
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGCGATAGAGGTTCTCCGAATCCGAGTCTCTCTAGTGATGAGTCTGACTCCCTTACTTG
S A I S K R L R L R E I T T Q T E G M N

TTCGATGATATCTCCGCTGCTGTGCTCAAGACTAAGATCGATAGGTCCACTCACATCTCC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGCTACTATAGAGGCGACGACACGAGTTCTGATTCTAGCTATCCAGGTGAGTGTAGAGG
F D D I S A A V L K T K I D R S T H I S

CCAGATACTCTCCAGATATCATCACTGAGTCTCCTCCGAGAAGTTTCATCCCAAAGCGTGCT
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCTATGAGAGGTTCTATAGTAGTACTCAGGAGGCTCTCAAGTAGGGTTTCGCACGA
P D T L P D I I T E S S E K F I P K R A

```

Figura 16B-5

```

2041  TACCGTGTTCTCAAGGATGATGAGGTGATGGAAGCTGATGTGGATGGAAGTCTTCGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGCACAAAGAGTTCCTACTACTCCACTACCTTCGACTACACCTACCTTTCAAGAAGCGA
Y_R_V_L_K_D_D_E_V_M_E_A_D_V_D_G_K_F_F_A

2101  TACAAAGTGGGAAC TTCGAAGAGGTGCCATFCGATGTGGATAAGTTCGTGGATCTCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTTTCACCCTTGAAAGCTTCTCCACGGTAAGCTACACCTATTCAAGCACCTAGAGCAC
Y_K_V_G_T_F_E_E_V_P_F_D_V_D_K_F_V_D_L_V

2161  ACTGATCCCCAGTGTATCTCCGCTATCATCGATTTCAAGACTCTCAAGAACC TCAACGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGACTAAGGGTCACTAGAGCGATAGTAGCTAAAGTCTGAGAGTCTTGGAGTTGCTA
T_D_S_P_V_I_S_A_I_I_D_F_K_T_L_K_N_L_N_D

2221  AACTACGGAATCACTAGGTCCCAGGCTCTCGATCTCATCCGTTCCGATCCAAGGGTGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGATGCCTTAGTGATCCAGGGTCCGAGAGCTAGAGTAGGCAAGGCTAGGTTCCCACGAG
N_Y_G_I_T_R_S_Q_A_L_D_L_I_R_S_D_P_R_V_L

2281  AGGGATTTCAATCAACCAGAACAACCCAATCATCAAGAACAGGATCGAGCAGCTCATTCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCCTAAAGTAGTTGGTCTTGTGGGTTAGTAGTTC TTGTCTAGCTCGTCGAGTAAGAG
R_D_F_I_N_Q_N_N_P_I_I_K_N_R_I_E_Q_L_I_L

2341  CAGTGCCGCTTTGATGACTCGAGGGATCCTCTAGAGAATTCGAGCTC SEQ ID NO: 15
-----+-----+-----+-----+-----+
GTCACGGCAGAACTACTGAGCTCCCTAGGAGATCTCTTAAGCTCGAG SEQ ID NO: 16
Q_C_R_L_*_* SEQ ID NO: 2

```


Figura 16C-1
VP6 de Rotavirus

Nombre del gen: **G9P6_VP6**

Longitud del gen: 1254 pb

Optimizado para la expresión en: ***Nicotiana tabacum***

```

1  GGTACCGAATTCGGACGCGTTCGTTCCATGGATGTGCTCTACTCCCTCTCCAAGACTCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATGGCTTAAGCCTGCGCAAGCAAGGTACCTACACGAGATGAGGGAGAGGTTCTGAGAG
      G R V R S M D V L Y S L S K T L

61  AAGGATGCTAGGGATAAGATCGTGGAGGGAACCTCTACTCCAACGTTCCGATCTCATC
-----+-----+-----+-----+-----+
TTCCTACGATCCCTATTCTAGCACCTCCCTTGAGAGATGAGGTTGCAAAGGCTAGAGTAG
K D A R D K I V E G T L Y S N V S D L I

121 CAGCAGTTCAACCAGATGATCATCACTATGAACGGAACGAGTTCAGACTGGTGGAAATC
-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGTCAAGTTGGTCTACTAGTAGTACTTGCCTTTGCTCAAGGCTGACCACCTTAG
Q Q F N Q M I I T M N G N E F Q T G G I

181 GGAAACCTCCCAATCAGGAACCTGGAACCTCGATTTCCGACTCCTCGGAACACTCTCCTC
-----+-----+-----+-----+-----+
CCTTTGGAGGGTTAGTCCTTGACCTTGAAGCTAAAGCCTGAGGAGCCTTGATGAGAGGAG
G N L P I R N W N F D F G L L G T T L L

241 AACCTCGATGCTAACTACGTGGAGACTGCTAGGAACACTATCGATTACTTCGTTGATTC
-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGAGCTACGATTGATGCACCTCTGACGATCCTTGATAGCTAATGAAGCAACTAAAG
N L D A N Y V E T A R N T I D Y F V D F

301 GTGATAATGTGTGCATGGATGAGATGGTTCGTGAGTCCCAGAGGAACGGAATTGCTCCA
-----+-----+-----+-----+-----+
CACCTATTACACAGTACCTACTCTACCAAGCACTCAGGGTCTCCTTGCCTTAACGAGGT
V D N V C M D E M V R E S Q R N G I A P

361 CAGTCCGATTCCTCAGGAAGCTCTCCGGTATCAAGTTCAAGAGGATCAACTTCGATAAC
-----+-----+-----+-----+-----+
GTCAGGCTAAGGGAGTCCTTCGAGAGGCCATAGTTCAAGTTCTCCTAGTTGAAGCTATTG
Q S D S L R K L S G I K F K R I N F D N

421 TCCTCCGAGTACATCGAGAACCTGGAACCTCCAGAACAGAAGGCAGAGGACTGGATTCACT
-----+-----+-----+-----+-----+
AGGAGGCTCATGTAGCTCTTGACCTTGAGGCTCTTGCTTCCGCTCCTGACCTAAGTGA
S S E Y I E N W N L Q N R R Q R T G F T

```


Figura 16C -2

TTCCACAAGCCAAACATCTTCCCATACTCCGCTTCCTTCACTCTCAACAGGTCCCAGCCA
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGGTGTTCCGGTTTGTAGAAGGGTATGAGGCGAAGGAAGTGAGAGTTGTCCAGGGTCCGGT
F H K P N I F P Y S A S F T L N R S Q P

GCTCACGATAACCTCATGGGAACATGTGGCTCAACGCTGGTCTGAGATCCAGGTGGCA
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGAGTGCATTTGGAGTACCCTTGATACACCGAGTTGCGACCAAGACTCTAGGTCCACCGT
A H D N L M G T M W L N A G S E I Q V A

GGATTGATTACTCCTGCGCTATCAACGCTCCAGCTAACACTCAGCAGTTCGAGCACATC
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCTAAGCTAATGAGGACGCGATAGTTGCGAGGTGCGATTGTGAGTTCGCAAGCTCGTGTGAT
G F D Y S C A I N A P A N T Q Q F E H I

GTTCAGCTCAGAAGGGTGCCTACTACTGCTACTATCACTCTCCTCCCAGATGCTGAGAGG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAAGTCGAGTCTTCCCACGAGTGATGACGATGATAGTGAGAGGAGGGTCTACGACTCTCC
V Q L R R V L T T A T I T L L P D A E R

TTCTCCTTCCCAAGGGTATCAACTCCGCTGATGGTGTACTACTTGGTACTTCAACCCA
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGAGGAAGGGTTCCTCACTAGTTGAGGCGACTACCACGATGATGAACCATGAAGTTGGGT
F S F P R V I N S A D G A T T W Y F N P

GTGATCCTCAGGCCAAACAACGTTGGAGGTGGAGTTCTTCTCAACGGACAGATCATCAAC
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTAGGAGTCCGGTTTGTGACACCACCCTCAAGGAAGAGTTGCCGTCTAGTAGTGTG
V I L R P N N V E V E F L L N G Q I I N

ACTTACCAGGCTCGTTTCGGAACATATCGTGGCTAGGAACTTCGATACAATCAGGCTCTCC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGAATGGTCCGAGCAAAGCCTTGATAGCACCGATCCTTGAAGCTATGTTAGTCCGAGAGG
T Y Q A R F G T I V A R N F D T I R L S

TTCCAGCTTATGAGGCCACCAAACATGACTCCATCCGTGGCTGCACTCTTCCCAAACGCA
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGGTGCAATACTCCGGTGGTTTGTACTGAGGTAGGCACCGACGTGAGAAGGGTTTGGCT
F Q L M R P P N M T P S V A A L F P N A

CAGCCATTCGAGCACCACGCTACTGTGGGACTCACTCTCAAGATCGAGTCCGCTGTGTGC
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCGGTAAGCTCGTGGTGGCAGTACACCCCTGAGTGAGAGTTCTAGCTCAGGCGACACAG
Q P F E H H A T V G L T L K I E S A V C

Figura 16C -3

1021 GAGTCTGTGCTCGCTGATGCTTCCGAGACTATGCTCGCTAACGTGACTTCTGTGAGGCAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCAGACACGAGCGACTACGAAGGCTCTGATACGAGCGATTGCACTGAAGACACTCCGTT
E S V L A D A S E T M L A N V T S V R Q

1081 GAGTACGCTATCCCAGTGGGACCAGTGTTCACCAGGAATGAACTGGACTGATCTCATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCATGCGATAGGGTCACCCTGGTCACAAAGGTGGTCCCTTACTTGACCTGACTAGAGTAG
E Y A I P V G P V F P P G M N W T D L I

1141 ACTAACTACTCCCCATCCAGAGAGGATAACCTCCAGAGGGTGTTCACTGTGGCTTCCATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGATTGATGAGGGGTAGGTCTCTCCTATTGGAGGTCTCCACAAGTGACACCGAAGGTAG
T N Y S P S R E D N L Q R V F T V A S I

CGTTCATGCTCGTGAAGTGATGACTCGAGGGATCCTCTAGAGAA
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCAAGGTACGAGCACTTCACTACTGAGCTCCCTAGGAGATCTCTT
R S M L V K * * SEQ ID NO: 3

TTCGAGCTC SEQ ID NO: 17

-----+-----

AAGCTCGAG SEQ ID NO: 18

Figura 16D-1
VP7 de Rotavirus

Nombre del gen: **G9P6_VP7**

Longitud del gen: 1041 pb
Optimizado para la expresión:

Nicotiana tabacum

```

1      GGTACCGAATTCGGACGCGTTCGTTGCATGTACGGAATCGAGTACACTACTATCCTCACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATGGCTTAAGCCTGCGCAAGCAACGTACATGCCTTAGCTCATGTGATGATAGGAGTGA
SEQ ID NO: 4 G R V R C M Y G I E Y T T I L T

61     TTCCTCATCTCCATCGTGCCTCCTCAACTACATCCTCAAGTCCCTCACTTCCGCTATGGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGGAGTAGAGGTAGCACGAGGAGTTGATGTAGGAGTTCAGGGAGTGAAGGCGATACCTA
F L I S I V L L N Y I L K S L T S A M D

121    TTCATCATCTACCGTTTCCTCCTCCTCATCGTGATCGCTTCCCCATTCGTTAAGACTCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTAGTAGATGGCAAAGGAGGAGGAGTAGCACTAGCGAAGGGGTAAGCAATTCGAGTGC
F I I Y R F L L L I V I A S P F V K T Q

181    AACTACGGTATCAACCTCCCAATCACTGGATCTATGGATACTGCTTACGCTAACCTCCTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGATGCCATAGTTGGAGGGTTAGTGACCTAGATACCTATGACGAATGCGATTGAGGAGG
N Y G I N L P I T G S M D T A Y A N S S

241    CAGCAAGAGACTTTCCTCACTTCCACACTCTGCCTCTACTACCCAAGTGGGCATCCACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGTTCCTCGAAAGGAGTGAAGGTGTGAGACGGAGATGATGGGTTGACTCCGTAGGTGT
Q Q E T F L T S T L C L Y Y P T E A S T

301    CAGATCGGAGATACAGAGTGAAGGATACTCTCTCCAGCTCTTCTCCTCACTAAGGGATGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCTAGCCTCTATGTCTCACCTTCTATGAGAGAGGGTCGAGAAGGAGTGATTCCCTACC
Q I G D T E W K D T L S Q L F L T K G W

361    CCAACTGGTTCGGTGTACTTCAAAGAGTACACTGATATCGCTTCTTCTCCATCGATCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTTGACCAAGGCACATGAAGTTTCTCATGTGACTATAGCGAAGGAAGAGGTAGCTAGGT
P T G S V Y F K E Y T D I A S F S I D P
    
```

Figura 16D -2

```

CAGCTCTACTGCGATTACAACGTGGTGC TTATGAAGTACGATTCCACTCTTGAGCTTGAT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGAGATGACGCTAATGTTGCACCACGAATACTTCATGCTAAGGTGAGAACTCGAACTA
Q_L_Y_C_D_Y_N_V_V_L_M_K_Y_D_S_T_L_E_L_D

ATGTCGAGCTTGCTGATCTCATCTCAACGAGTGGCTCTGCAACCCAAATGGATATCACT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACAGGCTCGAACGACTAGAGTAGGAGTTGCTCACCGAGACGTTGGGTTACCTATAGTGA
M_S_E_L_A_D_L_I_L_N_E_W_L_C_N_P_M_D_I_T

CTCTACTACTACCAGCAGACTGATGAGGCTAACAAAGTGGATCTCTATGGGACAGTCCCTGC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGATGATGATGGTCGCTCTGACTACTCCGATTGTTACCTAGAGATACCCTGTCAGGACG
L_Y_Y_Y_Q_Q_T_D_E_A_N_K_W_I_S_M_G_Q_S_C

ACTATCAAAGTGTGCCCACTCAACACTCAGACTCTCGGAATCGGATGCATCACTACTAAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGATAGTTTCACACGGGTGAGTTGTGAGTCTGAGAGCCTTAGCCTACGTAGTGATGATTG
T_I_K_V_C_P_L_N_T_Q_T_L_G_I_G_C_I_T_T_N

ACTGCTACTTTTCGAGGAAGTGGCTACTTCCGAGAAGCTCGTGATCACTGATGTGGTGGAT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGACGATGAAAGCTCCTTCACCGATGAAGGCTCTTCGAGCACTAGTGACTACACCACCTA
T_A_T_F_E_E_V_A_T_S_E_K_L_V_I_T_D_V_V_D

GGTGTTAACCACAAGCTCGATGTGACTACTAACACATGCACAATCAGGAACTGCAAGAAG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCACAATGGTGTTCGAGCTACACTGATGATTGTGTACGTGTTAGTCCTTGACGTTCTTC
G_V_N_H_K_L_D_V_T_T_N_T_C_T_I_R_N_C_K_K

CTCGGACCAAGGGAAAACGTGGCTATCATCCAAGTGGGAGGTTCCGATGTGCTCGATATC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGCCTGGTTCCTTTTGCACCGATAGTAGGTTACCCTCCAAGGCTACACGAGCTATAG
L_G_P_R_E_N_V_A_I_I_Q_V_G_G_S_D_V_L_D_I

ACTGCTGATCCAAC TACTGCTCCACAGACTGAGAGGATGATGAGGGTGA ACTGGAAGAAG
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGACGACTAGGTTGATGACGAGGTGTCTGACTCTCCTACTACTCCCACTTGACCTTCTTC
T_A_D_P_T_T_A_P_Q_T_E_R_M_M_R_V_N_W_K_K

TGGTGGCAGGTTTTCTACACTGTGGTGGATTACATCAACCAGATCGTTTCAGGTGATGTCC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCACCGTCCAAAAGATGTGACACCACCTAATGTAGTTGGTCTAGCAAGTCCACTACAGG
W_W_Q_V_F_Y_T_V_V_D_Y_I_N_Q_I_V_Q_V_M_S

```

Figura 16D -3

```
AAGAGGTCCCGTTCTCTCAACTCCGCTGCTTTCTACTACCGTGTGTGATGACTCGAGGGA
961 -----+-----+-----+-----+-----+
TTCTCCAGGGCAAGAGAGTTGAGGCGACGAAAGATGATGGCACACACTACTGAGCTCCCT
K R S R S L N S A A F Y Y R V * * SEQ ID NO: 4

TCCTCTAGAGAATTCGAGCTC SEQ ID NO: 19
1021 -----+-----+
AGGAGATCTCTTAAGCTCGAG SEQ ID NO: 20
```

Figura 17

A-2X35S/CPMV-HT/ RVA(WA) VP2(opt)/ NOS (Construcción número 1710)

Figura 17A, SEQ ID NO: 21

IF-WA_VP2(opt).s1+3c
AAATTTGTCGGGCCCATGGCATACCGGAAGAGAGGAGCAAAGCGCGAA

Figura 17B, SEQ ID NO: 22

IF-WA_VP2(opt).s1-4r
ACTAAAGAAAATAGGCCTTTAAAGCTCGTTCATTATTCGCATATTGTCGA

Figura 17C

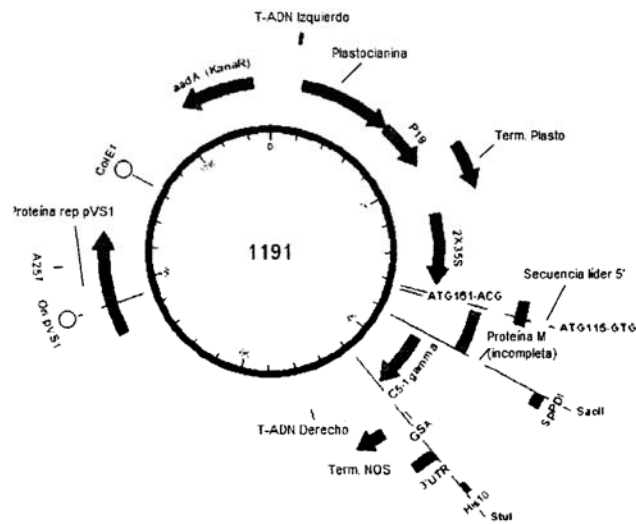


Figura 18, SEQ ID NO: 23

Construcción 1191 de los bordes izquierdo a derecho de ADNT (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina

TGGCAGGATATATTGTTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTT
TAAATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACC
 ATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATA
 AATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAA
 CAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAAATTTTGTGTTCTCTTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAG
 AGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTG
 TACCAAAAATAGTTGTACAAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTCG
 TGTAAATAAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAATA
 AGAAAGAATAAAATATTTTAAAAATTAAGGTTGAGTCATTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAA
 TTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTT
 GATCTTTTCCCTATATATTGCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTATATTTCATAGATCAATAAGA
 GAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAAAGGTTAATTTACTAAAAAATCTAAGCCACG
 TAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCGTGATG
 AGATAACCCACTTTAAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTTCCACA
 CATCTGAGCCACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTTCTATAAAAAATCACACATTTGTGAG
 TCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAG
 AGAAAATGGAACGAGCTATACAAGAAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATG
 GAGGATCAGGAGGTACCCTTCTCCCTTCAAACCTTCCGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCG
 GCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTC
 GGGAAAAGTTGATTAAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCTTGT
 GATCTTGGACGGGAGATTTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTCCGGTTTCGACCAGATCGGATGT
 ACCTATAGTATTCCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTTCGCGAACTCTTCAGCATCT
 CTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAGTGTACAGCTTGCCTCAATCGAAGTGGAAAAGTAAT
 GTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAAATGCTT
 CTTCGCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCG
 TTGTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAAGTGGAGT
 CAGAATCAGAAATGTTTCCCTCATAAATACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTTGCTTATATT
 TGAACAACATAAAATGAAACATCTTTTGCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATATGGT
 CAAGTTCATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAACTAACCTTAACGTTAT
 AACTACTAATTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCC
 TAGGAGATTGTCTGTTTCCCGCTTTCAGTTTGCAGAGTGTCTTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAAACCGC
 CTCTCCCGCGCGTTGGGAATTAAGCGCGTGTGACAAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGTTGGAG
 CACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTC
 ACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCTCGGATTCATTTGCCAGCTATCTGTCACTTTAT
 TGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAA
 CGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAA
 AAAGAAGACGTTCCAACACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGAC
 ACATTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAGACTTTTC
 AACAAGGGTAATATCCGGAAACCTCTCGGATTCATTTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTTGTGAAAG
 ATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTCAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAA
 GATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAA
 GACGTTCCAACACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG
 CACAATCCCCTATCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGTAT
 TAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAAACCTTCTTCTAAACTC
 TCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTCTCTTGTCTTCTTCTGCGTGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGA
 TCGTGTCTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACG
 TAGTGGCGCGCCATTAATAACGTTACTTGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
 AAGCTTCTGTATATCTGCCCCAAATTTGTGCGGGCCCGCGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCT
 TATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCCGCTGCAGGCTCTCAGCCAAAACGACA
 CCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTGCCAACTAACTCCATGGTGACCTGGGATG
 CCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGT
 GTGCACACTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTCTCCCTC
 CAGCACTGCCAGCGAGACCGTCACTTGAACGTTGCCCAACCGGCCAGCAGCAACCAAGGTGGA
 CAAGAAAATTTGCCCCAGGATTTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAAGTATCATCT
 GTCTTCTCTTCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTTGT
 TGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTG

CACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACITTCGCTCAGTCAGTGAACTTCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCCGGTGTGCATTTCTATGTTGGTGA GCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAG GTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGG GAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTG AATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAAT TAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTT AATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTAT GTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTTAC AACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAAGTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCTTTCGCC AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCG AATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGTTT GACAGGATATATTGGCGGTAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 19 Secuencia de nucleótidos que codifica VP2(opt) de la cepa WA de Rotavirus A (SEQ ID NO: 45).

ATGGCATAACCGGAAGAGAGAGGAGCAAAGCGCGAAAAACCTGCCGCAACAGAACGAGAGA
 CTGCAAGAAAAAGAGATAGAGAAAAGATGTGCGACGTAACAATGGAAAAACAAGAATAAC
 AATAGGAAACAACAGCTGTCCGACAAAAGTTCTGTCCAGAAAGGAGGAAATTTACTACT
 GACGCCCAGGACGATATTTAAAATTTGCCGGAGAAAAATAAGAAAGAGCTCGAAAGAAGAA
 TCTAAACAGCTGCTCGAAATTTCTGAAAACAAAAGAAGACCATCAGAAAAGAGATTTCAA
 TATGAAATTTTGCAAAAACAATACCTACATTTGAGTCCAAAAGAAAGTATCCTCAAG
 AAGCTTGAAGACATAAGACCCGAGCAGGCAAAAAACAGATGAAACTCTTTTCGCATT
 TTCGAGCCAAAACAGCTCCCTATATATCGCGCCAATGGCGAGAAGGAGCTACGCAAC
 CGGTGGTACTGGAAGTTGAAAAAAGACACCCTGCCAGATGGAGATTATGACGTCCGG
 GAGTATTTCTCAATCTCTATGATCAGATCCTCATCGAAATGCCGGACTATCTGCTC
 CTCAAGGACATGGCCGTGGAGAACAATAAGCAGAGACGCCGGCAAAGTTGTGCGAC
 TCTGAGACTGCCAATATTTGTGATGCCATCTTCCAGGATGAGGAGACCGAGGGAGTC
 GTCCGTAGATTCATCGCTGATATGCGGCAACAGGTCAGGCTGATCGTAACATTTGTC
 AATTACCCCTTCCATCCTTACCCTATTGATCATGCATTCATGAGTATTTTCTTAAAC
 CACCAGTTGGTGGAGCCGCTGAACAATGAGATAATCTTCAATTACATACCAGAGAGG
 ATAAGGAATGACGTGAATTACATCCTGAACATGGATATGAATCTGCCATCTACAGCC
 AGGTATATCAGGCCAAACTTGTTCGAGGATAGACTGAATCTTCCAGATAATTTTGGAG
 TCCCTGTGGGATAACCATCACAACTCCAACACTACATTTCCAGGAGGTCGGTCCGTTCCC
 GATTTGAAGGAGAAGGAGCTGGTCTCCACCGAAGCACAGATCCAGAAAATGAGCCAG
 GACCTGCAGCTGGAGGCCCTCACTATTCAGAGCGAGACACAGTTTTTTCAGCCGGGATT
 AACAGTCAGGCTGCCAATGATTTGTTTCAAGACCCCTCATAGCCGCCATGCTGTCTCAA
 AGAACCATGTCTTTGGACTTTGTGACCACGAACTATATGAGCCTAATCTCCGGGAATG
 TGGCTACTTACAGTGATTTCCCAACGATATGTTCTCCGGGAGTCACTAGTGGCCTGT
 GAGCTGGCGATCATCAACACCATCGTGTATCCAGCATTCGGAATGCAGAGAATGCAT
 TACCAGGAATGGCGACCCCTCAGACACCCTTCCAGATCGCAGAACAGCAGATCCAGAAT
 TTCCAGGTGGCGAACTGGCTCCATTTTATTAACAATAACAGATTCAGGCAAGTTGTG
 ATTGATGGAGTTCTGAATCAGACTCTGAACGACAATAACGGAAATGGACAGGTCATC
 AACCAGCTGATGGAAGCATTGATGCAACTCAGCAGACAGCAGTTCCCCACGATGCCT
 GTGGATTACAAACGGAGCATCCAACGGGGCATTTCTGCTTCTCTCCAATAGGCTGGGG
 CAGCTTGTGACTTAACCCGACTGGTCTCTATAACTACGAGACGCTAATGGCTTGT
 GTGACCATGAACATGCAGCACGTGCAAACCCCTGACAACTGAGAAGTTGCAGCTCACT
 TCTGTGACTTCGCTTTGTATGTTAATTTGGTAACACAACCGTGATTCGGTCCCCACAG
 AACTGTTCCACTACTACAACATCAACGTGAATTTCCACTCCAATTATAATGAGCGG
 ATCAACGACGCCGTGCGCATAATTTACCGCAGCAAAATAGGCTGAATCTTTATCAGAAA
 AAAATGAAGTCCATAGTGGAAAGACTTTCTGAAAACGGCTCCAGATTTTCGACGTACCA
 CGAGTGCCTGACGACCAAATGTACAGGCTGAGGGATCGCCTTCGGCTCTTACCCGTT
 GAACGGAGACGGCTTGACATATCAACTTGATCCTGATGAATATGGAGCAGATCGAA
 CGCGCTTCTGATAAGATTGCTCAGGGGTTATCATCGCATACCGAGATATGCAGCTG
 GAACCGCAGAGATGTACGGATATGTTAATATGACACGGAATCTTGATGGCTACCCAG
 CAAATTAACCTGGAGGAACTCATGCGCACCGGTGATTACGGACAAATTCAGAACATG
 CTTCTCAACAATCAACCCGTTGCCCTTGTGGGTGCATTGCCCTTCGTTACGGACTCA
 TCCGTGATCAGTCTAATCGCCAAGCTCGACGCAACCGTCTTCGCTCAGATAGTGAAG
 CTCAGGAAAGTTGACACACTGAAGCCATACTGTACAAAATAAACTCGGATTTCCAAT
 GACTTTTACCTTGTGGCCAACTACGACTGGATCCCCACAAGTACAACCTAAGGTCTAC
 AAACAGGTGCCACAACCATTGACTTTAGAGCCAGCATGCACATGCTGACTTCTAAC
 CTTACGTTTACCGTCTACTCTGACCTACTGTCATTTGTTTCAGCGGACACGGTAGAG
 CCCATTAACGCAGTCGCATTCGACAATATGCGAATAATGAACGAGCTTTAA

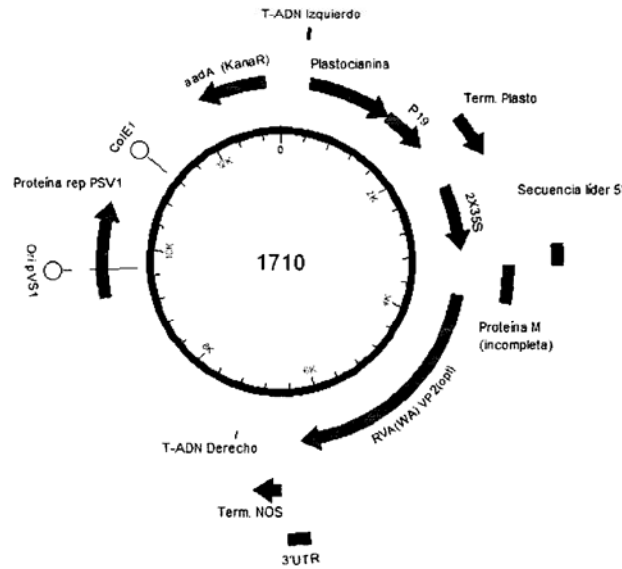
Figura 20, SEQ ID NO: 25

Secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa WA de Rotavirus A

MAYRKRGA KRENLPQQNERLQEKEIEKDVDVTMENKNNNRKQQLSDKVLSSQKEEITDAQDDIKIAGEIK
 KSSKEESKQLEILKTKEDHQKEIQYEILQKTIPTFESKESILKKLEDIRPEQAKKQMKLFRIFEPKQLPIYRA
 NGEKELRNRWYWKLLKDTLPDGDYDVREYFLNLYDQILIEMPDYLLLKDMAVENKNSRDAGKVVVSE
 TANICDAIFQDEETEGVRRFIADMRQQVQADRNVNYP SILHPIDHAFNEYFLNHQLVEPLNNEIIFNYIPE
 RIRNDVNYILNMDMNL PST ARYIRPNLLQDRNLNLDNFESLWDTTTSNYILARSVVPDLKEKELVSTEAQ
 IQKMSQDLQLEALTIQSETQFLAGINSQAANDCFKTLIAAML SQR TMSLDFVTTNYMSLSIGMWLLTVIPN
 DMFLRESL VACELAIINTIVYPAFGMQRMHYRNGDPQTPFQIAEQQIQNFQVANWLFHINNRRFRQVVID
 GVLNQTLNDNIRNGQVINQLMEALMQLSRQQFPTMPVDYKRSIQRGILL SNRLGQLVDLTRLVSYNYET
 LMACVTMNMQH VQTLTTEKLQLT SVTSLCMLIGNTTVIPSPQTLFHYYNINNVNFHSNYNERINDAVAIITA
 ANRLNLYQKKMKSIVEDFLKRLQIFDVPRVPDDQMYRLRDRRLLPVERRRLDIFNLILMNMEQIERASD
 KIAQGVIIAYRDMQLERDEMYGYVNIARNLDGYQQINLEELMRTGDY GQITNMLLNQPVALV GALPFV
 TDSSVISLIAKLDATVFAQIVKLRKVDTLK PILYKINSDSNDFYL VANYDWIPTSTTKVYKQVPQPFDFRAS
 MHMLTSLNLTFTVYSDLLSFVSADTVEPINAVAFDNMRIMNEL

Figura 21

Representación esquemática de la construcción número 1710



B-2X35S/CPMV-HT/RVA(WA) VP2(opt)/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)-Replicasa (Construcción número 1711)

Figura 22A

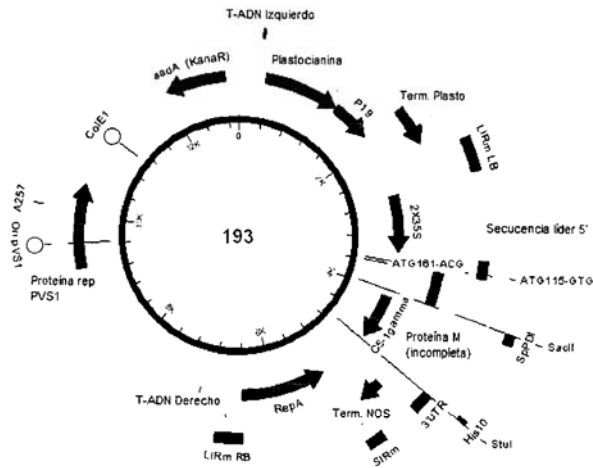


Figura 22B, SEQ ID NO: 26

Construcción 193 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTT
 TTAATGACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAAATAACTCAAAAACC
 ATAAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATA
 AATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAGTGATATTTTGACAA
 CAATTTTGTGCAACATTGAGAAAATTTTGTGTTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAG
 AGAAAAAGGAAAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTG
 TACCAAAATAGTTGTACAAAATATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGGTTAATTGC
 TGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAATA
 AGAAAGAATAAATTTTAAAAATAAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAA
 TTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAAATTTAATTTGACATTT
 GATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCAAGTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAAATAAGA
 GAAATAACGGTATATAATCCCTCCAAAAAAGAAAAAAGCGGTATTTACTAAAAAATCTAAGCCACG
 TAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATG
 AGATAACCCACTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTTCTCCACA
 CATCTGAGCCACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAG
 TCTACACTTTGATTCCCTTCAACACATACAAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAG
 AGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATG
 GAGGATCAGGAGGTACCATTCTCCCTTCAAACTTCTCTGACGAAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCG
 GCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAAGGAAAAGCTGGGGTTT
 GGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCTTGT
 GATCTTGGACGGGAGATTCCGTTAATATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGACCAGATCCGGATGT
 ACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACTTTCAGCATCT
 CTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGTACAGTTCGCCCCAATCGAAGTGGAAAGTAAT
 GTATCAAGAGGATGCCTGAAGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAATGCTT
 CTTCGTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCG
 TTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACCTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGT
 CAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCTACAATTTGCTTATATT
 TGAACAATAAATTTGAACATCTTTTGCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGT
 CAAGTTCAATAGATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATT
 AACTACTAATTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAAGGAAGGAGCATGCTGCC
 TAGGAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAACCCG
 CTCTCCCGCGCGTTGGGAATTAAGCGCGTGTGAGACGCGTTGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTG
 CCTCAAACCTCTATCTTAACCCGGCGTGGAGGATGGAGGACAGGGGATTTTGGTCTATTTAATAGAT
 AGTGGAAAATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAA
 TTTAATATTACCGCGTGGCCCCCTTATCGCGAGTGTCTTAGCACAGAGCGGTCCAGATTTAAAGTA
 GAAAATTTCCCGCCACTAGGGTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATT
 TGGTGCACAAGCTTGCATGCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATC
 AAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAC
 CTCCTCGGATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTC
 CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTCGCCGACAGTGGTCCC
 AAAGATGGACCCCCACCCAGGAGCATCGTGGAAAAGAAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAG
 CAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATA
 CAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGG
 ATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAA
 TGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTCGCCGACAGTGGTCCCAAAGATG
 GACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGG
 ATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCC
 TCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTGTATAAAAGCGAAC
 GTGGGAAAACCCGAACCAAACTTCTTCAAACCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCT
 GTCTTTTTCGCGTGAAGCATCTCAACGTTGTGAGTCTGATCGTGTCTCGGCACCAGTACAACTTTCTTC
 ACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAATAACGTTACTTGT
 CCTATCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGTGTTTCAGCCCCATACATT
 ACTTGTACGATTCTGTGACTTTCCGGGGTGCAATATCTCTACTTCTGTGACGAGGATTTGTTG
 CTGTACTCTTCTCTCTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAAACAGAG
 TTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAAATTTGTCGG
 GCCCGGGATGGCGAAAACGTTGCGATTTCCGGCTTATTGTTTTCTCTTGTGTTGGTTCTCTC
 AGATCTTCGCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATC
 TGCTGCCAAAATAACTCCATGGTACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTG
 ACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTCCAGCTGTCTGCAGTCTGA

CCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC
AACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTA
AGCCTTGCCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTG
CTCACCACTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGG
TCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCA
GTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCACTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAG
GAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAAT
TACTGTTATTCCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTA
TGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATT
TAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGAT
GTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTGCGCGTCTTGGCATGATTATCATA
TAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTATGAGATG
GGTTTTATGATTAGAGTCCCCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCA
AACTAGGATAAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAAGCTTGGCGC
GCCATAAAATGATTATTTATGAATATATTTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATA
ACACACGAAATAAACAAAAAAGACAATCCAAAAACAAACACCCAAAAAAAATAACACTTTAGA
TAAACTCGTATGAGGAGAGGCACGTTTCAGTGACTCGACGATTTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCGTC
ACACATATAGTGGGTGACGCAATATCTTTAAAGTAATCTTCTGTGACTTGTTCATTGATAACATCC
AGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTAAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTCTTTTCCATATT
TAGGGTTGACAGTGAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGG
GATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTTCATCGTAGTTGTTGAAATCGATGGTACCGTCCAAT
AGTTGTGTCGTCGAGACTTCTAGCCAGGTGGTCTTCCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAG
GCTGGGGTGTGCGATTCCATTCCCTCCATTGTCCTGGTTAAATCGGCCATCCATTCAAGGTCAGATTG
AGCTTGTGGTATGAGACAGGATGTAAGTAAGTATAAGCGTCTATGCTTACATGGTATAGATGGGTTT
CCCTCCAGGAGTGTAGATCTTCGTGGCAGCGAAGATCTGATTCGTGGAAGGGCGACACATACGGTTC
AGGTTGTGGAGGGAATAATTTGTTGGCTGAATATCCAGCCATTGAAGTTTGTGGCCATTTCATGAG
GGAAATTTCTTCTGATCATGTCAAGATATTCCTCCTTAGACGTTGCACTGGGATAAATAGTTCTCCAT
CGTGCCTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTAAATATCTCCGTC
CTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGAATTTCTTCAA
AATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATAACAAGGTTTTTATCAAGCTGGAGAAGAGCATGATAGTGGG
TAGTGCCATCTTGTATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCT
CCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGATAGGTAAGGAAAAACATATT
AGATTGGAGTCTGAAGTTCTTACTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCCAAAC
TCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGATTTTTGGTCAATTTAATAGATAGTGGAA
AATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCGAATTTAATAT
TACCGGCGTGGCCCCCTTATCGCGAGTGTCTTTCAGCAGAGCGGTCAGATTAAAGTAGAAAAAT
TCCCCCCTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGACTAG
TGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTT
GCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGCTGTTCCCGCCTT
CAGTTAAACTATCAGTGTGTTGACAGGATATATTGGCGGTTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTA

Figura 23, SEQ ID NO: 27

Casete de expresión número 1710 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP2(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCACG
TATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGAT
AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTTGCAGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG
GCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCACGATCTG
TCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTTGCAGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATACTCCACTG
ACGTAAGGGATGACGCAACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCA
CATTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGGAAACCCGAACCAA
CCTTCTTAAACTCTCTCTATCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTCTTGTGCGTGGAGGATCT
TCAACGTTGTGAGATCGTGTCTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATC
TCTTTGGACACGTAGTGCAGGCGCCATTAATAACGTTACTTGTCTTCTTGTGCGTGTGGTCT
TGGGAAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGTGTTGACCCCATACATTAAGTGTACGATTTGCTGACT
TTCGGCGGGTGAATATCTCTACTTCTGCTTGCAGGATTTGTTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCT
TTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTGAACT
GGGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCCAAATTTGTCGGGCCATGGCATAACCGGAAGAG
AGGAGCAAAGCGGAAAACCTGCGGCAACAGAACGAGAGACTGCAAGAAAAAGAGATAGAGAAAG
ATGTCGACGTAAACAATGGAAAACAAGAATAACAATAGGAAAACAACAGCTGTCCGACAAAGTTCTGT
CCAGAAGGAGGAAATATCACTGACGCCAGGACGATATAAAATGTCGGGAGAAATAAAGAAAGA
GCTCGAAAGAAGAATCTAAACAGCTGCTCGAAATTTCTGAAAACAAGAAAGACCATCAGAAAGAGA
TTCAATATGAAAATTTTGCAAAAACAATACCTACATTTGAGTCCAAAAGAAAGTATCCCTCAAGAAGCT
TGAAGACATAAAGACCGGAGCAGGCAAAAAACAGATGAAACTCTTTCGCATTTTCGAGCCAAAACA
GCTCCCTATATATCGCGCCAATGGCGAGAAGGAGCTACGCAACCGGTGGTACTGGAAAGTGAAGAA
AGACACCTTCCAGATGGAGATTATGACGTCGGGAGTATTTCTCAATCTCTATGATCAATCTCTCA
TCGAAATGCCGGACTATCTGCTCCTCAAGGACATGGCCGTGGAGAACAATAATAGCAGAGACGCCG
GCAAGTTTGTGACTCTGAGACTTGCCTATTTTGTGATGCCATCTTCCAGGATGAGGAGACCGGAGG
AGTTCGCTGTAGATTATCATCGCTGATATGCGGCAACAGGTTCCAGGCTGATCGTAACATTTGTA
CCTTCACTCTTACCCTATTGATCATGCATTCATGAGTATTTTCTTAACCACAGTTGGTGGAGCC
GCTGAACAATGAGATAATCTTCAATTACATACAGAGAGGATAAGGAATGACGTTGAATACATCTGT
AACTTGTATGAACTGACACTACAGCCAGGTATATACAGGCAAACTTGTGTCAGGATGATGATGAT
ATCTTACAGATAATTTTGTGCTTGTGGGATACCATCACAACATCCAATACATTTGCGCCAGGTC
GTCGTTCCCGATTGAAAGGAGAAGGAGCTGGTCTCCACCGAAGCACAGATCCAGAAAATGAGCCAG
GACCTGCAGCTGGAGGCCCTCACTATTCAGAGCGAGACACAGTTTGTAGCCGGATTAACAGTCAAG
CTGCAATGATTTGTTTCAAGACCTCATAGCCGCAATGCTGTCTCAAAGAACTGATGCTTGTGACT
GTGACCACGAACTATATGAGCCTAATCTCCGGAATGTGGCTACTTACAGTGTATCCCAACGATATGT
CTCCGGGAGTCACTAGTGGCTGTGAGCTGGCGATCATCAACACCATCGTGTATCCAGCATTCGGA
ATGCAGAGAATGCATTACCGGAATGGCGACCCTCAGACACCTTCCAGATCGCAGAACAGCAGATCC
AGAATTTCCAGGTGGCGAACTGGCTCCAATTTTATTAACAATAACAGATTCAGGCAAGTTGTGATTGA
TGGAGTTCTGAATCAGACTCTGAACGACAATATACGGAATGGACAGGTCATCAACCAGCTGATGGAA
GCATTGATGCAACTCAGCAGACAGCAGTTCCCAACGATGCCTGTGGATTACAAAACGGAGCATCCAAC
GGGGCAATCTGCTTCTTCCAATAGGCTGGGGCAGCTTGTGACTTAAACCCGACTGGTCTCTATAAC
TACGAGACGCTAATGGCTTGTGTGACCATGAACATGCAGCAGTGCAAACCCGACAACTGAGAAGT
TGCAGTCACTTCTGTGACTTCGCTTGTATGTTAATTGGTAACAACCGTGTATTCCGTTCCCAACAG
ACACTGTTCCACTACTACAACATCAACGTTGAATTTCCACTCCAATTAATGAGCGGATCAACGACG
CCGTCGCCATAATTACCGCAGCAATAGGCTGAATCTTTATCAGAAAAAATGAAGTCCATAGTGGGA
AGACTTTCTGAAACGGCTCCAGATTTTCGACGTACCACGAGTGCCTGACGACCAAATGTACAGGCTG
AGGGATCGCTTCCGGCTTTACCCGTTGAACGGAGACGGCTTGCATATTCAACTTGATCCCTGATGA
ATATGGAGCAGATCGAACCGCTTCTGATAAGATTGCTCAGGGGGTTATCATCGCATACCGAGATAT
GCAGCTGGAACCGCAGCAGATGTACGGATATGTTAATTTGCACGGAACTTGTATGGCTACCAGCAA
ATTAACCTTGGAGGAACCTATGCGCACCGGTGATTACGGACAATTAACGAACATGCTTCTCAACAATC
AACCCGTTGCCCTTGTGGGTGCATTGCCCTTCGTTACGGACTCATCCGTGATCAGTCTAATCGCCAA
CTCGAGCAACCCGCTTCTGCTCAGATAGTGAAGCTCAGGAAAGTTGACACACTGAAGCCCATACTGT
ACAAAATAAATCGGATTTCCAATGACTTTTACCTTGTGGCCAACACGACTGGATCCCAAGTAC
AACTAAGGTCTACAAAACAGGTGCCACAACCATTCGACTTTAGAGCCAGCATGCACATGCTGACTTCT
AACCTTACGTTTACCGTCTACTCTGACCTACTGTCTATTGTTTACGCGGACACGGTAGAGCCCATTA
CGCAGTCCGATTCGACAATATGCGAATAATGAACGAGCTTTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTGAATT
TACTGTTATTCGGTGTGCAATTTCTATGTTTGGTGAACGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTAT

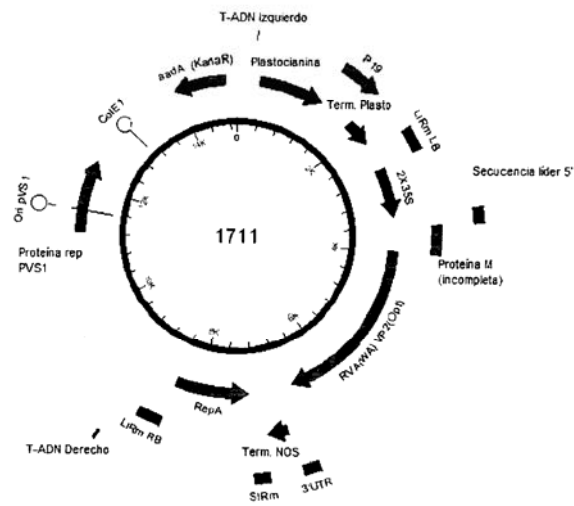
ES 2 658 987 T3

GTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTT
AATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATC
GTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGGATGATTATCATA
TAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATG
GGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCA
AACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTATCTATGTTACTAGAT

5

Figura 24

Representación esquemática de la construcción 1711



C-2X35S/CPMV-HT/RVA(WA) VP6(opt)/NOS (Construcción número 1713)

Figura 25a, SEQ ID NO: 28

IF-WA_VP6(opt).s1+3c

AAATTIGTCGGGCCCATGGAGGTCCTTTATAGTCTCTCCAAAACGCTGA

Figura 25b, SEQ ID NO: 29

IF-WA_VP6(opt).s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTCTACTTGATCAACATACTCCGGATAGAGGCCA
CA

Figura 25c, SEQ ID NO: 30

Casete de expresión número 1713 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGC
TATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGAT
AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAGAAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
GCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTG
TCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAGAACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTG
ACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTT
CATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGAAAACCCGAACAAA
CCTTCTTAAACTCTCTCTACTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTGTGCTTCTTGGGTGAGCGATCT
TCAACGTTGTCAGATCGTGTCTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATC
TCTTGTGGACACGTCAGTGCCTGCGGCCATTAATAACGTTGACTTGTCTTCTTGTGCGTGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCATACATTACTGTTACGATTCTGTGACT
TTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGACTTCTTCTTCTTCTTC
TTGCTGATTTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACTT
GGAGAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCCCAAATTTGTGGGGCCATGGAGGTCCTTATAGT
CTCTCCAAAACGCTGAAGGACGCTAGGGACAAGATCGTGGAGGGTACACTTTATAGCAATGTCAGGC
ACCTAATACAGCAGTTAATCAAATGATCGTTACAATGAATGGGAAATGATTTCCAAAACGCGGAT
TGGTAATCTGCCCGTGAGGAACTGGACATTCGATTTCCGGCTGCTGGGCACGACTCTCTTAATCTCG
ATGCAAAATTTATGTAGAAAACCGCAGAACGATTAATCGAGTACTTTATCGATTTCATTGATAACGTTGT
ATGGATGAGATGGCCCGCGAGTCAACCGGAACGGAGTTGCTCCACAGTCCGAGGCCCTTCGGAAA
CTCGCCGGCATTAAAGTTCAAGCGTATTAATTTGACAACCTCCTCCGAATATATAGAGAACTGGAACCT
GCAGAAATCGTCGACAGAGAACCAGGCTTCGTTCCATAAACTAATATCTTTCCGTTATAGCGCCTCAT
TCACCTGAATAGGAGTCAGCCATGCACGACAACCTCATGGGTACAATGTGGTGAATGCGGGGAG
TGAAATACAGGTCGCGGGGTTTCGATTACTCCTGTGCCATTAATGCACCCGCAAAACATCCAGCAGTTC
GAACATATCGTGCACACTAAGACGGGCTCTCACGACCGCGACAATTACACTCCTGCCCCGACGCCGAGC
GCCTTCTCTTTCCCGCGTAATCAACTCAGCTGATGGCGCCACCCTTGGTTCTTCAACCCTGTTATAT
TGCGCCCTAAACAACGTAGAGGTGGAGTTTCTCTTAAACGGACAGATCATCAATACCTACCAAGCCAG
GTTCCGACAGATTATTGCAAGAAATTTGACGCTATCAGGCTGCTTCCAACCTGATGAGGCCCCCA
ATATGACTCCCGCTGTGAACGCTTTGTTTCCGACAGGCTCAGCCTTTCCAGCACCACGCCACCGTCCGGC
TTGACTTTCGAATAGAGAGCGCGTCTGCGAATCAGTGTGGCAGACGCCAACGAGACGCTGCTGG
CAACGTTACCGCCGTGCGGCAAGAGTATGCCATCCAGTAGGGCTGTGTTCCACCCGGCATGAA
CTGGACTGAACTAATTAATACTAATAAGCCATCCAGAGAAGACAACCTGACGCGGGTCTTCACTGTG
GCCTCTATCCGGAGTATGTGATCAAGTAGAGGCTATTTTCTTTAGTTGAATTTACTGTTATTCCGGT
GTGCATTTCTATGTTTGGTGGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGTAATTTAATTTCT
TTGTGAGTCTCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTAATTTTATTAATAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAACATTTGGC
AATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCGTGTCGCGGCTTTCGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATT
ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGA
GTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTTAT
CGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGAT

Figura 25d

Secuencia de nucleótidos que codifica VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A (SEQ ID NO: 46)

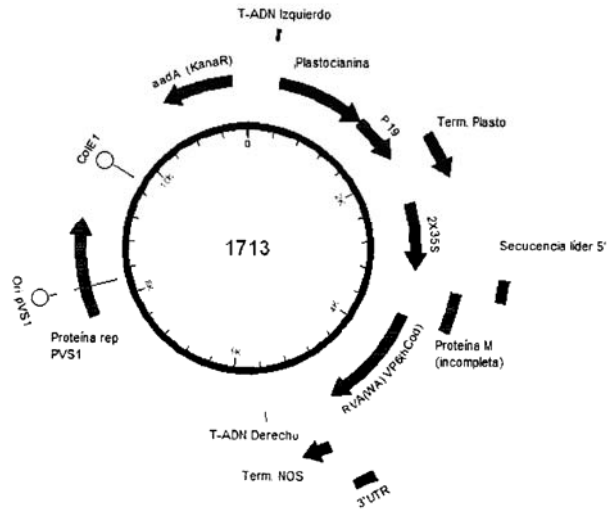
ATGGAGGTCCTTTATAGTCTCTCCAAAACGCTGAAGGACGCTAGGGACAAGATCGTG
 GAGGGTACACTTTATAGCAATGTCAGCGACCTAATACAGCAGTTTAATCAAATGATC
 GTTACAATGAATGGGAATGATTTCCAAACTGGCGGTATTGGTAATCTGCCCGTGAGG
 AACTGGACATTCGATTTCCGGCCTGCTGGGCACGACTCTCCTTAATCTCGATGCAAAT
 TATGTAGAAAACGCCAGAACGATTATCGAGTACTTTATCGATTTTCATTGATAACGTT
 TGTATGGATGAGATGGCCCGCGAGTCAACCGGAACGGAGTTGCTCCACAGTCCGAG
 GCCCTTCGGAAACTCGCCGGCATTAAAGTTCAAGCGTATTAATTTTCGACAACCTCCTCC
 GAATATATAGAGAAGTGGAACTTGCAGAATCGTCGACAGAGAACCGGCTTCGTGTTC
 CATAAACCTAATATCTTTCCGTATAGCGCCTCATTACCCTGAATAGGAGTCAGCCC
 ATGCACGACAACCTCATGGGTACAATGTGGCTGAATGCGGGGAGTGAATACAGGTC
 GCCGGGTTTCGATTACTCCTGTGCCATTAATGCACCCGCAAACATCCAGCAGTTCGAA
 CATATCGTGCAACTAAGACGGGCTCTCACGACCGCGACAATTACACTCCTGCCCGAC
 GCCGAGCGCTTCTCCTTTCCCCGCGTAATCAACTCAGCTGATGGCGCCACCCTGG
 TTCTTCAACCCTGTTATATTGCGCCCTAACACGTAGAGGTGGAGTTTCTCTTAAAC
 GGACAGATCATCAATACCTACCAAGCCAGGTTCCGGCAGGATTATTGCAAGAAATTTTC
 GACGCTATCAGGCTGCTCTTCCAACTGATGAGGCCCCCCAATATGACTCCCGCTGTG
 AACGCTTTGTTTCCGCGAGGCTCAGCCTTTCCAGCACCACGCCACCGTCCGGCTTGACT
 CTTCGAATAGAGAGCGCGGTCTGCGAATCAGTGCTGGCAGACGCCAACGAGACGCTG
 CTGGCAAACGTTACCGCCGTGCGGCAAGAGTATGCCATCCCAGTAGGGCCTGTGTTT
 CCACCCGGCATGAACCTGGACTGAACTAATTACTAACTATAGCCCATCCAGAGAAGAC
 AACTTGCAGCGGGTCTTCACTGTGGCTCTATCCGGAGTATGTTGATCAAGTAG

Figura 26, SEQ ID NO: 31

Secuencia de aminoácidos de VP6 de la cepa WA de Rotavirus A

MEVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPVRNWFDFGLLGTTL
 LNLNDANYVENARITIEYFIDFIDNVCMDEMARESRNGVAPQSEALRKLKLAGIKFKRINFDNSSEYIENWNL
 QNRRQRTGFVHKPNIFPYSASFTLNRSQPMHDNLMGTMWLNAGSEIQVAGFDYSCAINAPANIQQFEHI
 VQLRRALTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWFFNPVILRPNNVEVEFLLNGQIINTYQARFGTHARN
 FDAIRLLFQLMRPPNMTPAVNALFPQAQPFQHHATVGLTLRIESA VCESVLADANETLLANVTAVRQEYA
 IPVGPVFPFGMNWTELITNYSRPNLQRFVTVASIRSMLIK

Figura 27
Representación esquemática de la construcción número 1713



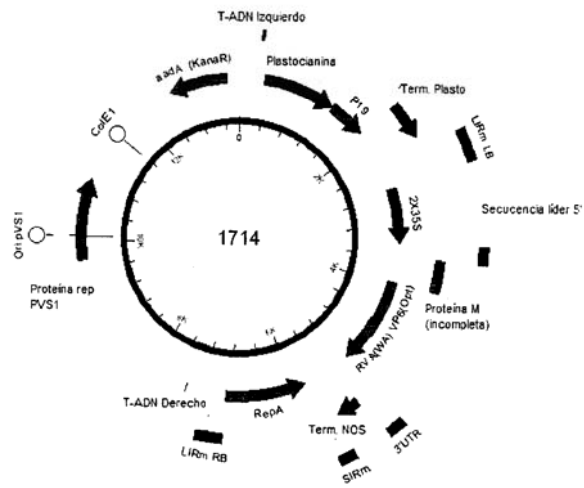
D-2X35S/CPMV-HT/RVA(WA) VP6(opt)/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)-Replicasa (Construcción número 1714)

Figura 28, SEQ ID NO: 32

Casete de expresión número 1714 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP6(opt) de la cepa WA de Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCTCAAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCACG
TATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAATGCCATCATTGCGAT
AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAAGATGGACCCACCCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCTCAAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG
GCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTG
TCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAATCCACTG
ACGTAAGGGATGACGCAACAATCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTATTT
CATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTGGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAA
CCTTCTCTAAACTCTCTCTATCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTTGCTTTCTTGGCGTGGAGGATCT
TCAACGTTGTGAGATCGTGTCTCGGCACCAAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATC
TCTTTGGACACGTAAGTGGCGGCCATTAATAACGTTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGTCTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCATACATTACTGTTACGATTCTGTGACT
TTCGGCGGGTGAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCGTGACTTCTTCTTCTCTC
TTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAAC
GGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTTCGGGCCATGGAGGTCCTTTATAGT
CTCTCCAAAACGCTGAAGGACGCTAGGGACAAGATCGTGGAGGTACACTTTATAGCAATGTCAGCG
ACCTAATACAGCAGTTTAATCAAATGATCGTTACAATGAATGGGAATGATTTCCAAAACCTGGCGGTAT
TGGAATCTGCCCGTGGAGAACTGGACATTCGATTTCGGCCTGCTGGGCACGACTCTCCTTAATCTCG
ATGCAAAATATGTAGAAAAAGCCAGAACGATTAATCGAGTACTTTATCGATTTCATTGATAACGTTTGT
ATGGATGAGATGGCCCGCGAGTCAACCGGAACGGAGTTGCTCCACAGTCCGAGGCCCTTCGGAAA
CTCGCCGCATTAAGTTCAAGCGTATTAATTTGCAACAACCTCCTCCGAATATATAGAGAACTGGAAC
GCAGAACTGTCGACAGAGAACCGGCTTCGTGTTCCATAAAACCTAATATCTTTCCGATAGCGCCTCAT
TCACCTGAATAGGAGTCAAGCCATGCACGACAACCTCATGGGTACAATGTGGCTGAATGCGGGGAG
TGAAATACAGGTCGCGGGTTCGATTACTCCTGTGCCATTAATGCACCCGCAAAACATCCAGCAGTTC
GAACATATCGTGAACAAAGACGGGCTCTCACGACCGCGACAATTACACTCCTGCCCGACCGCGAGC
GCTTCTCCTTTCCCGCGTAATCAACTCAGCTGATGGCGCCACCACTTGGTTCTCAACCCTGTTATAT
TGCGCCCTAAACAACGTAGAGGTGGAGTTTCTCTTAAACGGACAGATCATCAATACCTACCAAGCCAG
GTTCCGGCAGGATTATTGCAAGAAATTCGACGCTATCAGGCTGCTTCCAACTGATGAGGCCCCCA
ATATGACTCCCGCTGTGAACGCTTTGTTTCCGACGGCTCAGCCTTTCCAGCACCACGCCACCGTCCGG
TTGACTCTTCGAATAGAGAGCGCGGCTGCGAATCAGTGTGGCAGACGCCAAGGAGACGCTGCTGG
CAACGTTACCGCCGTGCGGCAAGAGTATGCCATCCAGTAGGGCCTGTGTTTCCACCCGGCATGAA
CTGGACTGAACTAATTAATACTATAAGCCATCCAGAGAAAGACAACCTGCAGCGGGTCTCACTGTG
GCCTCTATCCGGAGTATGTTGATCAAGTAGAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGT
GTGCATTCTATGTTTGGTGGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCT
TTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTTATTAATAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGC
AATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGTTCTGCGATGATTATCATATAAATTTCTGTTGAAT
ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGA
GTCCCGCAATATACATTTAATACCGGATAGAAAAAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTA
CGCGCGCGTGTCTATGTTACTAGAT

Figura 29
 Representación esquemática de la construcción número 1714



E-2X35S/CPMV-HT/ RVA(Rtx) VP4(opt)/ NOS (Construcción número 1731)

Figura 30A, SEQ ID NO: 33

IF-Rtx_VP4(opt).s1+3c

AAATTTGTCGGGCCCATGGCTAGCCTGATCTACAGACAACCTCTTGACCAAT
TC

Figura 30B, SEQ ID NO: 34

IF-Rtx_VP4(opt).s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAGAGTTTACATTGCAGGATTAATTGCTCAA
TCCTA

Figura 31A, SEQ ID NO: 35

Casete de expresión número 1731 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP4(opt) de la cepa Rotarix de Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGC
TATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGGCGAT
AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAAGACC
GCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTG
TCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAATCTCCACTG
ACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTT
CATTTGGAGAGGTATTAATACTTAAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGAAACCCGAACCAAA
CCTTCTTAAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCGTAGCGGATCT
TCAACGTTGTCAGATCGTGTCTGCCGACAGTACAACGTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATC
TCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGTCTGTCAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACT
TTCGGCGGGTGCAATATCTTACTTCTGCTTACGAGGATATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTC
TTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTGAAACTT
GGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCCCAAATTTGTGGGCCCATGGCTAGCTGATCTGAC
AGACAACCTCTTGACCAATTCATATTTCTGTGGATCTTCAATGACGAAATCGAGCAGATTGGGTCCGAGA
AGACCCAGAACGTTGACCATCAACCCCTGGACCTTTTGTCTCAGACCCGCTATGCCCCGTGTAATTGGGA
TCACGGAGAAATCAACGACAGTACGACCCGTCGAACCCATTCTGGACGGGCCATACCAACCCACCC
TTCAACCCACCTAATGATTATTTGGATTTTAAATCAACTCCAACACAAACGGAGTGGTCTACGAGTCCAC
TAATAACTCCGATTTTGGACCCGCTTGTAGCCATCGAGCCACACGTCATCTCTGTCGATCGCCAGT
ATATGATATTCGGCGAGTCCAAACAGTTTAAACGTTTCCAAATGACAGCAACAAATGGAAGTTTCTGGA
GATGTTTTCGCAGCTCCTCTCAGAACGAATCTATAATAGACGGACCCCTTACCTCCGATACACGACTCG
TGGGTATTTTTAAGTACGGCGGCAGGGTGTGGACATTTACGGGTGAAACCCCTCGAGCAACCACTGA
CTCCAGTAGCACTGCAAAACCTGAAACAATATATCTATTACCATCCACAGCGAATTTACATAATCCCA
AGATCTCAGGAAAAGTAAAGTGTAACGAATATATCAACAACGGACTTCCCCCAATTCAGAATAACCGG
AAACGTGGTGCCTCTCCACTCAGTTCTCGGTCTATCCAGTATAAGAGAGCACAAGTGAATGAGGACA
TTATTGTGAGCAAGACTAGCCTTTGGAAAGAAATGCAGTACAACAGAGACATTATCATCCGGTTTTAA
GTTTGGGAACTCTATCGTGAAGATGGGCGGCCTGGGTACAAATGGTCAGAAATCTCATATAAAGCC
GCCAACTATCAGTATAAATACTTGTAGAGACGGCGAGCAGGTAACCGCCACACAACATGCTCTGTCA
ACGGCGTTAATAACTTTAGCTACAACGGAGGCTTCTTCCACCAGCTTCCGTTATCAGCCGTTATGA
AGTICATCAAGGAAAATTTCTTATGTGTACGTAGATTACTGGGATGATAGCAAAGCGTTCCGCAACATG
GTGATGTTAGGAGCCTGGCTGCTAATCTCAATTTCTGTGAAGTGTACTGGTGGATCATATTATTTCTC
AATTTCCCGTGGGGGCTTGGCCAGTCAATGAAATGGCGGGCAGTCTCCCTCCATTTTGTGGCGTGACGT
TGAGCACTCAGTTTACCGATTTCTGTCTCTGAACTCCCTGAGGTTCCCGTTTTCCCTTACTGTGACG
AGCCCCATTCAGCATTCTGCGTACAAGAACTGTCAACCTTCTACGGGTTACCTGCGCGGAATCCAAA
CAACGGCAATGAATACTATGAAATTTCCGGGCCGTTCTCTTTGATAAAGTCTGGTACCAACTAATGAC
GACTATCAGACACCCATCATGAACAGCGTACTGTGACAGCAGGACCTGGAAAGACAACCTTACAGAT
CTGCGGGAAGAATTCATTTCTCAGTCAGGAGATTGCAATGGCCCAATTGATAGATCTTGCCTACT
GCCTCTCGATATGTTTAGTATGTTCTCCGGCATCAAATCAACTATAGATCTGACAAAAGAGCATGGCTA
CTTCTGTGATGAAGAAGTTACGGAATCAAACCTTGCACGAGCATATCAGAAATGACGAACCTCTCT
GAGTGTGACGATCATCAGCGTACGCAACGTTTCCATTCGGTTCGAATCTCAGCGCCATCAGCAAC
TGGACAAAACGTTGCAACGACGTCAGCAACGTTGACCAACTCCTTGAACGATAATTTCTACCCAGACGT
CAACGATCAGTAAGAAACTCCGCTTGAAGAAATGATCACCAGACTGAGGAATGCTTTTCGACGA

CATTTCCGCCGCGTGCTAAAAACCAAAATCGATATGTCTACTCAGATCGGCAAGAACACTCTGCCG
GATATCGTAACCGAAGCCTCCGAAAAAGTTTATCCCTAAGCGCAGCTACAGAATATTGAAAGATGACC
AGGTCATGGAGATCAACACAGAGAAGGGAAGTTCTTCGCTTATAAGATCAACACCTTTGACGAGGTCC
GTTTGACGTCAATAAGTTTGCAGAGCTCGTGACAGATAGTCCAGTGATTTCTGCCATCATTGACTTTA
AGACTTTGAAAGAACCTGAACGACAACCTATGGAATAACACGGACCGAAGCGTTGAACCTCATTAAGTC
CAATCCCAATATGTTGCGCAATTTCAATTAACCAGAACAATCCAATCATAAGAAAATAGGATTGAGCAA
TTAATCCTGCAATGTAACCTCTGAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCAT
TTCTATGTTTGGTGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGA
GCTCCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAA
AGTTTCTAAGATTGAATCCTGTGCGGCTTTCGCGATGATTATCATATAATTTCTGTGTAATACGTT
AAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCC
GCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGC
CGGTTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 31B

**Secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa
RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] (SEQ ID NO: 47)**

ATGGCTAGCCTGATCTACAGACAACCTTTGACCAATTCATATTCTGTGGATCTTCATGACGAAATCGA
GCAGATTGGGTCCGAGAAGACCCAGAACGTGACCAATCAACCCCTGGACCTTTTGGTCCAGACCCGCTAT
GCCCTGTGAATTGGGATCAGGAGAAAATCAACGACAGTACGACCGTCAACCCATTCTGGACGGGC
CATACCAACCCACCACCTTACCCCCACCTAATGATTATTGGATTTTAATCAACTCCAACACAAAACGGA
GTGGTCTACGAGTCCACTAATAAAGTATTTTGGACCGCCGTTGTAGCCATCGAGCCACACGTCAA
TCCTGTGATCGCCAGTATATGATATTCGGCGAGTCCAAACAGTTAAGTTTCCAAATGACAGCAAC
AAATGGAAGTTTCTGGAGATGTTTCGACGCTCCTCTCAGAACGAATTTCTATAATAGACGGACCCCTTA
CCTCCGATACACGACTCGTGGGTATTTTAAAGTACGGCGGCAGGGTGTGGACATTTACGGTGAAC
CCCTCGAGCAACCACTGACTCCAGTAGCACTGCAAACTGAAACAATATATCTATTACCATCCACAGC
GAATTTACATAATCCCAAGATCTCAGGAAAGTAAAGTGAACGAATATATCAACAACGGACTCCCCC
CAATTCAGAAATACAGGAACGTGGTGCCTCTCCACTCAGTTCTCGGTCTATCCAGTATAAGAGAGC
ACAAGTGAATGAGGACATTATTGTGAGCAAGACTAGCCTTTGGAAAGAAATGCAGTACAACAGAGA
CATTATCATCCGGTTTAAAGTTTGGGAACCTTATCGTGAAGATGGCGGCCTGGGGTACAAATGGTCA
GAAATCTCATATAAAGCCGCAACTATCAGTATAACTACTTGAGAGACGGCGAGCAGGTAACCGCCC
ACACAACATGCTCTGTCAACGGCTTAAATACTTTAGCTACAACGGAGGCTTCTTCCCACCGACTTC
GGTATCAGCCGGTATGAAGTCAATCAAGGAAAATTTATGTGTACGTAGATTACTGGGATGATAGCA
AAGCGTTCCGCAACATGGTGTATGTTAGGAGCCTGGCTGCTAATCTCAATTTCTGTGAAGTGTACTGGT
GGATCATATTATTCTCAATTCCTGGGGCTTGGCCAGTCAATGAATGGCGGGGCAGTCTCCCTCCA
TTTTGCTGGCGTACGTTGAGCACTCAGTTTACCAGTTTCGTGTCTCTGAACCTCCCTGAGGTTCCGGTT
TTCCCTTACTGTGACGAGCCCTTTCAGCATTCTGCGTACAAGAACTGTCAACCTTACGGGTTAC
CTGCCGGAATCCAAACAACGGCAATGAATACTATGAAATTTCCGGCCGCTTCTTTGATAAGTCT
GGTACCAACTAATGACGACTATCAGACACCCATCATGAACAGCGTGACTGTGACAGGACCTGGA
AAGACAACCTACAGATCTGCGGGAAGAATTCATTTCTCTCAGTCAGGAGATTGCAATGGCCCAATTG
ATAGATCTTGCCTACTGCCTCTCGATATGTTTAGTATGTTCTCCGGCATCAAATCAACTATAGATCT
GACAAAAGAGCATGGCTACTTCTGTGATGAAGAAGTTCAGGAAATCAAAAATTTGCCACGAGCATATCA
GAAATGACGAACTCTGTGAGTGTGAGCATCATCAGCGTACGCAACGTTTCCATTCCGGTCAATC
TCAGCGCCATCAGCAACTGGACAAAACGTGTCCAACGACGTGACCAACGTGACCAACTCCTTGAACGA
TATTTCTACCCAGACGTCACGATCAGTAAGAACTCCGCTTGAAGAAATGATCACCCAGACTGAG
GGAATGCTTTTCGACGACATTTCCGCCCGCTGCTAAAAACAAAATCGATATGTCTACTCAGATCG
GCAAGAACACTCTGCCGATATCGTAACCGAAGCCTCCGAAAAGTTTATCCCTAAGCGCAGCTACAG
AATATTGAAAGATGACGAGGTCATGGAGATCAACACAGAAAGGGAAGTTCTTCGCTTATAAGATCAA
CACCTTTGACGAGGTTCCGTTTACGTCAATAAGTTTTCAGAGCTCGTGACAGATAGTCCAGTGATTT
CTGCCATCATTGACTTTAAGACTTTGAAGAACCTGAACGACAACCTATGGAATAACACCGGACCGAAGC
GTTGAACCTCATTAAGTCCAATCCCAATATGTTGCGCAATTTCAATTAACCAGAACAATCCAATCATAA
GAAATAGGATTGAGCAATTAATCCTGCAATGTAACTCTGA

Figura 31C (SEQ ID NO: 44)

Casete de expresión número 1730 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP4(opt) de la cepa Rotarix de Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAAGGGTAATATCCGGAAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGC
TATCTGTCACITTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGAT
AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG
GCAATTGAGACTTTTCAACAAAAGGGTAATATCCGGAAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTG
TCACITTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATACTCCACTG
ACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTT
CATTTGGAGAGGTATTAATACTTTAATAGGTTTGTATAAAAAGCAACGTTGGGGAAACCCGAACCAAA
CCTTCTTCTAAACTCTCTCTATCTCTTAAAGCAAACITCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCT
TCAACGTTGTGACAGTCTGCTTCCGACACAGTACAACGTTTCTTCTACTGAAGCGAAAATCAAAGATC
TCTTTGTGGACACGTAAGTGGCGCCCAATTAATAACGTTACTGTCTATCTTGTGGTGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACT
TTCGGGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGCAGGATATTGTTGCCTGACTCTTTCTTCTTCTTCT
TTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACTT
GGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCAAAATTTGTGGGGCCATGGCTAGCCTGATCTAC
AGACAACCTTGCACCAATTCATATCTGTGGATCTTCATGACGAAATCGAGCAGATTGGGTCCGAGA
AGACCCAGAACGTGACCATCAACCTGGACCTTTTGTCTGACCCCGTATGCCCCTGTGAATTGGGA
TCACGGAGAAAATCAACGACAGTACGACCTGCAACCCATTCTGGACGGCCATACCAACCCACCC
TTCACCCACCTAATGATTATTGGATTTAATCAACTCCAACACAACCGAGTGGTCTACGAGTCCAC
TAATACTCCGATTTTGGACCGCGTGTAGCCATCGAGCCACAGTCAATCTCTGCGATCGCCAGT
ATATGATATTCGCGAGTCCAACAGTTTAAACGTTTCCAAATGACAGCAACAATGGAAATTTCTGGA
GATGTTTTCGAGCTCTCTCAGAACGAATTTCTATAATAGACGGACCTTACCTCCGATACACGACTCG
TGGGTATTTTAAAGTACGGCGCAGGGTGTGGACATTTACCGGTGAAACCCCTCGAGCAACCACTGA
CTCCAGTAGCACTGCAACCTGAACAATATATCTATTACCATCCACAGCGAATTTCTACATAATCCCA
AGATCTCAGGAAAAGTAAAGTGTAAACGAATATATCAACAACGGACTCCCCCAATTCAGAATACACGG
AACGTTGTGCTCTCCACTCAGTCTCCTGCTATCCAGTATAAGAGAGCACAAGTGAATGAGGACA
TTATTGTGAGCAAGACTAGCCTTTGGAAAAGAAATGCAAGTACAACAGAGACATTAATCATCCGGTTAA
GTTTGGGAACCTCTATCGTGAAGATGGCGCGCTGGGGTACAAATGGTTCAGAAATCTCATATAAAGCC
GCCAACTATCAGTATAACTACTTGTAGAGACGGCGAGCAGGTAACCGCCACACAACATGCTCTGTCA
ACGGCGTTAATAACTTTAGCTACAACGGAGGCTTCTTCCACCGACTTCGGTATCAGCCGGTATGA
AGTCAATCAAGGAAAATCTTATGTGTACGTAGATTACTGGGATGATAGCAAAGCGTTCCGCAACATG
GTGTATGTAGGAGCCTGGCTGCTAATCTCAATTTCTGTGAAGTGTACTGGTGGATCATATTTTCTC
AATCCCGTGGGGCTTGGCCAGTCAATGAGTGGCGGGCAGTCTCCCTCCATTTTGTGGCGTGACGT
TGAGCACTCAGTTTACCGATTTCTGTGTCTTGAACCTCCCTGAGGTTCCGGTTTCCCTTACTGTGACG
AGCCCCATTCAGCATTCTGCGTACAACGACTGTCAACCTCTACGGGTTACCTGCCCGCAATCCAAA
CAACGGCAATGAATACTATGAAATTTCCGGCCGCTTCTCTTTGATAAGTCTGGTACCAACTAATGAC
GACTATCAGACACCCATCATGAACAGCGTGACTGTGACAGAGGACCTGGAAAGACAACCTACAGAT
CTGCGGGAAGAATTCATTTCTCAGTCAGGAGATTGCAATGGCCCAATTGATAGATCTTGCCTACT
GCCTCTCGATATGTTTATGATGTTCTCCGGCATCAAACTCAACTATAGATCTGACAAAAGAGATGGCTA
CTTCTGTGATGAAGAAGTTCAGGAAATCAAACCTTCCACGAGCATATCAGAAATGACGAACTCTCT
GAGTGTGACGATCATCAGCGTACGCAACGTTTCCATTCGGTCAATCTCAGCGCCATCAGCAAC
TGGACAAAACGTTTCAACGACGTCAGCAACGTCAGCAACTCTTGAACGATATTTCTACCCAGACGT
CAACGATCAGTAAGAACTCCGCTTGAAGAAATGATCAACCCAGACTGAGGGAATGTCTTTGACGA
CATTTCCGCCCGGTGTAATAAACCAAAATCGATATGTCTACTCAGATCGGCAAGAACTCTGCGG
GATATCGTAACCGAAGCCTCCGAAAAGTTTATCCCTAAGCGCAGTACAGAATATTGAAAGATGACG
AGGTCAATGGAGATCAACACAGAAGGGAAGTTCTTCCGTTATAAGATCAACACCTTTGACGAGGTTCC
GTTTGACGTCATAAAGTTTGCAGAGCTCGTGACAGATAGTCCAGTGAATTTCTGCCATCATTGACTTTA
AGACTTTGAAGAACCTGAACGACAATATGGAATAACACGGACCGAAGCGTTGAACCTCATTAAGTC
CAATCCCAATATGTTGCGCAATTTCAATTAACCAGAACAATCCAATCATAAGAAAATAGGATTGAGCAA
TTAATCTGCAATGTAACCTCTGAAGGCCTATTTCTTTAGTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGAT
TTCTATGTTTGGTGGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGA
GCTCTGTTTACGAGTCTCCCTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTTAAATTTAAATTTAAATTTAA
AAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAA
AGTTTCTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCAGTGAATATCATATAATTTCTGTTGAATACGTT
AAGCATGTAATAAATCAATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTATGATTAGAGTCCC
GCAATTAACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAAATTTACGCGC
CGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 32, SEQ ID NO: 36

Secuencia de aminoácidos de VP4 de la cepa Rotarix de rotavirus A

MASLIYRQLLTNSYSVDLHDEIEIQIGSEKTQNVITNPGPFAQTRYAPVNWDHGEINDSTTVEPILDGPYQPT
TFTPPN DYWILINSNTNGVVYESTNNSDFWTA VVAIEPHVNPVDRQYMIFGESKQFNVSND SNKWKFLE
MFRSSSQNEFYNRRTLSDTRLVGIFKYGGRVWTFHGETPRATDSSSTANLNNISITHSEFYIIPRSQESK
CNEYINNGLPPIQNTNRNVVPLPLSSRSIQYKRAQVNEDIIVSKTSLWKEMQYNRDIIIRFKFGNSIVKMGGL
GYKWSEISYKAANYQYNYLRDGEQVTAHTTCSVNGVNNFSYNGGFLPTDFGISRYEVIKENSYYVVDY
WDDSKAFRNMVYVRSLAANLNSVKCTGGSY YFSIPVGAWPVMNGGAVSLHFAGVTLSTQFTDFVSLNS
LRFRFSLTVDEPPFSILRTRTVNLYGLPAANPNNGNEYEISGRFSLISLVPTNDDYQTPIMNSVTVRQDLE
RQLTDLREEFNLSQEIAMAQLIDLALLPLDMFSMFSGIKSTIDLTKSMATSVMKKFRKSKLATSISEMTNS
LSDAASSARNVSIRS NLSAISNWTNVSNDVSNVTNSLNDISTQTSTISKLRKEMITQTEGMSFDDISAA
VLKTKIDMSTQIGKNTLPDIVTEASEKFIPKRSYRILKDDEVMEINTEGKFAYKINTFDEVFPDVKFAEL
VTDSPVISAIIHDFKTLKNLNDNYGITRTEALNLIKSNPNMLRNFINQNNPIIRNRIEQLILQCKL

Figura 33A

Representación esquemática de la construcción número 1730

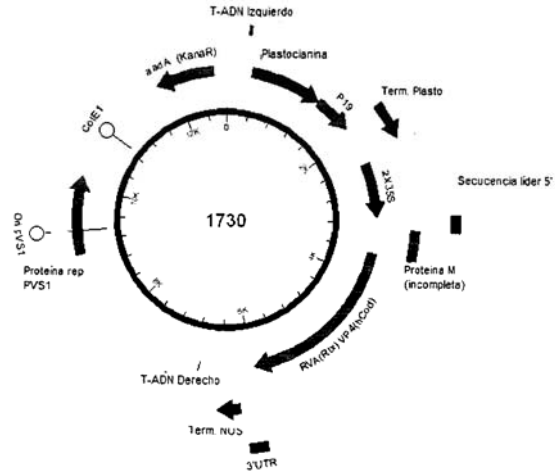
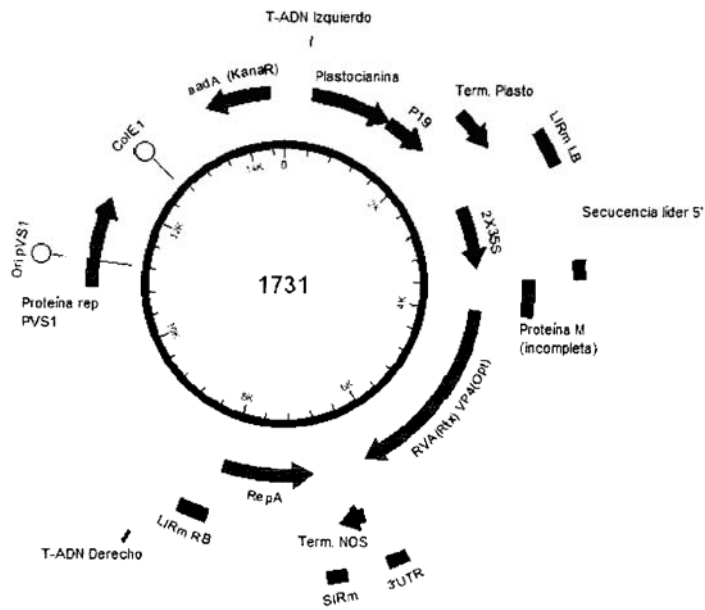


Figura 33B

Representación esquemática de la construcción número 1731



F-2X35S/CPMV-HT/RVA(Rtx) VP7(Opt)/NOS (Construcción número 1733)

Figura 34A, SEQ ID NO: 37

IF-Rtx_VP7(opt).s1+3c

AAATTTGTCGGGCCCATGTACGGCATCGAGTATACAACAATTTTAATTTTC

Figura 34B, SEQ ID NO: 38

IF-Rtx_VP7(opt).s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTCTAAACGCGATAATAGAAGGCTGCTGAGTTCA
GGGA

Figura 34C, SEQ ID NO: 24

Casete de expresión número 1733 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGC
TATCTGTACATTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGAT
AAAGGAAAAGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACG
AGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
ATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG
GCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTG
TCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATACTCCACTG
ACGTAAAGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATAAAGGAAGTTCAATT
CATTGGAGAGGTATTAATACTTAAATAGGTTTGGATAAAAGCGAAGCTGGGGAAAACCGAACCAAA
CCTTCTTCTAAACTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTCTTGGCGTGAGCGATCT
TCAACGTTGTGACATCGTCTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTTCACGTAAGCGAAATCAAAGATC
TCTTTGTGGACAGTAGTGGCGGCCATTAATAACGTTACTTGTCTTCTTGTCTGCGGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTAGCCCATACATTACTTGTACGATTCGTGACT
TTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCTGACTTCTTCTTCTTCT
TTGCTGATTGGTTCTATAAGAAAATCTAGTATTTTCTTGAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGA
GGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCATGTACGGCATCGAGTAT
ACAACAATTTTAAATTTTCTGATTTCCATCAATTCGTTAAACTACATCCTTAAAGTCCGTGACCAGAA
ATGGATTATATTTATCTATCGTAGCCTCCTCATCTACGTGGCCCTTTTGGCCCTGACCAGGGCCAGAA
CTATGGCCTGAACCTACCAATCACCGGTTCAATGGATACCGTTTACGCTAATCCACTCAAGAGGGG
ATATTTCTGACAAGTACCCTGTGCTGTATTTATCCAACAGAAGCCTTACCAGATCAATGATGGGG
AGTGGAAAGGATAGTCTCTCACAGATGTTCCCTAACCAAGGGCTGGCCACCGGTTCCGTCTACTTCAA
GGAACTCTAGTATTGTGCACTTCTCAGTTGACCCCAAGCTTTATTGCGACTACAACCTGGTACTTA
TGAAATACGACCAGAACCTGGAGCTGGATATGTCCGAGCTGGCTGACCTGATCCTCAATGAGTGGCT
GTGCAACCCCATGGACATCACATTATTAATACCAGCAGTCTGGAGAATCCAACAAGTGGATCAGT
ATGGGCTCAAGTTGCACCCGTGAAGGTGTGTCCCTTGAACACCCAAATGCTGGGCATTGGTTGTCAGA
CAACTAATGTGGATTCTGTTTGAATGGTAGCCGAAAACGAGAAGCTGGCTATAGTGGACGTAGTCGA
TGGGATTAACCACAAGATCAATCTGACTACCACCACTTGTACCATCAGAAAAGTGTAAAAAGCTCGGC
CCCCGGGAGAAGCTGCGCGTGTATCCAGGTGGGGGGGAGCAATGTGCTCGACATTAATGCGGCCCTA
CCACCAATCCACAGACGGAACCGATGATGAGAGTCAACTGGAAGAAAATGGTGGCAGGTCTTTTATA
CCATTGTGGACTACATTAACCAGATTGTGCAAGTCATGAGTAAACGGTCCAGATCCCTGAACTCAGC
AGCCTTCTATTATCGCGTTTAGAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCCGGTGTGCATTT
CTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTTATTTTATGTAATTAATTTCTTTGTGAGC
TCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTACAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTA
AAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAG
TTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAA
GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGC
AATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGC
GGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 34D

Secuencia de nucleótidos que codifica VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 48)

ATGTACGGCATCGAGTATACAACAATTTAATTTTCCTGATTTCCATCATTCTGTAAACTACATCCTT
 AAGTCCGTGACCAGAATTATGGATTATATTATCTATCGTAGCCTCCTCATCTACGTGGCCCTTTTTC
 CCTGACCAGGGCCAGAACTATGGCCTGAACTTACCAATCACCGTTCAATGGATACCGTTACGCT
 AATCCACTCAAGAGGGGATATTTCTGACAAGTACCCTGTGCCTGTATTATCCAACAGAAGCCTCTAC
 CCAGATCAATGATGGGGAGTGGAAAGGATAGTCTCTACAGATGTTCTAACAAGGGCTGGCCACC
 GGTTCCGTCTACTTCAAGGAATACTCTAGTATTGTGCGACTTCTCAGTTGACCCCCAGCTTTATTGCGA
 CTACAACCTGGTACTTATGAAATACGACCAGAACCTGGAGCTGGATATGTCCGAGCTGGCTGACCTG
 ATCCTCAATGAGTGGCTGTGCAACCCCATGGACATCACATTATATTACTACCAGCAGTCTGGAGAAT
 CCAACAAGTGGATCAGTATGGGCTCAAGTTGCACCGTGAAGGTGTGTCCCTTGAACACCCAAATGCT
 GGGCATTGGTTGTGACACAATAATGTGGATTCTGTTGAAATGGTAGCCGAAAACGAGAAGCTGGCT
 ATAGTGGACGTAGTCGATGGGATTAACCACAAGATCAATCTGACTACCACCACTGTACCATCAGAA
 ACTGTAAAAAGCTCGGCCCGGGAGAACGTCGCCGTGATCCAGGTGGGGGGGAGCAATGTGCTCG
 ACATTACTGCCGACCCTACCACCAATCCACAGACGGAACGGATGATGAGAGTCAACTGGAAGAAAT
 GGTGGCAGGTCTTTTATACCATTGTGGACTACATTAACCAGATTGTGCAAGTCATGAGTAAACGGTC
 CAGATCCCTGAACCTCAGCAGCCTTCTATTATCGCGTTTAG

Figura 34E

Secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] (SEQ ID NO 54)

ATGTACGGCATCGAGTATACAACAATTTAATTTTCCTGATTTCCATCATTCTGTAA
 AACTACATCCTTAAAGTCCGTGACCAGAATTATGGATTATATTATCTATCGTAGCCTC
 CTCATCTACGTGGCCCTTTTTCGCCCTGACCAGGGCCAGAACTATGGCCTGAACTTA
 CCAATCACCGGTTCAATGGATACCGTTTACGCTAATTCCACTCAAGAGGGGATATTT
 CTGACAAGTACCCTGTGCCTGTATTATCCAACAGAAGCCTTACCCAGATCAATGAT
 GGGGAGTGGAAAGGATAGTCTCTCACAGATGTTCTAACAAGGGCTGGCCACCAGGT
 TCCGTCTACTTCAAGGAATACTCTAGTATTGTGCGACTTCTCAGTTGACCCCCAGCTT
 TATTGCGACTACAACCTGGTACTTATGAAATACGACCAGAACCTGGAGCTGGATATG
 TCCGAGCTGGCTGACCTGATCCTCAATGAGTGGCTGTGCAACCCCATGGACATCACA
 TTATATTACTACCAGCAGTCTGGAGAATCCAACAAGTGGATCAGTATGGGCTCAAGT
 TGCACCGTGAAGGTGTGTCCCTTGAACACCCAAATGCTGGGCATTGGTTGTGACACA
 ACTAATGTGGATTCTGTTGAAATGGTAGCCGAAAACGAGAAGCTGGCTATAGTGGAC
 GTAGTCGATGGGATTAACCACAAGATCAATCTGACTACCACCACTTGTACCATCAGAA
 AACTGTAAAAAGCTCGGCCCGGGAGAACGTCGCCGTGATCCAGGTGGGGGGGAGC
 AATGTGCTCGACATTAAGTCCGACCCCTACCACCAATCCACAGACGGAACGGATGATG
 AGAGTCAACTGGAAGAAAATGGTGGCAGGTCTTTTATACCATTGTGGACTACATTAAC
 CAGATTGTGCAAGTCATGAGTAAACGGTCCAGATCCCTGAACTCAGCAGCCTTCTAT
 TATCGCGTTTAG

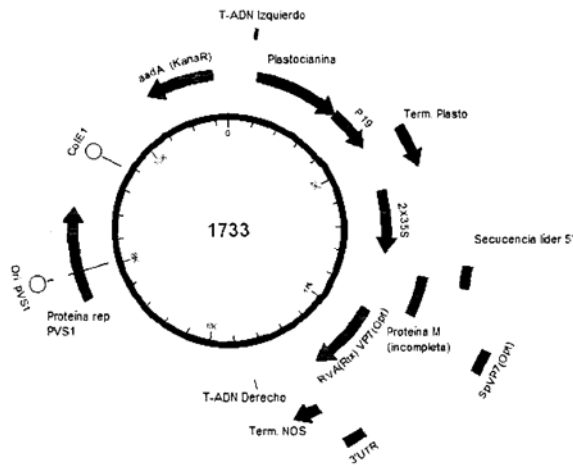
Figura 35, SEQ ID NO: 39

Secuencia de aminoácidos de VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A

MYGIEYTTILIFLISIILLNYILKSVTRIMDYIYRSLLIYVALFALTRAQNYGLNLPITGSMDTVYANSTQEGI
 FLTSTLCLYYPTEASTQINDGEWKDSLQMFLLTKGWPTGSVYFKEYSSIVDFSVDPLQYCDYNLVLKMYD
 QNLELDMSELADLILNEWLCNPMIDITLYYYQQSGESNKWISMGSSCTVKVCPNLTQMLGIGCQTTNVDS
 FEMVAENEKLAIVDVVDGINHKINLTTTCTIRNCKKLGPRENVAVIQVGGSNVLDITADPTTNPQTERM
 MRVNWKKWWQVFYTIVDYINQIVQVMSKRSLNSAAFYRV

Figura 36

Representación esquemática de la construcción número 1733



G-2X35S/CPMV-HT/ RVA(Rtx) VP7(opt)/NOS (Construcción número 1735)

Figura 37, SEQ ID NO: 40

IF-Rtx_VP7(opt).s2+4c

TCTCAGATCTTCGCCAGAACTATGGCCTGAACTTACCAATCACCGGTTCA
ATGGATACC

Figura 38

Representación esquemática de la construcción 1192. Los sitios de la enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación

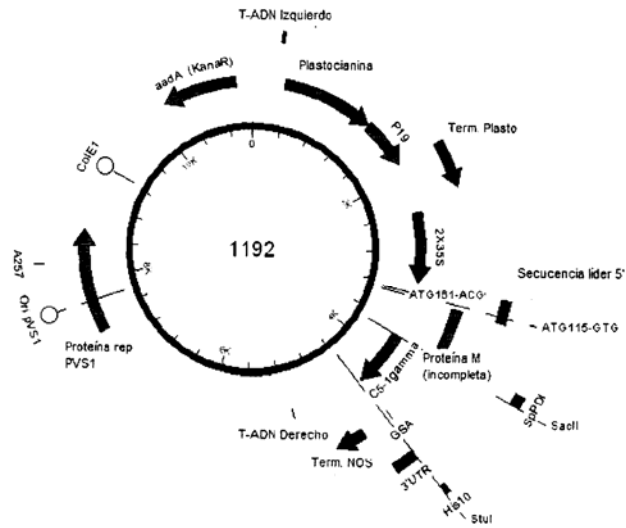


Figura 39, SEQ ID NO: 41

Construcción 1192 de los bordes izquierdo a derecho de ADNt (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTT
TTAATGTACTGAATTAACGCGAAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACC
 ATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATA
 AATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAA
 CAATTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAAACAATAGAGAG
 AGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTG
 TACCAAAAATAGTTGTACAAAATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAGGGTTAATTGC
 TGAAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAAATTTTGGCAAGTCATTAATA
 AGAAAGATAAAATATTTTTAAAAATTAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTAATGAA
 TTGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTT
 GATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTTCAGTAACTCAATTTTATATTTCATAGATCAAAATAAGA
 GAAATACCGTATATTAATCCCTCCAAAAAATAAAGTTGAGTATTTACTAAAAAATCTAAGCCACG
 TAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGTAG
 AGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTTCTCCACA
 CATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAG
 TCTACACTTTGATTCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGGAG
 AGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATG
 GAGGATCAGGAGGTACCCTCTCCCTCAAACCTCTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCG
 GCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTC
 GGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCCCTTG
 GATCTGGACGGGAGATTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGACCAGATCGGATGT
 ACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTTCGCGAACTCTTCAGCATCT
 CTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAGTGTACAGCTTGCCTCAATCGAAGTGGAAAGTAAT
 GTATCAAGAGGATGCCCTGAAGTACTCAAACCTTCGAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAATGCTT
 CTTCGCTCCTATTTATAAATATGGTTTGTATTGTTAATTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAAATTAATCG
 TTGTTGTTATGAAAATACTATTTGTATGAGATGAAGTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGT
 CAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACTGCGCGTACAAATTTGTTTATATT
 TGAACAACTAAAATGAAACATCTTTTGCCACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATATGGT
 CAAGTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAAATTCATTAACAATCAACTTAAACGTTATT
 AACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCC
 TAGGAGATTGTCGTTTCCCGCTTCAAGTTTGAAGCTGCTTAGCCGTGATAGCCAAATACGCAAAACCGC
 CTCCTCCCGCGCTTGGGAATTAAGTACTAGCGCGTGTGACAAAGCTTGCATGCCGTTCAACATGGTGGAG
 CACGACACACTTGTCTACTCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATTGAG
 ACTTTTCAAACAAAGGTAATATCCGGAACCTCTCCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAG
 ATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTCAAAATGCCATCATTTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAA
 GATGCCTTGCAGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAA
 GACGTTCCAAACCAAGCTTCAAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG
 CACAAATCCCACTATCCTTCGAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTCAATTTGGAGAGGTAT
 TAAAATCTTAATAGGTTTGGATAAAGCGAACGTTGGGAAACCCGAACCAAACTTCTTCTAAACTC
 TCTCATCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGCA
 TCGTGCTTCGGCACAGTACAACGTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACG
 TAGTGGCGGCCATTAATAACGTTACTTGTCTCTATTCTTGTGGTGTGGTCTTGGGAAAGAAAGC
 TTGCTGGAGGTGCTGTTACGCCCCATACATTAATTTGTTACGATTTCTGTGACTTTCCGGCGGGTGC
 TATCTCTACTTCTGCTTACGAGGATTTGTTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTGTGATTGGTCT
 ATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTT
 AAGCTCTGTATATTCTGCCAAAATTTGTCGGGCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTAT
 GTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGCGGCTCTCAGCCAAAACGACACCCCCA
 TCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTGCCAAAATAACTCCATGGTGACCTGGGATGCTGGT
 CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC
 ACCTTCCCAGCTGTCTGACGTCTGACCTTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTCTCCCTCCAGCAC
 CTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCAACCAAGTTGGACAAAGAA
 AATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCA
 TCTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTTGTGTGGTA
 GACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTGAGTGGTTGTAGATGTGGAGGTGCACACAG
 CTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAAGTGAACCTCCCATCAT

GCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACCATT
 AAAGGCCTATTTTCTTGTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAAGCGGTTT
 TCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTTCGTC
 CTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTTCG
 ATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAAGATTGAATCCTG
 TTGCCGGTCTTGCAGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATG
 TAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGC
 GATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC TAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTA
 GATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAAACGTCG
 TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTCGAGCAGATCCCCCTTTCGCAAGCTGGC
 GTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTA
 GAGCAGCTTGAGCTGGATCAGATTGTCGTTCCCGCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTGTTGACAGGA
 TATATTGGCGGTTAAACCTAAGAGAAAAAGCGGTTA

Figura 40A, SEQ ID NO:42

Casete de expresión número 1735 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la
 PDISP/VP7(opt) de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCAGCACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
 AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGC
 TATCTGTACATTTATGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGAT
 AAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACG
 AGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
 ATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAG
 GCAATTGAGACTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGTCTCTG
 TCACTTTATTTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGC
 ATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAATCTCCACTG
 ACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAAGTCAATT
 CATTTGGAGAGGATATAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCAAGTGGGGAAACCCGAACCAAA
 CCTTCTTAAACTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCTTCTTGGTGGAGCGATCT
 TCAACGTTGTGATCGTGTCTCGGCACCAAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATC
 TCTTTGTGGACAGTAGTGGCGGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATCTTGTGCGGTGTGGTCT
 TGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGTCTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTCTGACT
 TTCGGCGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTACGAGGATTTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTCTC
 TTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAACT
 GGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCAAAATTTGTGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGC
GATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCCTTCAGATCTTCGCCAGAACTATGGCCT
GAACTTACCAATCACCGTTCAATGGATACCGTTACGCTAATCCACTCAAGAGGGGATATTTCTGA
CAAGTACCCTGTGCCTGTATTAATCCAACAGAAGCCTTACCAGATCAATGATGGGGAGTGGAAAGGA
TAGTCTCTCACAGATGTTCTTAACCAAGGGCTGGCCACCAGTTCCGTTACTTCAAGGAATCTCTA
GTATTGTGACTTCTCAGTTGACCCCCAGCTTATTGCGACTACAACCTGGTACTTATGAAATACGAC
CAGAACCTGGAGCTGGATATGTCGAGCTGGCTGACCTGATCCTCAATGAGTGGCTGTGCAACCCCA
TGGACATCACTTATATTAATACTACCAGCTCTGGAGAATCCAACAAGTGGATCAGTATGGGCTCAAG
TTGCACCGTGAAGGTGTGTCCCTTGAACACCCAAATGCTGGGCATTGGTTGTGACAGAACTAATGTG
GATTCGTTTGAATGGTAGCCGAAAACGAGAGCTGGCTATAGTGGACGTAGTCGATGGGATTAACC
ACAAGATCAATCTGACTACCACCACTTGTACCATCAGAACTGTAAAAAGCTCGGCCCCCGGGAGAA
CGTCGCGGTGATCCAGGTGGGGGGGAGCAATGTGCTCGACATTACTGCCGACCCCTACCACCAATCCA
CAGACGGAACGGATGATGAGAGTCAACTGGAAGAAATGGTGGCAGGTCTTTTATACCATTGTGGACT
ACATTAACCAGATTGTGCAAGTCAATGAGTAAACGGTCCAGATCCCTGAACTCAGCAGCCTTCTATTA
TCGCGTTTTAGAGGCCTATTTTCTTAAAGTTGAATTTACTGTTTATTCGGTGTGCATTCTATGTTTGGTG
 AGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCA
 GGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCG
 GGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAAGATT
 GAATCCTGTGGCGGTCTTGCAGTATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAA
 TTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATT
 TAATACCGGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC TAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTA
 TGTTACTAGAT

Figura 40B

Secuencia de nucleótidos que codifica PDISP/VP7(opt) de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A (SEQ ID NO: 62)

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTC
 GCCCAGAACTATGGCCTGAACTTACCAATCACCGGTTCAATGGATACCGTTTACGCTAATTCCTACTCA
 AGAGGGGATATTTCTGACAAGTACCTGTGCCTGTATTATCCAACAGAAGCCTCTACCCAGATCAAT
 GATGGGGAGTGAAGGATAGTCTCTCACAGATGTTCTAACCAAGGGCTGGCCACCGGTTCCGTCT
 ACTCAAGGAATACTCTAGTATTGTCGACTTCTCAGTTGACCCAGCTTTATTGCGACTACAACCTG
 GACTTATGAAATACGACCAGAACCCTGGAGCTGGATATGTCCGAGCTGGCTGACCTGATCCTCAATG
 AGTGGCTGTGCAACCCATGGACATCACATTATATTACTACCAGCAGTCTGGAGAATCCAACAAGTG
 GATCAGTATGGGCTCAAGTTGCACCGTGAAGGTGTGTCCCTGAACACCCAAATGCTGGGCATTGGT
 TGTGAGACAATAATGTGGATTTCGTTTGAATGGTAGCCGAAAAACGAGAAGCTGGCTATAGTGGACG
 TAGTCGATGGGATTAACCACAAGATCAATCTGACTACCACCACTTGTACCATCAGAAACTGTAAAAA
 GCTCGGCCCCGGGAGAACGTCGCCGTGATCCAGGTGGGGGGAGCAATGTGCTCGACATTACTGCC
 GACCCTACCACCAATCCACAGACGGAACGGATGATGAGAGTCAACTGGAAGAAATGGTGGCAGGTC
 TTTTATACCAATTGTGGACTACATTAACCAGATTGTGCAAGTCATGAGTAAACGGTCCAGATCCCTGAA
 CTCAGCAGCCTTCTATTATCGCGTTTAG

Figura 41, SEQ ID NO: 43

Secuencia de aminoácidos de PDISP/VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A

MAKNVAIFGLLSLLVLPVPSQIFAQNYGLNLPITGSMDTVYANSTQEGIFLSTLCLLYPTEASTQINDGE
 WKDLSLQMFLLTKGWPTGSVYFKEYSSIVDFSVPQLYCDYNLVLKMYDQNLLELDMSELADLILNEWLC
 NPMIDITLYYYQSGESNKWISMGSSCTVKVCPPLNTQMLGIGCQTTNVDSFEMVAENEKLAIVDVVGIN
 HKINLTTTTCTIRNCKKLGPRENVAVIQVGGSNVLDITADPTTNPQTERMMRVNWKKWWQVIFYTIVDYI
 NQIVQVMSKRSLNSAAFYYRV

Figura 42

Representación esquemática de la construcción número 1735

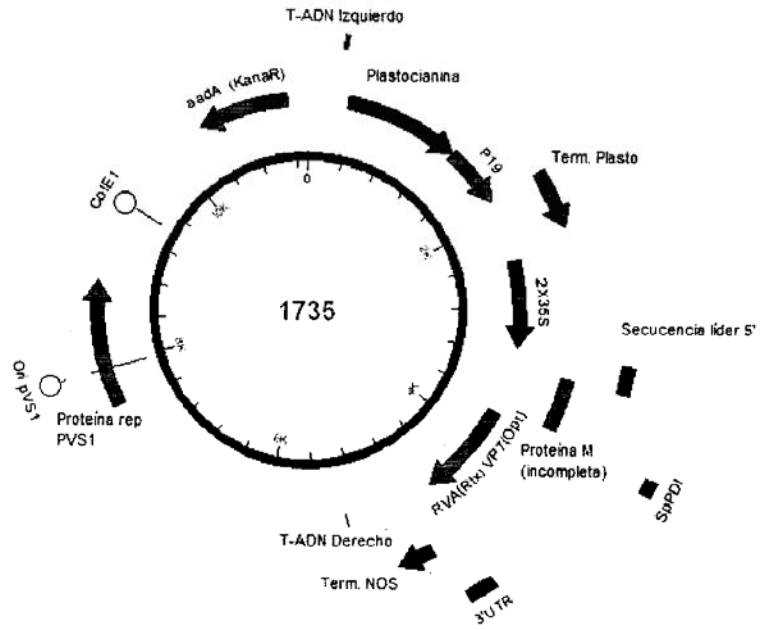


Figura 43A

Secuencia de codificación de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] (SEQ ID NO: 50)

ATGGCTTCGCTCATTTATAGACAATTGCTCACGAATTCTTATACAGTAGATTTATCC
 GATGAGATACAAGAGATTGGATCAACTAAATCACAAAATGTCACAATTAATCCTGGA
 CCATTTGCGCAAAACAGGTTATGCTCCAGTTAACTGGGGACCTGGAGAAATTAATGAT
 TCTACGACAGTTGAACCATGCTGGATGGGCCTTATCAACCAACGACATTCAATCCA
 CCAGTCGATTATGGATGTTACTGGCTCCAACGACACCTGGCGTAATTGTTGAAGGT
 ACAAATAATACAGATAGATGGTTAGCCACAATTTAATCGAGCCAAATGTTCACTCT
 GAAAATAGAACTTACACTATATTTGGTATTCAAGAACAATTAACGGTATCCAATACT
 TCACAAGACCAGTGGAAATTTATTGATGTCGTAAAAACAACCTGCAAATGGAAGTATA
 GGACAATATGGACCATTACTATCCAGTCCGAAATTATATGCAGTTATGAAGCATAAT
 GAAAAATTATATACATATGAAGGACAGACACCTAACGCTAGGACAGCACATTATTCA
 ACAACGAATTATGATTCTGTTAATATGACTGCTTTTTGTGACTTTTATATAATTCT
 AGATCTGAAGAGTCTAAATGTACGGAATACATTAATAATGGATTACCACCAATACAA
 AATACTAGAAATGTTGTACCATTATCGTTGACTGCTAGAGATGTAATACACTATAGA
 GCTCAAGCTAATGAAGATATTGTGATATCCAAGACATCATTGTGGAAAGAAATGCAA
 TATAATAGAGATATAACTATTAGATTTAAATTTGCAAATACAATTATAAAATCAGGA
 GGGCTGGGATATAAGTGGTCAGAAATATCATTTAAGCCAGCGAATTATCAATACACA
 TATACTCGTGATGGTGAAGAAGTTACCGCACATACTACTTGTTCAGTGAATGGCGTT
 AATGACTTCAGTTTTAATGGAGGATATTTACCAACTGATTTTGTGTATCTAAATTT
 GAAGTAATTAAGAGAATTCATACGTCTATATCGATTACTGGGATGATTCAACAAGCA
 TTTTCGTAACGTGGTGTATGTCCGATCGTTAGCAGCAAACCTGAATTCAGTTATGTGT
 ACTGGAGGCAGCTATAATTTTAGTCTACCAGTTGGACAATGGCCTGTTTTAACTGGG
 GGAGCAGTTTCTTTACATTCAGCTGGTGTAACTATCTACTCAATTTACAGATTTT
 GTATCATTAAATTCATTAAGATTTAGATTTAGACTAGCTGTGGAAGAACCACACTTT
 AAATGACTAGAACTAGATTAGATAGATTGTATGGTCTGCCTGCTGCAGATCCAAAT
 AATGGTAAAGAATATPATGAAATGCTGGACGATTTTCACTTATATCATTAGTGCCA
 TCAAATGATGACTATCAGACTCCTATAGCAAACCTCAGTTACTGTACGACAAGATTTA
 GAAAGGCAGTTAGGAGAACTAAGAGAAGAGTTTAAACGCTTTGTCTCAAGAAATGCA
 ATGTGCGAGTTAATCGATTTAGCGCTTCTACCATTAGATATGTTCTCAATGTTTTCT
 GGCATTAAGAGTACTATTGATGCTGCAAATCAATGGCTACTAATGTTATGAAAAAA
 TTCAAAAAGTCAGGATTAGCGAATTCAGTTTCAACACTGACAGATTCTTTATCAGAC
 GCAGCATCATCAATATCAAGAGGTTTCATCTATACGTTTCGATTGGATCTTCAGCATCA
 GCATGGACGGATGTATCAACACAAATAACTGATATATCGTCATCAGTAAGTTTCAGTT
 TCGACACAAACGTCAACTATCAGTAGAAGATTGAGACTAAAGGAAATGGCAACACAA
 ACTGAGGGTATGAATTTTGATGATATATCAGCGGCTGTTTTGAAGACTAAGATAGAT
 AAATCGACTCAAATATCACCAAACACAATACCTGACATTGTTACTGAAGCATCGGAA
 AAATTCATACCAAATAGGGCTTACCGTGTTATAAACAACGATGATGTGTTTTGAAGCT
 GGAATTGATGGAAAAATTTTTGCTTATAAAGTGGATACATTTGAGGAAATACCATTT
 GATGTACAAAAATTCGCTGACTTAGTTACAGATTCTCCAGTAATATCCGCTATAATT
 GATTTTAAAAACACTTAAAAATTTGAACGATAATTACGGCATTACTAAGCAACAAGCA
 TTTAATCTTTAAGATCTGACCCAAGAGTTTTACGTGAATTCATTAATCAGGACAAT
 CCTATAATTAGAAATAGAAATGAACAACCTGATTATGCAATGCAGGTTGTGA

Figura 43B

Secuencia de codificación optimizada de VP4 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] (SEQ ID NO : 51)

ATGGCTTCATTGATATATCGCCAGTTGCTGACTAATAGCTATACTGTGGATTTGTCA
 GACGAAATCCAGGAAATAGGATCCACAAAGAGTCAGAACGTGACCATAAACCCCGGA
 CCGTTTCGCCCAGACTGGGTATGCCCCCGTAAACTGGGGCCCCGGCGAGATTAACGAC
 AGCACCACCGTGGAGCCACTGCTGGATGGACCCTACCAACCCACTACTTTTAATCCT
 CCAGTGGACTACTGGATGTTGTTGGCTCCACGACACCTGGTGTAAATTGTAGAGGGC
 ACCAACAAATACCGATCGCTGGCTGGCGACAATACTGATAGAACCCAACGTGCAGTCC
 GAGAACAGAACCTATAACATTTTCGGCATCCAGGAACAGCTAACCGTGAGCAATACG
 AGCCAGGACCAGTGGAAAGTTTATCGATGTAGTGAAGAACTACGGCCAATGGATCTATC
 GGGCAATACGGGCGCTGCTGTCCCTCACCTAAGCTCTACGCCGTGATGAAACATAAT
 GAGAACTGTACTTACGAGGGGCCAAACCCCAATGCCAGAAGTGGCCACTACAGT
 ACAACCAACTATGACTCGGTGAACATGACAGCGTTCTGTGATTTTTATATTATCCA
 AGATCAGAAGAATCCAAGTGTACTGAGTACATCAACAATGGACTTCCACCCATCCAG
 AACACTCGAAATGTCGTCCCACTGTCTCTAACTGCTCGGGATGTGATCCACTATCGC
 GCCAAGCTAATGAGGATATAGTCATTTCAAAGACGAGCTTATGGAAGGAAATGCAG
 TATAACAGAGACATCACAATCAGGTTCAAGTTCGCCAATACTATTATTAAGTCCGGG
 GGACTGGGGTACAAATGGAGTGAGATCAGTTTTTAAGCCCGCTAACTATCAGCACC
 TATACTCGCGACGGCGAAGAGGTAACCGCCACACAACCTTGCTCGGTTAATGGCGTG
 AACGATTTTAGCTTCAACGGGGGCTACCTGCCTACTGATTTTCGTGGTGAGCAAGTTT
 GAAGTCATCAAGGAAAATTCCTACGTGTATATTGACTACTGGGATGATAGCCAGGCC
 TTCCGAAATGTTGTGTATGTTAGATCACTGGCCGCAAACCTTAATTCAGTCATGTGC
 ACAGGAGGTTCTTACAATTTTAGTCTTCCCGTCGGGCAGTGGCCAGTGTCTCACAGGG
 GCGCTGTGAGCTTGCATTCGCGCGGAGTCACCTTGAGTACTCAGTTCACAGACTTT
 GTGTCTCTGAATAGCCTAAGGTTTCAAGTTTACAGTGTGAGTACAGAGCCTCACTTT
 AAGCTCACTCGTACGAGGCTGGATCGGCTGTACGGCCTGCCGGCCGTGATCCCAAT
 AACGGCAAGGAATATTACGAGATAGCCGGGAGATTTTTCGCTGATCAGTCTGGTGGCC
 TCAAACGATGATTACCAGACCCCAATTGCCAACAGTGTCACTGTGAGCAAGATCTG
 GAGAGACAACCTTGGCGAGCTGAGAGAGGAGTTCAACGCCCTGTCTCAAGAGATCGCA
 ATGTCTCAGCTCATTGACCTGGCCCTGTTACCCCTCGACATGTTCTCAATGTTCTCC
 GGCATAAAATCCACTATCGACGCTGCAAAGTCCATGGCCACAAATGTGATGAAGAAG
 TTTAAGAAGAGCGGTCTGGCAAATAGCGTGTCTACGCTGACCGATAGTTTGTGCGAT
 GCCGCCAGTTCATTAGCCGTGGATCCAGCATTAGGTCCATTGGCTCTTCCGCCCTCT
 GCTTGGACTGACGTGAGTACACAGATAACTGACATTTCTCTTCTGTCTCCAGTGTG
 AGCACACAAACTTCCACGATATCAAGACGACTGAGGCTCAAAGAGATGGCAACGCAA
 ACGGAAGGTATGAATTTTGATGACATCAGCGCCGAGTTTTGAAGACAAAGATCGAT
 AAAAGCACTCAAATTAGCCCCAATACGATCCCTGACATTGTGACTGAGGCATCTGAA
 AAGTTCATTCCCAACCGTGTCTATCGGGTCATTAACAATGATGATGTCTTCGAGGCC
 GGCATCGATGGCAAGTTTTTTGCTTATAAAGTGGATACCTTCGAGGAGATTCTTTTC
 GATGTACAGAAGTTTGCTGACCTCGTAACGGATAGCCAGTGATAAGCGCCATTATA
 GACTTCAAAACATTGAAAAATTTGAACGATAATTATGGTATTACCAAGCAGCAGGCT
 TTTAACTTGTTAAGATCTGACCCTCGCGTGCTCAGAGAGTTTATTAACCAGGACAAC
 CCCATCATCAGAAACAGGATCGAGCAGCTGATTATGCAGTGTGCGCTGTAA

Figura 43C

Secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-
 H96/1958/G3P5B[2] (SEQ ID NO : 52)

ATGTATGGTATTGAATATACCACAGTTCCTAACCTTTCTGATATCGATTATTCTACTA
 AATTACATACTTAAATCATTAAGTAAATAGGACTTTATAATTTATAGATTTCTT
 TTTATAATTGTGATATTGTCACCATTTCTCAGAGCACAAAATTATGGTATTAAATCTT
 CCAATCACAGGCTCCATGGACACTGCATACGCTAATTCACGCAAGAAGAAAACATTC

CTCACTTCTACACTTTGCCTATATTATCCGACTGAGGCTGCGACTGAAATAAACGAT
 AATTCATGGAAAGACACACTGTCACAACATTTTCTTACGAAAGGGTGGCCAACGGA
 TCCGTATATTTTAAAGAATATACTAACATTGCATCGTTTTCTGTTGATCCGCAGTTG
 TATTGTGATTATAACGTAAGTACTAATGAAATATGACGCGACGTTGCAATTGGATATG
 TCAGAACTTGCAGATCTAATATTAACGAATGGTTGTGTAATCCAATGGATATTACT
 CTGTATTATTATCAGCAAACGACGAAGCGAATAAATGGATATCAATGGGCTCATCA
 TGTACAATTAAGTATGTCCACTTAATACACAACTCTTGGAAATTGGATGCTTGACA
 ACTGATGCTACAACCTTTGAAGAAGTTGCGACAGCTGAAAAGTTGGTAATTACTGAC
 GTGGTTGATGGCGTTAATCATAAGCTGGATGTCACAACAGCAACGTGACTATTAGA
 AACTGTAAGAAATGGGACCAAGAGAAAACGTAGCCGTTATACAAGTTGGTGGTTCT
 GACATCCTCGATATAACTGCTGATCCAACACTGACCCACAGACAGAACGGATGATG
 CGAATTAACGTAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTTATACTGTAGTAGACTATGTAGAT
 CAGATAATACAAGTTATGTCCAAAAGATCAAGATCACTAAATTCAGCAGCATTTTAT
 TACAGAGTGTAG

Figura 43D

Secuencia de codificación de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Simian-tc/ZAF/SA 11-H96/195
 8/G3P5B [2] (SEQ ID NO :53)

ATGTACGGAATCGAGTATACCACCGTTCTGACATTTCTTATTAGTATTATCCTCTTG
 AACTATATTCTGAAGTCACTTACCCGGATAATGGATTTTATTATATATAGGTTTCTG
 TTCATCATTGTAATCTGAGCCCTTTCCTGAGGGCCCAGAATTACGGCATAAACCTA
 CCAATCACCGGTTCTATGGATACCGCTTATGCTAACTCTACACAAGAGGAGACATTC
 CTCACATCAACCCTATGCCTGTACTATCCGACTGAAGCAGCCACAGAGATAAACGAT
 AACTCTTGGAAAGATACATTGAGCCAGCTCTTCTGACTAAGGGATGGCCCCACGGGA
 TCGGTCTACTTTAAGGAGTACACAAACATCGCAAGTTTTAGCGTGGATGGCCCCACGGG
 TATTGTGATTATAACGTTGTGCTGATGAAATACGACGCAACCCTCCAGCTTGACATG
 AGCGAGTTGGCAGACCTAATCCTCAATGAGTGGCTGTGTAACCAATGGATATAACA
 CTGTACTATTATCAGCAGACCGATGAAGCAAACAAATGGATTTCAATGGGAAGCAGC
 TGTACCATCAAAGTTTGTCTCTCAACACCCAACTCTCGGCATAGGGTGTCTGACC
 ACAGACGCTACTACCTTTGAAGAAGTTGCGACCGCGGAAAAGCTGGTTATCACAGAT
 GTGGTAGATGGCGTTAACCACAAATGGACGTAACCACAGCAACATGCACAATTAGG
 AACTGCAAGAAGCTAGGACCCAGGGAAAACGTAGCCGTCATCCAAGTGGGCGGCAGT
 GACATCCTAGACATCACCGCAGACCCAACAACAGCACCACAAACCGAGAGGATGATG
 CGCATTAATTGGAAGAAATGGTGGCAGGTGTTTTTACACTGTCGTTGACTATGTGGAC
 CAGATCATTAGGTGATGAGCAAGCGGAGTCGCTCATTGAATAGTGTGCTGCTTTTAT
 TACAGAGTCTAA

D-2X35S/CPMV-HT/RVA(Rtx) VP7(Opt)/NOS (Construcción número 1734)

Figura 44A (SEQ ID NO: 55)

IF-TrSP+Rtx_VP7 (opt) .s1+3c

AAATTTGTGGGCCCATGGATTATATTATCTATCGTAGCCTCCTCATCTA

Figura 44B, (SEQ ID NO: 56)

IF-Rtx_VP7 (opt) .s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTCTAAACGCGATAATAGAAGGCTGCTGAGTTCAGGGA

Figura 44C, (SEQ ID NO: 57)

Secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación optimizada de VP7 de Rotavirus A de la cepa RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P 1A[8]

ATGTACGGCATCGAGTATACAACAATTTTAAATTTTCCTGATTTCCATCATTCTGTTA
 AACTACATCCTTAAGTCCGTGACCAGAATTATGGATTATATTATCTATCGTAGCCTC
 CTCATCTACGTGGCCCTTTTGGCCCTGACCAGGGCCCAGAACTATGGCCTGAACTTA
 CCAATCACCGGTTCAATGGATACCGTTTACGCTAATTCCACTCAAGAGGGGATATTT
 CTGACAAGTACCCTGTGCCTGTATTATCCAACAGAAGCCTCTACCCAGATCAATGAT
 GGGGAGTGGAAAGGATAGTCTCTCACAGATGTTTCCCTAACCAAGGGCTGGCCCACCGGT
 TCCGTCTACTTCAAGGAATACTCTAGTATTGTGCGACTTCTCAGTTGACCCCCAGCTT
 TATTGCGACTACAACCTGGTACTTATGAAATACGACCAGAACCTGGAGCTGGATATG
 TCCGAGCTGGCTGACCTGATCCTCAATGAGTGGCTGTGCAACCCCATGGACATCACA
 TTATATTACTACCAGCAGTCTGGAGAATCCAACAAGTGGATCAGTATGGGCTCAAGT
 TGCACCGTGAAGGTGTGTCCCTTGAACACCCAAATGCTGGGCATTGGTTGTGAGACA
 ACTAATGTGGATTTCGTTTGAATGGTAGCCGAAAACGAGAAGCTGGCTATAGTGGAC
 GTAGTCGATGGGATTAACCACAAGATCAATCTGACTACCACCACTTGTACCATCAGA
 AACTGTAAAAAGCTCGGCCCCCGGGAGAACGTGCGCCGTGATCCAGGTGGGGGGGAGC
 AATGTGCTCGACATTACTGCCGACCCACCACCAATCCACAGACGGAACGGATGATG
 AGAGTCAACTGGAAGAAAATGGTGGCAGGTCTTTTATACCATTGTGGACTACATTAAC
 CAGATTGTGCAAGTCATGAGTAAACGGTCCAGATCCCTGAACTCAGCAGCCTTCTAT
 TATCGCGTTTAG

Figura 44D, (SEQ ID NO: 58)

Casete de expresión número 1734 del promotor 2X35S al terminador NOS. Está subrayada la VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8] de la vacuna contra Rotavirus A.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
 TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTC
 CTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAA
 GGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
 TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAA
 GAAGACGTTCCAACCACGTCCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAG
 CACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGG
 GCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGC
 CCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAA
 TGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGT
 CCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACC
 ACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA
 CAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTTCATTTTCATTTG
 GAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAAC
 CAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTT
 TCTTGGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGATCGTCTTCCGGCACCAGTACAACGTT

TTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGGCCATT
AAATAACGTGTACTTGTCCATTTCTTGTCCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGC
TGGAGGCTGCTGTTTACGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTCGGCG
GGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCT
TCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTTC
CCGTGGTTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATT
TGTCCGGGCCCATGGATTATATTATCTATCGTAGCCTCCTCATCTACGTGGCCCTTTT
TGCCCTGACCAGGGCCCAGAACTATGGCCTGAACTTACCAATCACCAGTTCAATGGA
TACCGTTTACGCTAATCCACTCAAGAGGGGATATTTCTGACAAGTACCCTGTGCCT
GTATTATCCAACAGAAGCCTCTACCCAGATCAATGATGGGGAGTGAAGGATAGTCT
CTCACAGATGTTCCTAACCAAGGGCTGGCCACCAGTTCCGTCTACTTCAAGGATA
CTCTAGTATTGTCGACTTCTCAGTTGACCCCCAGCTTTATTGCGACTACAACCTGGT
ACTTATGAAATACGACCAGAACCCTGGAGCTGGATATGTCCGAGCTGGCTGACCTGAT
CCTCAATGAGTGGCTGTGCAACCCCATGGACATCACATTATATTACTACCAGCAGTC
TGGAGAAATCCAACAAGTGGATCAGTATGGGCTCAAGTTGCACCGTGAAGGTGTGTCC
CTTGAACACCCCAAATGCTGGGCATTGGTTGTCAGACAACATAATGTGGATTTCGTTTGA
AATGGTAGCCGAAAACGAGAAGCTGGCTATAGTGGACGTAGTCGATGGGATTAACCA
CAAGATCAATCTGACTACCACCCTTGTACCATCAGAACTGTAAAAAGCTCGGCC
CCGGGAGAACGTCGCCGTGATCCAGGTGGGGGGGAGCAATGTGCTCGACATTACTGC
CGACCTACCACCAATCCACAGACGGAACGGATGATGAGAGTCAACTGGAAGAAATG
GTGGCAGGTCTTTTATACCATTGTGGACTACATTAACCAGATTGTGCAAGTCATGAG
TAAACGGTCCAGATCCCTGAACTCAGCAGCCTTCTATTATCGCGTTTAGAGGCCTAT
TTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGT
TTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGT
TTAGCAGGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAC
ATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCGTTGCGGGTCTTGCATGATTATC
ATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACG
TTATTTATGAGATGGTTTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAATACGCG
ATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCT
ATGTTACTAGAT

Figura 44E, SEQ ID NO: 59

Secuencia de aminoácidos de TrSp-VP7 de la cepa USA/Rotarix-A41CB052A/11988/G1P1A[8]
de la vacuna contra Rotavirus A

MDYIIYRSLLIYVALFALTRAQNYGLNLPITGSMDEVYANSTQEGIFLTSTLCLLYP
TEASTQINDGEWKDSLSQMFLTKGWPTGSVYFKEYSSIVDFSVDPQLYCDYNLVLK
YDQNLLELDMSELADLILNEWLCNPMIDITLYYYQQSGESNKWISMGSSCTVKVCP
LNTQMLGIGCQTNNVDSFEMVAENEKLAIVDVVDGINHKINLTTTCTIRNCKKLGPREN
VAVIQVGGSNVLDITADPTTNPQTERMMRVNWKWQVFTYIVDYINQIVQVMSKRS
RSLNSAAFYYRV

Figura 44F

Representación esquemática de la construcción número 1734

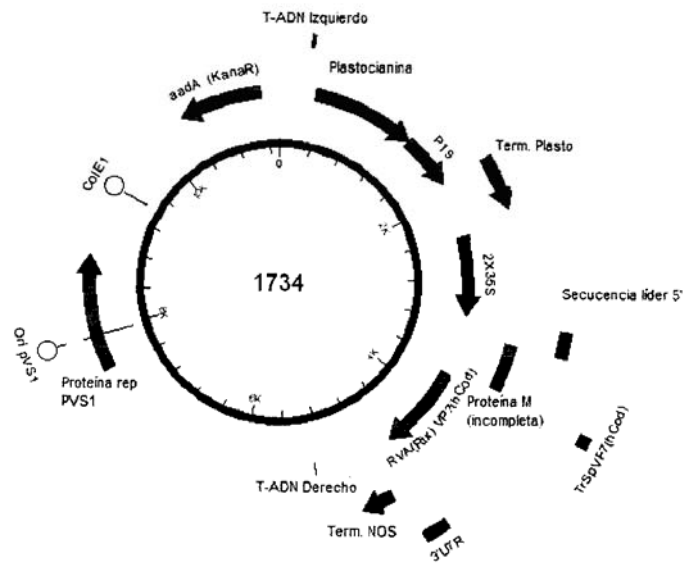


Figura 45

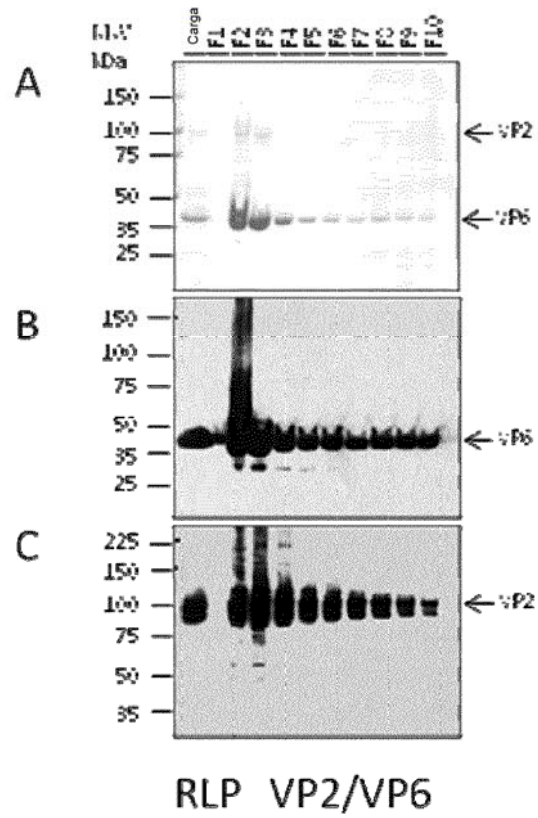


Figura 46

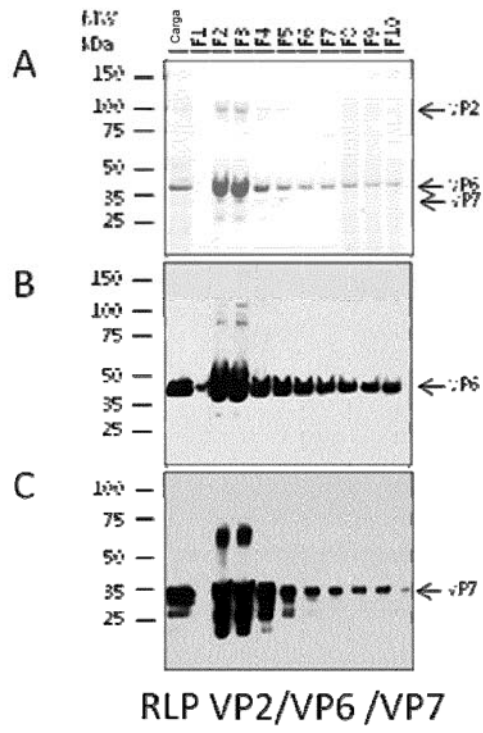


Figura 47

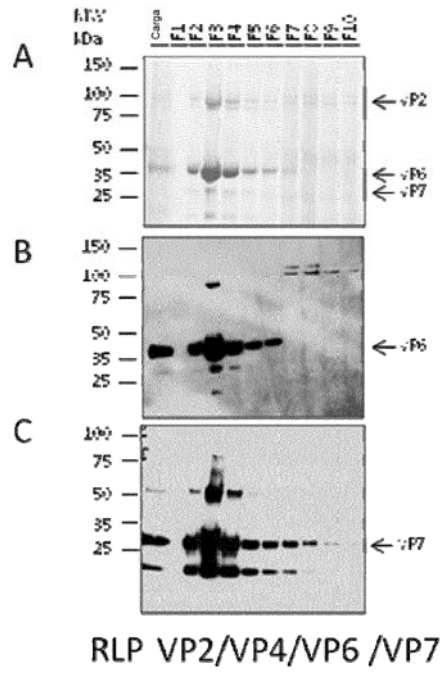


Figura 48

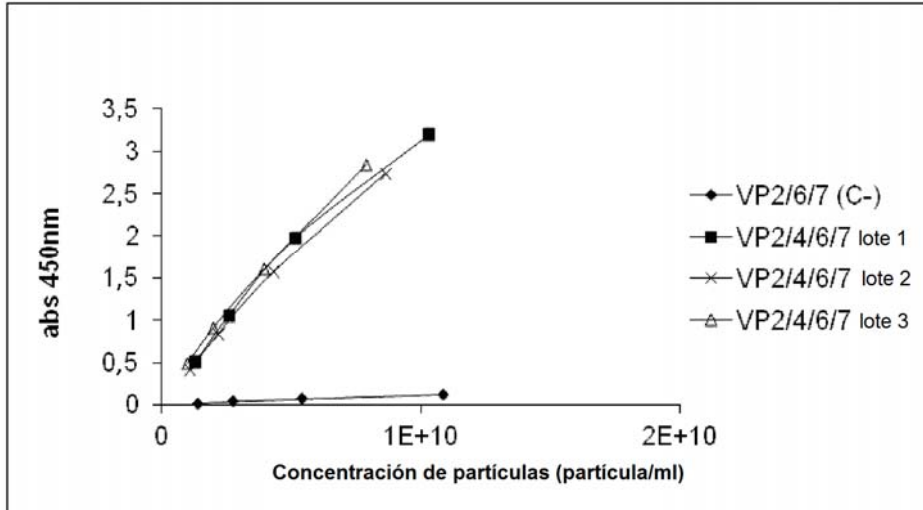


Figura 49

