

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 118**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/02 (2008.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2006** **E 11162685 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 2374892**

54 Título: **Expresión de proteínas virales en las plantas**

30 Prioridad:

29.04.2005 ZA 200503454

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

05.04.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CAPE TOWN (100.0%)
Observatory
8001 Cape Town, ZA**

72 Inventor/es:

**WILLIAMSON, ANNA-LISE;
RYBICKI, EDWARD PETER;
MACLEAN, JAMES MALCOLM y
BECKER-HITZEROTH, INGA ISABEL**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 662 118 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

Expresión de proteínas virales en las plantas

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a la expresión de proteína en las plantas. En particular, la presente invención se refiere a un método de expresión de proteína transgénica y localización intracelular para la producción de proteínas con alto rendimiento. En particular, esta invención se refiere a la producción de proteína del virus de influenza H5 en una
10 planta. También se desvela un mecanismo rápido para evaluar la expresión de proteínas en las plantas.

El uso de plantas transgénicas para la producción a gran escala de proteínas heterólogas está ganando gradualmente gran aceptación, y podría ser una plataforma para la producción rentable de proteínas para vacunas. La generación de plantas transgénicas para investigar las características de expresión de una gran variedad de
15 proteínas y/o vectores de expresión no siempre es viable debido a la dilatada naturaleza de este proceso. Por el contrario, los sistemas de expresión transitoria son capaces de evaluar rápidamente la expresión de proteínas de una diversidad de diferentes proteínas en una diversidad de especies de plantas.

Otro problema relacionado con el uso de plantas transgénicas para la producción a gran escala de proteínas son los
20 niveles generalmente decepcionantemente bajos de proteína heteróloga producida. Los plastos de planta, especialmente los cloroplastos, se han transformado exitosamente con vectores recombinantes que expresan una proteína heteróloga para aumentar significativamente los niveles de proteína producidos por la proteína soluble total en la planta (véase, por ejemplo, los documentos WO2005/011367 y WO2004/005467A2). Los plastos son también capaces de importar una diversidad de moléculas, incluyendo proteínas. Existen diferentes procesos a través de los
25 cuales se produce esto, uno de los cuales implica la interacción con la membrana tilacoidal del plasto. El direccionamiento de proteínas heterólogas al plasto es un mecanismo para aumentar significativamente la acumulación de proteína dentro de la célula vegetal.

La transferencia génica mediada por *Agrobacterium* se ha utilizado durante muchos años para generar plantas
30 transformadas de forma estable. Este método implica la transferencia del complejo T (un complejo formado con el ADN-T agrobacteriano y los productos génicos de virulencia) de cepas de *Agrobacterium* a células vegetales (Zupan et al., 2000). Cualquier ADN situado entre las repeticiones directas de 25 pb (bordes izquierdo y derecho) que delimitan al ADN-T monocatenario se transfiere al núcleo de la célula vegetal (Zupan et al., 2000), donde se integra en el cromosoma de la planta a través de recombinación ilegítima (Somers y Makarevitch, 2004). Muchas de las
35 copias de ADN-T presentes en el núcleo no se integran, pero consiguen transcribirse, provocando una expresión transitoria. La expresión transitoria no se ve afectada por el efecto de la posición, y puede producir niveles drásticamente más altos de proteína extraña que la transformación estable (Kapila et al., 1997).

Dos métodos de infiltración de *Agrobacterium* (agroinfiltración) se utilizan comúnmente: Inyección e infiltración al
40 vacío. La inyección de *Agrobacterium* consiste en la inyección directa en los espacios aéreos abaxiales de una hoja, mientras que la hoja está todavía unida a la planta (Voinnet et al., 2003). Durante la infiltración al vacío se aplica un vacío a una suspensión agrobacteriana en el que las hojas están sumergidas (Kapila et al., 1997). Aunque normalmente se realiza en tan sólo unas pocas hojas, esta técnica se puede ampliar: Los investigadores de Medicago Inc. (Quebec, Canadá) son capaces de agroinfiltrar hasta 7500 hojas de alfalfa por semana, y Stefan
45 Schillberg et al. (Institute for Molecular Biotechnology, RWTH Aachen, Alemania) han agroinfiltrado hasta 100 kg de hojas de tabaco (Twyman 2004).

La expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* alcanza su máximo a las 60 a 72 horas después de la infiltración, y luego disminuye drásticamente como resultado de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS)
50 (Voinnet et al., 2003). El PTGS o la interferencia de ARN es una respuesta adaptativa de defensa antiviral que limita la replicación y propagación del virus en las plantas. Este proceso implica el reconocimiento de un ARN diana y la iniciación de una ruta de degradación de ARN específica de la secuencia en el citoplasma (Voinnet, 2001). Ciertos virus vegetales codifican supresores de silenciamiento que tienen la capacidad para inhibir el PTGS. Algunas de estas proteínas supresoras del silenciamiento, tales como NS del virus del marchitamiento moteado del tomate
55 (TSWV) (Takeda et al., 2002), y p19 del virus de la atrofia del follaje del tomate (Voinnet et al., 2003) se han utilizado para prolongar y amplificar la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* por medio de la coinfiltración de *Agrobacterium* que contiene un gen supresor del silenciamiento.

Huang Chun-Yuan et al. (1999) describen plantas de tabaco transgénicas que expresan de forma estable la proteína H5 del virus de influenza. Existe la necesidad de optimizar la expresión de proteínas comercialmente viables en las

plantas a niveles que harán de las plantas una plataforma viable. En particular, existe la necesidad de un método para producir proteína del virus de influenza H5 en una planta.

También existe la necesidad de vectores, plantas transgénicas o partes de las mismas, y la progenie de dichas plantas para satisfacer la necesidad descrita anteriormente en el presente documento.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un polipéptido H5 del virus de influenza en una planta que comprende las etapas de:

1. clonar un gen del virus de influenza H5 o ácido nucleico que codifica un polipéptido H5 en un vector adaptado para dirigir un componente presente en la planta, en el que el componente de la planta es el retículo endoplasmático;
2. infiltrar al menos una porción de la planta con el vector o transformar el tejido vegetal con el vector para expresar de forma transitoria el polipéptido del virus de influenza H5; y
3. recuperar el polipéptido H5 del virus de influenza expresado por la planta.

El término "planta" pretende incluir todos los organismos vivos que carecen de órganos sensoriales especializados y el poder de movimientos voluntarios. Como tal, la definición incluye tanto monocotiledóneas y las dicotiledóneas y todos los organismos fotosintéticos.

El término "polipéptidos del VPH" pretende incluir la proteína L1 del VPH; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a otro péptido antigénico del VPH; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a un péptido heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, proteína específica de linfocitos B o de linfocitos T y una proteína L2 del VPH o sus equivalentes funcionales. Lo mismo se aplica, *mutatis mutandis*, a la expresión "gen del VPH".

El término "componentes de la planta" pretende incluir plastos, retículos endoplasmáticos, citoplasma y apoplastos.

Por direccionamiento se pretende que las secuencias diana se puedan incluir en el vector. Dichas secuencias diana pueden ser traducidas en un péptido que dirige el vector o el producto del mismo al componente deseado en la planta.

El vector de acuerdo con la presente invención incluye preferiblemente promotores y otros reguladores necesarios, tales como terminadores, o similares, unidos operativamente a la secuencia codificante.

Se apreciará que infiltrar por lo menos una porción de la planta con el vector puede dar lugar a la expresión transitoria de la proteína y la transformación del tejido de la planta con el vector para crear una planta transgénica puede dar lugar a la expresión transgénica de la proteína, ambas de cuyas formas de expresión se contemplan como dentro del ámbito de la presente divulgación. En esta memoria descriptiva, la referencia a una proteína, un péptido o un gen o sus equivalentes funcionales incluye referencias variantes de los mismos que son capaces de realizar en gran parte la misma función que la proteína, el péptido, el polipéptido o el gen. Esta divulgación describe la producción de la proteína L1 del HPV-16; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a otro péptido antigénico del VPH; o un péptido quimérico L1 del VPH L1 fusionado a un péptido heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, específico de linfocitos B o linfocitos T; una proteína L2 del VPH; o una proteína H5 del virus de influenza.

Preferiblemente, los vectores son vectores binarios, más preferibles vectores primarios de *Agrobacterium tumefaciens*.

Un vector de la presente divulgación puede adaptarse para dirigir plastos haciendo que un polipéptido que se expresa incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoidales de los plastos, en particular, el mecanismo de transferencia de las membranas tilacoidales. Esta interacción puede causar que el polipéptido se importe al plasto del citoplasma donde se expresa. El mecanismo de importación al citoplasma puede ser importante para el correcto pligamiento de las proteínas.

Sin embargo, se apreciará que se puede adaptar para hacer que los propios plastos se transformen y tenga lugar la expresión del polipéptido totalmente dentro del plasto.

Sin desear quedar ligado por la teoría, el solicitante es de la opinión de que un polipéptido importado dentro del plasto es importado en su estructura primaria y experimenta plegamiento en su estructura secundaria y terciaria dentro del plasto, es decir, a distancia del citoplasma de la célula. Como tal, el solicitante considera que es una extensión lógica de la divulgación que la expresión del polipéptido por el vector pueda tener lugar dentro del plasto, 5 después de lo cual adopta sus estructuras secundaria y terciaria. En otras palabras, los solicitantes consideran que la divulgación se extiende a la transformación de los plastos. En dichas condiciones, la expresión de la proteína tendrá lugar completamente dentro del plasto y sin contacto con el citoplasma de la célula.

Preferiblemente, el gen H5 del virus de influenza es un gen optimizado, por ejemplo, optimizado por codones 10 humanos, optimizado por codones BCG u optimizado por codones vegetales.

El método de acuerdo con la presente invención puede incluir además la etapa de coinfiltración de la planta con una proteína supresora adaptada para inhibir el silenciamiento génico post-transcripcional en una planta. Preferiblemente, la proteína supresora es la proteína NSs del virus del marchitamiento moteado del tomate o el p19 15 del virus de la atrofia del follaje del tomate. Más preferiblemente, la proteína supresora es NSs.

Se describen en el presente documento plastos seleccionados de cloroplastos, cromoplastos y leucoplastos. Los plastos son preferiblemente cloroplastos.

20 La infiltración puede hacerse por medio de inyección directa o por vacío. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las plantas enteras pueden infiltrarse al vacío. En esta memoria descriptiva, se debe considerar que "plantas enteras" incluye a las plantas a las que se les han quitado sus raíces, así como las plantas que han sido parcialmente defoliadas, así como las plantas intactas en gran medida. La referencia a una planta debe incluir una referencia a las partes de la planta, incluyendo, pero sin limitación, la semilla, hojas, raíz, tallo, flores, frutos, 25 embriones, meristemos, hipocotiledones, epicótilos, cotiledones, polen y tejido.

En el método de acuerdo con la presente invención, tanto la infiltración y como la transformación de la planta se puede lograr con *Agrobacterium tumefaciens*, que ha sido transformado para aceptar al vector.

30 La planta también se puede seleccionar de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*. Se apreciará, sin embargo, que cualquier planta que soporta la expresión transitoria de proteínas o que se ha vuelto transgénica será adecuada para los fines de la presente invención.

La infiltración se realiza preferiblemente sobre las hojas de la planta. La infiltración por inyección directa se realiza 35 preferiblemente en la región abaxial de la hoja.

De acuerdo con la presente invención, el método puede implicar la producción del polipéptido H5 del virus de influenza en una planta en la que sustancialmente toda la planta se infiltra con un vector adecuado por medio de infiltración al vacío. 40

También se describe en el presente documento un polipéptido H5 del virus de influenza siempre y cuando sea producido de acuerdo con un método como el descrito anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un vector en el que se ha clonado 45 un gen H5 del virus de influenza o un ácido nucleico que codifica un polipéptido H5, cuyo vector está adaptado para dirigir el polipéptido H5 al retículo endoplasmático en una planta para expresar transitoriamente el polipéptido H5 del virus de influenza en el citoplasma y luego importar el polipéptido H5 del virus de influenza al retículo endoplasmático. También se describe en el presente documento un vector en el que se ha clonado un gen H5 del virus de influenza o un ácido nucleico que codifica un polipéptido H5, cuyo vector está adaptado para dirigir el 50 polipéptido H5 al retículo endoplasmático en una planta para expresar transitoriamente el polipéptido H5 del virus de influenza en el citoplasma y luego importar el polipéptido H5 del virus de influenza al retículo endoplasmático.

También se describe en el presente documento una vacuna profiláctica o terapéutica que consiste en un polipéptido H5 del virus de influenza capaz de inducir una respuesta inmune en un huésped adecuado, siempre que se 55 produzca mediante un método como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

También se describe en el presente documento una planta transgénica, parte o progenie de la misma que contiene una célula capaz de expresar un polipéptido H5 del virus de influenza.

En estos aspectos posteriores a la invención, las opciones y preferencias del primer aspecto, se aplican *mutatis mutandis*.

5 Existía la necesidad de optimizar la expresión de proteínas comercialmente viables en las plantas a niveles que harán de las plantas una plataforma viable. Un ejemplo es la producción de la proteína de la cápside principal L1 del VPH como capsómeros y/o como partículas pseudovíricas (VLP) para los propósitos de una vacuna humana o un reactivo.

10 Siguiendo las enseñanzas de esta divulgación, se puede comparar la expresión de una cantidad de proteínas antigénicas, así como el efecto del direccionamiento del compartimento de las células vegetales de las proteínas por expresión transitoria mediante agroinfiltración. Este método implica en la infiltración de recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* que transportan los vectores de expresión a las plantas mediante inyección directa, o creando un vacío sobre las hojas sumergidas o remojadas en el cultivo de *Agrobacterium*.

15 L1 del HPV optimizado por codón humano o de codón BCG se expresó en niveles significativamente más altos que las otras secuencias de L1 y la optimización de codón humano también dio como resultado una alta expresión de la proteína H5 de influenza. El direccionamiento a cloroplastos provocó una acumulación significativamente mayor que el direccionamiento al retículo citoplasmático o endoplasmático (RE). La microscopía electrónica de los extractos de plantas enteras del L1 del VPH reveló que L1 se ensambló en partículas pseudovíricas (VLP) en las plantas. La
20 proteína producida también reaccionó con los anticuerpos monoclonales específicos de L1 del VPH (MAb) que reconocen epítomos específicos de conformación.

El L1 obtenido a través de la expresión transitoria en plantas indujo altos niveles de anticuerpos específicos de L1 en ratones, y se encontró que estos anticuerpos se neutralizaban en un ensayo de neutralización *in vitro*. Los vectores
25 de expresión que facilitaron una alta expresión transitoria de L1 en los cloroplastos de plantas se utilizaron para generar plantas transgénicas que también expresaron altos niveles de los otros polipéptidos como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

La infiltración de *Agrobacterium* al vacío típicamente implica la infiltración de las hojas que se han eliminado del tallo.
30 La presente invención describe la novedosa infiltración al vacío de plantas intactas, o de plantas intactas sin raíces. Las plantas intactas con sistemas de raíces pequeñas se pueden extraer de la tierra, infiltrarse y plantarse de nuevo sin pérdida de viabilidad. Los sistemas de raíces grandes se pueden retirar, la planta se infiltra, y luego se plantan de nuevo en la espuma de la planta que se cultivará durante al menos tres días sin pérdida de viabilidad. Las plantas con sistemas radiculares complejos también se pueden cultivar en forma hidropónica lo que permite la infiltración sin
35 necesidad de retirar las raíces. Las plantas enteras son más fáciles de incubar que las hojas sueltas después del proceso de infiltración, y sobreviven durante más tiempo, aumentando así la expresión del gen extraño. La ventaja de infiltrar plantas intactas es la posibilidad de aumentar la producción de proteínas extrañas por medio de expresión transitoria hasta niveles que sean comercialmente viables.

40 La presente divulgación también enseña el direccionamiento de la proteína L1 del VPH a subcompartimentos de células vegetales específicos (RE y cloroplastos) por medio de agroinfiltración o en plantas transgénicas. El direccionamiento a cloroplastos aumentó significativamente la acumulación de L1 sobre la acumulación dirigida al RE y citoplasmática. La acumulación de cloroplastos puede proteger a la proteína L1 de la degradación por proteasas presentes en el citoplasma y/o permitir que se acumule a una mayor concentración sin afectar a la función
45 de la célula de la planta. Las mismas consideraciones se aplican a los otros polipéptidos como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

EJEMPLOS

50 La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Expresión de proteína L1 del VPH a altos niveles

55

Construcciones de expresión

Tres vectores de *Agrobacterium*: pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP y pTRAc-ERH (Figura 1) se obtuvieron a partir de Rainer Fischer (Fraunhofer Institute, Aachen, Alemania). El vector pTRAc consiste de un promotor 35S (P35SS) del

Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV), con potenciador transcripcional duplicado, región no traducida 5' de chalcona sintasa (CHS) y señal de poliadenilación 35S del CaMV (pA35S), para la expresión de gen extraño; 2 regiones de unión al andamiaje (SAR) para el gen RB7 del tabaco; los bordes izquierdo y derecho para la integración del ADN-T; orígenes de replicación para *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y el gen *bla* para selección de antibióticos. pTRAc-rbcs1-cTP es un derivado de pTRAc con una secuencia adicional de rbcs-cTP (señal que se dirige al cloroplasto desde la subunidad pequeña de Rubisco de *Solanum*), formando una fusión 3' con el gen extraño. pTRAc-ERH se deriva también de pTRAc, e incluye las secuencias KDEL y his6, formando una fusión 5' con el gen extraño. Los vectores pTRAc-rbcs1-cTP y pTRAc-ERH también incluyen al gen *nptII*, para resistencia a la kanamicina en las plantas.

10

Cuatro variantes del gen L1 del HPV-16 se clonaron en los vectores anteriormente mencionados de *Agrobacterium*: (1) un aislado sudafricano, SAL1 (acceso al GenBank N.º AY177679), (2) L1 optimizado por codón humano (HL1, Figura 2), (3) L1 optimizado por codón de planta (SYNL1, Figura 3), y (4) señal de localización nuclear deficiente, truncamiento del aminoácido 22 de HL1, HL1 Δ C22.

15

Para facilitar la clonación direccional, se añadieron sitios de restricción de la enzima a los extremos de los genes L1 mediante amplificación por PCR. Se amplificó SAL1 con cebadores sentido: 5'-GGACGCGTTAGGTACATGTCTCTTTGGCTGCCT (SEQ. ID NO. 1), y cebador antisentido: 5'-TCTAGACTCGAGTTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTT (SEQ. ID NO. 2), se digirió con *Afl* III y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios de pTRAc, formando pTra-SAL1; o se digirió con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-SAL1. Se amplificó también SAL1 con el cebador sentido y el cebador antisentido anteriores: 5'-AGCGGCCGC CAGCTTACGTTTTTTGCG (SEQ. ID NO. 3), se digirió con *Afl* III y *Not* I y se clonó en los sitios *Nco* I y *Not* I de pTRAc-ERH, formando pTRAERH-SAL1.

25 Se amplificó SYNL1 con el cebador sentido: 5'-GGACGCGTGAGATTCATGAGCCTTTGGCTC CCT (SEQ. ID NO. 4), y cebador antisentido: 5'-ATCTAGACTCGAGTTAGAGCTTCTTCTTCTTCTT (SEQ. ID NO. 5), se digirió con *Bsp* HI y *Xho* I y se clonó en los sitios *Afl* III y *Xho* I de pTRAc, formando pTRA-SYNL1; o se digirió con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-SYNL1. SYNL1 también se amplificó con el cebador sentido y el cebador antisentido anteriores: 5'-AGCGGCCGCAGCTTCTTCTTCTTCTTCTT (SEQ. ID NO. 6), se digirió con *Bsp* HI y *Not* I y se clonó en los sitios *Nco* I y *Not* I de pTRAc-ERH, formando pTRAERH-SYNL1.

Se amplificó HL1 con el cebador sentido: 5'-GGACGCGTGAGTTTCATGAGCCTGTGGCTGCC C (SEQ. ID NO. 7), y cebador antisentido: 5'-ATCTAGACTCGAGTCACAGCTTGCCTTCTTCCG (SEQ. ID NO. 8), se digirió con *Bsp* HI y *Xho* I y se clonó en los sitios *Afl* III y *Xho* I de pTRAc, formando pTRA-HL1; o se digirió con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-HL1. HL1 también se amplificó con el cebador sentido y el cebador antisentido anteriores: 5'-AGCGGCCGCAGCTTGCCTTCTTCCG (SEQ. ID NO. 9), se digirió con *Bsp* HI y *Not* I y se clonó en los sitios *Nco* I y *Not* I de pTRAc-ERH, formando pTRAERH-HL1.

40 Se formó HL1 Δ C22 mediante amplificación por PCR de HL1, con el cebador sentido, y el cebador antisentido anteriores: 5' TCTAGACTCGAGTCAGCCCAGGGTGAAGTTAGG (SEQ. ID NO. 10), para facilitar la terminación antes de NLS (Zhou et al. 1991). Se digirió el producto de la PCR con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-HL1 Δ C22.

45 Se amplificó el gen *gfp* mutante de 30B-GFPC3 (acceso al GenBank N.º U62637) a partir de pBSG1057 (Biosource Technologies Inc., Vacaville, Estados Unidos) con el cebador sentido: 5' GGACGCGTTAGGTCCATGGCTAGCAAAGGAGAAG (SEQ. ID NO. 11), y cebador antisentido: 5' ATCTAGATTATTTGTA GAGCTCATCCATG (SEQ. ID NO. 12), se digirió con *Nco* I y *Xba* I y se clonó en los mismos sitios de pTRAc, formando pTRA-GFP.

50

Transformación de *Agrobacterium*

Se hizo electrocompetente *Agrobacterium* GV3101::pMP90RK (obtenido de Rainer Fischer, Fraunhofer Institute, Aachen) como se describe por (Shen y Forde, 1989). Se mezclaron 50-200 ng de los vectores de HPV-16L1/*Agrobacterium* con 100 μ l de células electrocompetentes en una cubeta con paso de electrones de 0,1 cm (BioRad). Las células se transformaron en un GenePulser (BioRad), fijado en 1,8 kV, 25 μ F y 200 Ω .

Se incubaron las células sometidas a electroporación en 1 ml de LB durante 2 horas antes de la colocación en placas sobre LB que contenía 50 μ g.ml⁻¹ de carbenicilina, 50 μ g.ml⁻¹ de rifampicina y 30 μ g.ml⁻¹ de kanamicina. Se

verificaron los clones positivos por medio del aislamiento del ADN plasmídico de colonias recombinantes de *Agrobacterium*, y la nueva transformación del ADN plasmídico en células DH5 α de *E. coli* y selección sobre 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina.

5 Tabla A. Resumen de los recombinantes de *Agrobacterium* utilizados

Clon	Vector	Inserción	Compartimento celular dirigido	Cepa de <i>Agrobacterium</i>
pTRA-SAL1	pTRAc	SAL1 (aislado L1 de HPV-16 sudafricano)	citoplasma	GV3101
pTRA-SYNL1	pTRAc	SYNL1 (L1 del HPV-16 optimizado por el codón de la planta)	citoplasma	GV3101
pTRA-HL1	pTRAc	HL1 (L1 del HPV-16 optimizado por codón humano)	citoplasma	GV3101
pTRA-GFP	pTRAc	<i>Gfp</i>	citoplasma	GV3101
pTRACTP-SAL1	pTRAc-rbcs1-cTP	SAL1	plastos	GV3101
pTRACTP-SYNL1	pTRAc-rbcs1-cTP	SYNL1	plastos	GV3101
pTRACTP-HL1	pTRAc-rbcs1-cTP	HL1	plastos	GV3101
pTRACTP-HL1 Δ C22	pTRAc-rbcs1-cTP	HL1 Δ C22 (truncamiento de la señal de localización nuclear)	plastos	GV3101
pTRACTP-GFP	pTRAc-rbcs1-cTP	<i>Gfp</i>	plastos	GV3101
pTRAERH-SAL1	pTRAc-ERH	SAL1	RE	GV3101
pTRAERH-SYNL1	pTRAc-ERH	SYNL1	RE	GV3101
pTRAERH-HL1	pTRAc-ERH	HL1	RE	GV3101
pTRAERH-GFP	pTRAc-ERH	<i>Gfp</i>	RE	GV3101
pBIN-NSs	pBIN	<i>NSs</i>	citoplasma	LBA4404

Preparación de *Agrobacterium* para infiltración

Se obtuvo *Agrobacterium* LBA4404 (pBIN-NSs), que contenía los genes supresores del silenciamiento de NSs de TSWV, de Marcel Prins (Laboratory of Virology, Wageningen, Países Bajos). Se complementaron los cultivos de *Agrobacterium* GV3101 que contenían plásmidos basados en los vectores pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP-y pTRAc-ERH con 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de carbenicilina y 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de rifampicina. Se complementaron los cultivos de *Agrobacterium* LBA4404 (pBIN-NSs) con 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de rifampicina y 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamicina. Los cultivos de *Agrobacterium* se desarrollaron con agitación a 27 °C hasta fase logarítmica ($\text{OD}_{600} \approx 0,8$) en caldo LB, que contenía los antibióticos apropiados. Se recogieron las células por centrifugación a 4000 g, se resuspendieron en medio de inducción (caldo LB a pH 5,6 que contenía ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico [MES] 10 mM, acetosiringona 20 mM, y MgSO_4 2 mM) con los antibióticos apropiados, y se cultivaron como anteriormente. Las células se recogieron por centrifugación, como anteriormente, y se suspendieron de nuevo en medio de infiltración (MgCl_2 10 mM, MES 10 mM, sacarosa al 2% y 150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de acetosiringona, pH 5,6). Para la infiltración al vacío se reemplazó el MgCl_2 con 4 g de sales MS.I¹. Se diluyeron las suspensiones de *Agrobacterium* en medio de infiltración hasta una OD_{600} de 1,0, y se mantuvieron a 22 °C durante 2-3 h.

Agroinfiltración

25 Inyección: Se diluyeron suspensiones de *Agrobacterium*-L1 y *Agrobacterium* (pBIN-NSs) y se combinaron en un medio de infiltración, ambos a una OD_{600} final de 0,25. Cuando se coinfiltró *Agrobacterium* (pTRA-GFP) con la suspensión anterior, se utilizó a una OD_{600} final de 0,0125. Se infiltraron hojas de plantas de *N. benthamiana* de 2-4 semanas de edad mediante inyección de la suspensión de *Agrobacterium* en los espacios aéreos abaxiales de la parte inferior de la hoja. Se agroinfiltraron seis hojas con cada mezcla agrobacteriana (3 plantas, 2 hojas/planta). Las

plantas se desarrollaron durante 3-6 días bajo condiciones de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, 22 °C.

Vacío: Se cultivaron durante una noche *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y *Agrobacterium* (pBIN-NSs) en medio de inducción. Las células de cada cultivo se combinaron y se suspendieron de nuevo en 1-8 litros de medio de infiltración, a una OD₆₀₀ final de 0,25 por cultivo. Plantas enteras de *N. benthamiana* o de *N. tabacum* (con las raíces eliminadas) L. cv. Petite Havana SR1 en la suspensión de *Agrobacterium* y se sometieron a un vacío de -90 kPa durante 10 min, con agitación ocasional para liberar las burbujas de aire atrapadas. El vacío se liberó rápidamente el (~10 kPa.segundo⁻¹). Se plantaron de nuevo plantas de *N. benthamiana* en el suelo. Se colocaron los tallos de las plantas de *N. tabacum* en espuma floral saturada con agua. Las plantas se desarrollaron durante 3 días bajo condiciones de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, 22 °C.

Extracción y detección de proteínas

Se recolectaron discos de hoja (tapa de un tubo de Eppendorf) de hojas agroinfiltradas, y se molieron en 250 µl de PBS altamente salina (NaCl 0,5 M)/disco de hoja. El extracto se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min en una centrífuga de mesa, se recolectó el sobrenadante, y se repitió la centrifugación. Se realizaron extracciones a gran escala en plantas de *N. tabacum* infiltradas al vacío: las plantas se homogenizaron con un mezclador Waring en 2 ml de tampón de extracción (fosfato sódico 0,25 M, metabisulfito sódico 0,1 M, EDTA 10 mM, polivinilpolipirrolidona al 4% [PVPP], pH 7,4)/g de material vegetal. El extracto se filtró a través de 2 capas de estopilla, después de lo cual el filtrado se centrifugó a 10.000 g durante 20 min. El sobrenadante resultante se ultracentrifugó a 30.000 rpm durante 3 h, y los sedimentos resultantes se resuspendieron en PBS, y se liofilizaron para reducir el volumen. Se determinó la concentración de proteína soluble total (TSP) con un ensayo de Bradford (Sigma).

Para el análisis de transferencia de Western, los extractos de las plantas se incubaron a 85 °C durante 2 minutos en tampón de carga (Sambrook et al., 1989), se separaron en un gel SDS-PAGE al 10%, y después se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia semiseca. Se detectó la proteína L1 con anticuerpo monoclonal H16:J4 (1:3000), y luego con un conjugado de fosfatasa alcalina anti-ratón de cabra (1:10000, Sigma). Se realizó la detección con Comprimidos de NBT/BCIP (Roche).

La proteína L1 se cuantificó a partir de los extractos de plantas por medio de ELISA de captura, se modificaron a partir del método de ELISA de bloqueo con alcohol polivinílico (PVA) de Studentsov et al. (2002). Una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubrió con anticuerpos monoclonales H16:J4 (se une al epítipo lineal de L1 del HPV-16) o H16:V5 (se une al epítipo conformacional) durante 1 hora a 37 °C, se lavó y se bloqueó. Después, se añadió extracto de planta durante 1 h a 37 °C seguido de una etapa de lavado y la adición de suero policlonal VLP anti-HPV-16 de conejo (1:1000) durante 1 h a 37 °C. Se detectó este suero con conjugado anti-conejo-HRP de cerdo (1:5000; DAKO, Dinamarca) y sustrato de diclorhidrato de 1,2-fenilendiamina (OPD; DAKO).

Se detectó GFP por ELISA de captura. Se diluyeron los extractos de plantas en una solución láctea al 1% (leche en polvo Elite® en PBS con Tween 20 al 0,05% [PBS-T]), y se incubaron sobre una placa recubierta de Reacti-Bind anti-GFP (Pierce) durante 1 h a 37 °C. La placa se lavó 4 veces con PBS-T, seguido de la adición de conjugado HRP anti-GFP de cabra (1:2000 en solución de leche al 1%; Abcam), la placa se incubó durante 30 min a 37 °C, y después se lavó 4 veces con PBS-T. Se utilizó sustrato TMB (KPL) para la detección.

Microscopía electrónica

Se inmunoatrapó el extracto de la planta con anticuerpo H16:V5 (1:50) sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono. Se tiñeron las rejillas con acetato de uranilo al 2% y visualizaron usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 200CX.

50 Inmunización de ratones con extracto de planta y análisis del suero

Aproximadamente 350 g de *N. tabacum* que se habían infiltrado al vacío con *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y con *Agrobacterium* (pBIN-NSs) se extrajeron como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en 0,5 µl de PBS. Los ratones BALB/c se inmunizaron por vía subcutánea con 100 µl del extracto de planta (11 µg de L1), ya sea con la adición de adyuvante incompleto de Freund (4 ratones) o sin la adición (5 ratones). Se inmunizaron los grupos de control dos veces con 10 µg de las VLP producidas en baculovirus, o una vez con 1 µg de las VLP producidas en baculovirus. Se recogió suero de la vena del ojo 4 semanas después de la inmunización.

Se utilizó un ELISA de bloqueo de PVA (Studentsov et al., 2002) para detectar anticuerpos contra L1 en los ratones.

Se recubrió una placa de microtitulación con las VLP de L1 del HPV-16 producidas por baculovirus ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), se bloqueó durante 2 h a 4°C con PVA al 0,5% en PBS, y luego se lavó 6 veces con PBS. Se diluyeron en serie los sueros en PVA al 0,5% (1:40 a 1:40960) y se incubaron sobre la placa a 37°C durante 1 h. Después de lavar 6 veces con PBS, se añadió el conjugado de HRP anti-ratón de conejo (1:2000; DAKO) durante 30 min a 37°C . La 5 detección se realizó con sustrato OPD (DAKO).

El ensayo del anticuerpo neutralizante del pseudovirus de HPV-16 se realizó de acuerdo con el método de (Pastrana et al., 2004). Los plásmidos necesarios para el ensayo se obtuvieron de John Schiller (Laboratory of Cellular Oncology, National Cancer Institute, Bethesda, Estados Unidos).

10

Transformación y regeneración de la planta

Las hojas de L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* se cortaron en trozos de $\pm 1 \text{ cm}^2$, se esterilizaron en lejía al 10% y se aclararon en agua estéril. Se sumergieron los discos de hoja en el cultivo de *Agrobacterium* relevante 15 recombinante y crecieron sobre un medio de cultivo conjunto (Tabla 2) bajo luz constante durante dos días. Los discos de hojas se colocaron entonces en medio de regeneración fresco (Tabla 2) cada dos semanas hasta que aparecieron brotes pequeños (4-6 semanas). Los brotes de 1,5-2 cm se transfirieron a medio de enraizamiento (Tabla 2). Los brotes se incubaron hasta que fue evidente el crecimiento fuerte de la raíz, y luego se transplantaron a una mezcla de suelo/vermiculita (2:1), se cubrieron con bolsas de plástico y se mantuvieron alejados de la luz directa 20 durante tres días antes de trasladarse a la luz directa. Las plantas transgénicas se seleccionaron por medio de PCR usando el kit Extract-N-Amp Plant PCR (Sigma) e cebadores específicos de L1.

Tabla B: Medios para la transformación y regeneración de tabaco. Todos los medios contenían MS con vitaminas (Highveld Biological, Sudáfrica), sacarosa al 1% y agar al 0,8%.

	Co-cultivo	Regeneración	Enraizamiento
ácido α -naftalenoacético	0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	
Bencilaminopurina	1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	
Cefotaxima		250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Kanamicina		300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

25

El método de inyección de infiltración demostró ser útil para la comparación rápida de numerosas construcciones de *Agrobacterium*, y para la optimización de las concentraciones de cultivo para infiltración. El análisis de transferencia de Western de muestras de *N. benthamiana* (Figura 4), después de la infiltración con *Agrobacterium* que portaba el gen L1 del HPV-16 optimizado por codón humano (HL1), demostró la expresión exitosa del monómero de L1 de 55 30 kDa. La expresión de HL1 del vector pTRA-HL1 (localización citoplasmática de L1) no pudo ser detectada después de 6 días, a menos que se produjera coinfiltración de *Agrobacterium* (pBIN-NSS). Por otro lado, HL1 dirigido al cloroplasto (vector pTRACTP-HL1) produjo niveles detectables de HL1 sin *Agrobacterium* (pBIN-NSSs), que fueron reforzados con la coinfiltración de *Agrobacterium* (pBIN-NSSs).

35 Los resultados anteriores fueron confirmados por medio de ELISA de captura (Figura 5). Además, el ELISA estableció que L1 se ensambló en las estructuras multiméricas necesarias para la generación de anticuerpos de neutralización, ya que el mAb H16.V5 utilizado para este ELISA de captura es específico para un epítipo conformacional formado por pentámeros y las VLP. La formación de VLP se confirmó por medio de microscopía electrónica (Figura 6) de un extracto en bruto de una hoja de *N. benthamiana* que había sido infiltrada con 40 *Agrobacterium* GV3101 (pTRACTP-HL1).

La optimización del codón y el direccionamiento del compartimiento de la planta afectó significativamente la acumulación de L1 (Figura 7). Los niveles de acumulación de SYN1 y SAL1 en hojas agroinfiltradas fueron a menudo bajos, o indetectables, sin embargo, HL1 se acumuló hasta niveles altos (hasta $\sim 600 \text{ mg}$ de L1/kg de material de la hoja; -17% de TSP). Fue sorprendente que L1 optimizado por el codón de la planta (SYN1) se expresara en niveles inferiores que L1 nativo (SAL1). El direccionamiento de L1 a los cloroplastos aumentó su acumulación significativamente tanto sobre L1 citoplasmático como el dirigido al RE, y puede ser un resultado de la protección de las proteasas presentes en el citoplasma. La expresión de L1 fue más baja cuando se dirigió al RE. Se utilizó *Agrobacterium* (pTRA-GFP) para medir las desviaciones de eficiencia de la infiltración entre las hojas (que 50 generalmente se encontró que eran pequeñas, con una diferencia del 14% entre las infiltraciones más y menos eficientes).

Se demostró el potencial para la expresión a media escala o posiblemente a gran escala de HPV-L1 en *N. benthamiana* y *N. tabacum* L. cv. Petite Havana SR1 por la infiltración al vacío. La infiltración al vacío de plantas de

N. benthamiana enteras se produjo fácilmente en el 90-100% del área foliar, y en el 70-90% de la superficie foliar de *N. tabacum*. Por medio de infiltración al vacío de plantas enteras, en lugar de hojas sueltas como se describe por Kapila et al. (1997), fue relativamente fácil aumentar la infiltración hasta 2 kg del material de la planta *N. tabacum*.

- 5 Una sola inmunización de ratones BALB/c con un extracto en bruto de *N. Tabacum*/HL1 indujo títulos altos de anticuerpos específicos de VLP del HPV-16 (40 960) (Figura 8), que eran equivalentes a lo provocado en ratones después de 2 inmunizaciones con 10 µg de las VLP producidas por baculovirus. La adición de adyuvante incompleto de Freund al extracto de la planta no parece aumentar la respuesta humoral producida para HL1, lo que sugiere que las proteínas de la planta adjuntas en la muestra sin adyuvante incompleto de Freund pueden tener propiedades
- 10 adyuvantes. Se realizó un ensayo de neutralización *in vitro* del pseudovirus del HPV-16 usando los sueros de ratón anteriores (Tabla 3). Este ensayo se basa en la capacidad de neutralización del suero para bloquear la entrada de pseudovirus de HPV-16 de SEAP en las células, deteniendo de este modo la transferencia del gen indicador para SEAP en las células. Los ratones que habían sido inmunizados con el extracto en bruto de *N. Tabacum*/HL1, provocaron con éxito niveles neutralizantes de anticuerpo mayores a los provocados por 2 inmunizaciones con 10 µg
- 15 de las VLP producidas por baculovirus. Fue sorprendente que los niveles de anticuerpo neutralizantes provocados por el extracto de *N. tabacum*/HL1 fueran menores al añadir el adyuvante incompleto de Freund.

Las hojas de L. cv. Petite Havana SR1 se transformaron con éxito con *Agrobacterium* que transportaba el gen L1 del HPV-16 optimizado por codón humano. Como se observó con la expresión transitoria, se acumuló L1 dirigido al cloroplasto hasta altos niveles en las plantas transgénicas (hasta 60 mg de L1/kg de material de la planta, el 10,6% de la TSP) (Figura 9). La observación de que L1 fue detectada con el mAb H16.V5 específico de la conformación de los extractos de hojas transgénicas sugiere que están presentes capsómeros y posiblemente una formación de VLP en estas plantas.

20

- 25 **Tabla C.** Ensayo de neutralización del pseudovirus HPV-16 de SEAP que analiza la inducción de anticuerpos de neutralización en ratones, después de la inmunización con extracto en bruto de planta/HL1. Tres días después de que se infiltraran al vacío plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* con *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y *Agrobacterium* (pBIN-NSs), se produjeron extractos de planta concentrados y se usaron con ratones inmunizados. Se tomaron sueros 4 semanas después de la inmunización. Se definieron los títulos de neutralización como el
- 30 recíproco de la dilución en suero más alta que causó al menos una reducción del 50% en la actividad de SEAP. Los títulos por debajo de 25 se consideraron negativos.

Antígeno	Antígeno (recíproco de la dilución más alta del suero para provocar al menos una reducción del 50% en la actividad de SEAP)
PBS	<25
Planta/Agro pTRA-HL1	6400
Planta/Agro pTRA-HL1 + Ady. Inc. de Freund	1600
1 µg de VLP de HPV-16 producido por baculovirus	<25
2 x 10 µg de VLP de HPV-16 producido por baculovirus	1600

Ejemplo 2

35

Proteína HA subtipo H5 del virus de la influenza expresada en niveles elevados

Construcción de plásmidos

- 40 El gen H5 del gen de longitud completa (H5, 1704 pb, Figura 10) del virus A/VietNam/1194/2004 (H5N1) de la influenza (acceso a GenBank n.º AY651333) y un gen HA truncado en 23 aminoácidos (H5tr, 1635 pb, Figura 11) se optimizaron por codones humanos, y se sintetizaron por Geneart (Alemania). H5tr se truncó desde el nucleótido 1597-1665 para eliminar su dominio de anclaje a la membrana (Figura 12): esto debe impedir que la proteína HA se asocie con las membranas celulares, y debe permitir que la proteína H5tr se secrete desde células de la planta
- 45 después del procesamiento apropiado en el RE, que en gran medida puede ayudar a su purificación. Se añadieron secuencias de reconocimiento de la enzima durante la síntesis génica para facilitar la clonación.

Los genes H5 y H5tr se clonaron cada uno en los tres vectores de *A. tumefaciens*, en el Ejemplo 1. Los genes H5 y H5tr se digirieron con Nco I y Xba I y se clonaron en los sitios Afl III y Xba I de pTRAc, formando los clones pTRA-H5

y pTRA-H5tr. Para la clonación en pTRAc-ERH, se digirieron tanto el vector como los genes H5/H5tr con Nco I y Not I, formando pTRAERH-H5 y pTRAERH-H5tr. Se digirieron los genes H5 y H5tr con Mlu I y Xba I y se clonó en pTRAc-rbcs1-cTP, formando los clones pTRACTP-H5 y pTRACTP-H5tr. Se construyó un cuarto conjunto de clones, pTRAa-H5 y pTRAa-H5tr, por medio de la clonación de los genes H5 y H5tr (digeridos con Nco I y Xba I) en el vector pTRAc-ERH después de la digestión de Nco I y Xba I, eliminando así la señal de retención del RE (SEKDEL) para crear construcciones de direccionamiento aoplásico.

Transformación de *Agrobacterium*

10 La transformación de *Agrobacterium* se realizó como en el ejemplo 1.

Agroinfiltración

Se desarrollaron cultivos de *A. tumefaciens* recombinantes GV3101 que contenían los clones del vector binario H5 y H5tr, y GV3101 de *A. tumefaciens* (pTRA-P19), que contenía el gen supresor del silenciamiento de p19 del virus de la atrofia del follaje del tomate, con agitación a 27 °C hasta fase logarítmica ($OD_{600} \approx 0,8$) en caldo LB complementado con 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de carbenicilina, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de rifampicina y 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de kanamicina. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 g, se resuspendieron en medio de inducción (caldo LB a pH 5,6 que contenía ácido MES 10 mM, acetosiringona 20 mM, y MgSO_4 2 mM) con los antibióticos apropiados, y se cultivaron como anteriormente. Las células se recogieron por centrifugación, como anteriormente, y se suspendieron de nuevo en medio de infiltración (MgCl_2 10 mM, MES 10 mM, sacarosa al 2% y 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de acetosiringona, pH 5,6). Se diluyeron las suspensiones de *A. tumefaciens* en medio de infiltración hasta una OD_{600} de 1,0, y se mantuvieron a 22 °C durante 2-3 h.

Las suspensiones de H5 de *A. tumefaciens* o de H5tr de *A. tumefaciens* se combinaron con *A. tumefaciens* (pTRA-P19) y se diluyeron con medio de infiltración a una OD_{600} final de 0,25 para cada cultivo. Se infiltraron hojas de plantas de *N. benthamiana* mediante inyección de la suspensión bacteriana en los espacios aéreos abaxiales de la parte inferior de la hoja. Cuatro hojas se agroinfiltraron con cada mezcla de agrobacterias. Las plantas se desarrollaron durante 6 días bajo condiciones de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, 22 °C.

Extracción de proteínas y detección de HA

Se recolectaron discos de hojas de *N. benthamiana* (cortados utilizando la tapa de un tubo de microcentrífuga de 2 ml) a partir de hojas agroinfiltradas, y se molieron en 250 μl de tampón fosfato de alta salinidad (NaCl 0,5 M)/disco. El extracto se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se recogió, y la centrifugación se repitió.

Las muestras se analizaron para detectar la presencia de HA por medio de análisis por transferencias de Western. Los extractos de las plantas se incubaron a 85 °C durante 2 minutos en tampón de carga {Sambrook, 1989 33369 /id}, se separaron en un gel SDS-PAGE al 10%, y después se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia semiseca. Se detectó la proteína HA con suero de pollo positivo para H5 (1:1000; James Kitching, Elsenburg, Western Cape Dept of Agriculture), suero anti-pollo de conejo (1:1000, Ed. Rybicki, UCT), y después con conjugado de fosfatasa alcalina anti-conejo de cerdo (1:10000, Sigma). Se realizó la detección con Comprimidados de NBT/BCIP (Roche).

La agroinfiltración demostró ser útil para comparar rápidamente la expresión de numerosas construcciones de HA en plantas. Los resultados preliminares muestran que la mayor acumulación de la proteína HA se obtuvo al usar las construcciones pTRAERH-H5 y pTRAERH-H5tr, que dirigen la proteína al RE (Figura 13). HA no se pudo detectar al usar las otras construcciones.

Ejemplo 3

50

Construcción de plásmidos

Los vectores de *Agrobacterium* pTRAc, pTRAc-ERH, pTRAc-A, y pTRAc-rbcs1-cTP (Figura 14) se suministraron por Rainer Fischer (Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Aachen, Alemania). Se incluyeron sitios de restricción enzimática en cada extremo del ORF de L2 por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para facilitar la clonación direccional en los tres vectores de *Agrobacterium*. El marco de lectura abierto (ORF) de 1,4 kb de L2 del HPV-16 de tipo silvestre (saL2), el codón del ORF de L2 del HPV-16 optimizado para la expresión en plantas (vegetalizado) y el ORF de L2 del HPV-16 optimizado por codón para la expresión de mamíferos (humanizado) se amplificaron por PCR. La optimización por codón para *Nicotiana* de L2 del HPV-16 (pL2)

se hizo por GENEART® (Regensburg, Alemania). El L2 del HPV-16 humanizado (hL2) se suministró por Martin Müller (Alemania).

Los vectores pTRA mantienen una cantidad de características que optimizan la expresión del gen extraño. pTRAc
5 contiene las características del esqueleto y es competente en la expresión del transgén en el citoplasma de las células de la planta (Figura 14). El vector pTRAc-ERH incluye todas las características de pTRAc con algunas adiciones (Figura 14). Se añadió un gen de resistencia a la kanamicina (*nptII*), esto permite que estos vectores sean utilizados para la generación de plantas transgénicas. Sin embargo, en este estudio se utilizó expresión transitoria. pTRAc-ERH también incluye secuencias que dan como resultado las fusiones carboxi terminales de una etiqueta
10 His y la señal de retención (KDEL) del retículo endoplasmático (RE). Se cree que la secuencia de KDEL retrasa las proteínas en el RE, donde pueden estar protegidas de la degradación. La secuencia de KDEL puede inferir la protección contra la degradación ya que las proteínas que son incapaces de formar su conformación final, permanecen en el RE (1). Las proteínas presentes en el RE que no tienen una secuencia de KDEL se degradan (1). El vector pTRAc-A se obtiene a partir del vector pTRAc-ERH, contiene la señal secretora "LPH" pero carece de la
15 "KDEL", por lo tanto, la proteína se secreta fuera de la célula en el espacio apoplásico. El vector pTRAc-rbcs1-CTP que se basa en pTRAc, también incluye la secuencia del dominio de direccionamiento al estroma (STD), rbcs1-CTP, que forma una fusión de STD amino terminal con la proteína extraña. Las proteínas probablemente se cruzan donde las membranas interior y exterior se encuentran, una vez dentro del estroma, el STD se procesa por una metaloproteasa de 140 kDa (2).

20 Los bordes izquierdo y derecho flanquean la región del ADN que se va a transferir a la célula de la planta, el ADN-T. Las regiones de fijación del andamiaje, también conocidas como regiones de unión de la matriz, están a ambos lados del transgén. Se cree que estas regiones interactúan con las proteínas de la matriz nuclear formando dominios de bucle en el ADN lo que ha demostrado que aumentan la expresión con la inserción en un plásmido (3). La
25 expresión del transgén se controla por un promotor dual del CaMV P35S, con un potenciador transcripcional duplicado. Se ha demostrado que este promotor aumenta la expresión sobre el promotor único del CaMV tradicional P35S (4). La señal de poliadenilación del gen P35S se fusiona con el extremo del gen extraño; esto estabiliza los transcritos de ARN. La replicación del plásmido en *Agrobacterium* se inicia en el origen de replicación de RK2. Debido al bajo número de copias del plásmido en *Agrobacterium*, el vector puede replicarse alternativamente en
30 *Escherichia coli* usando el origen de replicación de ColE1 (5). El desarrollo de resistencia por una cantidad de *Agrobacterium* a la ampicilina ha conducido a la fusión de resistencia a la carbenicilina y a la ampicilina en el gen *bla*. La ampicilina se utiliza como un marcador en *E. coli* con carbenicilina como un marcador en *Agrobacterium*.

La clonación de todos los genes en sus respectivos vectores se hizo utilizando el par cebador aplicable. El ORF de
35 saL2 se amplificó con el par cebador F L2-ERH y R L2-pTRAc (Tabla 1). El par cebador de F pL2-pTRAc y R pL2-pTRAc se usó para amplificar el ORF de pL2, y el par F-hL2-pTRAc y R hL2-pTRAc se utilizó para amplificar el ORF de hL2 para facilitar la clonación en pTRAc. Los fragmentos de 1,4 kb se clonaron en pGEM®-T easy (Promega) y se secuenciaron para confirmar la fidelidad de la PCR. Se cortó saL2 con las enzimas de restricción BspHI y XbaI y se subclonó en los sitios Afl III y XbaI de pTRAc haciendo el plásmido pTRA-saL2-C. Las enzimas de restricción
40 BspHI y BamHI se usaron para cortar pL2 que se subclonó en los sitios AflIII y BamHI de pTRAc haciendo el plásmido pTRA-pL2-C. hL2 se clonó usando las enzimas de restricción BspHI y XbaI para hacer el plásmido pTRA-hL2-C.

Con el fin de clonar saL2 en pTRAc-ERH, se amplificó el ORF de saL2 con el par cebador F L2-ERH y R L2-ERH
45 (Tabla 1), y se clonó en los sitios Nco I y NotI de pTRAc-ERH utilizando BspHI y NotI, haciendo el plásmido pTRA-saL2-E. De forma similar, el ORF de hL2 se clonó en pTRAc-ERH usando el par cebador F hL2 pTRAc y R hL2-pTRA E.

TABLA 1. Cebadores usados en la PCR con su secuencia y los sitios de restricción a los que se unen

Nombre del cebador	Secuencia	Sitio de restricción subrayado
F L2-ERH	GCTCATGAGACACAAACGTTCTGCAAAAG	BspHI
R L2-ERH	AAGCGGCCGCGGCAGCCAAAGAGACATC	NotI
R L2-pTRAc	AATCTAGAPTAGGCAGCCAAAGAGAC	XbaI
F L2-Plast	AAACGCGTTAGGTGCATGAGACACAAACGTTCTGCAAAAC	MluI
F pL2-pTRAc	AATCATGAGACATAAGAGATCTGCTAAG	BspHI
R pL2-pTRAc	CGGGATCCCTAAGCAGCAAGAGAAACATC	BamHI
F pL2-CTP	GGACGCGTTAGGTGCATGAGACATAAGAGATCTGC	MluI

F hL2-pTRAc	ATTCATGAGGCACAAGAGGAGCGCC	BspHI
R hL2-pTRAc	VTTCTAGATCAGGCGGCCAGGCTCAC.	XbaI
F hL2-pTRA-P	ATACGCGTTAGGTGCATGAGGCACAAGAGGAGC	MluI
R hL2-pTRA-E	ATGCGGCCGCGGCGGCCAGGCTCACGTC	NotI
Las secuencias destacadas en rojo indican el codón de inicio del ORF de L2		
Las secuencias destacadas en azul indican el codón de detención del ORF de L2		

Para la clonación en pTRAc-rbcs1-cTP, saL2, pL2 y hL2 se amplificaron por PCR con los pares cebadores F L2-Plast y R L2-pTRAc, F pL2-cTP y R pL2-pTRAc, y F hL2-pTRA-P y R hL2-pTRAc respectivamente (Tabla 1). Se clonaron adicionalmente hL2 y saL2 utilizando enzimas MluI y XbaI en los sitios MluI y XbaI de pTRAc-rbcs1-cTP, formando el plásmido pTRA-saL2-P y pTRA-hL2-P. Se usaron MluI y BamHI para clonar pL2 en los sitios MluI y BamHI de pTRAc-rbcs1-cTP, creando pTRA-pL2-P.

El clon pTRA-hL2-A se hizo por medio de la clonación del mismo fragmento BspHI y XbaI utilizado para elaborar pTRA-hL-C y se clonó en el fragmento BspHI - XbaI de pTRAc-ERH

10 Generación de *Agrobacterium* recombinante

El *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se proporcionó por Rainer Fischer (Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Aachen, Alemania). La cepa GV3101 contiene el plásmido auxiliar, pMP90RK, que contiene los genes cruciales *vir* (5). Los vectores pTRA, como se ha mencionado anteriormente, se pueden replicar en *E. coli*, así como en *Agrobacterium*. Se clonaron primero las construcciones del vector en las células DH5a, que son más fáciles de cultivar y tienen un mayor número de copias del plásmido en comparación con *Agrobacterium* (5). Se cultivaron células de *Agrobacterium* GV3101 hasta fase logarítmica de 0,8 de OD₆₀₀ a 26° C con agitación, en caldo Luria (LB) que contenía antibióticos; 50 µg/ml de rifampicina (Rif) y 30 µg/ml de kanamicina (Kan). Las células se hicieron electrocompetentes por medio de lavado 3 veces con agua Milli-Q y se resuspendieron en 1/20 del volumen de cultivo con glicerol al 10%. Se determinó la concentración de ADN del plásmido aislado de células DH5a por espectrometría UV a 260 nm. Se mezcló el ADN plasmídico (400 ng) con 100 µl de células electrocompetentes GV3101 en una cubeta de 0,1 cm (BIORAD®), y se sometió a electroporación usando los siguientes parámetros: 200 Ω, 25 µF, y 1,5 kV (Gene Pulse, BIORAD®). Después de incubación a 26 °C en caldo Luria (LB) durante 1 hora, las células sometidas a electroporación se colocaron en placas sobre agar Luria (LA), que contenía 50 µg/ml de Rif, 30 µg/ml de Kan, y 50 µg/ml de carbenicilina (Carb), y se desarrollaron a 26 °C durante 3-4 días.

Se determinó éxito de la transformación tanto por PCR de colonias, como por análisis con enzimas de restricción. Debido al bajo número de copias del plásmido en *Agrobacterium*, el plásmido se extrajo de las colonias sometidas a electroporación exitosamente de GV3101 y se transformó en *E. coli* para obtener suficiente ADN para el análisis de restricción. Esto se logró mediante la inoculación de LB que contenía Rif, Kan, y Carb con colonias de *Agrobacterium* que habían crecido a 26 °C sobre el agar Luria. Las células competentes DH5a se transformaron con el ADN plasmídico aislado de *Agrobacterium* y se colocaron en placas sobre LA con 100 µg/ml de ampicilina incubada a 37 °C durante una noche. Se utilizaron cinco colonias de DH5a por cada colonia viable de *Agrobacterium* para inocular LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina desarrollado a 37 °C hasta la fase logarítmica. Se usaron cultivos para la preparación a pequeña escala de ADN plasmídico y se realizó un análisis de restricción por digestión para determinar si la inserción estaba presente. Se elaboraron reservas de glicerol de la colonia adecuada de *Agrobacterium*. Se elaboraron nueve cepas de *Agrobacterium* GV3101 de L2 que contenían los plásmidos: pTRA-saL2-E, pTRA-saL2-C, pTRA-saL2-P, pTRA-pL2-C, pTRA-pL2-P, pTRA-hL2-A, pTRA-hL2-C, pTRA-hL2-E, y pTRA-hL2-P (Tabla 2).

40

Líneas de plantas

Se cultivaron *Nicotiana benthamiana* de tipo silvestre en condiciones de 16 h de luz, 8 h de oscuridad a 22 ° C. Las plantas se utilizaron 14-28 días después de haber sido trasplantadas de las bandejas de siembra a macetas.

45

Preparación de *Agrobacterium* para infiltración

El protocolo de infiltración simula el proceso natural de inducción de *Agrobacterium* por acetosiringona. El medio de inducción y de infiltración contienen ambos acetosiringona, que activa los diversos genes *vir* (6). Se cultivaron cepas de *Agrobacterium* a partir de reservas de glicerol en LB con Rif, Kan, y Carb hasta una OD₆₀₀ entre 1 y 2 a 26 °C. Se centrifugó *Agrobacterium* a 5.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en medio de inducción (LB, ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico [MES] 10 mM, MgSO₄ 2 mM, acetosiringona 20 µM, pH 5,6, con Rif, Carb, y Kan) y se desarrolló hasta una OD₆₀₀ de entre 1 y 2 a 26 °C. Las células se centrifugaron a 5.000 x g

50

durante 10 min a TA y se resuspendieron en medio de infiltración (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, 2,2105 g/l de sales de Murashige Skoog [MS], 35 g/l de sacarosa, acetosiringona 150 μM, a pH 5,6). Se midió la densidad óptica de las células y se diluyó hasta una OD₆₀₀ de entre 0,4 y 1,0. Las células se incubaron durante 3 h en el medio de infiltración antes de la infiltración.

5

TABLA 2. Un resumen de las cepas de *Agrobacterium*, los vectores que se usaron, los plásmidos fabricados, las inserciones que contienen, y donde se dirige la proteína heteróloga

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Vector de <i>Agrobacterium</i>	Nombre del plásmido	Inserción	Compartimento celular dirigido
GV3101	pTRAc	pTRA-saL2-C	HPV-16 saL2	citoplasma
GV3101	pTRAc-ERH	pTRA-saL2-E	HPV-16 saL2	retículo endoplasmático
GV3101	pTRAc-rbcs1-CTP	pTRA-saL2-P	HPV-16 saL2	cloroplasto
GV3101	pTRAc	pTRA-pL2-C	HPV-16 pL2	citoplasma
GV3101	pTRAc-rbcs1-CTP	pTRA-pL2-P	HPV-16 pL2	cloroplasto
GV3101	pTRAc	pTRA-hL2-C	HPV-16 hL2	citoplasma
GV3101	pTRAc-A	pTRA-hL2-A	HPV-16 hL2	espacio apoplásico
GV3101	pTRAc-ERH	pTRA-hL2-E	HPV-16 hL2	retículo endoplasmático
GV3101	pTRAc-rbcs1-CTP	pTRA-hL2-P	HPV-16 hL2	cloroplasto
*GV3101	pTRAc	pTRA-HL1	HPV-16 HL1	citoplasma
*GV3101	pTRAc	pTRA-p19	p19	citoplasma

*Cepas de *Agrobacterium* suministradas por James MacLeau
 ORF de L2 de tipo silvestre del HPV-16 saL2.
 ORF de L2 del HPV-16 pL2 optimizado para expresión en *Nicotiana*.
 ORF de L1 de tipo silvestre del HPV-16 saL1b.
 ORF de L1 del HPV-16 hL1 optimizado para expresión en *Homo sapiens*.

Procedimiento de infiltración

10

Un gen L1 del HPV-16 optimizado de mamífero en GV3101 clonado en el vector dirigido al citoplasma (pTRA-hL1) se donó amablemente por el Dr. James McLean (UCT, Ciudad del Cabo, Sudáfrica). Las cepas de *Agrobacterium* GV3101 que contenían las construcciones L1 o L2 se infiltraron en solitario o mezcladas con cantidades iguales de GV3101 (pTRA-p19) que codifican un supresor silenciador p19; esta cepa también fue donada por el Dr. James McLean (UCT, Ciudad del Cabo, Sudáfrica). Se usaron dos protocolos de infiltración diferentes: infiltración por inyección o infiltración al vacío. Para la infiltración por inyección se utilizó una jeringa de 2 ml para inyectar el *Agrobacterium* suspendido en un medio de infiltración en los espacios aéreos abaxiales de hojas de *N. benthamiana*.

15

Para la infiltración al vacío se suspendieron plantas enteras de *N. benthamiana* en medio para infiltración que contenía las cepas de *Agrobacterium* y se colocaron en placas al vacío a 60 mbar durante 5 min. *Agrobacterium* se infiltró con la liberación del vacío. El protocolo difiere del usado por Vaquero et al. (1999) (7). Se desarraigaron las plantas enteras, se infiltraron al vacío y se plantaron de nuevo. Vaquero et al. (1999) infiltraron al vacío hojas enteras de plantas Petite Havana. El uso de plantas enteras no sólo es más fácil, sino que se pueden administrar nutrientes adicionales a las hojas para aumentar la expresión del transgén. Las plantas se incuban posteriormente a 28 °C en una habitación con control de humedad.

20

25

Extracción de proteínas y transferencias de Western

Se realizó la homogeneización moliendo el material en nitrógeno líquido. Se suspendió la muestra homogeneizada en 2 μl/mg de urea 8 M. Se separaron los restos celulares y otras moléculas más grandes por medio de dos rondas de centrifugación (10.000 x g, 10 min a TA). Se añadió el tampón de carga dodecil sulfato sódico (SDS)-PAGE a las muestras y se hirvió durante 10 minutos. Se cargó la muestra sobre SDS-PAGE al 10% y se procesó a 100 V durante ~2,5 h. La proteína se transfirió a una membrana de nylon (Nitrobind, Nitrocelulosa fundida y pura, 0,45 micrómetros, OSMONICS INC.) por medio de transferencia semiseca a 15 V, 400 mA, durante 2 h (Trans Blot@ semiseca, BioRad® con la fuente de alimentación Electrophoresis Power Supply, AMERSHAM®). El éxito de la transferencia se midió mediante tinción con azul Coomassie del gel después de la transferencia. La membrana se bloqueó durante una noche en leche desnatada al 5% suspendida en PBS con Tween-20 al 0,05%. La membrana se

30

35

incubó durante 4 horas más a temperatura ambiente con antisuero policlonal de conejo surgido contra L2 del HPV-16 (1:3.000), anticuerpos monoclonales de ratón contra L1 del HPV-16 (J4) (1:5.000). Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-conejo de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma®-Aldrich) diluidos a 1:10.000 durante 2 h a TA. La inmunodetección se realizó utilizando fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) elaborado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche® Diagnostics).

Expresiones de L2 por expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*.

10 Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* con las nueve cepas de *Agrobacterium* que contenían los diferentes ORF de L2. La expresión de L2 no pudo ser detectada por transferencia de Western de ninguna de las cepas que contenían el ORF de pL2 o el ORF de saL2 (datos no mostrados). Esto podría deberse al uso de codones como se ha publicado previamente para L1. (8) Sin embargo, se observó la expresión al expresarse a partir de cualquiera de los clones que tienen el gen hL2 (Figura 15). Se observó una expresión similar de L2 a través del conjunto de
15 vectores. Se observaron también cantidades similares de productos de degradación en los diferentes vectores. Esto indica que posiblemente L2 se localiza en la misma región de la célula de la planta a pesar de las moléculas de señalización dentro del vector. Se espera un cierto grado de protección, en particular por las proteínas dirigidas al cloroplasto. Estas cifras contradicen otros hallazgos realizados con estos vectores, por ejemplo, la expresión de L1 es notablemente menor con el vector dirigido al RE que en los vectores dirigidos al cloroplasto o al citoplasma. (Dr.
20 James MacLean, comunicación personal)

L2 parece ser altamente expresado.

El material vegetal de cada infiltración se pesó y, por lo tanto, se añadió la misma cantidad de tampón (urea 8 M).
25 Esto permite la posibilidad de determinar empíricamente el peso original del material vegetal que se cargó en una transferencia de Western (Figura 3). Esta inmunotransferencia mostró que L2 aún se puede detectar hasta 0,4 mg del material vegetal original. Sólo podemos especular la cantidad de L2 que está presente en relación con la proteína soluble total, se intentó un nuevo análisis por ELISA, pero fracasó debido a que sólo un anticuerpo policlonal estaba disponible.

30

Coexpresión de L1 y L2 en la misma región.

L2 y L1 se coinfiltraron simultáneamente en plantas de *N. benthamiana*. La expresión tanto de L1 como de L2 pudo ser detectada en estas muestras de hojas, sin embargo, a partir de estos resultados, no es concluyente si L1 y L2 se
35 expresan en la misma célula. La bibliografía sugiere que es más que probable que se expresen en la misma célula, habiéndose probado con expresión de anticuerpos con múltiples subunidades que las forman (29)

Se ha mostrado que las respuestas inmunes contra L1 producen anticuerpos de tipo específico, con el advenimiento de la vacunas contra el VPH de GSK y HPV, esto ha abierto el camino para vacunas de segunda generación que
40 muy probablemente incorporarán L2 y sus propiedades de neutralización cruzadas. La producción de proteínas heterólogas, y en particular vacunas de subunidades en las plantas, ha demostrado ser más rentable que otros sistemas de expresión. En conclusión, una unión de estos dos ideales sencillos pero importantes podría conducir a lo más necesario en la lucha contra el cáncer del cuello del útero: una vacuna barata y eficaz.

Ejemplo 4

Proteína quimérica L1 del VPH expresada a altos niveles

El método descrito en el documento WO2003/097673 se usa para la expresión de alto nivel de proteínas quiméricas
50 L1 del VPH como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

FIGURAS

La memoria descriptiva debe leerse con referencia a las siguientes figuras, en las que:

55

- La Figura 1 muestra vectores de *Agrobacterium* pTRAc, pTRAc-rbcs1-cTP y pTRAc-ERH.
- La Figura 2 muestra L1 del HPV-16 optimizado por codón humano (HL1) (SEQ ID NO. 13).
- La Figura 3 muestra L1 del HPV-16 optimizado por codón humano (SYNL1) (SEQ ID NO. 14).
- La Figura 4 muestra una transferencia tipo Western de muestras de hojas de *N. benthamiana* después de la

infiltración con *Agrobacterium* que lleva el gen L1 del HPV-16. Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* por inyección con una construcción de *Agrobacterium*-L1, o se coinfiltraron con *Agrobacterium*-L1 y *Agrobacterium* (pBIN-NSs). La transferencia de Western se realizó sobre extractos en bruto de hoja 6 días después de la infiltración, usando el anticuerpo monoclonal L1 anti-HPV-16 de H16.J4. Las muestras en los carriles 1-5 eran de hojas infiltradas con *Agrobacterium* que llevaba los siguientes vectores: 1, pTRACTP-GFP; 2, pTRA-HL1; 3, pBIN-NSs y pTRA-HL1; 4, pTRACTP-HL1; 5, pBIN-NSs y pTRACTP-HL1.

La Figura 5 muestra la detección de L1 en muestras de hojas de *N. benthamiana* después de la infiltración con *Agrobacterium* que lleva el gen L1 del HPV-16. Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron por inyección con una construcción de *Agrobacterium*-L1, o se coinfiltraron con *Agrobacterium*-L1 y *Agrobacterium* (pBIN-NSs). Seis días después de la infiltración se evaluaron los extractos en bruto de hojas por medio de un ELISA de captura de H16.V5.

La Figura 6 muestra una micrografía electrónica del extracto en bruto de la planta de *N. benthamiana* después de la infiltración con GV3101 (pTRACTP-HL1). Las VLP se indican por las flechas.

La Figura 7 muestra los miligramos de L1 del HPV-16 producidos en las plantas por agroinfiltración. Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron en una mezcla de una construcción de *Agrobacterium*-L1, *Agrobacterium* (pBIN-NSs), y *Agrobacterium* (pTRA-GFP). Seis días después de la infiltración, los extractos en bruto de hojas se evaluaron por medio de análisis ELISA de captura de mAb H16.V5 y H16.J4. El nivel de L1 expresado como un % de la proteína soluble total (TSP) se muestra para construcciones específicas.

La Figura 8 muestra los títulos de anticuerpo sistémico específicos de VLP del HPV-16 inducidos en ratones BALB/c después de una sola inmunización con un extracto en bruto de planta/HL1. Tres días después de que se infiltraran al vacío plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* con *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y *Agrobacterium* (pBIN-NSs), se produjeron extractos de planta concentrados y se usaron con ratones inmunizados. Se inmunizaron los grupos de control dos veces con 10 µg de las VLP producidas en baculovirus, o una vez con 1 µg de las VLP producidas en baculovirus. Se tomaron sueros 4 semanas después de la inmunización, se diluyeron en serie (agrupados por cada grupo de ratones) y se usaron en un ELISA contra VLP de HPV-16. Los valores de OD 492 nm se midieron y los resultados se registraron como el recíproco de la dilución más alta donde la OD es >2x la del sangrado previo.

La Figura 9 muestra los miligramos de L1 del HPV-16 L1 producidos por kg de material vegetal transgénico. Las plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* se transformaron con *Agrobacterium* que llevaba el gen L1 del HPV-16. L1 se detectó en extractos en bruto de hojas por medio de los ELISA de captura de los mAb H16.V5 y H16.J4. El nivel de L1 expresado como un % de TSP se muestra para construcciones específicas.

La Figura 10 muestra un gen HA del gen de longitud completa optimizado por codón humano (H5, 1704 pb) del virus de la influenza A/VietNam/1194/2004 (H5N1) (acceso al GenBank n.º AY651333) (SEQ. ID NO. 15).

La figura 11 muestra un gen HA optimizado por codón humano truncado en 23 aminoácidos (H5tr, 1635 pb). H5tr se truncó desde el nucleótido 1597-1665 para eliminar su dominio de anclaje a la membrana (SEQ. ID NO. 16).

La Figura 12 muestra la predicción de transmembrana para el gen H5 (CBS Prediction Servers, <http://www.cbs.dtu.dk>).

La Figura 13 muestra la transferencia de Western de muestras de hojas de *N. benthamiana* después de la infiltración con *Agrobacterium* que llevaba de los genes H5 o H5tr. Las muestras de *Agrobacterium* fueron las siguientes: 1, pTRA-H5; 2, pTRA-H5tr; 3, pTRACTP-H5; 4, pTRACTP-H5tr; 5, pTRAERH-H5; 6, pTRAERH-H5tr. El carril 7 contenía extracto no infiltrado de *N. benthamiana*.

La Figura 14 muestra los vectores de *Agrobacterium* utilizados en este estudio, concretamente, pTRAc, pTRAc-ERH, pTRAc-rbcs1-cTP, y pTRAc-A. La barra de color azul claro indica el ADN-T que se transfiere a la célula de la planta en la transfección. El gen heterólogo se clona en los vectores en el sitio de clonación múltiple (MCS). Los vectores comparten varias características comunes indicadas por las regiones en gris. La región del ADN-T está flanqueada por el borde izquierdo (LB) y el borde derecho (RB). En cada extremo del MCS hay regiones de unión del andamiaje (SAR). La expresión del transgén se controla por un promotor dual 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (P35SS CaMV) con la unión de la señal de poliadenilación del mismo gen del CaMV (pA35S). La replicación del vector en *Agrobacterium* se inicia en el ori RK2. Se usa un sitio separado de inicio de la replicación, ColE1, en *E. coli*. El vector pTRAc contiene sólo un marcador de resistencia a antibióticos (*bla*) que permite la selección con ampicilina/carbenicilina. Los pTRAc-ERH, pTRAc-A, y pTRAc-rbcs1-cTP contienen un segundo marcador de antibiótico (*nptII*) que permite la selección con kanamicina en plantas. El gen *nptII* se controla por el promotor del gen de *Agrobacterium* nopalina sintasa (Pnos), el poliadenilación del mismo gen se une a *nptII* (pAnos). pTRAc-ERH adicionalmente incluye una señal de secreción (LPH), una secuencia de la etiqueta His (His6) y una secuencia de la señal de retención del retículo endoplasmático (KDEL) aguas

abajo del MCS. pTRAc-rbcs1-cTP incluye una secuencia del péptido de señalización de cloroplasto (rbcs1-cTP) aguas arriba del MCS.

La Figura 15 muestra que la expresión de L2 puede ser detectada con cada uno de los cuatro vectores. *N. benthamiana* se infiltró de forma transitoria con la misma OD de *Agrobacterium* que contenía los diferentes vectores que tienen el gen L2 humanizado. Estos son pTRA-hL2-A (hL2-A), pTRA-hL2-C (hL2-C), pTRA-hL2-E (hL2-E), y pTRA-hL2-P (hL2-P). Como control negativo, el material de la planta que no se había infiltrado con *Agrobacterium* también se extrajo (-ve). Se usó L2 del HPV-16 expresado por *E. coli* como control positivo (+ ve). Se extrajo material de la planta después de dos días (A) y cinco días (B) y se inmunotransfirió. Se sondaron las transferencias de Western usando pAb- α L2 de conejo.

La Figura 16 muestra una cuantificación en bruto de la cantidad de L2 presente en el material de la hoja después de la infiltración. Se infiltró *N. benthamiana* con la cepa de *Agrobacterium* que contenía el vector pTRA-hL2-C. Se extrajo el material de la planta cuatro días después de la infiltración. Se determinaron empíricamente diferentes cantidades de material de la hoja (8 mg, 0,8 mg y 0,4 mg) y se cargaron en un Western. Se sondaron las transferencias de Western usando pAb- α L2 de conejo.

La Figura 17 muestra que L1 y L2 se coexpresan en la misma región. Se infiltró *N. benthamiana* con la misma OD de *Agrobacterium* que contenía el gen L1 humanizado dirigido al citoplasma mezclado y coinfiltrado con *Agrobacterium* que contenía el gen L2 humanizado en el vector dirigiendo también la proteína al citoplasma. Se extrajo el material de la planta que se coinfiltró después de cuatro días y se inmunotransfirió (L1/L2). Se usó material vegetal no infiltrado como control negativo (-ve). Se cargó L2 expresado en *E. coli* y se procesó como un control positivo. Las inmunotransferencias se sondearon con mAb de ratón J4 (α L1) o con Ab- α L2 policlonal de conejo (α L1).

En esta memoria descriptiva, cuando se describe o bien se expone cualquier secuencia de acuerdo con la divulgación, la divulgación pretende abarcar secuencias de al menos un 75% de homología, más preferiblemente al menos un 77% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 80% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 82% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 85% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 87% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 90% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 92% de homología, incluso más preferiblemente al menos un 95% de homología, mucho más preferible al menos un 97% de homología.

Las siguientes referencias se incluyen en el presente documento.

- Chun-Yuan, H and Suarez D.L. (1999): Expression of recombinant influenza virus antigens in transgenic plants as an oral vaccine for poultry", FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 13, no. 4, PART 1. Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., and Angenon, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122, 101-108. Pastrana, D. V., Buck, C. B., Pang, Y. Y., Thompson, C. D., Castle, P. E., FitzGerald, P. C., Kruger, K. S., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2004). Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* 321, 205-216.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. E. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York.)
- Shen, W. J. and Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 17, 8385.
- Somers, D. A. and Makarevitch, I. (2004). Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 126-131.
- Studentsov, Y. Y., Schiffman, M., Strickler, H. D., Ho, G. Y., Pang, Y. Y., Schiller, J., Herrero, R., and Burk, R. D. (2002). Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1755-1760.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett.* 532, 75-79.
- Twyman, R. M. (2004). Host Plants, Systems and Expression Strategies of Molecular Farming. In 'Molecular Farming'. (Eds. R. Fischer and S. Schillberg.) pp. 191-216. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.)
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449-459.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949-956.
- Zhou, J., Doorbar, J., Sun, X. Y., Crawford, L., Mclean, C. S., and Frazer, I. H. (1991). Identification of the

Nuclear Localisation Signal of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein. *Virology* 185, 625-632.

Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., and Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23, 11-28. Pagny, S., P. Lerouge, L. Faye, and V. Gomord. 1999. Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* 50(331): 157-164

Cline, K. and R. Henry. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. 1996. *Annu. Rev. of Cell Dev. Biol.* 12: 1-26

Nowak, W., M. Gawtowska, A. Jarmolowski, and J. Augustyniak. 2001. Effect of nuclear attachment regions on transgene expression in tobacco plants. *Acta Biochim Pol.* 48(3): 637-646

Rukatsova, E., O. Zolova, N. Buryanova, V. Borisova, V. Bykova, and Y. Buryanova. 2003. *Russ. J. Genet.* 39(1): 41-45

Koncz, C. and J. Schell. 1986. The Promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396

Vaquero, C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, F. Schuster, M. Monecke, S. Schillberg, and R. Fischer. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11128-11133

Biemelt, S., U. Sonnemald, P. Galmbacher, L. Willmitzer, and M. Müller. 2003. Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in Transgenic Plants. *J. Virol.* 77(17): 9211-9220

20 Diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención se describen con referencia a los siguientes párrafos numerados ("par.").

1. Un método para producir polipéptidos del VPH y/o un polipéptido H5 del virus de influenza en una planta que comprende las etapas de:

- clonar un gen de VPH y/o un gen del virus de influenza H5 o un ácido nucleico que codifica sus equivalentes funcionales en un vector adaptado para dirigir los componentes presentes en la planta;
- infiltrar al menos una porción de la planta con el vector o transformar el tejido vegetal con el vector para expresar de forma transitoria los polipéptidos del VPH y/o un polipéptido del virus de influenza H5, y/o para crear una planta transgénica; y
- recuperar los polipéptidos del VPH y/o un polipéptido H5 del virus de influenza expresado por la planta.

2. Un método de acuerdo con el par. 1, en el que los polipéptidos del VPH se seleccionan del grupo que consiste en una proteína L1 del VPH; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a otro péptido antigénico del VPH; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a un péptido heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, proteína específica de linfocitos B o de linfocitos T y una proteína L2 del VPH o sus equivalentes funcionales.

3. Un método de acuerdo con cualquiera de los par. 1 y 2, en el que los componentes de la planta se seleccionan del grupo que consiste en pastos, retículos endoplasmáticos, citoplasma y apoplastos.

4. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que las secuencias de direccionamiento están incluidas en el vector.

5. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior, en el que el vector incluye promotores y otros reguladores, o similares, unidos operativamente a la secuencia de codificación del vector.

6. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior, en el que los vectores son vectores binarios.

7. Un método de acuerdo con el par. 6 en el que los vectores son vectores binarios de *Agrobacterium tumefaciens*.

8. Un método de acuerdo con el par. 2 en el que el gen L1 del VPH; el gen L1 quimérico del VPH fusionado a otro gen del antígeno del VPH; el gen L1 quimérico del VPH fusionado a un gen heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, específico de linfocitos B o linfocitos T; el gen L2 del VPH; o el virus H5 del virus de influenza es un gen optimizado.

9. Un método de acuerdo con el par. 8 en el que el gen optimizado es optimizado por codones humanos, optimizado por codones BCG u optimizado por codones vegetales.

10. Un método de acuerdo con el par. 2 en el que el gen L1 del VPH o los genes de las quimeras L1 del VPH se modifican para que sean deficientes en la señal de localización nuclear.

11. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior que incluye además la etapa de coinfiltración de la planta con una proteína supresora adaptada para inhibir el silenciamiento génico post-transcripcional en una planta.

12. Un método de acuerdo con el par., en el que la proteína supresora es la proteína NSs del virus del marchitamiento moteado del tomate o el p19 del virus de la atrofia del follaje del tomate.
13. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que los plastos se seleccionan de cloroplastos, cromoplastos y leucoplastos.
- 5 14. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que la infiltración se realiza mediante inyección directa o mediante vacío.
15. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que la infiltración y/o transformación de la planta se logra con *Agrobacterium tumefaciens* que se ha transformado para aceptar el vector.
- 10 16. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que la planta se selecciona de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*.
17. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que la infiltración se realiza sobre las hojas de la planta.
18. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que la infiltración de inyección directa se realiza en la región abaxial de la hoja.
- 15 19. Un método de acuerdo con cualquier par. anterior en el que el gen del VPH y/o el gen H5 del virus de influenza o el ácido nucleico que codifica sus equivalentes funcionales se seleccionan de las SEQ ID NOS. 13, 14, 15 y 16.
- 20 20. Un método para producir un polipéptido del VPH /o un polipéptido H5 del virus de influenza en una planta en la que sustancialmente toda la planta se infiltra con un vector adecuado por medio de infiltración al vacío.
21. Un polipéptido de HPV y/o un polipéptido H5 del virus de influenza siempre que se produzca de acuerdo con un método de uno cualquiera de los par. 1 a 20.
22. Uso de un vector en el que se ha clonado un gen del VPH y/o un gen H5 del virus de influenza, cuyo vector se adapta para dirigir componentes presentes en una planta, para producir una planta transgénica capaz de expresar polipéptidos del VPH y/o polipéptidos H5 del virus de influenza.
- 25 23. Un vector en el que se ha clonado un gen del VPH y/o un gen H5 del virus de influenza, cuyo vector se adapta para dirigir componentes presentes en una planta, para producir una planta transgénica capaz de expresar polipéptidos del VPH y/o polipéptidos H5 del virus de influenza.
24. Una vacuna profiláctica o terapéutica que consiste en un polipéptido del VPH o un polipéptido H5 del virus de influenza capaz de inducir una respuesta inmune en un huésped adecuado, siempre que se produzca mediante un método de uno cualquiera de los par. 1 a 20.
- 30 25. Una planta transgénica, parte o progenie de la misma que contiene una célula capaz de expresar un polipéptido del VPH y/o un polipéptido H5 del virus de influenza.
26. Un método sustancialmente como se ha descrito o ilustrado anteriormente en el presente documento.
- 35 27. Un polipéptido del VPH y/o un polipéptido H5 del virus de influenza sustancialmente como se ha descrito o ilustrado anteriormente en el presente documento.
28. Uso de un vector en el que se ha clonado sustancialmente un gen del VPH y/o un gen H5 del virus de influenza, como se ha descrito o ilustrado anteriormente en el presente documento.
- 40 29. Un vector en el que se ha clonado sustancialmente un gen del VPH y/o un gen H5 del virus de influenza, como se ha descrito o ilustrado anteriormente en el presente documento.
30. Una vacuna profiláctica o terapéutica sustancialmente como se ha descrito o ilustrado anteriormente en el presente documento.
- 45 31. Una planta transgénica, parte o progenie de la misma sustancialmente como se ha descrito o ilustrado anteriormente en el presente documento

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un polipéptido H5 del virus de influenza en una planta que comprende las etapas de:
- 5
- i) clonar un gen del virus de influenza H5 o ácido nucleico que codifica un polipéptido H5 en un vector adaptado para dirigir un componente presente en la planta, en el que el componente de la planta es el retículo endoplasmático;
 - 10 ii) infiltrar al menos una porción de la planta con el vector o transformar el tejido vegetal con el vector para expresar de forma transitoria el polipéptido del virus de influenza H5; y
 - iii) recuperar el polipéptido H5 del virus de influenza expresado por la planta.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una o más secuencias de direccionamiento que codifican un polipéptido para dirigir el polipéptido H5 del virus de influenza desde el citoplasma al componente
- 15 de la planta, están incluidas en el vector.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el vector incluye promotores y otros reguladores, o similares, unidos operativamente a la secuencia de codificación del vector.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que los vectores son vectores binarios preferiblemente vectores binarios de *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el gen H5 del virus de influenza es un gen optimizado para el uso de codones, preferiblemente un gen optimizado para el uso de codones humanos,
- 25 optimizado para el uso de codones BCG u optimizado para el uso de codones vegetales.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que incluye además una etapa de coinfiltración de la planta con una proteína supresora adaptada para inhibir el silenciamiento génico post-transcripcional en una planta, tal como la proteína NSs del virus del marchitamiento moteado del tomate o el p19 del
- 30 virus de la atrofia del follaje del tomate.
7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la infiltración se realiza mediante inyección directa o mediante vacío.
- 35 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la infiltración y/o transformación de la planta se logra con *Agrobacterium tumefaciens* que se ha transformado para aceptar el vector.
9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la planta se selecciona de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*.
- 40 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen H5 del virus de influenza o el ácido nucleico que codifica un equivalente funcional del mismo, se selecciona de las secuencias que se exponen en las Figuras 10 y 11.
- 45 11. Un método de acuerdo con cualquiera reivindicación anterior, en el que la infiltración se realiza sobre las hojas de la planta, preferiblemente en el que la infiltración se realiza por inyección directa en la región abaxial de la hoja.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que sustancialmente
- 50 toda la planta se infiltra con un vector adecuado por medio de infiltración al vacío.
13. Uso de un vector en el que se ha clonado un gen H5 del virus de influenza o un ácido nucleico que codifica un polipéptido H5, cuyo vector está adaptado para dirigir el polipéptido H5 al retículo endoplasmático en una planta para expresar transitoriamente el polipéptido H5 del virus de influenza en el citoplasma y luego importar el
- 55 polipéptido H5 del virus de influenza al retículo endoplasmático.

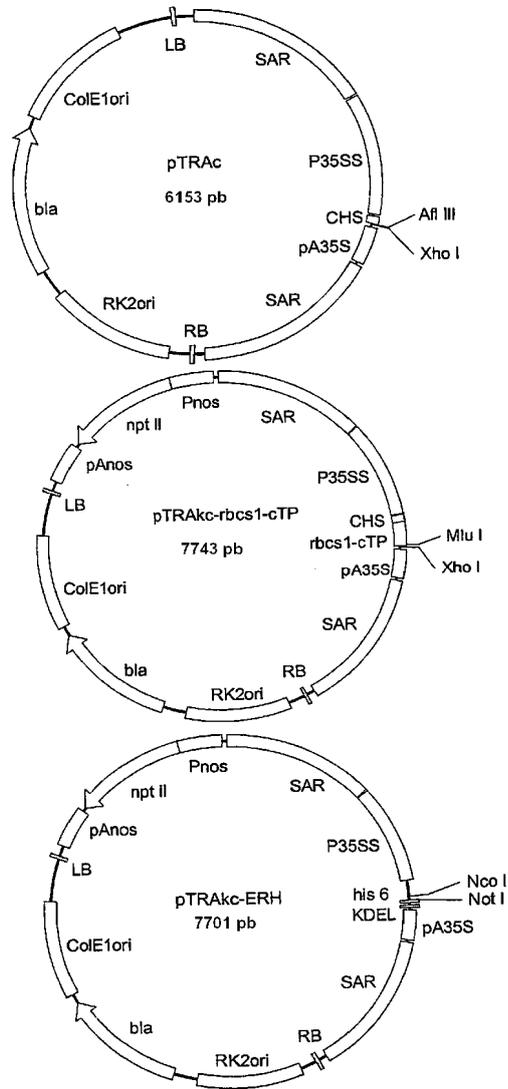


Figura 1.

```

1      ATGTCCTGT  GGCTGCCAG  CGAGGCCACC  GTGTACCTGC  CCCCCGTGCC  CGTGAGCAAG
61     GTGGTGAGCA  CCGATGAGTA  CGTGGCCCCG  ACCAACATCT  ACTACCACGC  CGGCACCTCC
121    AGACTGCTGG  CCGTGGGCCA  CCCCTACTTC  CCCATCAAGA  AGCCCAACAA  CAACAAGATC
181    CTGGTGCCCA  AGGTGAGCGG  CCTGCAATAC  CGGGTGTTC  GAATCCACCT  GCCCGACCCC
241    AATAAGTTCG  GCTTCCCCGA  CACCAGCTTC  TACAACCCCG  ACACCCAGAG  ACTGGTGTGG
301    GCCTGCCTGG  GCGTGGAGGT  GGGCAGAGGC  CAGCCTCTGG  GCGTGGGCAT  CAGCGGCCAC
361    CCTCTGCTGA  ACAAGCTGGA  CGACACCGAG  AACGCCAGCG  CCTACGCCGC  CAACGCCGGC
421    GTGGATAACA  GAGAATGCAT  CAGCATGGAC  TACAAGCAGA  CCCAGCTGTG  CCTCATCGGC
481    TGCAAGCCCC  CCATCGGCGA  GCACTGGGGC  AAGGGCAGCC  CCTGCACCAA  CGTGGCCGTG
541    AATCCTGGCG  ACTGTCCCTC  CCTGGAACTC  ATCAACACCG  TGATCCAGGA  CGGCACATG
601    GTGGACACCG  GCTTCGGCGC  CATGGACTTC  ACCACCCTCC  AGGCCAATAA  GAGCGAGGTG
661    CCCCTGGACA  TCTGCACCAG  CATCTGCAAG  TACCCCGACT  ACATCAAGAT  GGTGAGCGAG
721    CCTACGGCG  ATAGCCTGTT  CTTCTACCTG  CGGCGGGAGC  AGATGTTCGT  GCGGCACCTG
781    TTCAACAGAG  CCGGCACCGT  GGGCAGAAAC  GTGCCCGACG  ACCTGTACAT  CAAGGGCAGC
841    GGCAGCACCG  CCAACCTGGC  CAGCAGCAAC  TACTTCCCTA  CCCCCAGCGG  CTTCCATGGT
901    ACCAGCGACG  CCCAGATCTT  CAACAAGCCC  TACTGGCTCC  AGAGAGCCCA  GGGCCACAA
961    AATGGCATCT  GCTGGGGCAA  CCAGCTGTT  GTGACCGTGG  TGATACCAC  CCGGAGCACC
1021   AACATGTCCC  TGTGCCCGCG  CATCAGCACC  AGCGAGACCA  CCTACAAGAA  CACCAACTTC
1081   AAGGAGTACC  TGAGGCACGG  CGAGGAGTAC  GACCTCCAGT  TCATCTTCCA  GCTGTGCAAG
1141   ATCACCTCA  CCGCCGACGT  GATGACCTAC  ATCCACAGCA  TGAACAGCAC  CATCCTGGAG
1201   GACTGGAACT  TCGGCCGTGA  GCCCCTCTCT  GGGGGCACCC  TGGTGGAGGA  GACCAGCTTC
1261   ATCGACGCGG  GAGCCCCCGC  ATGCCAGAA  CACACCCTCC  CCGCCCTTAA  GGAGGACCCC
1321   CTGAAGAAGT  ACACCTTCTG  GAGGTGAAC  CTGAAGGAGA  AGTTCAGCGC  CGAGCTGGAC
1381   CAGTTCCTCC  TGGGCAGAAA  GTTCTGCTG  CAAGCCGGCC  TGAAGGCCAA  GCCTAAGTTC
1441   ACCTGGGCA  AGAGAAAGGC  CACCCACC  ACAAGCAGCA  CCAGCACCA  CGCCAAGCGG
1501   AAGAAGCGCA  AGCTGTGA

```

Figura 2.

```

1      ATGAGCCTTT  GGCTCCCTAG  CGAGGCCACT  GTCTACCTCC  CTCTGTGCC  AGTGTCTAAG
61     GTGGTGAGCA  CTGATGAGTA  TGTGGCAAGG  ACCAACATCT  ACTACCATGC  AGGAACCTCT
121    AGGCTCCTTG  CAGTGGGACA  CCCCTACTTC  CCTATCAAGA  AGCCTAACAA  CAACAAGATC
181    TTGGTGCCTA  AGGTGTCAGG  ACTCCAATAT  AGGGTGTTTA  GAATCCACCT  CCCTGACCCC
241    AACAAGTTTG  GTTCCCTGTA  CACTCCTTC  TACAACCCAG  ACACCCAAAG  GTTGGTGTGG
301    GCATGTGTGG  GTGTGGAGGT  GGGTAGGGGT  CAACCATGG  GTGTGGGCAT  CTCTGGCCAC
361    CCTCTCCTCA  ACAAGTTGGA  TGACACAGAG  AATGCTTCTG  CTTATGCAGC  AAATGCAGGT
421    GTGGACAATA  GGGAGTGAT  CTCTATGGAC  TACAAGCAA  CCAATTTGTG  CCTCATTTGT
481    TGAAGCCAC  CTATTGGAGA  GCATTGGGGC  AAGGGATCCC  CATGCACTAA  TGTGGCAGTG
541    AACCCAGGTG  ATTGCCACC  ATTGGAGCTT  ATCAACACAG  TGATCCAAGA  TGGTGCATG
601    GTGGACACTG  GCTTTGGTGC  TATGGACTTC  ACTACCCTCC  AAGCTAACAA  GTCTGAGGTG
661    CCATTGGACA  TTTGCACCTC  TATTTGCAAG  TACCCAGACT  ACATCAAGAT  GGTGTCAGAG
721    CCATATGGAG  ATAGCCTCTT  CTTCTACTTG  AGGAGGGAGC  AAATGTTTGT  GAGGCACCTC
781    TTCAATAGGG  CTGTAAGTGT  GGGTGAGAA  GTGCCAGATG  ACCTCTACAT  CAAGGGCTCT
841    GGATCTACTG  CAAACTTGGC  AAGCTCCAAC  TACTTCCCTA  CCCCTTCTGG  TTCTATGGTG
901    ACCTCTGATG  CCCAAATCTT  CAACAAGCCT  TATTGGCTCC  AAAGGGCACA  AGGCCACAAC
961    AATGGCATT  GTTGGGGTAA  CCAACTCTTT  GTGACTGTGG  TGGACACTAC  AAGGACACCC
1021   AACATGTCC  TGTGTGCTGC  CATCTCTACT  TCAGAGACTA  CCTACAAGAA  CACTAACTTC
1081   AAGGAGTACC  TTAGGCATGG  AGAGGAGTAT  GACCTCCAAT  TCATCTTCCA  ATTGTGCAAG
1141   ATCACCTCA  CTGCAGATGT  GATGACCTAC  ATCCACTCTA  TGAACCTCAC  TATCTTGGAG
1201   GATTGGAAC  TTGGTCTCCA  ACCTCCCCA  GGAGGCACCT  TGGAGGACAC  TTATAGGTTT
1261   GTGACCTCC  AAGCAATFGC  TTGCCAAAAG  CACACCCTCC  CAGCACCTAA  GGAGGACCCC
1321   CTTAAGAAGT  AACTTTTGG  GGAGGTGAAC  CTCAAGGAGA  AGTTCCTGTC  TGACTTGGAC
1381   CAATTCCTT  TGGGAAGGAA  GTTCTCTCT  CAAGCAGGAC  TCAAGGCCAA  GCCAAGTTC
1441   ACCTTGGGAA  AGAGGAAGGC  TACCCACC  ACCTCTCTA  CCTTACCAC  TGCTAAGAGG
1501   AAGAAGAGGA  AGCTCTAA

```

Figura 3.

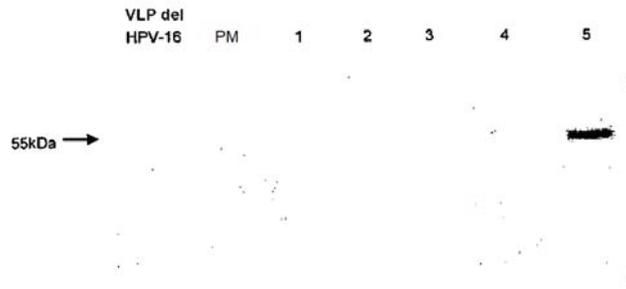


Figura 4.

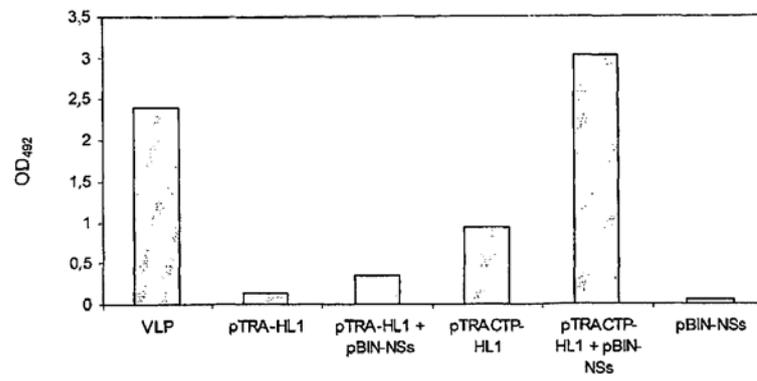


Figura 5.

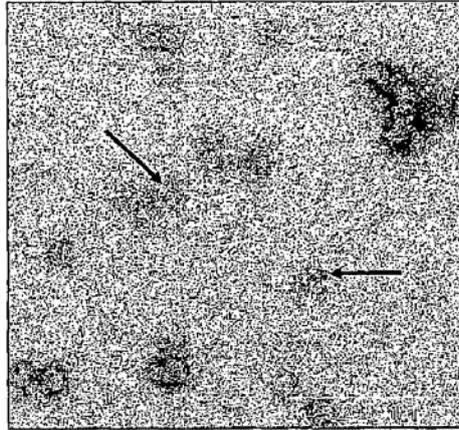


Figura 6.

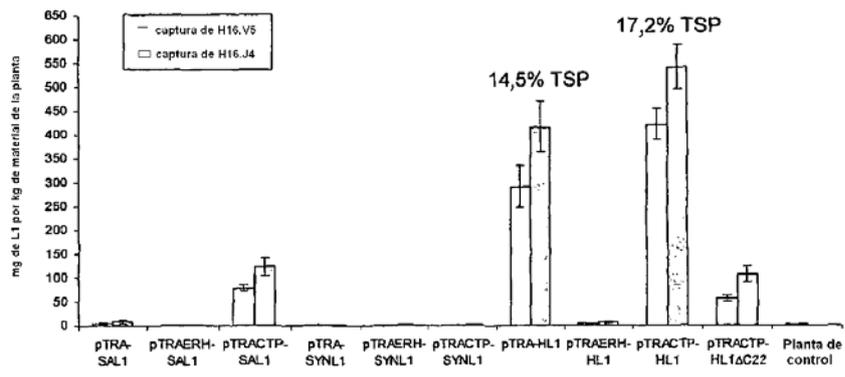


Figura 7.

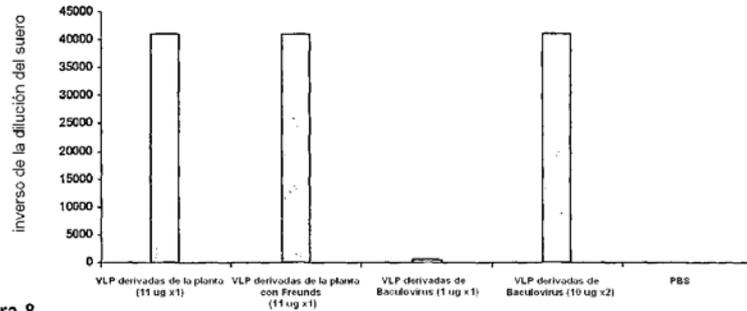


Figura 8.

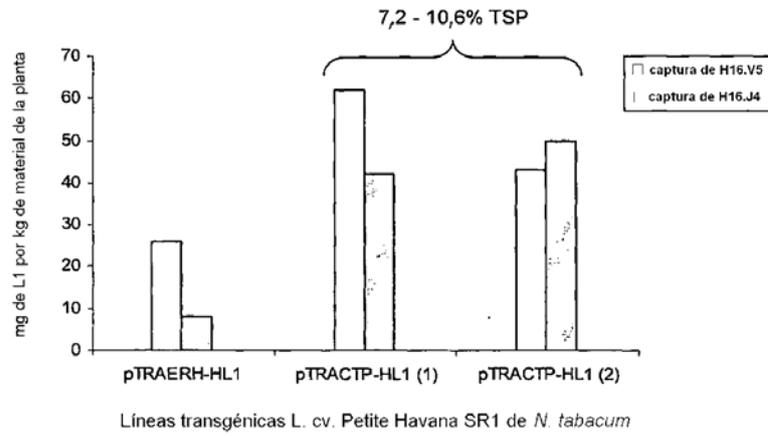


Figura 9.

H5

```

1      GGTACCGGAT CCACGCGTTA GGTCCATGGA AAAGATCGTG CTGCTGTTCG CCATCGTGAG
61     CCTGGTGAAG AGCGACCAGA TCTGCATCGG CTACCACGCC AACCAACAGCA CCGAGCAGGT
121    GGACACCATC ATGGAAAAAA ACGTGACCGT GACCCACGCC CAGGACATCC TGGAAAAAGAC
181    CCACAACGGC AAGTGTGCG ACCTGGACGG CGTGAAGCCC CTGATCCTGC GGGACTGCAG
241    CGTGGCCGGC TGGTGTCTGG GCAACCCCAT GTGCGACGAG TTCATCAACG TGCCCGAGTG
301    GAGCTACATC GTGGAGAAGG CCAACCCCGT GAACGACCTG TGCTACCCCG GCGACTTCAA
361    CGACTACGAG GAACTGAAGC ACCTGCTGTC CCGGATCAAC CACTTCGAGA AGATCCAGAT
421    CATCCCAAG AGCAGCTGGT CCAGCCACGA GGCCAGCCTG GCGGTGAGCA GCGCCTGCC
481    ATACCAGGGC AAGTCCAGCT TCTTCCGAA CGTGGTGTGG CTGATCAAGA AGAACAGCAC
541    CTACCCACC ATCAAGCGGA GCTACAACAA CACCAACCAG GAAGATCTGC TGGTCTGTG
601    GGGCATCCAC CACCCCAACG ACGCCGCCGA GCAGACCAAG CTGTACCAGA ACCCCACCAC
661    CTACATCAGC GTGGGCACCA GCACCTGAA CCAGCGGCTG GTGCCCGGA TCGCCACCCG
721    GTCCAAGGTG AACGGCCAGA GCGCCGGAT GGAATTTTTC TGGACCATCC TGAAGCCCAA
781    CGATGCCATC AACTTCGAGA GCAACGGCAA CTTCATCGCC CCCGAGTACG CCTACAAGAT
841    CGTGAAGAAG GCGGACAGCA CCATCATGAA GAGCGAGCTG GAATACGGCA ACTGCAACAC
901    CAAGTGCCAG ACCCCTATGG CCGCCATCAA CAGCAGCATG CCCTCCACA ACATCCACCC
961    CCTGACCATC GCGGAGTGCC CCAAGTACGT GAAGAGCAAC AGGCTGGTGC TGGCCACCGG
1021   CCTGCGGAAC AGCCCCCAGC GGGAGCGGCG GAGGAAGAAG CGGGGCCTGT TCGGCGCCAT
1081   CGCCGGCTTC ATCGAGGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGGAC GGGTGGTACG GCTACCACCA
1141   CAGCAATGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCG CGACAAGAG AGCACCCAGA AGGCCATCGA
1201   CGGCTCACC AACAGGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG AACACCCAGT TCGAGCCCGT
1261   GGGCCGGGAG TTCACAACC TGGAACGGCG GATCGAGAAC CTGAACAAGA AAATGGAAGA
1321   TGGCTTCTG GACGTGTGGA CCTACAACGC CGAGCTGCTG GTGCTGATGG AAAACGAGCG
1381   GACCCTGGAC TTCACAGACA GCAACGTGAA GAACCTGTAC GACAAGTGC GGCTGCAGCT
1441   GCGGGACAAC GCCAAGAGC TGGCAACGG CTGCTTCGAG TTCTACCACA AGTGGACAA
1501   CGAGTGCATG GAAAGCGTGC GSAACGGCAC CTACGACTAC CCCAGTACA GCGAGGAAGC
1561   CCGGCTGAAG CGGGAGGAAA TCAGCGGCGT GAAACTGGAA AGCATCGGCA TCTACCAGAT
1621   CCTGAGCATC TACAGCACCG TGGCCAGCAG CCTGGCCCTG GCCATCATGG TGGCCGGCCT
1681   GAGCTGTGG ATGTGCAGCA ACGGCAGCCT GCAGTGTAGA GCGCCCGCAT AATCTAGAGA
1741   GCTC
    
```

Figura 10.

H5tr

```

1      GGTACCGGAT CCACGCGTTA GGTCCATGGA AAAGATCGTG CTGCTGTTCG CCATCGTGAG
61     CCTGGTGAAG AGCGACCAGA TCTGCATCGG CTACCACGCC AACACACGCA CCGAGCAGGT
121    GGACACCATC ATGGAAAAAA ACGTGACCGT GACCCACGCC CAGGACATCC TGGAAAAGAC
181    CCACAACGGC AAGCTGTGCG ACCTGGACGG CGTGAAGCCC CTGATCCTGC GGGACTGCAG
241    CSTGGCCGGC TGGCTGTGCG GCAACCCCAT GTGCGACGAG TTCATCAACG TGCCCGAGTG
301    GAGCTACATC GTGGAGAAGG CCAACCCCGT GAACGACCTG TGCTACCCCG GCGACTTCAA
361    CCACTACGAG GAACTGAAGC ACCTGCTGTC CCGGATCAAC CACTTCGAGA AGATCCAGAT
421    CATCCCCAAG AGCAGCTGGT CCAGCCACGA GGCCAGCCTG GGGCTGAGCA GCGCCTGCCC
481    ATACCAGGGC AAGTCCAGCT TCTTCCGGAA CGTGGTGTGG CTGATCAAGA AGAACAGCAC
541    CTACCCACCC ATCAAGCGGA GCTACAACAA CACCAACCAG GAAGATCTGC TGGTCTCTGTG
601    GGGCATCCAC CACCCCAACG ACGCCGCCGA GCAGACCAAG CTGTACCAGA ACCCCACCAC
661    CTACATCAGC GTGGGCACCA GCACCTGAA  CCAGCGGCTG GTGCCCGGA  TCGCCACCCG
721    FTCCAAGGTG AACGGCCAGA GCGGCCGGAT GGAATTTTTC TGGACCATCC TGAAGCCCAA
781    CGATGCCATC AACTTCGAGA GCAACGGCAA CTTTCATCGCC CCCGAGTACG CCTACAAGAT
841    CGTGAAGAAG GGGACAGCA  CCATCATGAA GAGCGAGCTG GAATACGGCA ACTGCAACAC
901    CAAGTGCCAG ACCCCTATGG GCGCCATCAA CAGCAGCATG CCCTTCCACA ACATCCACCC
961    CCTGACCAFC GGGGAGTGCC CCAAGTACGT GAAGAGCAAC AGGCTGGTGC TGGCCACCCG
1021   CCTGCCGAAC AGCCCCAGC  GGGAGCGGCG GAGGAAGAAG CGGGGCCTGT TCGGCGCCAT
1081   CGCCGGCTTC ATCAGAGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGGAC GGGTGGTACG GCTACCACCA
1141   CAGCAATGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCGC CGACAAAGAG AGCACCAGA  AGGCCATCGA
1201   CGGCGTACC AACCAAGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG AACCCAGT  TCGAGGCCGT
1261   GGGCCGGGAG TTCACAACC  TGAACGGCGG GATCGAGAAC CTGAACAAGA AATGGAAGA
1321   TGGCTTCCTG GACGTGTGGA CCTACAACGC CGAGCTGTG  GTGCTGATGG AAAACGAGCG
1381   GACCTGGAC  TTCCACGACA GCAACGTGAA GAACCTGTAC GACAAAGTGC GGCTGCAGCT
1441   GCGGGACAC  GCCAAAGAGC TGGGCAACGG CTGCTTCGAG TTCTACCACA AGTGCGACAA
1501   CGAGTGCAFG GAAAGCGTGC GGAACGGCAC CTACGACTAC CCCCAGTACA GCGAGGAGGC
1561   CCGGTGAAG  CGGGAGGAAA TCAGCGCGCT GAAACTGGA  AGCATCGGCA TCTACCAGAT
1621   CATGTGCAGC AACGGCAGCC TGCASTGTAG AGCGGCCGCA TAATCTAGAG AGCTC
    
```

Figura 11.

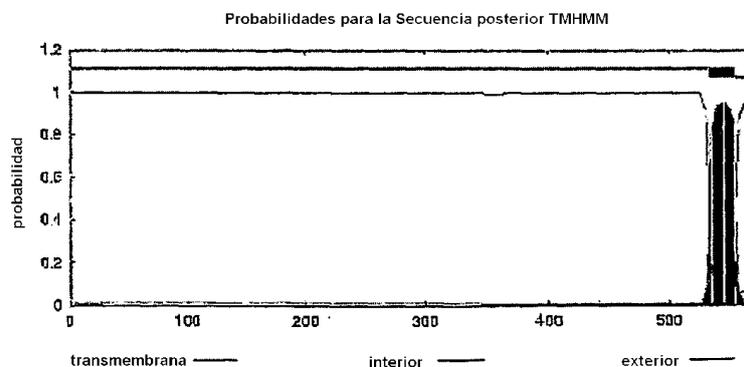


Figura 12.

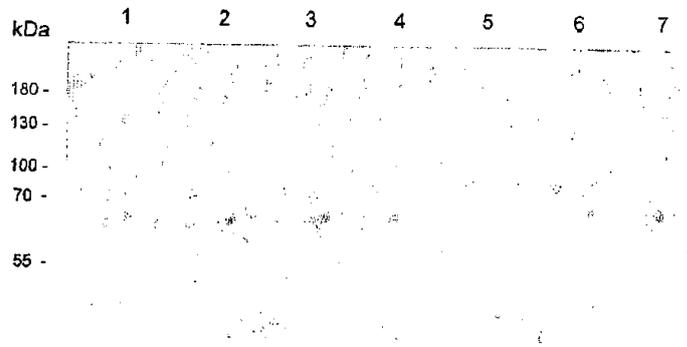


Figura 13.

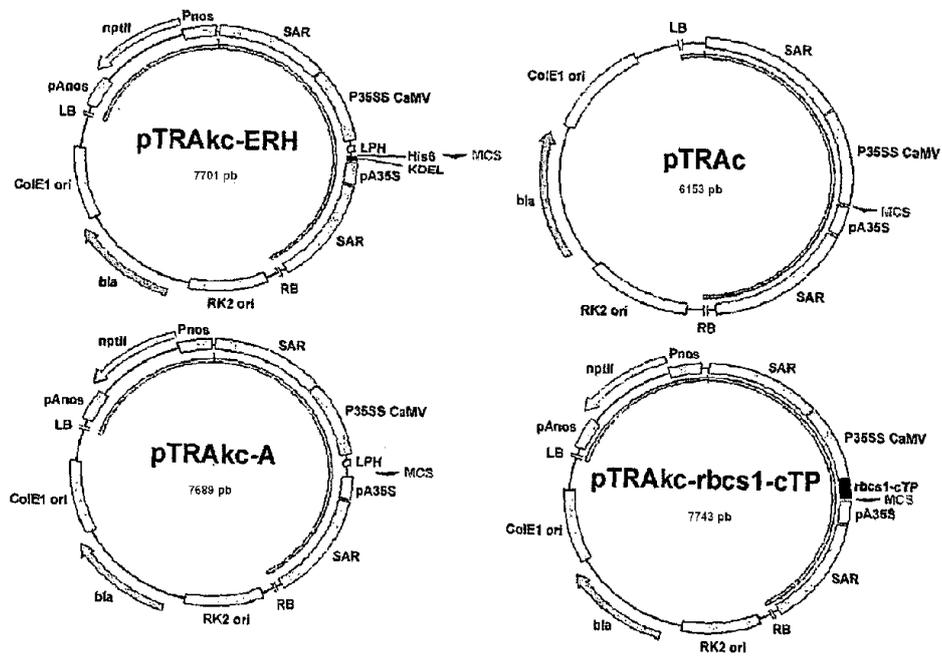


Figura 14.

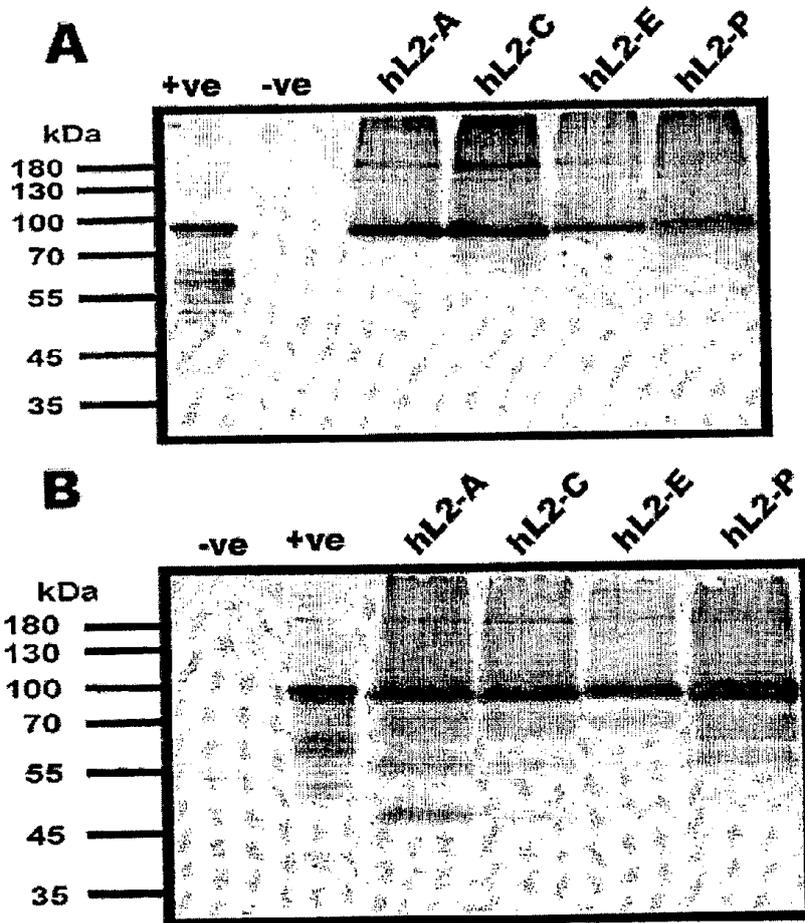


Figura 15.

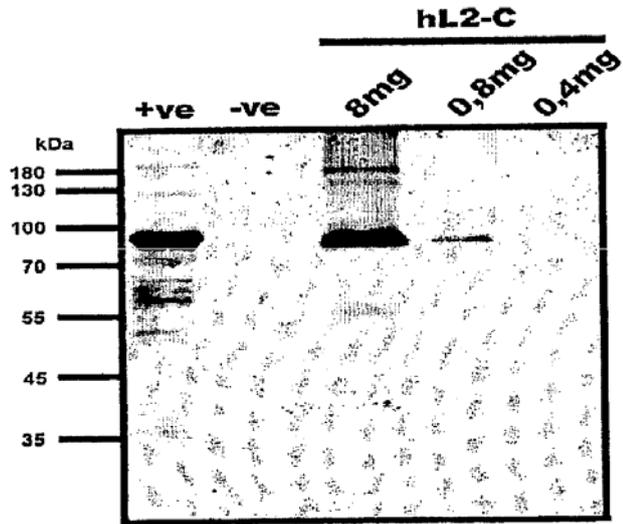


Figura 16.

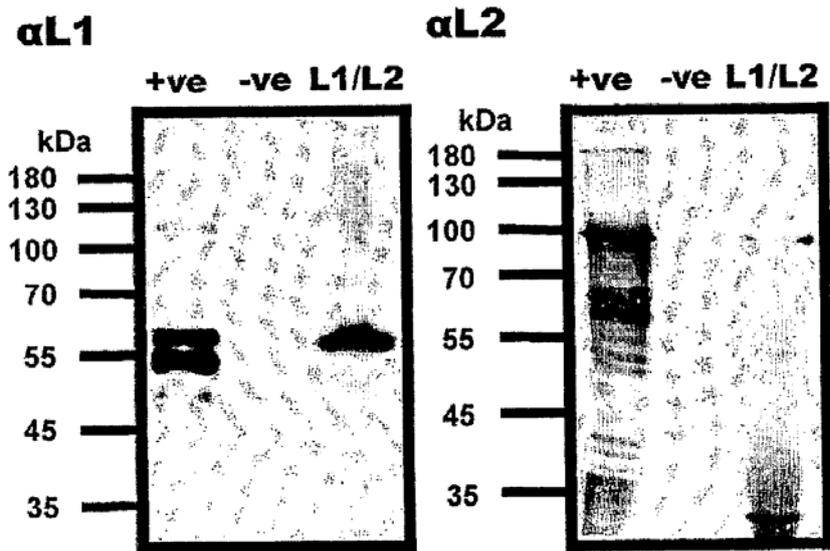


Figura 17.