(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 665 512**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012** **PCT/CA2012/000581**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012** **WO12171104**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012** **E 12801020 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2718428**

(54) Título: **Producción de partículas pseudovíricas de la rabia en plantas**

(30) Prioridad:

13.06.2011 US 201161496371 P
21.12.2011 US 201161578787 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 665 512 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de partículas pseudovíricas de la rabia en plantas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la producción de proteínas víricas nativas en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere también a la producción de partículas pseudovíricas que comprenden proteínas estructurales del virus de la rabia en plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La vacunación proporciona protección contra una enfermedad causada por un agente infeccioso induciendo a un sujeto a orquestar una defensa antes de la infección. Convencionalmente, esto se ha logrado a través del uso de formas vivas atenuadas o enteras inactivadas de los agentes infecciosos como inmunógenos. Para evitar el peligro de usar el virus entero (tal como virus muertos o atenuados) como vacuna, las proteínas víricas recombinantes, por ejemplo, subunidades, se han buscado como vacunas. Tanto las vacunas de péptidos como de subunidades están sujetas a varias limitaciones potenciales. Las vacunas de subunidades pueden presentar una baja inmunogenicidad, debido a un plegamiento incorrecto, presentación deficiente de antígeno, o diferencias en la composición de carbohidratos y lípidos. Un problema importante es la dificultad de asegurar que la conformación de las proteínas modificadas imita la de los antígenos en su entorno natural. Se deben usar adyuvantes adecuados y, en el caso de los péptidos, proteínas portadoras, para aumentar la respuesta inmune. Además, estas vacunas provocan principalmente respuestas humorales, y por lo tanto, pueden no provocar una inmunidad eficaz. Las vacunas de subunidades son a menudo ineficaces para enfermedades en las que se puede demostrar que todo el virus inactivado proporciona protección.

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

Hasta la fecha, se han producido VLP para más de 30 virus diferentes que infectan a seres humanos y otros animales. Una de las características más llamativas de este grupo es que es extremadamente diverso en cuanto a la estructura de los virus individuales. Incluye virus que tienen una sola proteína de cápside, proteínas de cápside múltiples, y aquellos con y sin envolturas lipídicas.

La formación de VLP para virus con una envoltura lipídica tiene un tipo diferente de desafío técnico que las producidas para virus con múltiples cápsides. Para estos virus, la elección del sistema de expresión puede ser importante para la eficacia de la formación de VLP. Por ejemplo, el virus Hantaan forma fácilmente VLP cuando se expresa en células de mamífero a partir de un vector basado en virus vaccinia, pero la formación de VLP es relativamente ineficiente en células de insecto (Betenbaugh M et al. 1995, Virus Res. 38, 111-124).

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

Las vacunas basadas en cultivos celulares para la rabia se limitan a cultivar las cepas inactivadas del virus en cultivos celulares. Estas vacunas comprenden el virus cultivado en cultivos celulares. Los actuales enfoques biotecnológicos tienen el objetivo de expresar el gen de la proteína de cubierta del virus de la rabia para desarrollar una proteína recombinante segura que podría desplegarse como una vacuna activa. La expresión estable de la glucoproteína del virus de la rabia se ha mostrado en células de ovario de hámster chino (Burger et al., 1991, J Gen Virol., Feb; 72 (Pt 2):359-67). Se obtuvo una proteína glucosilada de longitud completa de 67 K que migró conjuntamente con la proteína G aislada de células infectadas con virus.

La expresión del gen de la glucoproteína de la rabia mediante vectores baculovirales en células de insecto da rendimientos de proteína en la extensión del 18 % de la proteína celular total, 48 h después de la infección. Prehaud D H et al, (1989, Virology, Dec; 173(2):390-9) describen la colocación de una secuencia que codifica la proteína G de la cepa CVS bajo el control del promotor de polihedrina AcNPV y la expresión de la construcción usando una línea celular de *Spodoptera fugiperda*. La proteína derivada de insecto presentó una movilidad electroforética alterada en comparación con el tipo salvaje debido a las diferencias en los componentes del glicano.

Rupprecht et al (1993, Vaccine, 11(9): 925-8) demuestran que una glucoproteína (cepa ERA) derivada de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante era eficaz como vacuna oral en mapaches. El documento WO/1993/001833 muestra la producción de partículas pseudovíricas (VLP) en un sistema de expresión de baculovirus que contiene un genoma de ARN que incluye un dominio 3' y un dominio de relleno rodeado por una vaina de proteína N de la rabia y proteína M de la rabia. La VLP también incluye una envoltura lipídica de la proteína G de la rabia. En vista de los costes relativamente altos de los sistemas celulares de insecto y mamífero, estos no son los sistemas de elección para la expresión de la proteína G como estrategia para desarrollar una vacuna contra la rabia.

McGarvey et al. (1995, Bio/Technology Vol. 13, N.º 13, págs. 1484-1487) describen la transformación de cotiledones de tomate usando un ADNc de longitud completa que codifica la glucoproteína G del virus de la rabia (cepa ERA) bajo el control del promotor 35S' del virus del mosaico de la coliflor. La proteína se expresó en tomate y se caracterizó por tener un peso molecular de 62 y 60 kDa en la transferencia de Western después de inmunoprecipitación, en comparación con 66 kDa observados para la proteína G del virus cultivado en células BHK. Se sugirió que la diferencia en el peso molecular en comparación con la glucoproteína natural era resultado de la modificación postraduccional de la proteína (escisión proteolítica y/o glucosilación modificada). Se encontró que la cantidad de proteína G inmunoprecipitada era de aproximadamente 1-10 ng/mg de proteína soluble, es decir, del 0,0001 % al 0,001 % de proteína soluble. El bajo nivel de expresión puede haberse debido al uso de un gen mal diseñado. Por ejemplo, se usó un gen codificante de la proteína G nativo junto con su péptido señal nativo.

Se informó sobre la respuesta inmune derivada de plantas contra enfermedades tales como enteritis de visón y rabia mediante la expresión de epítopos virales en la superficie de virus de plantas, seguido de la infección de huéspedes susceptibles con el virus modificado recombinante (Modelska et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2481-2485; Yusibov et al., 2002, Vaccine 20: 3155-3164). El tamaño del polipéptido antigénico expresado sobre la superficie de un virus vector se limitó a 37 aminoácidos, y requirió el mapeo de epítopos del antígeno. Tal conocimiento profundo del antígeno no está generalmente disponible, especialmente con enfermedades recientemente descubiertas donde la expresión de proteínas de longitud completa puede ser la única opción. En algunos casos, pueden requerirse múltiples epítopos para proporcionar una protección aceptable contra la exposición al virus patógeno. Además, la contención podría considerarse un problema significativo a nivel agrícola, especialmente cuando se usan virus de plantas ambientalmente estables, por ejemplo, el virus del mosaico del tabaco.

El documento WO 97/43428 muestra un método para producir la glucoproteína G del virus de la rabia, o un virus relacionado con el virus de la rabia, en plantas. La construcción comprendía una secuencia que codificaba una proteína G quimérica que comprendía una proteína viral madura G con un péptido señal N-terminal distinto del asociado naturalmente con la proteína viral G. La glucoproteína tenía un peso molecular de aproximadamente 66 kDa y era altamente insoluble. Los detergentes, tales como SDS o Triton X-100, fueron necesarios para extraer y solubilizar la glucoproteína. Los autores concluyeron que la glucoproteína "insoluble" estaba relacionada con la presencia del dominio transmembrana C-terminal (la región situada a unos 40 a 60 aminoácidos del extremo carboxi de la glucoproteína) que es importante para una respuesta protectora cuando se usa la glucoproteína como vacuna.

Los virus envueltos pueden obtener su envoltura lipídica al gemarse de la célula infectada y obtener la membrana a partir de la membrana plasmática, o a partir de la de un orgánulo interno. Por ejemplo, durante el proceso de ensamblaje en los rabdovirus, el complejo N-P-L encapsula el ARN genómico de cadena negativa para formar el núcleo de RNP. La proteína M forma una cápsula, o matriz, alrededor de la RNP, y el complejo RNP-M migra a un área de la membrana plasmática que contiene inserciones de glucoproteína. La proteína M inicia el enrollamiento, y el complejo M-RNP se une a la glucoproteína, con lo cual los virus completados geman de la membrana plasmática.

Dentro del sistema nervioso central (SNC), existe una gemación viral preferencial de las membranas plasmáticas. Por el contrario, el virus en las glándulas salivales gema principalmente de la membrana celular en el lumen acinar. La gemación viral en la glándula salival y el comportamiento de mordedura agresivo inducido por virus en el animal huésped aumentan las posibilidades de infección vírica de un nuevo huésped. En sistemas celulares de mamíferos o baculovirus, por ejemplo, gemaciones de rabia de la membrana plasmática. Solo se conocen unos pocos virus con

envoltura que infecten a las plantas (por ejemplo, miembros de Topovirus y Rabdovirus). De los virus con envoltura vegetal conocidos, se caracterizan por gemar de las membranas internas de la célula huésped, y no de la membrana plasmática. Sin embargo, se han producido VLP recombinantes en huéspedes de plantas a partir de la membrana plasmática (WO 2011/035422).

El ensamblaje/gemación en los rabdovirus está impulsado en gran parte por la proteína de matriz (M). La proteína M contiene un dominio de gemación tardía que media en el reclutamiento de proteínas del huésped unidas a la ruta de clasificación de la proteína vacuolar de la célula para facilitar la separación de las células del virus. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que la gemación de virus envueltos de las membranas celulares depende de la presencia de proteínas espiculares transmembrana que interactúan con los componentes citoplásmicos del virus. Por ejemplo, las células infectadas con mutantes del virus de la rabia que eran deficientes para la glucoproteína G, o la cola citoplásmica G, liberaron partículas de rabdovirus no espiculares, lo que demuestra que la proteína de superficie viral no es necesaria para impulsar el proceso de gemación. (Mebatsion T. et al., 1996, Cell, Mar 22:84(6): 941-51). Por el contrario, las partículas infecciosas producidas dentro de mutantes del virus de la rabia deficientes en proteína M se asociaron principalmente a células, y el rendimiento del virus infeccioso libre de células se redujo en hasta 500.000 veces. Esto demuestra el importante papel de la proteína M en la gemación del virus. Los sobrenadantes de las células infectadas con el virus de la rabia con deficiencia de M comprendían viriones largos en forma de bastón, en lugar de las típicas partículas de rabdovirus en forma de bala, confirmando además el deterioro del proceso de formación del virus. La complementación con proteína M expresada a partir de plásmidos rescató la formación de rabdovirus. Por lo tanto, la proteína M parece desempeñar un papel importante en la condensación y el direccionamiento de la RNP a la membrana plasmática, así como en la incorporación de la proteína G en los viriones en gemación. (Mebatsion T. et al., 1999, J Virol Jan; 73(1): 242-50).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la producción de proteínas víricas nativas en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere también a la producción de partículas pseudovíricas que comprenden proteínas estructurales del virus de la rabia en plantas.
De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para producir una partícula pseudovírica (VLP) de la rabia en una planta de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas 1 a 5 y 11 a 16; una VLP derivada de una planta producida por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, como se expone en las reivindicaciones adjuntas 6 y 7; una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP derivada de plantas de la reivindicación 6 o 7 para inducir una respuesta inmune en un sujeto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se expone en la reivindicación adjunta 8; la VLP derivada de plantas de la reivindicación 6 o 7 para su uso en la inducción de inmunidad a una infección por virus de la rabia en un sujeto, como se expone en la reivindicación 9; y un complemento alimenticio que comprende la VLP derivada de plantas de la reivindicación 6 o 7, como se expone en la reivindicación 10.

La primera región reguladora activa en la planta, y la segunda región reguladora activa en la planta pueden ser iguales o diferentes.

En el método de la invención, el uno o más de un elemento de amplificación de geminivirus pueden seleccionarse de una región intergénica larga del virus del enanismo amarillo del frijol (LIR de BeYDV), y una región intergénica corta de BeYDV (SIR de BeYDV).

En los métodos de la invención, la planta o porción de la planta puede comprender además otra secuencia de ácido nucleico que codifica un supresor de silenciamiento, por ejemplo, HcPro o p19, una replicasa de geminivirus o ambos. Como alternativa, la planta o porción de la planta puede comprender aún otro ácido nucleico que codifica la replicasa de geminivirus.

La presente invención también incluye el método como se ha descrito anteriormente, en el que la planta o porción de la planta expresó de forma transitoria el primer ácido nucleico. Como alternativa, el primer ácido nucleico se expresa de manera estable en la planta o porción de la planta.
En la VLP de la presente invención, la una o más proteínas estructurales del virus de la rabia, la VLP, pueden comprender N-glicanos específicos de plantas, o N-glicanos modificados. También se proporciona un anticuerpo policlonal preparado usando la VLP.

También se proporciona un método para inducir inmunidad a una infección por virus de la rabia en un sujeto, que comprende administrar la VLP tal como se acaba de describir, al sujeto. La VLP se puede administrar a un sujeto por

vía oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea.

También se proporciona materia vegetal que comprende una VLP producida por el método (A) y/o (B) descritos anteriormente. La materia vegetal puede usarse en la inducción de la inmunidad a una infección por virus de la rabia en un sujeto. La materia vegetal también se puede mezclar como un complemento alimenticio.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La **Figura 1** muestra un análisis de transferencia de Western de la expresión transitoria de la proteína G de la rabia en *Nicotiana benthamiana*. La proteína G de rabia se expresó bajo el control de CPMV-HT con (1091) o sin (1071) el sistema de amplificación de ADN basado en BeYDV (véase la tabla 2 en los Ejemplos para construcciones). Los números entre paréntesis se refieren a la cantidad de cultivo de *Agrobacterium*, en mililitros, usada en la preparación del inóculo bacteriano. Las plantas infiltradas con AGL1/1091 se cosecharon 3 o 4 días después de la infiltración (DPI). Las hojas de plantas infiltradas se cosecharon y se extrajeron mecánicamente. Los extractos de proteína se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-G de la rabia (Santa-Cruz SC-57995).
La **Figura 2** muestra una comparación del contenido de proteína G de la rabia en extractos de proteínas de métodos de extracción bioquímicos y mecánicos para la proteína G de la rabia. Los extractos de proteína se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-G de la rabia (Santa-Cruz SC-57995). Los números entre paréntesis se refieren a la cantidad de cultivo de *Agrobacterium*, en mililitros, usada en la preparación del inóculo bacteriano (véase la tabla 2 para construcciones).
La **Figura 3A** muestra un análisis de transferencia de Western del contenido de proteína G de la rabia después de la separación, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), de extractos proteicos concentrados de plantas infiltradas con AGL1/1091. Las fracciones de elución de SEC se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-proteína de la rabia G (Santa-Cruz SC-57995). La **Figura 3B** muestra un análisis de transferencia de Western del contenido de proteína G de la rabia después de la separación, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), de extractos proteicos concentrados de plantas infiltradas con AGL1/1091 +AGL1/1086. Las fracciones de elución de SEC se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-proteína de la rabia G (Santa-Cruz SC-57995).
La **Figura 4A** muestra el cebador IF-RabM-S3.c (SEQ ID NO:1). La **Figura 4B** muestra el cebador IF-RabM-S1-4.r (SEQ ID NO: 2). La **Figura 4C** muestra la secuencia codificante de la proteína M sintetizada (correspondiente a nt 2496-3104 del Genbank número de acceso FJ913470) (SEQ ID NO. 3). La **Figura 4D** muestra una representación esquemática de la construcción número 1191. Los sitios de la enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación. La **Figura 4E** muestra la construcción número 1191 de los bordes del ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento) (SEQ ID NO: 4). La **Figura 4F** muestra el casete de expresión número 1066 del promotor 2X35S al terminador NOS. El marco de lectura abierto de la proteína M de las cepas ERA del virus de la rabia está subrayado (SEQ ID NO: 5). La **Figura 4G** muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia (SEQ ID NO: 6). La **Figura 4H** muestra la representación esquemática de la construcción número 1066.
La **Figura 5A** muestra una representación esquemática de la construcción número 1193. Los sitios de la enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación. La **Figura 5B** muestra la construcción número 1193 de los bordes del ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión de plastocianina-TBSV P19-Plastocianina (supresor de silenciamiento) (SEQ ID NO:7). La **Figura 5C** muestra el casete de expresión número 1086 de la LIR izquierda de BeYDV a la LIR derecha de BeYDV. El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado. (SEQ ID NO: 8). La **Figura 5D** muestra una representación esquemática de la construcción número 1086.

La **Figura 6A** muestra el cebador IF-RabG-S2+4.c (SEQ ID NO: 9). La **Figura 6B** muestra el cebador IF-RabG-S1-4.r (SEQ ID NO:10). La **Figura 6C** muestra la secuencia codificante de la proteína G de la rabia sintetizada (correspondiente a nt 3317-4891 del Genbank número de acceso EF206707) (SEQ ID NO: 11). La Figura 6D muestra una representación esquemática de la construcción número 1192. Los sitios de la enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación. La **Figura 6E** muestra la construcción número 1192 de los bordes del ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento) (SEQ ID NO: 12). La **Figura 6F** muestra el casete de expresión número 1071 del promotor 2X35S al terminador NOS. El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado. (SEQ ID NO: 13). La **Figura 4G** muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP-proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia (SEQ ID NO: 14). La **Figura 6H** muestra una representación esquemática de la construcción número 1071.
La **Figura 7A** muestra una representación esquemática de la construcción número 1194. Los sitios de la enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido están anotados en la representación. La **Figura 7B** muestra la construcción número 1194 de los bordes del ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión de plastocianina-P19-Plastocianina (supresor de silenciamiento) (SEQ ID NO: 15). La **Figura 7C** muestra el casete de expresión número 1091 de la LIR izquierda de BeYDV a la LIR derecha de BeYDV. El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado. (SEQ ID NO:16). La **Figura 7D** muestra una representación esquemática de la construcción número 1091.
La **Figura 8A** muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie (prefundido al 4-12 %, de BioRad) que muestra la preparación de VLP de la proteína G. 1) Preparación de Rab-VLP, 2) marcador de peso molecular. La **Figura 8B** muestra las respuestas de anticuerpos neutralizantes (UI/ml) en grupos de ratones (5 por grupo) inmunizados por vía intramuscular (i.m.) con tres dosis (D0, D7 y D28) de 0,1 ml de la vacuna NG-VLP (VLP de proteína G nativa) con o sin adyuvante (Alhydrogel (Alhy)). Las muestras de sangre se tomaron el Día 44, 16 días después de la tercera dosis. Método de ensayo utilizado: Prueba RFFIT (prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes): Se calcularon los títulos medios geométricos (GMT), usando los valores individuales obtenidos para cada animal y se indican los respondedores positivos. Las barras representan GMT con 95 % de IC. Se realizó Anova entre todos los grupos de tratamiento y no se informaron diferencias estadísticamente significativas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La siguiente descripción es de una realización preferida.

La presente invención se refiere a partículas pseudovíricas (VLP) que comprenden una o más proteínas estructurales del virus de la rabia, y a métodos para producir VLP de la rabia en plantas. Las VLP de la rabia comprenden una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas, específicamente una o más glucoproteínas (G) de la rabia nativas, y opcionalmente una o más proteínas de matriz. La VLP no comprende proteínas de virus de un virus vegetal.

La presente invención proporciona, en parte, un método para producir una partícula pseudovírica de la rabia (VLP) en una planta. El método puede comprender introducir un ácido nucleico que comprende una región reguladora activa en la planta unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una glucoproteína (G) del virus de la rabia nativa y uno o más de un elemento de amplificación, en la planta, o porción de la planta. Seguido de la incubación, la planta o porción de la planta en condiciones que permitan la expresión de los ácidos nucleicos, produciendo de esta manera la VLP.

La proteína del virus estructural de la rabia nativa (también denominada proteína vírica estructural de la rabia nativa) puede referirse a la totalidad o a una porción de una secuencia de proteína estructural del virus de la rabia nativa aislada del virus de la rabia, presente en cualquier cepa de virus de la rabia de origen natural o variante o aislado. Por lo tanto, la expresión proteína estructural de virus de la rabia nativa, y similares, incluye variantes de secuencias de proteínas estructurales de virus de la rabia de origen natural producidas por mutación durante el ciclo de vida del virus o producidas en respuesta a la presión selectiva (por ejemplo, terapia farmacológica, expansión del tropismo o infectividad de la célula huésped, etc.). Como apreciará un experto en la técnica, dichas secuencias de proteínas estructurales del virus de la rabia nativas y variantes de las mismas, también pueden producirse usando técnicas recombinantes. La proteína del virus estructural de la rabia nativa no incluye proteínas quiméricas en las que, por ejemplo, un dominio transmembrana y/o una cola citoplásmica se han reemplazado con un dominio transmembrana

heterólogo y/o una cola citoplasmática con respecto a la proteína del virus estructural de la rabia nativa.

Un ejemplo no limitante de una proteína estructural del virus de la rabia nativa es la proteína glucoproteína (G) de la rabia, un fragmento de proteína G, una proteína de matriz (M), un fragmento de proteína M, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de proteína G, o fragmentos de proteína G, que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas proteínas G de la cepa ERA de la rabia. Un ejemplo de una proteína G, que no se considerará limitante, se expone en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Además, la proteína del virus estructural de la rabia nativa puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma.

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

La proteína viral estructural nativa puede existir como un monómero, un dímero, un trímero o una combinación de los mismos. Un trímero es un complejo macromolecular formado por tres proteínas unidas, normalmente no covalentemente. Sin desear quedar ligado a la teoría, el dominio de trimerización de una proteína puede ser importante para la formación de dichos trímeros. Por lo tanto, la proteína viral, o fragmento de la misma, puede comprender un dominio de trimerización.

Por "proteína de la matriz" (también denominada proteína de núcleo viral) se refiere a una proteína que organiza y mantiene la estructura del virión. Las proteínas de matriz virales normalmente interactúan directamente con las membranas celulares y pueden estar implicadas en el proceso de gemación. Las proteínas de núcleo viral son proteínas que forman parte de la nucleocápside y típicamente están directamente asociadas con el ácido nucleico viral. Los ejemplos de proteínas de matriz o de núcleo viral son la proteína M de la rabia, influenza M1, RSV, M y gag de retrovirus. Los ejemplos de proteínas de matriz que se pueden usar como se describe en el presente documento incluyen, pero sin limitación, la proteína M de la rabia. Un ejemplo no limitante de secuencias que se pueden usar con la presente invención incluye la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia. Una proteína M ejemplar consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6. Además, la proteína del virus estructural de la rabia nativa puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6, o secuencias que tienen al menos aproximadamente un 90-100 % de similitud de secuencia con la misma, incluyendo cualquier porcentaje de similitud dentro de estos intervalos, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con la misma.

Tanto el virus de la estomatitis vesicular (un rabdovirus como la rabia) como el virus del herpes simple (un virus del herpes como el virus varicela-zóster) geman de una manera dependiente de VSP4 (Taylor et al. J. Virol 81: 13631-13639, 2007; Crump et al., J. Virol 81: 7380-7387, 2007). Dado que VSP4 interactúa con el dominio tardío de la proteína de matriz, esto sugiere que la proteína de matriz es necesaria para la gemación y, como corolario, para la producción de VLP. Sin embargo, como se describe en el presente documento, las VLP de la rabia nativas se pueden producir dentro de las plantas con o sin la coexpresión de una proteína de matriz. Por lo tanto, las VLP de la rabia nativas producidas en plantas a partir de proteínas estructurales nativas derivadas de virus, de acuerdo con la presente invención, pueden o no comprender una proteína de matriz viral (o núcleo viral).

La presente invención también proporciona un método para producir VLP de proteínas pseudovíricas de la rabia en una planta, en el que un ácido nucleico (un primer ácido nucleico) que codifica una proteína G de la rabia nativa se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de matriz viral, por ejemplo, pero sin limitación, proteína de matriz de la rabia. El ácido nucleico, y el segundo ácido nucleico, pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse secuencialmente en la planta.

Como se describe en más detalle a continuación, las VLP pueden producirse en una planta expresando un ácido nucleico (un primer ácido nucleico) que codifica una o más proteínas G del virus de la rabia nativas. Un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de matriz, por ejemplo, pero sin limitación, la proteína de matriz de la rabia, podría coexpresarse en la planta. El ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse secuencialmente en la planta. El ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se pueden introducir en la planta de manera transitoria, o de una manera estable.

Además, una planta que expresa un primer ácido nucleico que codifica una o más proteínas G del virus de la rabia, puede transformarse con una proteína de matriz, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína de matriz de la rabia (segundo ácido nucleico) de manera que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresan en la planta. Como alternativa, una planta que expresa una proteína de matriz, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína de matriz de la rabia (segundo ácido nucleico) puede transformarse con un primer ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas, por ejemplo, una proteína G de la rabia, de manera que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresen en la planta.

La presente invención también proporciona un método para producir VLP del virus de la rabia en una planta que implica introducir uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas G nativas del virus de la rabia unidas operativamente a una región reguladora activa en la planta, y uno o más de un elemento de amplificación, en la planta o porción de la planta. La planta o porción de la planta se incuba a continuación en condiciones que permiten la expresión del uno o más ácidos nucleicos, produciendo así las VLP del virus de la rabia.

La presente invención proporciona además una VLP que comprende una o más proteínas G del virus de la rabia nativas producidas por el método proporcionado por la presente invención.

La expresión "partícula pseudovírica" (VLP), o "partículas pseudovíricas" o "VLP" se refiere a estructuras que se autoensamblan y comprenden una o más proteínas estructurales tales como, por ejemplo, proteína estructural del virus de la rabia nativa, por ejemplo, pero sin limitación, proteína G de la rabia. Las VLP generalmente son morfológica y antigénicamente similares a los viriones producidos en una infección, pero carecen de información genética suficiente para replicarse y, por lo tanto, no son infecciosas. Las VLP pueden producirse en células huésped adecuadas, incluyendo células huésped vegetales. Después de la extracción de la célula huésped y tras el aislamiento y la purificación adicional en las condiciones adecuadas, las VLP se pueden purificar como estructuras intactas.

El tamaño (es decir, el diámetro) de las VLP definidas anteriormente, que puede medirse, por ejemplo, mediante técnicas de dispersión dinámica de la luz (DLS) o de microscopía electrónica (EM), está habitualmente entre 40 a 300 nm, o cualquier tamaño los mismos. En algunas realizaciones, el tamaño de la estructura de VLP intacta puede variar de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 300 nm, o cualquier tamaño entre los mismos, tales como 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm, 190 nm, 200 nm, 210 nm, 220 nm, 230 nm, 240 nm, 250 nm, 260 nm, 270 nm o 280 nm, o cualquier tamaño entre los mismos. En una realización, el tamaño de la estructura de VLP intacta puede variar de aproximadamente 170 nm a aproximadamente 200 nm, o cualquier tamaño entre los mismos, tal como 175 nm, 180 nm, 185 nm, 190 nm, 195 nm o cualquier tamaño entre los mismos.

También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas unidas operativamente a una región reguladora activa en una planta. Además, una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas pueden estar unidas operativamente a uno o más de un elemento de amplificación. La una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas pueden ser, por ejemplo, una o más proteínas G de la rabia, una o más proteínas M, o ambas.

Una secuencia de ácido nucleico a la que se hace referencia en la presente invención, puede ser "sustancialmente homóloga" o "sustancialmente similar" a una secuencia, o un complemento de la secuencia si la secuencia de ácidos nucleicos se hibrida con una o más de una secuencia de nucleótidos o un complemento de la secuencia de ácidos nucleicos como se define en el presente documento bajo condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente el 70 %, o entre el 70 al 100 %, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo el 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84 , 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100 %, o cualquier cantidad entre las mismas, de los nucleótidos coinciden en una longitud definida de la secuencia de nucleótidos, siempre que tales secuencias homólogas presenten una o más de las propiedades de la secuencia, o el producto codificado como se describe en el presente documento. El plegamiento correcto de la proteína puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación de VLP y la función. El plegamiento de una proteína puede verse influenciado por uno o más factores, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de la proteína, la abundancia relativa de la proteína, el grado de aglomeración intracelular, la disponibilidad de cofactores que pueden unirse o estar asociados transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada.

Tal similitud de secuencia puede determinarse usando un programa de comparación de secuencias nucleotídicas, tal

como el proporcionado en DNASIS (usando, por ejemplo, pero sin limitación, los siguientes parámetros: Penalización GAP 5, n.º de diagonales superiores 5, penalización GAP fija 10, k-tupla 2, hueco flotante 10 y tamaño de ventana 5). Sin embargo, otros métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica, por ejemplo, los algoritmos de Smith y Waterman (1981, Adv. Appl. Math. 2: 482), Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970), Pearson y Lipman (1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444), y por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y BLAST, disponibles a través del NIH), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. 1995, complemento), o usando hibridación Southern o Northern en condiciones rigurosas (véase Maniatis et al., en Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Preferiblemente, las secuencias que son sustancialmente homólogas presentan al menos aproximadamente un 80 % y más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de similitud de secuencia sobre una longitud definida de la molécula.

Un ejemplo de una de tales condiciones de hibridación rigurosas puede ser hibridación (de aproximadamente 16-20 horas) durante una noche en 4 x SSC a 65 ºC seguido por lavado en 0,1 x SSC a 65 ºC durante una hora, o 2 lavados en 0,1 x SSC a 65 ºC cada 20 o 30 minutos. Como alternativa, una condición de hibridación rigurosa ejemplar podría ser durante una noche (16-20 horas) en formamida al 50 %, 4 x SSC a 42 ºC seguido por lavado en 0,1 x SSC a 65 ºC durante una hora, o 2 lavados en 0,1 x SSC a 65 ºC durante 20 o 30 minutos, o durante una noche (16-20 horas), o hibridación en tampón de fosfato acuoso Church (SDS al 7 %, tampón $NaPO_4$ 0,5 M, pH 7,2, EDTA 10 mM) a 65 ºC, con 2 lavados a 50 ºC en 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno, o 2 lavados a 65 ºC en 2 x SSC, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno para regiones de secuencia únicas.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido estructural de la rabia nativo o una proteína estructural del virus de la rabia nativa puede describirse como un "ácido nucleico de la rabia", una "secuencia de nucleótidos de la rabia", un "ácido nucleico de la rabia nativo", o una "secuencia de nucleótidos de la rabia nativa". Por ejemplo, que no debe considerarse limitante, una partícula pseudovírica que comprende una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas o polipéptidos estructurales del virus de la rabia nativos, puede describirse como una "VLP de la rabia" o "VLP de la rabia nativa".

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

Un péptido señal (SP) puede ser nativo de la proteína o proteína viral, o un péptido señal puede ser heterólogo con respecto a la secuencia primaria de la proteína o proteína viral que se expresa. Por ejemplo, el péptido señal nativo de la proteína G de la rabia nativa o la proteína M de la rabia nativa se puede usar para expresar la proteína estructural del virus de la rabia nativa en un sistema vegetal.

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

Por lo tanto, la presente invención proporciona una proteína estructural del virus de la rabia nativa que comprende un péptido señal nativo, o no nativo, y ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas estructurales del virus de la rabia.

Elemento de amplificación

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

El sistema de expresión como se describe en el presente documento, comprende un casete de expresión basado en

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "elementos de amplificación" se refiere a un segmento de ácido nucleico que comprende al menos una porción de una o más regiones intergénicas largas o de repetición intergénica larga (LIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en el presente documento, "región intergénica larga" o "repetición intergénica larga" se refiere a una región de una región intergénica larga que contiene un sitio de unión rep capaz de mediar la escisión y la replicación por una proteína Rep de geminivirus. En algunos aspectos, el segmento de ácido nucleico que comprende una o más LIR, puede comprender además una región intergénica corta o región intergénica pequeña (SIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en el presente documento, la "región intergénica corta" o "región intergénica corta" se refiere a la cadena complementaria (la IR corta (SIR) de un Mastrevirus). Puede usarse en el presente documento cualquier elemento de amplificación derivado de geminivirus adecuado. Véase, por ejemplo, los documentos WO2000/20557; WO2010/025285; Zhang X. et al. (2005, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 93, 271-279), Huang Z. et al. (2009, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 103, 706-714), Huang Z. et al.(2009, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 106, 9-17); que se incorporan en el presente documento por referencia). Si se usa más de una LIR en la construcción, por ejemplo dos LIR, entonces el promotor, las regiones CMPV-HT y la secuencia de ácido nucleico de interés y el terminador están delimitadas por cada una de las dos LIR. Además, el elemento de amplificación podría originarse, por ejemplo, a partir de la secuencia como se describe en Halley-Stott et al. (2007) Archives of Virology 152: 1237-1240, depositado bajo el número de acceso de GenBank DQ458791. El segmento de ácido nucleico que comprende las LIR se une a los nucleótidos 2401 a 2566 y 1 a 128. El segmento de ácido nucleico que comprende las SIR son los nucleótidos 1154 a 1212.

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

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

También se puede incluir una replicasa viral en el sistema de expresión como se describe en el presente documento,

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

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

Chaperona

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

Las proteínas de choque térmico (Hsp), o proteínas de estrés, son ejemplos de proteínas chaperonas, que pueden participar en diversos procesos celulares incluyendo síntesis de proteínas, tráfico intracelular, prevención de plegado erróneo, prevención de agregación de proteínas, ensamblaje y desmontaje de complejos de proteínas, plegamiento de proteínas, y disgregación de proteínas. Los ejemplos de tales proteínas chaperonas incluyen, pero sin limitación, Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBPs, ciclofilinas, ClpP, GrpE, ubiquitina, calnexina, y proteína disulfuro isomerasas (véase, por ejemplo, Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25: 59-70. 1995; Parsell, D.A. y Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27: 437-496 (1993); la Patente de Estados Unidos N.º 5.232.833). Como se describe en el presente documento, las proteínas chaperonas, por ejemplo, pero sin limitación, Hsp40 y Hsp70, pueden usarse para asegurar el plegamiento de una proteína del virus de la rabia.

Los ejemplos de Hsp70 incluyen Hsp72 y Hsc73 de células de mamífero, DnaK de bacterias, particularmente micobacterias tales como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (tales como Bacille-Calmette Guerin: a la que se hace referencia en el presente documento como Hsp71). DnaK de *Escherichia coli,* levadura y otros procariotas, y BiP y Grp78 de eucariotas, tal como *A. thaliana* (Lin et al. 2001 (Cell Stress and Chaperones 6: 201-208). Un ejemplo particular de una Hsp70 es *A. thaliana* Hsp70 (codificada por Genbank ref: AY120747.1). Hsp70 es capaz de unirse específicamente a ATP, así como a polipéptidos y péptidos no plegados, participando de este modo en el plegamiento y despliegue de proteínas, así como en el ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos.

Los ejemplos de Hsp40 incluyen DnaJ de procariotas tales como *E. coli* y micobacterias y HSJ1, HDJ1 y Hsp40 de eucariotas, tales como alfalfa (Frugis et al., 1999. Plant Molecular Biology 40: 397-408). Un ejemplo particular de una Hsp40 es *M. sativa* MsJ1 (Genbank ref: AJ000995.1). Hsp40 desempeña un papel como una chaperona molecular en el plegamiento de proteínas, termotolerancia y replicación del ADN, entre otras actividades celulares.

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

formación de agregados con otras proteínas (revisado en Hartl, FU. 1996. Nature 381: 571-579).

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

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para producir VLP de la rabia en una planta, en el que un primer ácido nucleico que codifica una glucoproteína del virus de la rabia nativa (G) se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una chaperona. El primer y segundo ácidos nucleicos pueden introducirse en la planta en la misma etapa, o pueden introducirse en la planta secuencialmente.

Elemento regulador

El uso de las expresiones "región reguladora", "elemento regulador" o "promotor" en la presente solicitud se refiere a una porción de ácido nucleico típicamente, pero no siempre, aguas arriba de la región codificante de la proteína de un gen, que puede estar compuesta por ADN o ARN, o tanto ADN como ARN. Cuando una región reguladora está activa, y en asociación operativa, u operativamente unida, con un gen de interés, esto puede dar como resultado la expresión del gen de interés. Un elemento regulador puede ser capaz de mediar la especificidad del órgano, o controlar el desarrollo o activación del gen temporal. Una "región reguladora" puede incluir elementos promotores, elementos promotores del núcleo que muestran una actividad promotora inicial, elementos que pueden inducirse en respuesta a un estímulo externo, elementos que median la actividad promotora, tales como elementos reguladores negativos o potenciadores transcripcionales. La "región reguladora", como se usa en el presente documento, también puede incluir elementos que están activos después de la transcripción, por ejemplo, elementos reguladores que modulan la expresión génica, tales como potenciadores traduccionales y transcripcionales, represores traduccionales y transcripcionales, secuencias de activación aguas arriba, y determinantes de inestabilidad de ARNm. Varios de estos últimos elementos pueden localizarse próximos a la región codificante.

En el contexto de esta divulgación, la expresión "elemento regulador" o "región reguladora" se refiere típicamente a una secuencia de ADN, normalmente, pero no siempre, aguas arriba (5') con respecto a la secuencia codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante proporcionando el reconocimiento de la ARN polimerasa y/u otros factores requeridos para iniciar la transcripción en un sitio particular. Sin embargo, debe entenderse que otras secuencias de nucleótidos, ubicadas dentro de los intrones, o 3' de la secuencia, pueden también contribuir a la regulación de expresión de una región codificante de interés. Un ejemplo de un elemento regulador que proporciona el reconocimiento de la ARN polimerasa u otros factores de transcripción para asegurar el inicio en un sitio particular es un elemento promotor. La mayoría, aunque no todos los elementos promotores eucariotas contienen una caja TATA, una secuencia de ácido nucleico conservada que consta de pares de bases de nucleótidos de adenosina y timidina normalmente situados aproximadamente 25 pares de bases aguas arriba de un sitio de inicio de la transcripción. Un elemento promotor comprende un elemento promotor inicial, responsable del inicio de la transcripción, así como otros elementos reguladores (como se han enumerado anteriormente) que modifican la expresión génica.

Existen varios tipos de regiones reguladoras, incluyendo aquellas que se regulan con respecto al desarrollo, inducibles o constitutivas. Una región reguladora que se regula con respecto al desarrollo, o controla la expresión diferencial de un gen bajo su control, se activa en ciertos órganos o tejidos de un órgano en momentos específicos durante el desarrollo de ese órgano o tejido. Sin embargo, algunas regiones reguladoras que se regulan con respecto al desarrollo pueden estar activas preferiblemente en ciertos órganos o tejidos en fases de desarrollo específicas, también pueden estar activas de una manera regulada con respecto al desarrollo, o a un nivel basal también en otros órganos o tejidos en la planta. Los ejemplos de regiones reguladoras específicas de tejido, por ejemplo, véase específicas de una región reguladora, incluyen el promotor de napina, y el promotor de cruciferina (Rask et al., 1998, J. Plant Physiol. 152: 595-599; Bilodeau et al., 1994, Plant Cell 14: 125-130). Un ejemplo de un promotor específico de la hoja incluye el promotor de plastocianina (véase, el documento US 7.125.978.

Una región reguladora inducible es aquella que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias o genes de ADN en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias o genes

de ADN no se transcribirán. Típicamente, el factor de proteína que se une específicamente a una región reguladora inducible para activar la transcripción puede estar presente en una forma activa, que se convierte entonces, directa o indirectamente, en la forma activa por el inductor. Sin embargo, el factor de proteína también puede estar ausente. El inductor puede ser un agente químico, tal como una proteína, metabolito, regulador de crecimiento, herbicida o compuesto fenólico o un estrés fisiológico impuesto directamente por calor, frío, sal o elementos tóxicos, o indirectamente mediante la acción de un patógeno o agente infeccioso tal como un virus. Una célula vegetal que contiene una región reguladora inducible puede exponerse a un inductor aplicando externamente el inductor a la célula o la planta, por ejemplo, por aspersión, riego, calentamiento o métodos similares. Los elementos reguladores inducibles pueden derivarse de genes de la planta o que no son de la planta (por ejemplo, Gatz, C. y Lenk, LR.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358). Los ejemplos de promotores inducibles potenciales incluyen, pero sin limitación, un promotor inducible por tetraciclina (Gatz, C.,1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48,89-108), un promotor inducible por esteroides (Aoyama. T. y Chua, N.H.,1997, Plant 1. 2, 397-404; y un promotor inducible por etanol (Salter, M.G., et al, 1998, Plant 10urnal 16, 127-132; Caddick, M.X., et al,1998, Nature Biotech. 16, 177-180, genes IB6 y CK11 inducibles por citocina (Brandstatter, I. y Kieber, 1.1.,1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982-985; y el elemento inducible por auxina, DR5 (Ulmasov, T., et al., 1997, Plant Cell 9, 1963-1971).

Una región reguladora constitutiva dirige la expresión de un gen a través de las diferentes partes de una planta y continuamente durante todo el desarrollo de la planta. Los ejemplos de elementos reguladores constitutivos conocidos incluyen promotores asociados con el transcrito CaMV 35S (Odell et al., 1985, Nature, 313: 810-812), los genes actina 1 de arroz (Zhang et al, 1991, Plant Cell, 3: 1155-1165), actina 2 (An et al., 1996, Plant J., 10: 107-121), o tms 2 (documento U.S. 5.428.147, y triosefosfato isomerasa 1 (Xu et. al., 1994, Plant Physiol. 106: 459-467), el gen de ubiquitina 1 de maíz (Cornejo et al, 1993, Plant Mol. Biol. 29: 637-646), los genes de *Arabidopsis* ubiquitina 1 y 6 (Holtorf et al, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 637-646), y el gen del factor 4A de inicio de la traducción del tabaco (Mandel et al, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 995-1004).

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

La invención proporciona VLP que obtienen una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula, en la que se expresan las VLP. Por ejemplo, si la una o más proteínas estructurales del virus de la rabia nativas se expresan en un sistema basado en plantas, la VLP resultante puede obtener una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula vegetal.

Generalmente, el término "lípido" se refiere a las moléculas de origen natural y solubles en grasa (lipófilas). Una VLP producida en una planta de acuerdo con la invención puede complejarse con lípidos derivados de plantas. Los lípidos derivados de plantas pueden estar en forma de una bicapa lipídica, y pueden comprender además una envoltura que rodea la VLP. Los lípidos obtenidos de plantas pueden comprender componentes lipídicos de la membrana plasmática de la planta, donde la VLP se produce, incluyendo, fosfolípidos, tri, di y monoglicéridos, así como un esterol soluble en grasa o metabolitos que comprenden esteroles. Los ejemplos incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol, fosfatidilserina, glicoesfingolípidos, fitoesteroles o una combinación de los mismos. Un lípido derivado de plantas puede denominarse, como alternativa, como un "lípido vegetal". Los ejemplos de fitoesteroles incluyen campesterol, estigmaesterol, ergoesterol, brasicaesterol, delta-7-estigmaesterol, delta-7-avenaesterol, daunoesterol, sitoesterol, 24-metilcolesterol, colesterol o beta-sitoesterol - véase, por ejemplo, Mongrand et al., 2004. Como entenderá un experto en la técnica, la composición lipídica de la membrana plasmática de una célula puede variar con el cultivo o las condiciones de crecimiento de la célula u organismo del que se obtiene la célula. En general, el beta-sitoesterol es el fitoesterol más abundante.

Las membranas celulares comprenden generalmente bicapas lipídicas, así como proteínas para diversas funciones.

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

La VLP producida dentro de una planta puede inducir una proteína estructural del virus de la rabia nativa que comprende N-glicanos específicos de la planta. Por lo tanto, esta invención también proporciona una VLP que comprende una proteína estructural del virus de la rabia nativa que tiene N-glicanos específicos de la planta.

Además, se conoce la modificación del N-glicano en las plantas (véase, por ejemplo, el documento U.S. 60/944.344; que se incorpora en el presente documento por referencia) y se pueden producir proteínas estructurales del virus de la rabia nativas que tienen N-glicanos modificados. Pueden obtenerse proteínas estructurales del virus de la rabia nativas que comprenden un patrón de glucosilación modificado, por ejemplo, N-glicanos fucosilados, xilosilados, o ambos, fucosilados y xilosilados reducidos, o pueden obtenerse proteínas estructurales del virus de la rabia nativas que tienen un patrón de glucosilación modificado, en el que la proteína carece de fucosilación, xilosilación, o ambas, y comprende un aumento de galactosilación. Además, la modulación de modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la adición de galactosa terminal, puede dar como resultado una reducción de la fucosilación y la xilosilación de las proteínas estructurales del virus de la rabia nativas expresadas en comparación con una planta de tipo salvaje que expresa proteínas estructurales del virus de la rabia nativas.

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

Por lo tanto, la presente invención también proporciona VLP que comprenden una proteína estructural del virus de la rabia nativa que tiene N-glicanos modificados.

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

La aparición de las VLP puede detectarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, gradientes de sacarosa, o cromatografía de exclusión por tamaño. Las VLP pueden evaluarse para determinar la estructura y el tamaño mediante, por ejemplo, microscopía electrónica o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

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

La fracción separada puede ser, por ejemplo, un sobrenadante (si se centrifuga, se sedimenta o se precipita), o un filtrado (si se filtra), y se enriquece con proteínas, o proteínas superestructurales, tales como, por ejemplo, estructuras en forma de roseta o partículas de orden mayor, de mayor peso molecular, tales como VLP. La fracción separada puede procesarse adicionalmente para aislar, purificar, concentrar, o una combinación de los mismos, las

proteínas, o proteínas supraestructurales, por ejemplo, mediante etapas de centrifugación adicionales, precipitación, etapas cromatográficas (por ejemplo, exclusión de tamaño, intercambio iónico, cromatografía de afinidad), filtración de flujo tangencial, o una combinación de los mismos. La presencia de proteínas purificadas, o proteínas de superestructura, puede ser confirmada, por ejemplo, mediante un análisis Western nativo o SDS-PAGE, utilizando un anticuerpo de detección apropiado, electroforesis capilar, microscopía electrónica, o cualquier otro método que será evidente para un experto en la técnica.

Las Figuras 3A y 3B, muestran un ejemplo de un perfil de elución de un análisis de cromatografía de exclusión de maños de un extracto de planta que comprende VLP. En este caso, las VLP que comprenden proteínas estructurales del virus de la rabia nativas eluyen en las fracciones 8 a aprox. 11, las rosetas y las estructuras de alto peso molecular eluyen de aproximadamente las fracciones 12 a aproximadamente 14, y la forma soluble de las proteínas estructurales del virus de la rabia, de menor peso molecular, eluyen en fracciones de aproximadamente 15 a aproximadamente 17.

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

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

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

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

Las construcciones de la presente invención pueden introducirse en las células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de dichas técnicas véanse, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academy Press, Nueva York VIII, págs. 421-463 (1988); Geierson y Corey, Plant Molecular Biology, 2ª Ed. (1988); y Miki y Iyer, Fundamentals of Gene Transfer in Plants. In Plant Metabolism, 2ª Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebrve, DB Layzell (eds), Addison Wesly, Langmans Ltd. Londres, págs. 561-579 (1997). Otros métodos incluyen la captación de ADN directa, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo, usando protoplastos, microinyección, microproyectiles o triquitas, e infiltración al vacío. Véanse, por ejemplo, Bilang, et al. (Gene 100: 247-250 (1991),

Scheid et al. (Mol. Gen. Genet. 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (Plant Science 52: 111-116, 1987), Neuhause et al. (Theor. Appl Genet. 75: 30-36, 1987), Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987); Howell et al. (Science 208: 1265, 1980), Horsch et al. (Science 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., Plant Physiology 91: 694-701, 1989), Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach y Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), Methods in Plant Molecular Biology (Schuler y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu y Lomonossoff (J Virol Meth, 105: 343-348, 2002), Pat. de Estados Unidos N.º 4.945.050; 5.036.006; y 5.100.792, Solicitud de patente de Estados Unidos N.º 08/438.666, presentada el 10 de mayo de 1995, y 07/951.715, presentada el 25 de septiembre de 1992.

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

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

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

La presente divulgación incluye secuencias nucleotídicas:

Tabla 1. Lista de números de identificación de secuencias.

SEQ ID NO:	**Descripción**	**Tabla/Figura**
1	IF-RabM-S3.c	Figura 4A
2	IF-RabM-S1-4.r	Figura 4B
3	Secuencia de codificación de proteína M sintetizada (correspondiente a nt2496-3104 del Genbank número de acceso FJ913470)	Figura 4C
4	Construcción número 1191 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento)	Figura 4E
5	Casete de expresión número 1066 del promotor 2X35S al terminador NOS. El marco de lectura abierto de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.	Figura 4F
6	Secuencia de aminoácidos de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia	Figura 4G
7	Construcción número 1193 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión de plastocianina-TBSV P19-Plastocianina (supresor de silenciamiento)	Figura 5B
8	Casete de expresión número 1086 de la LIR izquierda de BeYDV a la LIR derecha de BeYDV. El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la	Figura 5C

	rabia está subrayado.	
9	IF-RabG-S2+4.c	Figura 6A
10	IF-RabG-S1-4.r	Figura 6B
11	Secuencia codificante de la proteína G de la rabia sintetizada (correspondiente a nt 3317-4891 del Genbank número de acceso EF206707)	Figura 6C
12	Construcción número 1192 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento)	Figura 6E
13	Casete de expresión número 1071 del promotor 2X35S al terminador NOS. El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.	Figura 6F
14	Secuencia de aminoácidos de PDISP-proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia	Figura 6G
15	Construcción número 1194 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento)	Figura 7B
16	Casete de expresión número 1091 de la LIR izquierda de BeYDV a la LIR derecha de BeYDV. El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.	Figura 7C

La presente invención se ilustrará en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Construcciones

Tabla 2. Construcciones que comprenden secuencias que codifican una proteína estructural del virus de la rabia nativa

Sistema de expresión	Sistema de amplificación	Péptido señal	Proteína estructural	Construcción número
CPMV HT	-	-	M de la rabia	**1066**
CPMV HT	BeYDV+rep	-	M de la rabia	**1086**
CPMV HT	-	Sp PDI	G de la rabia	**1071**
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	G de la rabia	**1091**

La construcción número 1091 codifica la proteína G de la rabia nativa y comprende un elemento de amplificación, que está de acuerdo con el ácido nucleico de la invención reivindicada. La construcción número 1066 codifica una proteína de matriz (M) de la rabia y la construcción número 1086 comprende un elemento de amplificación y codifica una proteína de matriz (M) de la rabia. Las construcciones número 1086 y 1066 podrían usarse junto con la construcción 1091 de acuerdo con una realización de la invención reivindicada. La construcción número 1071 es relevante para la comprensión de la invención.

Ejemplo 1: Ensamblaje de casetes de expresión con proteína de la rabia

A-2X35S/CMPV-HT/M de la rabia/NOS (Construcción número 1066)

Una secuencia que codifica la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de la proteína M completa se amplificó usando los cebadores IF-RabM-S3.c (Figura 4A, SEQ ID NO:1) e F-RabM-S1-4.r (Figura 4B, SEQ ID NO: 2) usando el gen M sintetizado (correspondiente a nt 2496-3104 del Genbank número de acceso FJ913470) (Figura 4C, SEQ ID NO: 3) como plantilla. El producto de PCR se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1191 (Figura 4D) se digirió con la enzima de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19 del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. La cadena principal de la construcción número 1191 es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 4E (SEQ ID NO:4). A la construcción resultante se le dio el número 1066 (Figura 4F, SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia se presenta en la Figura 4G (SEQ ID NO: 6). Una representación del plásmido 1066

se presenta en la Figura 4H.

B-2X35S/CMPV-HT/M de la rabia/NOS en sistema de amplificación BeYDV+Replicasa (Construcción número 1086)

Una secuencia que codifica la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprendía el sistema de amplificación BeYDV+replicasa en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de la proteína M completa se amplificó usando los cebadores IF-RabM-S3.c (Figura 4A, SEQ ID NO: 1) e IF-RabM-S1-4.r (Figura 4B, SEQ ID NO: 2) usando el gen M sintetizado (correspondiente a nt 2496-3104 del Genbank número de acceso FJ913470) (Figura 4C, SEQ ID NO: 3) como plantilla. El producto de PCR se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1193 (Figura 5A, SEQ ID NO: B1) se digirió con la enzima de restricción SacII y StuI y se usó el plásmido linealizado para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19 del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. La cadena principal de la construcción número 1193 es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 5B (SEQ ID NO: 7). A la construcción resultante se le da el número 1086 (Figura 5C, SEQ ID NO: 8). La secuencia de aminoácidos de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia se presenta en la Figura 4G (SEQ ID NO: 6). Se presenta una representación del plásmido 1086 en la Figura 5D.

C-2X35S/CPMV-HT/PDISP/G de la rabia/NOS (Construcción número 1071)

Una secuencia que codifica la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia se clonó en el sistema de expresión 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de la proteína G sin su péptido señal de tipo salvaje se amplificó usando los cebadores IF-RabG-S2+4.c (Figura 6A, SEQ ID NO:9) e IF-RabG-S1-4.r (Figura 6B, SEQ ID NO: 10), usando el gen G sintetizado (correspondiente a nt 3317-4891 del Genbank número de acceso EF206707) (Figura 6C, SEQ ID NO: 11) como plantilla. El producto de PCR se clonó en marco con el péptido señal PDI de la alfalfa en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1192 (Figura 6D) se digirió con la enzima de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1192 es un plásmido aceptor diseñado para la clonación "In Fusion" de genes de interés dentro del marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19 del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. La cadena principal de la construcción 1192 es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 6E (SEQ ID NO: 12). A la construcción resultante se le dio el número 1071 (Figura 6F, SEQ ID NO: 13). La secuencia de aminoácidos de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia se presenta en la Figura 6G (SEQ ID NO: 14). Una representación del plásmido 1071 se presenta en la Figura 6H.

D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/G de la rabia/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa (Construcción número 1091)

Una secuencia que codifica la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia se clonó en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprendía el sistema de amplificación BeYDV+replicasa en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter usando el siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de la proteína G de la rabia sin su péptido señal de tipo salvaje se amplificó usando los cebadores IF-RabG-S2+4.c (Figura 6A, SEQ ID NO: 9) e IF-RabG-S1-4.r (Figura 6B, SEQ ID NO: 10), usando el gen G sintetizado (correspondiente a nt 3317-4891 del Genbank número de acceso EF206707) (Figura 6C, SEQ ID NO: 11) como plantilla. El producto de PCR se clonó en marco con el péptido señal PDI de la alfalfa en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV usando el sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 1194 (Figura 7A) se digirió con la enzima de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1194 es un plásmido aceptor diseñado para la clonación "In Fusion" de genes de interés dentro del marco con un péptido señal PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación BeYDV. También incorpora una construcción génica para la co-expresión del supresor de TBSV P19

del silenciamiento bajo el promotor génico de plastocianina de la alfalfa y el terminador. La cadena principal de la construcción número 1194 es un plásmido binario de pCAMBIA y la secuencia de los bordes de ADN-t de izquierda a derecha se presenta en la Figura 7B (SEQ ID NO: 15). A la construcción resultante se le da el número 1091 (Figura 7C, SEQ ID NO: 16). La secuencia de aminoácidos de PDISP de influenza/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia se presenta en la Figura 6G (SEQ ID NO: 14). Una representación del plásmido 1091 se presenta en la Figura 7D.

Ejemplo 2: Preparación de biomasa vegetal, inóculo, agroinfiltración

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

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

Las *Agrobacteria* transfectadas con cada construcción se dejaron crecer en un medio YEB complementado con ácido 2-[N-morfolino]etansulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de canamicina y 25 µg/ml de carbenicilina a pH 5,6, hasta que alcanzaron una OD_{600} de entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso, se suspendieron de nuevo en medio de infiltración ($MgCl_2$ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante una noche a 4 ºC. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 2,5 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 2-6 días hasta la cosecha.

Las cepas de *A. tumefaciens* que comprenden las diversas construcciones como se describe en el presente documento se denominan usando el prefijo "AGL1". Por ejemplo, *A. tumefaciens* que comprende la construcción número 1091 se denomina "AGL1/1091".

Recolección de hojas y extracción total de proteínas (extracción mecánica)

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 ºC y se trituró en trozos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra del material vegetal congelado-triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogenización, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 ºC y estos extractos en bruto aclarados (sobrenadantes) se conservaron para su análisis.

Recolección de hojas y extracción total de proteínas (extracción bioquímica)

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó y se cortó en trozos pequeños (3 mm cuadrados) con un cortador rodante y se tuvo especial cuidado de no aplastar las hojas. La biomasa cortada se incubó durante 15-17 horas en 2,5 volúmenes de manitol 200 mM, citrato 125 mM, $NaPO_4$ 75 mM, NaCl 500 mM, ácido etilendiaminotetraacético 25 mM, Multifect CX CG al 1 % (v/v) (Genencor, Cat. N.º A03140G190), Multifect CX B al 1 % (v/v) (Genencor, Cat. N.º A03042G190) y Multifect Pectinase FE al 1 % (v/v) (Genencor, Cat. N.º A02080G190) pH 6,5 a 21 °C bajo agitación a 100-200 rpm. Después, la biomasa digerida se filtró en Miracloth (Calbiochem, Cat. 475855) y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y el sobrenadante se conservó para su análisis.

Análisis de proteínas e inmunotransferencia

El contenido de proteína total de los extractos en bruto depurados se determinó por el ensayo Bradford (Bio-Rad,

Hercules, CA) usando albúmina sérica bovina como el patrón de referencia. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron sobre membranas de difluoruro de polivinileno (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) para determinar la inmunodetección. Antes de la inmunotransferencia, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % y Tween-20 al 0,1 % en solución salina tamponada con Tris (TBS-T) durante 16-18 h a 4 °C. La inmunotransferencia se realizó mediante incubación con 0,25 µg/µl de un anticuerpo primario Santa Cruz SC-57995 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. La detección por quimioluminiscencia se realizó después de la incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa, (JIR, 115-035-146) diluido 1:10,000 en leche desnatada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia usando luminol como el sustrato (Roche Diagnostics Corporation).

Cromatografía de exclusión por tamaño de extracto de proteínas

Para la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), el sobrenadante de biomasa extraída bioquímicamente se concentró por centrifugación a 70.000 g durante 20 min a 4 ºC y el sedimento resultante se suspendió de nuevo en 1/50 en volumen de Tris 50 mM frío pH 8,0, NaCl 150 mM. Las columnas de cromatografía de exclusión por tamaño de 32 ml de microesferas de alta resolución Sephacryl™ S-500 (S-500 HR: GE Healthcare, Uppsala, Suecia, Cat. N.º 17-0613-10) se rellenaron y se equilibraron con tampón de equilibrio/elución (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM). Se cargó un milímetro y medio de extracto concentrado en la columna seguido de una etapa de elución con 45 ml de tampón de equilibrio/elución. La elución se recogió en fracciones de 1,5 ml y el contenido de proteína relativo de las fracciones eluidas se controló mezclando 10 µl de la fracción con 200 µl de reactivo de colorante de proteína Bio-Rad diluido (Bio-Rad, Hercules, CA). Se precipitaron doscientos microlitros de cada fracción mediante la adición de 5 volúmenes de acetona enfriada con hielo seguido de congelación durante una noche a -20 ºC. Las proteínas precipitadas se sedimentaron por centrifugación a 20000 g durante 10 min (4 °C) y se suspendieron de nuevo en 50 µl de tampón de carga de muestra SDS-PAGE caliente. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de NaOH 0,2 N seguido de 10 volúmenes de columna de Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, etanol al 20 %. Cada separación fue seguida de una calibración de la columna con Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, Estados Unidos). Se compararon los perfiles de elución de Blue Dextran 2000 y las proteínas solubles del huésped entre cada separación para asegurar la uniformidad de los perfiles de elución entre las columnas usadas.

Ejemplo 3: Evaluación de la expresión de la proteína G de la rabia y estrategias de coexpresión.

Se agroinfiltraron plantas de *Nicotiana benthamiana* con inóculos de AGL1/1071 (con o sin AGL1/1066) o AGL1/1091 (con o sin AGL1/1086) a diferente concentración y las hojas se cosecharon después de 5 días después de la infiltración (DPI) para plantas infiltradas con 1071 y 1071 + 1066 o de 3 a 4 DPI para plantas infiltradas con 1091 y 1091 + 1086. El análisis de transferencia de Western de extractos de proteína de hoja de plantas transformadas mostró que los elementos BeYDV se requerían para alcanzar un nivel de acumulación de proteína G detectable (comparar plantas infiltradas con 1071 y 1091 en la Figura 1). El nivel máximo de acumulación se alcanzó a 3 DPI para plantas infiltradas con AGL1/1091 con o sin coexpresión de proteína M (AGL1/1086) (Figura 1).

El método de extracción bioquímica se comparó con la extracción mecánica por su capacidad de liberar proteína G de la rabia de las hojas de las plantas transformadas. El análisis de transferencia de Western de extractos obtenidos por extracción bioquímica y extracción mecánica en plantas infiltradas con 1091 y 1091 + 1086 mostró que los extractos proteicos de la extracción bioquímica contenían significativamente más proteína G que el extracto de la extracción mecánica (Figura 2).

Los extractos de proteínas de plantas infiltradas con 1091 y 1091 + 1086 se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño para evaluar su ensamblaje en estructuras de alto peso molecular. Se recogieron las fracciones de elución y se concentró una alícuota de cada fracción mediante precipitación con acetona y se analizó el contenido de proteína G mediante transferencia de Western. Como se muestra en la Figura 3A, el contenido de proteína G alcanzó su punto máximo en las fracciones de elución SEC 8 a 10, que correspondían al volumen vacío de la columna donde se espera que se encuentren las VLP con envoltura. Se obtuvo un perfil de elución similar al separar, por SEC, extractos de proteínas de plantas que expresaban la proteína G de la rabia con proteína M (plantas infiltradas con 1091 + 1086, Figura 3B).

Ejemplo 4: Estudios con animales

Purificación rápida de Rab-VLP de plantas

Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con AGL1/1091 como se describe, por ejemplo, en el documento WO/2011/035422 que se incorpora en el presente documento por referencia. La extracción de Rab-VLP (también denominada NG-VLP, VLP de proteína G nativa, G-VLP o VLP de proteína G) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Brevemente, las hojas se recogieron el día 4 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm^2 y se digirieron durante 15 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. El tampón de digestión contenía Multifect Pectinase FE al 1,0 % (v/v), Multifect CX CG al 1,0 % (v/v) y/o Multifect CX B al 1,0 % (v/v) (todos de Genencor), cada uno en una solución de manitol 200 mM, citrato 75 mM, al 0,04 %, NaCl 500 mM, tampón de bisulfito sódico pH 6,0 usando una relación de biomasa:tampón de digestión de 1:2,5 (p/v).

Tras la digestión, la fracción apoplásica se filtró a través de un filtro de nylon de 400 µm para retirar el tejido vegetal bruto grueso (<5 % de la biomasa de partida). El extracto filtrado se centrifugó entonces a temperatura ambiente durante 15 min a 5000 x g para eliminar los protoplastos y los contaminantes intracelulares (proteínas, ADN, membranas, vesículas, pigmentos, etc.). A continuación, el sobrenadante se filtró en profundidad (para clarificación) usando un filtro de fibra de vidrio de 1,2 µm (Sartorius Stedim) y un filtro de 0,45/0,2 µm (Sartorius Stedim), antes de someterse a cromatografía.

Para preparar la cromatografía, el extracto puede concentrarse por métodos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, el extracto puede centrifugarse y el sedimento puede suspenderse de nuevo en tampón y volumen apropiados, o el extracto puede concentrarse y diafiltrarse en sistemas de filtración de flujo tangencial (TFF), equipados con una membrana apropiada antes de la carga en medios cromatográficos. Las membranas pueden ser fibras planas o huecas, el tamaño de poro puede variar entre 100, 300, 500, 750 kDa o corte de peso molecular de 1 µ. El tamaño del lumen se puede elegir de acuerdo con la línea de producto del proveedor, generalmente es preferible un tamaño de lumen de 0,75 a 1 mm. Las tasas de cizallamiento pueden ajustarse entre 2000 s^{-1} a 10 000 s^{-1} con caudales apropiados de retenido y permeado.

La fracción apoplásica clarificada se cargó en una columna de intercambio catiónico (Poros HS Applied Biosystems) equilibrada con un tampón de equilibrio/elución ($NaPO^4$ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 al 0,005 % pH 6,0). Una vez que el UV volvió a cero, el extracto se eluyó por etapas con el tampón de equilibrio/elución que contenía concentraciones crecientes de NaCl (500 mM). Cuando fue necesario, las fracciones cromatográficas se concentraron 10 veces utilizando dispositivos Amicon™ equipados con MWCO de 10 kDa. El análisis de proteínas se realizó como se describe en los ejemplos anteriores.

Finalmente, se puede emplear un último enfoque de formulación para intercambiar el tampón de la vacuna candidata final, mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una centrifugación o una etapa TFF para tal fin, como se ha descrito anteriormente.

En las condiciones descritas como anteriormente, puede obtenerse una pureza del 75 % o superior para la preparación de vacunas de Rab-VLP con calidad suficiente para el estudio de inmunogenicidad. Como se ilustra en la Figura 8A, la proteína G migra al peso molecular esperado de aprox. 55 kDa. El tamaño de la Rab-VLP se estima entre 175-190 nm por dispersión de luz dinámica (dimensionador Zeta 90, Malvern Instruments), un tamaño de partícula similar al descrito para el virus de la rabia.

Estudios de inmunización en ratones

Se evaluó la inmunogenicidad de Rab-VLP en el modelo de ratón Balb/c. Brevemente, se vacunaron grupos de ratones hembra BALB/c (8-10 semanas de edad; Charles River Laboratories, Estados Unidos) con un total de tres inyecciones (0,05 ml/sitio) en cada día de inmunización (Días de estudio 0, 7 y 28) en la musculatura izquierda y derecha de la extremidad posterior por vía intramuscular (i.m.) para un total de 0,1 ml de volumen inyectado que contenía varias dosis de la vacuna Rab-VLP (1 o 5 µg - con o sin adyuvantes). Las dosis se basaron en las concentraciones de proteína G determinadas por el ácido bicinconínico (BCA) combinado con la evaluación de la pureza por densitometría. Se usó Alhydrogel® a una concentración final del 1 % como adyuvante. El grupo de placebo se inmunizó por la misma ruta y régimen que la vacuna candidata. Se usaron quince ratones por grupo para proporcionar la potencia estadística adecuada para el estudio. Se recogieron muestras de suero antes de la vacunación (sueros preinmunes) y el día 7, 21 y 44. Se sacrificaron cinco animales por grupo los días 7, 21 y 44 para realizar una prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) para evaluar el anticuerpo protector en el suero. La dosis protectora establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la vacuna contra la rabia es de 0,5 unidades internacionales (UI) por ml. Como se muestra en la Figura 8b, la vacuna Rab-VLP sin adyuvante, con dosis tan bajas como 1 µg, permite alcanzar títulos más altos que los títulos estándar establecidos por la OMS.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MEDICAGO INC.
D'AOUST, Marc-Andre
LAVOIE, Pierre-Olivier
VEZINA, Louis-Philippe
MANON, COUTURE

<120> Producción de pseudovirus de la rabia en plantas

<130> V83990WO

<150> US 61/496.371
<151> 13-06-2011

<150> US 61/578.787
<151> 21-12-2011

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IF-RabM-S3.c

<400> 1
aaatttgtcg ggcccatgaa ctttctacgt aagatag 37

<210> 2
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IF-RabM-SI-4.r

<400> 2
actaaagaaa ataggccttt attctagaag cagagagga 39

<210> 3
<211> 609
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de proteína M sintetizada

<400> 3

atgaactttc tacgtaagat agtgaaaaat tgcagggacg aggacactca aaaaccctct 60

cccgtgtcag cccctctgga tgacgatgac ttgtggcttc cacccccctga atacgtcccg 120

ctgaaagaac ttacaagcaa gaagaacatg aggaactttt gtatcaacgg aggggttaaa 180

gtgtgtagcc cgaatggtta ctcgttcagg atcctgcggc acattctgaa atcattcgac 240

gagatatatt ctgggaatca taggatgatc gggttagtca aagtagttat tggactggct 300

ttgtcaggat ctccagtccc tgagggcatg aactgggtat acaaattgag gagaaccttt 360

atcttccagt gggctgattc caggggccct cttgaagggg aggagttgga atactctcag 420

gagatcactt gggatgatga tactgagttc gtcggattgc aaataagagt gattgcaaaa 480

cagtgtcata tccagggcag aatctggtgt atcaacatga acccgagagc atgtcaacta 540

tggtctgaca tgtctcttca gacacaaagg tccgaagagg acaaagattc ctctctgctt 600

ctagaataa 609

<210> 4
<211> 4903
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción número 1191

<400> 4

```
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg      60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgttgtca     120
aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa     180
aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg     240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt     300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata     360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaaa atagttgtac     420
aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa     480
taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga     540
aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta     600
atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt     660
taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta     720
tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaaa aaaaaaaacg     780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata     840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttaa gcccacgcat     900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa     960
accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt    1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag    1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg    1140
gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg    1200
```

actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcggttaa ctatgcagca 1380
tctcgatttt tcggtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tcgaggagtt 1440
agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt 1620
ctcctattta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
tcgttgttgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
gtggttaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgcatg ccggtcaaca tggtggagca 2160
cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat 2220
tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat 2280
ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg 2340
cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtggtccca aagatggacc 2400
cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 2460
ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga 2520
tacagtctca gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa 2580
cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga 2640
aggtggctcc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc 2700
tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga 2760
cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga 2820
tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca 2880
tttggagagg tattaaaatc ttaataggtt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa 2940
ccaaaccttc ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc 3000
ttgcgtgagc gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt 3060

tcactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg 3120

tgtacttgtc ctattcttgt cggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct 3180

gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct 3240

acttctgctt gacgaggtat tgttgcctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt 3300

tctataagaa atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga 3360

gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggcccgcg gatggcgaaa 3420

aacgttgcga ttttcggctt attgttttct cttcttgtgt tggttccttc tcagatcttc 3480

gcctgcaggc tcctcagcca aaacgacacc cccatctgtc tatccactgg cccctggatc 3540

tgctgcccaa actaactcca tggtgaccct gggatgcctg gtcaagggct atttccctga 3600

gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc ggtgtgcaca ccttcccagc 3660

tgtcctgcag tctgacctct acactctgag cagctcagtg actgtcccct ccagcacctg 3720

gcccagcgag accgtcacct gcaacgttgc ccacccggcc agcagcacca aggtggacaa 3780

gaaaattgtg cccagggatt gtggttgtaa gccttgcata tgtacagtcc cagaagtatc 3840

atctgtcttc atcttccccc caaagcccaa ggatgtgctc accattactc tgactcctaa 3900

ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc gaggtccagt tcagctggtt 3960

tgtagatgat gtggaggtgc acacagctca gacgcaaccc cgggaggagc agttcaacag 4020

cactttccgc tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag gactggctca atggcaagga 4080

gcgatcgctc accatcacca tcaccatcac catcaccatt aaaggcctat tttctttagt 4140

ttgaatttac tgttattcgg tgtgcatttc tatgtttggt gagcggtttt ctgtgctcag 4200

agtgtgttta ttttatgtaa tttaatttct ttgtgagctc ctgtttagca ggtcgtccct 4260

tcagcaagga cacaaaaaga ttttaatttt attaaaaaaa aaaaaaaaaa agaccgggaa 4320

ttcgatatca agcttatcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa 4380

gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta 4440

agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta 4500

gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg 4560

ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatct ctagagtctc aagcttggcg 4620

cgcccacgtg actagtggca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg 4680

gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg 4740

aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgctaga 4800

gcagcttgag cttggatcag attgtcgttt cccgccttca gtttaaacta tcagtgtttg 4860

acaggatata ttggcgggta aacctaagag aaaagagcgt tta 4903

<210> 5
<211> 2349
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Casete de expresión número 1066

<400> 5
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60

gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120

ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180

tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240

ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300

acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360

tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420

agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg 480

aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540

atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggt cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600

atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660

tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata 720

taaggaagtt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780

acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840

cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacgtt gtcagatcgt gcttcggcac 900

cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960

ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttcttgtcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020

gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080

gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttcttct 1140

tcttcttgct gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200

tggttttcga acttggagaa agattgttaa gcttctgtat attctgccca aatttgtcgg 1260

gcccatgaac tttctacgta agatagtgaa aaattgcagg gacgaggaca ctcaaaaacc 1320

ctctcccgtg tcagcccctc tggatgacga tgacttgtgg cttccacccc ctgaatacgt 1380

cccgctgaaa gaacttacaa gcaagaagaa catgaggaac ttttgtatca acggaggggt 1440

taaagtgtgt agcccgaatg gttactcgtt caggatcctg cggcacattc tgaaatcatt 1500

cgacgagata tattctggga atcataggat gatcgggtta gtcaaagtag ttattggact 1560

ggctttgtca ggatctccag tccctgaggg catgaactgg gtatacaaat tgaggagaac 1620

```
ctttatcttc cagtgggctg attccagggg ccctcttgaa ggggaggagt tggaatactc     1680
tcaggagatc acttgggatg atgatactga gttcgtcgga ttgcaaataa gagtgattgc     1740
aaaacagtgt catatccagg gcagaatctg gtgtatcaac atgaacccga gagcatgtca     1800
actatggtct gacatgtctc ttcagacaca aaggtccgaa gaggacaaag attcctctct     1860
gcttctagaa taaaggccta ttttctttag tttgaattta ctgttattcg gtgtgcattt     1920
ctatgtttgg tgagcggttt tctgtgctca gagtgtgttt attttatgta atttaatttc     1980
tttgtgagct cctgtttagc aggtcgtccc ttcagcaagg acacaaaaag attttaattt     2040
tattaaaaaa aaaaaaaaaa aagaccggga attcgatatc aagcttatcg acctgcagat     2100
cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg     2160
attatcatat aatttctgtt gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg     2220
acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg     2280
atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg     2340
ttactagat                                                             2349
```

<210> 6
<211> 202
<212> PRT
<213> Virus de la rabia

<400> 6

```
Met Asn Phe Leu Arg Lys Ile Val Lys Asn Cys Arg Asp Glu Asp Thr
1               5                   10                  15

Gln Lys Pro Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Asp Asp Asp Leu Trp
            20                  25                  30

Leu Pro Pro Pro Glu Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Thr Ser Lys Lys
        35                  40                  45

Asn Met Arg Asn Phe Cys Ile Asn Gly Gly Val Lys Val Cys Ser Pro
    50                  55                  60

Asn Gly Tyr Ser Phe Arg Ile Leu Arg His Ile Leu Lys Ser Phe Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Tyr Ser Gly Asn His Arg Met Ile Gly Leu Val Lys Val Val
                85                  90                  95

Ile Gly Leu Ala Leu Ser Gly Ser Pro Val Pro Glu Gly Met Asn Trp
            100                 105                 110

Val Tyr Lys Leu Arg Arg Thr Phe Ile Phe Gln Trp Ala Asp Ser Arg
```

115 120 125

Gly Pro Leu Glu Gly Glu Glu Leu Glu Tyr Ser Gln Glu Ile Thr Trp
130 135 140

Asp Asp Asp Thr Glu Phe Val Gly Leu Gln Ile Arg Val Ile Ala Lys
145 150 155 160

Gln Cys His Ile Gln Gly Arg Ile Trp Cys Ile Asn Met Asn Pro Arg
165 170 175

Ala Cys Gln Leu Trp Ser Asp Met Ser Leu Gln Thr Gln Arg Ser Glu
180 185 190

Glu Asp Lys Asp Ser Ser Leu Leu Leu Glu
195 200

<210> 7
<211> 6789
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción N.º 1193

<400> 7
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60

gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgttgtca 120

aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa 180

aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240

ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt 300

gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360

aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaaa atagttgtac 420

aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa 480

taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540

aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600

atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660

taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta 720

tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaaa aaaaaaaacg 780

gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840

acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttaa gcccacgcat 900

ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960

accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140
gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcggttaa ctatgcagca 1380
tctcgatttt tcggtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tcgaggagtt 1440
agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt 1620
ctcctattta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
tcgttgttgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
gtggttaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca cgcgtggcgc gccctagcag aaggcatgtt 2160
gttgtgactc cgaggggttg cctcaaactc tatcttataa ccggcgtgga ggcatggagg 2220
caagggcatt ttggtaattt aagtagttag tggaaaatga cgtcatttac ttaaagacga 2280
agtcttgcga caagggggc ccacgccgaa ttttaatatt accggcgtgg ccccacctta 2340
tcgcgagtgc tttagcacga gcggtccaga tttaaagtag aaaagttccc gcccactagg 2400
gttaaaggtg ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat ggtatttgat aaagcgtata 2460
ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtaca agcttcttaa gccggtcaac 2520
atggtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctcagaagac 2580
caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 2640
tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctcctacaaa 2700
tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtggtccc 2760
aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 2820

tcaaagcaag tggattgatg tgataacatg gtggagcacg acacacttgt ctactccaaa 2880
aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca acaaagggta 2940
atatccggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata 3000
gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt 3060
gaagatgcct ctgccgacag tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg 3120
gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact 3180
gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga 3240
agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaataggt tttgataaaa gcgaacgtgg 3300
ggaaacccga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc tctcttaaag caaacttctc 3360
tcttgtcttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga tcgtgcttcg gcaccagtac 3420
aacgttttct ttcactgaag cgaaatcaaa gatctctttg tggacacgta gtgcggcgcc 3480
attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt cttgggaaaa gaaagcttgc 3540
tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat tctgctgact ttcggcgggt 3600
gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgcctg tacttctttc ttcttcttct 3660
tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa acagagtttt cccgtggttt 3720
tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg cccaaatttg tcgggcccgc 3780
ggctcctcag ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc 3840
caaactaact ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtg 3900
acagtgacct ggaactctgg atccctgtcc agcggtgtgc acaccttccc agctgtcctg 3960
cagtctgacc tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc 4020
gagaccgtca cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt 4080
gtgcccaggg attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc 4140
ttcatcttcc ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg 4200
tgtgttgtgg tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gtttgtagat 4260
gatgtggagg tgcacacagc tcagacgcaa ccccgggagg agcagttcaa cagcactttc 4320
cgctcagtca gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggaaggccta 4380
ttttctttag tttgaattta ctgttattcg gtgtgcattt ctatgtttgg tgagcggttt 4440
tctgtgctca gagtgtgttt attttatgta atttaatttc tttgtgagct cctgtttagc 4500
aggtcgtccc ttcagcaagg acacaaaaag attttaattt tattaaaaaa aaaaaaaaaa 4560
aagaccggga attcgatatc aagcttatcg acctgcagat cgttcaaaca tttggcaata 4620
aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt 4680
gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt 4740

ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg 4800
cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc tctagagtct 4860
caagcttggc gcggggtacc gagctcgaat tccgagtgta cttcaagtca gttggaaatc 4920
aataaaatga ttattttatg aatatatttc attgtgcaag tagatagaaa ttacatatgt 4980
tacataacac acgaaataaa caaaaaaaca caatccaaaa caaacacccc aaacaaaata 5040
acactatata tatcctcgta tgaggagagg cacgttcagt gactcgacga ttcccgagca 5100
aaaaaagtct ccccgtcaca catatagtgg gtgacgcaat tatcttcaaa gtaatccttc 5160
tgttgacttg tcattgataa catccagtct tcgtcaggat tgcaaagaat tatagaaggg 5220
atcccacctt ttattttctt ctttttttcca tatttagggt tgacagtgaa atcagactgg 5280
caacctatta attgcttcca caatgggacg aacttgaagg ggatgtcgtc gatgatatta 5340
taggtggcgt gttcatcgta gttggtgaag tcgatggtcc cgttccagta gttgtgtcgc 5400
ccgagacttc tagcccaggt ggtctttccg gtacgagttg gtccgcagat gtagaggctg 5460
gggtgtctga ccccagtcct tccctcatcc tggttagatc ggccatccac tcaaggtcag 5520
attgtgcttg atcgtaggag acaggatgta tgaaagtgta ggcatcgatg cttacatgat 5580
ataggtgcgt ctctctccag ttgtgcagat cttcgtggca gcggagatct gattctgtga 5640
agggcgacac gtactgctca ggttgtggag gaaataattt gttggctgaa tattccagcc 5700
attgaagctt tgttgcccat tcatgaggga attcttcttt gatcatgtca agatactcct 5760
ccttagacgt tgcagtctgg ataatagttc gccatcgtgc gtcagatttg cgaggagaga 5820
ccttatgatc tcggaaatct cctctggttt taatatctcc gtcctttgat atgtaatcaa 5880
ggacttgttt agagtttcta gctggctgga tattagggtg atttccttca aaatcgaaaa 5940
aagaaggatc cctaatacaa ggttttttat caagctggat aagagcatga tagtgggtag 6000
tgccatcttg atgaagctca gaagcaacac caaggaagaa aataagaaaa ggtgtgagtt 6060
tctcccagag aaactggaat aaatcatctc tttgagatga gcacttgggg taggtaagga 6120
aaacatattt agattggagt ctgaagttct tgctagcaga aggcatgttg ttgtgactcc 6180
gaggggttgc ctcaaactct atcttataac cggcgtggag gcatggaggc aagggcattt 6240
tggtaattta agtagttagt ggaaaatgac gtcatttact taaagacgaa gtcttgcgac 6300
aagggggcc cacgccgaat tttaatatta ccggcgtggc cccaccttat cgcgagtgct 6360
ttagcacgag cggtccagat ttaaagtaga aaagttcccg cccactaggg ttaaaggtgt 6420
tcacactata aaagcatata cgatgtgatg gtatttgatg gagcgtatat tgtatcaggt 6480
atttccgtcg gatacgaatt attcgtacgg ccggccacta gtggcactgg ccgtcgtttt 6540
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc 6600

```
cccttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt      6660

gcgcagcctg aatggcgaat gctagagcag cttgagcttg gatcagattg tcgtttcccg      6720

ccttcagttt aaactatcag tgtttgacag gatatattgg cgggtaaacc taagagaaaa      6780

gagcgttta                                                              6789
```

<210> 8
<211> 4379
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Casete de expresión número 1086

<400> 8

```
ctagcagaag gcatgttgtt gtgactccga ggggttgcct caaactctat cttataaccg        60

gcgtggaggc atggaggcaa gggcattttg gtaatttaag tagttagtgg aaaatgacgt       120

catttactta aagacgaagt cttgcgacaa ggggggccca cgccgaattt taatattacc       180

ggcgtggccc caccttatcg cgagtgcttt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa       240

agttcccgcc cactagggtt aaaggtgttc acactataaa agcatatacg atgtgatggt       300

atttgataaa gcgtatattg tatcaggtat ttccgtcgga tacgaattat tcgtacaagc       360

ttcttaagcc ggtcaacatg gtggagcacg acacacttgt ctactccaaa aatatcaaag       420

atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca acaaagggta atatccggaa       480

acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg       540

aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct       600

ctgccgacag tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag       660

acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga taacatggtg gagcacgaca       720

cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga       780

cttttcaaca aagggtaata tccggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc       840

actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgccat cattgcgata       900

aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac       960

ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt      1020

gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc      1080

cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggta ttaaaatctt aataggtttt      1140

gataaaagcg aacgtgggga aacccgaacc aaaccttctt ctaaactctc tctcatctct      1200

cttaaagcaa acttctctct tgtctttctt gcgtgagcga tcttcaacgt tgtcagatcg      1260

tgcttcggca ccagtacaac gttttctttc actgaagcga aatcaaagat ctctttgtgg      1320

acacgtagtg cggcgccatt aaataacgtg tacttgtcct attcttgtcg gtgtggtctt      1380
```

gggaaaagaa agcttgctgg aggctgctgt tcagccccat acattacttg ttacgattct 1440
gctgactttc ggcgggtgca atatctctac ttctgcttga cgaggtattg ttgcctgtac 1500
ttctttcttc ttcttcttgc tgattggttc tataagaaat ctagtatttt ctttgaaaca 1560
gagttttccc gtggttttcg aacttggaga aagattgtta agcttctgta tattctgccc 1620
aaatttgtcg ggcccatgaa ctttctacgt aagatagtga aaaattgcag ggacgaggac 1680
actcaaaaac cctctcccgt gtcagcccct ctggatgacg atgacttgtg gcttccaccc 1740
cctgaatacg tcccgctgaa agaacttaca agcaagaaga acatgaggaa cttttgtatc 1800
aacggagggg ttaaagtgtg tagcccgaat ggttactcgt tcaggatcct gcggcacatt 1860
ctgaaatcat tcgacgagat atattctggg aatcatagga tgatcgggtt agtcaaagta 1920
gttattggac tggctttgtc aggatctcca gtccctgagg gcatgaactg ggtatacaaa 1980
ttgaggagaa cctttatctt ccagtgggct gattccaggg gccctcttga aggggaggag 2040
ttggaatact ctcaggagat cacttgggat gatgatactg agttcgtcgg attgcaaata 2100
agagtgattg caaaacagtg tcatatccag ggcagaatct ggtgtatcaa catgaacccg 2160
agagcatgtc aactatggtc tgacatgtct cttcagacac aaaggtccga agaggacaaa 2220
gattcctctc tgcttctaga ataaaggcct attttcttta gtttgaattt actgttattc 2280
ggtgtgcatt tctatgtttg gtgagcggtt ttctgtgctc agagtgtgtt tattttatgt 2340
aatttaattt ctttgtgagc tcctgtttag caggtcgtcc cttcagcaag gacacaaaaa 2400
gattttaatt ttattaaaaa aaaaaaaaaa aaagaccggg aattcgatat caagcttatc 2460
gacctgcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg 2520
gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca 2580
tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca 2640
tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg 2700
tgtcatctat gttactagat ctctagagtc tcaagcttgg cgcggggtac cgagctcgaa 2760
ttccgagtgt acttcaagtc agttggaaat caataaaatg attattttat gaatatattt 2820
cattgtgcaa gtagatagaa attacatatg ttacataaca cacgaaataa acaaaaaaac 2880
acaatccaaa acaaacaccc caaacaaaat aacactatat atatcctcgt atgaggagag 2940
gcacgttcag tgactcgacg attcccgagc aaaaaaagtc tccccgtcac acatatagtg 3000
ggtgacgcaa ttatcttcaa agtaatcctt ctgttgactt gtcattgata acatccagtc 3060
ttcgtcagga ttgcaaagaa ttatagaagg gatcccacct tttattttct tctttttcc 3120
atatttaggg ttgacagtga aatcagactg gcaacctatt aattgcttcc acaatgggac 3180
gaacttgaag gggatgtcgt cgatgatatt ataggtggcg tgttcatcgt agttggtgaa 3240

gtcgatggtc ccgttccagt agttgtgtcg cccgagactt ctagcccagg tggtctttcc 3300

ggtacgagtt ggtccgcaga tgtagaggct ggggtgtctg accccagtcc ttccctcatc 3360

ctggttagat cggccatcca ctcaaggtca gattgtgctt gatcgtagga gacaggatgt 3420

atgaaagtgt aggcatcgat gcttacatga tataggtgcg tctctctcca gttgtgcaga 3480

tcttcgtggc agcggagatc tgattctgtg aagggcgaca cgtactgctc aggttgtgga 3540

ggaaataatt tgttggctga atattccagc cattgaagct ttgttgccca ttcatgaggg 3600

aattcttctt tgatcatgtc aagatactcc tccttagacg ttgcagtctg gataatagtt 3660

cgccatcgtg cgtcagattt gcgaggagag accttatgat ctcggaaatc tcctctggtt 3720

ttaatatctc cgtcctttga tatgtaatca aggacttgtt tagagtttct agctggctgg 3780

atattagggt gatttccttc aaaatcgaaa aaagaaggat ccctaataca aggtttttta 3840

tcaagctgga taagagcatg atagtgggta gtgccatctt gatgaagctc agaagcaaca 3900

ccaaggaaga aaataagaaa aggtgtgagt ttctcccaga gaaactggaa taaatcatct 3960

ctttgagatg agcacttggg gtaggtaagg aaaacatatt tagattggag tctgaagttc 4020

ttgctagcag aaggcatgtt gttgtgactc cgaggggttg cctcaaactc tatcttataa 4080

ccggcgtgga ggcatggagg caagggcatt ttggtaattt aagtagttag tggaaaatga 4140

cgtcatttac ttaaagacga agtcttgcga caagggggc ccacgccgaa ttttaatatt 4200

accggcgtgg ccccacctta tcgcgagtgc tttagcacga gcggtccaga tttaaagtag 4260

aaaagttccc gcccactagg gttaaaggtg ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat 4320

ggtatttgat ggagcgtata ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtac 4379

<210> 9
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IF-RabG-S2+4.c

<400> 9
tctcagatct tcgccaaatt ccctatttac acgataccag ac 42

<210> 10
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IF-RabG-SI-4.r

<400> 10
actaaagaaa ataggccttc acagtctggt ctcaccccca ctcttgtg 48

<210> 11
<211> 1575
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de proteína G de la rabia sintetizada

<400> 11
atggttcctc aggctctcct gtttgtaccc cttctggttt ttccattgtg ttttgggaaa 60

ttccctattt acacgatacc agacaagctt ggtccctgga gcccgattga catacatcac 120

ctcagctgcc caaacaattt ggtagtggag gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc 180

tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc ttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc 240

acaggcgttg tgacggaggc tgaaacctac actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg 300

ttcaaaagaa agcatttccg cccaacacca gatgcatgta gagccgcgta caactggaag 360

atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg 420

cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat 480

ttggacccat atgacagatc ccttcactcg agggtcttcc ctagcgggaa gtgctcagga 540

gtagcggtgt cttctaccta ctgctccact aaccacgatt acaccatttg gatgcccgag 600

aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt tttaccaata gtagagggaa gagagcatcc 660

aaagggagtg agacttgcgg ctttgtagat gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga 720

gcatgcaaac tcaagttatg tggagttcta ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc 780

gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaatgg tgccctcccg atcagttggt gaacctgcac 840

gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt gttgtagagg agttggtcag gaagagagag 900

gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc 960

agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc 1020

ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctcccttca 1080

aaagggtgtt taagagttgg ggggaggtgt catcctcatg tgaacggggt gtttttcaat 1140

ggtataatat taggacctga cggcaatgtc ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc 1200

cagcaacata tggagttgtt ggaatcctcg gttatccccc ttgtgcaccc cctggcagac 1260

ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttgttgaagt tcaccttccc 1320

gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta 1380

ttactgagtg caggggccct gactgccttg atgttgataa ttttcctgat gacatgttgt 1440

agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggaggtg 1500

tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt 1560

gagaccagac tgtga 1575

<210> 12
<211> 4897
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción número 1192

<400> 12
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60

gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgttgtca 120

aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa 180

aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240

ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt 300

gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360

aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaaa atagttgtac 420

aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa 480

taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540

aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600

atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660

taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta 720

tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaaa aaaaaaaacg 780

gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840

acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttaa gcccacgcat 900

ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960

accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020

gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080

aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140

gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200

actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260

aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320

gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcggttaa ctatgcagca 1380

tctcgatttt tcggtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tcgaggagtt 1440

agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500

tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560

tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt 1620

ctcctattta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
tcgttgttgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
gtggttaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgcatg ccggtcaaca tggtggagca 2160
cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat 2220
tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gcccagctat 2280
ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg 2340
cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtggtccca aagatggacc 2400
cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 2460
ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga 2520
tacagtctca gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa 2580
cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga 2640
aggtggctcc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc 2700
tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga 2760
cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga 2820
tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca 2880
tttggagagg tattaaaatc ttaataggtt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa 2940
ccaaaccttc ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc 3000
ttgcgtgagc gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt 3060
tcactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg 3120
tgtacttgtc ctattcttgt cggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct 3180
gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct 3240
acttctgctt gacgaggtat tgttgcctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt 3300
tctataagaa atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga 3360
gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggcccatg gcgaaaaacg 3420
ttgcgatttt cggcttattg ttttctcttc ttgtgttggt tccttctcag atcttcgccg 3480

cggctcctca gccaaaacga cacccccatc tgtctatcca ctggcccctg gatctgctgc 3540

ccaaactaac tccatggtga ccctgggatg cctggtcaag ggctatttcc ctgagccagt 3600

gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacaccttcc cagctgtcct 3660

gcagtctgac ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag 3720

cgagaccgtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat 3780

tgtgcccagg gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt 3840

cttcatcttc cccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac 3900

gtgtgttgtg gtagacatca gcaaggatga tcccgaggtc cagttcagct ggtttgtaga 3960

tgatgtggag gtgcacacag ctcagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt 4020

ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagcgatc 4080

gctcaccatc accatcacca tcaccatcac cattaaaggc ctattttctt tagtttgaat 4140

ttactgttat tcggtgtgca tttctatgtt tggtgagcgg ttttctgtgc tcagagtgtg 4200

tttattttat gtaatttaat ttctttgtga gctcctgttt agcaggtcgt cccttcagca 4260

aggacacaaa aagattttaa ttttattaaa aaaaaaaaaa aaaaagaccg ggaattcgat 4320

atcaagctta tcgacctgca gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga 4380

atcctgttgc cggtcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg 4440

taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc 4500

cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat 4560

tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag atctctagag tctcaagctt ggcgcgccca 4620

cgtgactagt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta 4680

cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 4740

cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgc tagagcagct 4800

tgagcttgga tcagattgtc gtttcccgcc ttcagtttaa actatcagtg tttgacagga 4860

tatattggcg ggtaaaccta agagaaaaga gcgttta 4897

<210> 13
<211> 3330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Casete de expresión N.º 1071

<400> 13
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60

gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120

ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180

tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa 420
agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg 480
aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggt cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata 720
taaggaagtt catttcattt ggagaggtat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
acgtggggaa acccgaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacgtt gtcagatcgt gcttcggcac 900
cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttcttgtcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattacttgt tacgattctg ctgactttcg 1080
gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttcttct 1140
tcttcttgct gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200
tggttttcga acttggagaa agattgttaa gcttctgtat attctgccca aatttgtcgg 1260
gcccatggcg aaaaacgttg cgattttcgg cttattgttt tctcttcttg tgttggttcc 1320
ttctcagatc ttcgccaaat tccctattta cacgatacca gacaagcttg gtccctggag 1380
cccgattgac atacatcacc tcagctgccc aaacaatttg gtagtggagg acgaaggatg 1440
caccaacctg tcagggttct cctacatgga acttaaagtt ggatacatct tagccataaa 1500
aatgaacggg ttcacttgca caggcgttgt gacggaggct gaaacctaca ctaacttcgt 1560
tggttatgtc acaaccacgt tcaaaagaaa gcatttccgc ccaacaccag atgcatgtag 1620
agccgcgtac aactggaaga tggccggtga ccccagatat gaagagtctc tacacaatcc 1680
gtaccctgac taccgctggc ttcgaactgt aaaaaccacc aaggagtctc tcgttatcat 1740
atctccaagt gtggcagatt tggacccata tgacagatcc cttcactcga gggtcttccc 1800
tagcgggaag tgctcaggag tagcggtgtc ttctacctac tgctccacta accacgatta 1860
caccatttgg atgcccgaga atccgagact agggatgtct tgtgacattt ttaccaatag 1920
tagagggaag agagcatcca aagggagtga gacttgcggc tttgtagatg aaagaggcct 1980
atataagtct ttaaaaggag catgcaaact caagttatgt ggagttctag gacttagact 2040

tatggatgga acatgggtcg cgatgcaaac atcaaatgaa accaaatggt gccctcccga 2100

tcagttggtg aacctgcacg actttcgctc agacgaaatt gagcaccttg ttgtagagga 2160

gttggtcagg aagagagagg agtgtctgga tgcactagag tccatcatga caaccaagtc 2220

agtgagtttc agacgtctca gtcatttaag aaaacttgtc cctgggtttg gaaaagcata 2280

taccatattc aacaagacct tgatggaagc cgatgctcac tacaagtcag tcagaacttg 2340

gaatgagatc ctcccttcaa aagggtgttt aagagttggg gggaggtgtc atcctcatgt 2400

gaacggggtg tttttcaatg gtataatatt aggacctgac ggcaatgtct taatcccaga 2460

gatgcaatca tccctcctcc agcaacatat ggagttgttg gaatcctcgg ttatccccct 2520

tgtgcacccc ctggcagacc cgtctaccgt tttcaaggac ggtgacgagg ctgaggattt 2580

tgttgaagtt caccttcccg atgtgcacaa tcaggtctca ggagttgact tgggtctccc 2640

gaactggggg aagtatgtat tactgagtgc aggggccctg actgccttga tgttgataat 2700

tttcctgatg acatgttgta gaagagtcaa tcgatcagaa cctacgcaac acaatctcag 2760

agggacaggg agggaggtgt cagtcactcc ccaaagcggg aagatcatat cttcatggga 2820

atcacacaag agtgggggtg agaccagact gtgaaggcct attttcttta gtttgaattt 2880

actgttattc ggtgtgcatt tctatgtttg gtgagcggtt ttctgtgctc agagtgtgtt 2940

tattttatgt aatttaattt ctttgtgagc tcctgtttag caggtcgtcc cttcagcaag 3000

gacacaaaaa gattttaatt ttattaaaaa aaaaaaaaaa aaagaccggg aattcgatat 3060

caagcttatc gacctgcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat 3120

cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta 3180

ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg 3240

caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta 3300

tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat 3330

<210> 14
<211> 529
<212> PRT
<213> Virus de la rabia

<400> 14
Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro
20 25 30

Asp Lys Leu Gly Pro Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys
35 40 45

Pro Asn Asn Leu Val Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly
50 55 60

Phe Ser Tyr Met Glu Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met
65 70 75 80

Asn Gly Phe Thr Cys Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr
85 90 95

Asn Phe Val Gly Tyr Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg
100 105 110

Pro Thr Pro Asp Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly
115 120 125

Asp Pro Arg Tyr Glu Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg
130 135 140

Trp Leu Arg Thr Val Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser
145 150 155 160

Pro Ser Val Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg
165 170 175

Val Phe Pro Ser Gly Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr
180 185 190

Cys Ser Thr Asn His Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg
195 200 205

Leu Gly Met Ser Cys Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala
210 215 220

Ser Lys Gly Ser Glu Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Lys Ser Leu Lys Gly Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly
245 250 255

Leu Arg Leu Met Asp Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu
260 265 270

Thr Lys Trp Cys Pro Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe Arg
275 280 285

Ser Asp Glu Ile Glu His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg
290 295 300

Glu Glu Cys Leu Asp Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val
305 310 315 320

Ser Phe Arg Arg Leu Ser His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly
325 330 335

Lys Ala Tyr Thr Ile Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His
340 345 350

Tyr Lys Ser Val Arg Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys
355 360 365

Leu Arg Val Gly Gly Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe
370 375 380

Asn Gly Ile Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met
385 390 395 400

Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val
405 410 415

Ile Pro Leu Val His Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp
420 425 430

Gly Asp Glu Ala Glu Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His
435 440 445

Asn Gln Val Ser Gly Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr
450 455 460

Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
465 470 475 480

Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His
485 490 495

Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly
500 505 510

Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
515 520 525

Leu

<210> 15
<211> 6861
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción N.º 1194

<400> 15

```
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg      60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgttgtca     120
aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa     180
aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg     240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatttt     300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata     360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaaa atagttgtac     420
aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa     480
taaggatgac gcattagaga gatgtaccat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga     540
aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta     600
atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt     660
taatttgaca tttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta     720
tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaaa aaaaaaaacg     780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata     840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccactttaa gcccacgcat     900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa     960
accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt    1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag    1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg    1140
gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg    1200
actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc    1260
aaggaaagct ggggtttcgg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg    1320
gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcggttaa ctatgcagca    1380
tctcgatttt tcggtttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcggtt tcgaggagtt    1440
agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcgg    1500
tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga    1560
tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttcttcgt    1620
ctcctattta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa    1680
```

tcgttgttgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
gtggttaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
tatcgaaatt cattaacaat caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
ccgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca cgcgtggcgc gccctagcag aaggcatgtt 2160
gttgtgactc cgaggggttg cctcaaactc tatcttataa ccggcgtgga ggcatggagg 2220
caagggcatt ttggtaattt aagtagttag tggaaaatga cgtcatttac ttaaagacga 2280
agtcttgcga caagggggc ccacgccgaa ttttaatatt accggcgtgg ccccacctta 2340
tcgcgagtgc tttagcacga gcggtccaga tttaaagtag aaaagttccc gcccactagg 2400
gttaaaggtg ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat ggtatttgat aaagcgtata 2460
ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtaca agcttcttaa gccggtcaac 2520
atggtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctcagaagac 2580
caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat 2640
tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctcctacaaa 2700
tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtggtccc 2760
aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 2820
tcaaagcaag tggattgatg tgataacatg gtggagcacg acacacttgt ctactccaaa 2880
aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca acaaagggta 2940
atatccggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata 3000
gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt 3060
gaagatgcct ctgccgacag tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg 3120
gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact 3180
gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga 3240
agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaataggt tttgataaaa gcgaacgtgg 3300
ggaaacccga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc tctcttaaag caaacttctc 3360
tcttgtcttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga tcgtgcttcg gcaccagtac 3420
aacgttttct ttcactgaag cgaaatcaaa gatctctttg tggacacgta gtgcggcgcc 3480
attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt cttgggaaaa gaaagcttgc 3540

tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat tctgctgact ttcggcgggt 3600
gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgcctg tacttctttc ttcttcttct 3660
tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa acagagtttt cccgtggttt 3720
tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg cccaaatttg tcgggcccat 3780
ggcgaaaaac gttgcgattt tcggcttatt gttttctctt cttgtgttgg ttccttctca 3840
gatcttcgcc gcggctcctc agccaaaacg acacccccat ctgtctatcc actggcccct 3900
ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg accctgggat gcctggtcaa gggctatttc 3960
cctgagccag tgacagtgac ctggaactct ggatccctgt ccagcggtgt gcacaccttc 4020
ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc 4080
acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac gttgcccacc cggccagcag caccaaggtg 4140
gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa 4200
gtatcatctg tcttcatctt ccccccaaag cccaaggatg tgctcaccat tactctgact 4260
cctaaggtca cgtgtgttgt ggtagacatc agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc 4320
tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc 4380
aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt cccatcatgc accaggactg gctcaatggc 4440
aaggaaggcc tattttcttt agtttgaatt tactgttatt cggtgtgcat ttctatgttt 4500
ggtgagcggt tttctgtgct cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tctttgtgag 4560
ctcctgttta gcaggtcgtc ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat tttattaaaa 4620
aaaaaaaaaa aaaagaccgg gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcgttcaaa 4680
catttggcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat 4740
ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt 4800
tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa 4860
caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga 4920
tctctagagt ctcaagcttg gcgcggggta ccgagctcga attccgagtg tacttcaagt 4980
cagttggaaa tcaataaaat gattatttta tgaatatatt tcattgtgca agtagataga 5040
aattacatat gttacataac acacgaaata aacaaaaaaa cacaatccaa aacaaacacc 5100
ccaaacaaaa taacactata tatatcctcg tatgaggaga ggcacgttca gtgactcgac 5160
gattcccgag caaaaaaagt ctccccgtca cacatatagt gggtgacgca attatcttca 5220
aagtaatcct tctgttgact tgtcattgat aacatccagt cttcgtcagg attgcaaaga 5280
attatagaag ggatcccacc ttttattttc ttctttttc catatttagg gttgacagtg 5340
aaatcagact ggcaacctat taattgcttc cacaatggga cgaacttgaa ggggatgtcg 5400
tcgatgatat tataggtggc gtgttcatcg tagttggtga agtcgatggt cccgttccag 5460

tagttgtgtc gcccgagact tctagcccag gtggtctttc cggtacgagt tggtccgcag 5520

atgtagaggc tggggtgtct gaccccagtc cttccctcat cctggttaga tcggccatcc 5580

actcaaggtc agattgtgct tgatcgtagg agacaggatg tatgaaagtg taggcatcga 5640

tgcttacatg atataggtgc gtctctctcc agttgtgcag atcttcgtgg cagcggagat 5700

ctgattctgt gaagggcgac acgtactgct caggttgtgg aggaaataat ttgttggctg 5760

aatattccag ccattgaagc tttgttgccc attcatgagg gaattcttct ttgatcatgt 5820

caagatactc ctccttagac gttgcagtct ggataatagt tcgccatcgt gcgtcagatt 5880

tgcgaggaga gaccttatga tctcggaaat ctcctctggt tttaatatct ccgtcctttg 5940

atatgtaatc aaggacttgt ttagagtttc tagctggctg gatattaggg tgatttcctt 6000

caaaatcgaa aaaagaagga tccctaatac aaggtttttt atcaagctgg ataagagcat 6060

gatagtgggt agtgccatct tgatgaagct cagaagcaac accaaggaag aaaataagaa 6120

aaggtgtgag tttctcccag agaaactgga ataaatcatc tctttgagat gagcacttgg 6180

ggtaggtaag gaaaacatat ttagattgga gtctgaagtt cttgctagca gaaggcatgt 6240

tgttgtgact ccgaggggtt gcctcaaact ctatcttata accggcgtgg aggcatggag 6300

gcaagggcat tttggtaatt taagtagtta gtggaaaatg acgtcattta cttaaagacg 6360

aagtcttgcg acaagggggg cccacgccga attttaatat taccggcgtg gccccacctt 6420

atcgcgagtg ctttagcacg agcggtccag atttaaagta gaaaagttcc cgcccactag 6480

ggttaaaggt gttcacacta taaaagcata tacgatgtga tggtatttga tggagcgtat 6540

attgtatcag gtatttccgt cggatacgaa ttattcgtac ggccggccac tagtggcact 6600

ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgcct 6660

tgcagcacat ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 6720

ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atgctagagc agcttgagct tggatcagat 6780

tgtcgtttcc cgccttcagt ttaaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa 6840

cctaagagaa aagagcgttt a 6861

<210> 16
<211> 5360
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Casete de expresión número 1091

<400> 16
ctagcagaag gcatgttgtt gtgactccga ggggttgcct caaactctat cttataaccg 60

gcgtggaggc atggaggcaa gggcattttg gtaatttaag tagttagtgg aaaatgacgt 120

catttactta aagacgaagt cttgcgacaa ggggggccca cgccgaattt taatattacc 180
ggcgtggccc caccttatcg cgagtgcttt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa 240
agttcccgcc cactagggtt aaaggtgttc acactataaa agcatatacg atgtgatggt 300
atttgataaa gcgtatattg tatcaggtat ttccgtcgga tacgaattat tcgtacaagc 360
ttcttaagcc ggtcaacatg gtggagcacg acacacttgt ctactccaaa aatatcaaag 420
atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca acaaagggta atatccggaa 480
acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg 540
aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct 600
ctgccgacag tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag 660
acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga taacatggtg gagcacgaca 720
cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga 780
cttttcaaca aagggtaata tccggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc 840
actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgccat cattgcgata 900
aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac 960
ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt 1020
gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc 1080
cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggta ttaaaatctt aataggtttt 1140
gataaaagcg aacgtgggga aacccgaacc aaaccttctt ctaaactctc tctcatctct 1200
cttaaagcaa acttctctct tgtctttctt gcgtgagcga tcttcaacgt tgtcagatcg 1260
tgcttcggca ccagtacaac gttttctttc actgaagcga aatcaaagat ctctttgtgg 1320
acacgtagtg cggcgccatt aaataacgtg tacttgtcct attcttgtcg gtgtggtctt 1380
gggaaaagaa agcttgctgg aggctgctgt tcagccccat acattacttg ttacgattct 1440
gctgactttc ggcgggtgca atatctctac ttctgcttga cgaggtattg ttgcctgtac 1500
ttctttcttc ttcttcttgc tgattggttc tataagaaat ctagtatttt ctttgaaaca 1560
gagttttccc gtggttttcg aacttggaga aagattgtta agcttctgta tattctgccc 1620
aaatttgtcg ggcccatggc gaaaaacgtt gcgattttcg gcttattgtt ttctcttctt 1680
gtgttggttc cttctcagat cttcgccaaa ttccctattt acacgatacc agacaagctt 1740
ggtccctgga gcccgattga catacatcac ctcagctgcc caaacaattt ggtagtggag 1800
gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc 1860
ttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc acaggcgttg tgacggaggc tgaaacctac 1920
actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg ttcaaaagaa agcatttccg cccaacacca 1980
gatgcatgta gagccgcgta caactggaag atggccggtg accccagata tgaagagtct 2040

ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct 2100
ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat ttggacccat atgacagatc ccttcactcg 2160
agggtcttcc ctagcgggaa gtgctcagga gtagcggtgt cttctaccta ctgctccact 2220
aaccacgatt acaccatttg gatgcccgag aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt 2280
tttaccaata gtagagggaa gagagcatcc aaagggagtg agacttgcgg ctttgtagat 2340
gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga gcatgcaaac tcaagttatg tggagttcta 2400
ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaatgg 2460
tgccctcccg atcagttggt gaacctgcac gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt 2520
gttgtagagg agttggtcag gaagagagag gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg 2580
acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt 2640
ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca 2700
gtcagaactt ggaatgagat cctcccttca aaagggtgtt taagagttgg ggggaggtgt 2760
catcctcatg tgaacggggt gtttttcaat ggtataatat taggacctga cggcaatgtc 2820
ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc cagcaacata tggagttgtt ggaatcctcg 2880
gttatccccc ttgtgcaccc cctggcagac ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag 2940
gctgaggatt ttgttgaagt tcaccttccc gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac 3000
ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta ttactgagtg caggggccct gactgccttg 3060
atgttgataa ttttcctgat gacatgttgt agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa 3120
cacaatctca gagggacagg gagggaggtg tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata 3180
tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt gagaccagac tgtgaaggcc tattttcttt 3240
agtttgaatt tactgttatt cggtgtgcat ttctatgttt ggtgagcggt tttctgtgct 3300
cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tctttgtgag ctcctgttta gcaggtcgtc 3360
ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat tttattaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg 3420
gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct 3480
taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 3540
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 3600
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact 3660
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tctctagagt ctcaagcttg 3720
gcgcggggta ccgagctcga attccgagtg tacttcaagt cagttggaaa tcaataaaat 3780
gattatttta tgaatatatt tcattgtgca agtagataga aattacatat gttacataac 3840
acacgaaata aacaaaaaaa cacaatccaa aacaaacacc ccaaacaaaa taacactata 3900

tatatcctcg tatgaggaga ggcacgttca gtgactcgac gattcccgag caaaaaaagt 3960
ctccccgtca cacatatagt gggtgacgca attatcttca aagtaatcct tctgttgact 4020
tgtcattgat aacatccagt cttcgtcagg attgcaaaga attatagaag ggatcccacc 4080
ttttattttc ttctttttc catatttagg gttgacagtg aaatcagact ggcaacctat 4140
taattgcttc cacaatggga cgaacttgaa ggggatgtcg tcgatgatat tataggtggc 4200
gtgttcatcg tagttggtga agtcgatggt cccgttccag tagttgtgtc gcccgagact 4260
tctagcccag gtggtctttc cggtacgagt tggtccgcag atgtagaggc tggggtgtct 4320
gaccccagtc cttccctcat cctggttaga tcggccatcc actcaaggtc agattgtgct 4380
tgatcgtagg agacaggatg tatgaaagtg taggcatcga tgcttacatg atataggtgc 4440
gtctctctcc agttgtgcag atcttcgtgg cagcggagat ctgattctgt gaagggcgac 4500
acgtactgct caggttgtgg aggaaataat ttgttggctg aatattccag ccattgaagc 4560
tttgttgccc attcatgagg gaattcttct ttgatcatgt caagatactc ctccttagac 4620
gttgcagtct ggataatagt tcgccatcgt gcgtcagatt tgcgaggaga gaccttatga 4680
tctcggaaat ctcctctggt tttaatatct ccgtcctttg atatgtaatc aaggacttgt 4740
ttagagtttc tagctggctg gatattaggg tgatttcctt caaaatcgaa aaaagaagga 4800
tccctaatac aaggtttttt atcaagctgg ataagagcat gatagtgggt agtgccatct 4860
tgatgaagct cagaagcaac accaaggaag aaaataagaa aaggtgtgag tttctcccag 4920
agaaactgga ataaatcatc tctttgagat gagcacttgg ggtaggtaag gaaaacatat 4980
ttagattgga gtctgaagtt cttgctagca gaaggcatgt tgttgtgact ccgaggggtt 5040
gcctcaaact ctatcttata accggcgtgg aggcatggag gcaagggcat tttggtaatt 5100
taagtagtta gtggaaaatg acgtcattta cttaaagacg aagtcttgcg acaaggggg 5160
cccacgccga attttaatat taccggcgtg gccccacctt atcgcgagtg ctttagcacg 5220
agcggtccag atttaaagta gaaaagttcc cgcccactag ggttaaaggt gttcacacta 5280
taaaagcata tacgatgtga tggtatttga tggagcgtat attgtatcag gtatttccgt 5340
cggatacgaa ttattcgtac 5360

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una partícula pseudovírica (VLP) de la rabia en una planta, que comprende,

a) proporcionar una planta o porción de la planta que comprende un ácido nucleico que comprende una región reguladora activa en la planta unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una o más glucoproteínas (G) nativas de la rabia, en el que la secuencia de nucleótidos además codifica, comprende, o tanto codifica como comprende, uno o más de un elemento de amplificación que comprende una o más regiones intergénicas largas o una repetición intergénica larga de un genoma de geminivirus,
b) incubar la planta o porción de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo así la VLP de la rabia, la VLP de la rabia producida por autoensamblaje tras la expresión de la glucoproteína de la rabia nativa y la gemación de la VLP de la rabia a partir de un membrana de plasma,
c) cosechar la planta, y
d) extraer las VLP, en el que las VLP varían en tamaño de 40-300 nm, y

en el que la VLP comprende una envoltura lipídica que comprende lípidos obtenidos de la membrana plasmática de la planta,
opcionalmente la planta o porción de la planta comprende además un segundo ácido nucleico que comprende una segunda región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de matriz (M) de la rabia o fragmento de la misma, y se expresa al incubar la planta o porción de la planta en la etapa b), y/o
la VLP no contiene una matriz vírica o una proteína de núcleo.

2. El método de la reivindicación 1, en el que, antes de la etapa de suministro, el ácido nucleico que comprende la región reguladora activa en la planta y unida operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la glucoproteína (G) nativa de la rabia se introduce por transformación en la planta, o porción de la planta.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el uno o más de un elemento de amplificación es de un virus del enanismo amarillo del frijol.

4. El método de la reivindicación 2, en el que, en la etapa de introducción, el ácido nucleico se expresa de forma transitoria en la planta o el ácido nucleico se expresa de forma estable en la planta.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la VLP se extrae mediante extracción bioquímica.

6. Una VLP derivada de una planta producida por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo la envoltura de la VLP una glucoproteína (G) de la rabia nativa y lípidos obtenidos de la membrana plasmática de la planta.

7. La VLP derivada de plantas de la reivindicación 6, en la que el lípido comprende uno o más de un lípido derivado de la planta y/o en la que una o más glucoproteínas (G) comprenden N-glicanos específicos de plantas, o N-glicanos modificados.

8. Una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP derivada de plantas de la reivindicación 6 o 7 para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. La VLP derivada de plantas de la reivindicación 6 o 7 para su uso en la inducción de inmunidad a una infección por virus de la rabia en un sujeto.

10. Un complemento alimenticio que comprende la VLP derivada de plantas de la reivindicación 6 o 7.

11. El método de la reivindicación 2, que comprende además introducir por transformación un ácido nucleico adicional, comprendiendo el ácido nucleico adicional una secuencia de nucleótidos que codifica un supresor de silenciamiento, una replicasa de geminivirus o ambos, preferiblemente el supresor de silenciamiento se selecciona del grupo HCPro y p19 y el supresor del silenciamiento y la replicasa de geminivirus están codificados por dos ácidos nucleicos adicionales diferentes que se introducen en la planta, o porción de la planta.

12. El método de la reivindicación 1, en el que la glucoproteína (G) nativa de la rabia tiene al menos un 90

% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14, o en el que la glucoproteína (G) nativa de la rabia tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína de matriz (M) de la rabia tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, o en el que la proteína de matriz (M) de la rabia tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6.

14. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que comprende la región reguladora está unido operativamente adicionalmente con uno o más potenciadores del comovirus, una UTR del comovirus, o una UTR del virus del mosaico del caupí (CPMV).

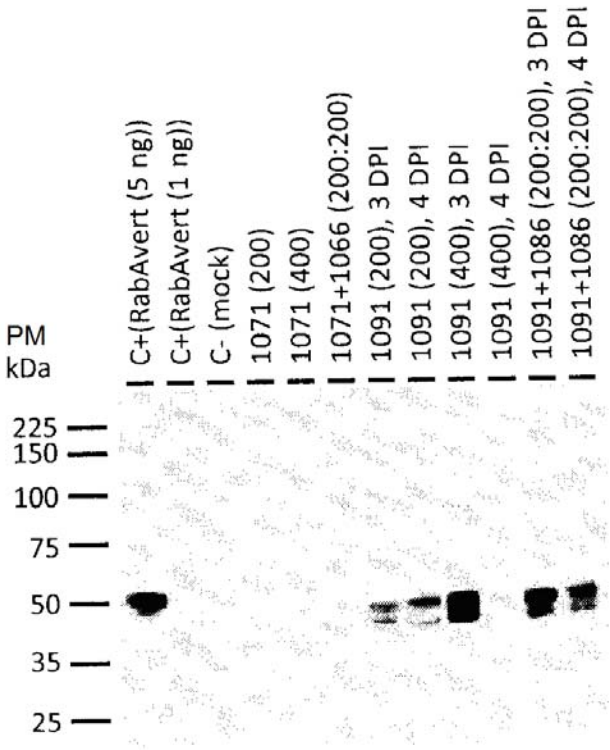

PM
kDa
225
150
100
75
50
35
25
C+(RabAvert (5 ng))
C+(RabAvert (1 ng))
C- (mock)
1071 (200)
1071 (400)
1071+1066 (200:200)
1091 (200), 3 DPI
1091 (200), 4 DPI
1091 (400), 3 DPI
1091 (400), 4 DPI
1091+1086 (200:200), 3 DPI
1091+1086 (200:200), 4 DPI

Figura 1

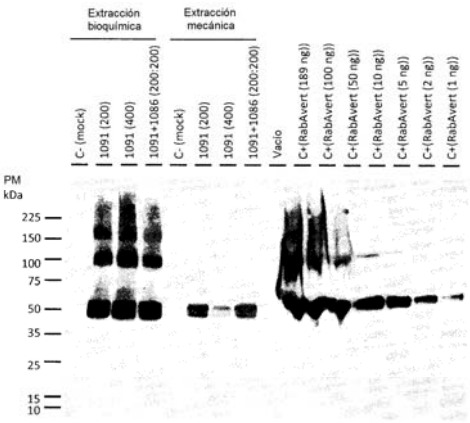
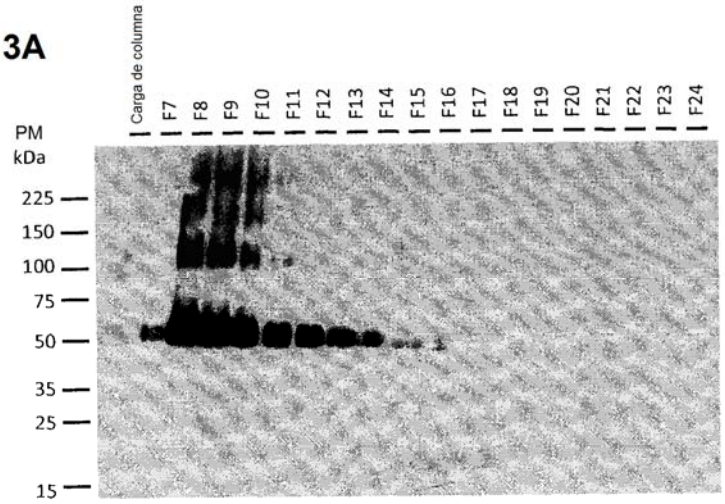

Extracción bioquímica
Extracción mecánica
C- (mock)
1091 (200)
1091 (400)
1091+1086 (200:200)
C- (mock)
1091 (200)
1091 (400)
1091+1086 (200:200)
Vacío
C+(RabAvert (189 ng))
C+(RabAvert (100 ng))
C+(RabAvert (50 ng))
C+(RabAvert (10 ng))
C+(RabAvert (5 ng))
C+(RabAvert (2 ng))
C+(RabAvert (1 ng))
PM
kDa
225
150
100
75
50
35
25
15
10

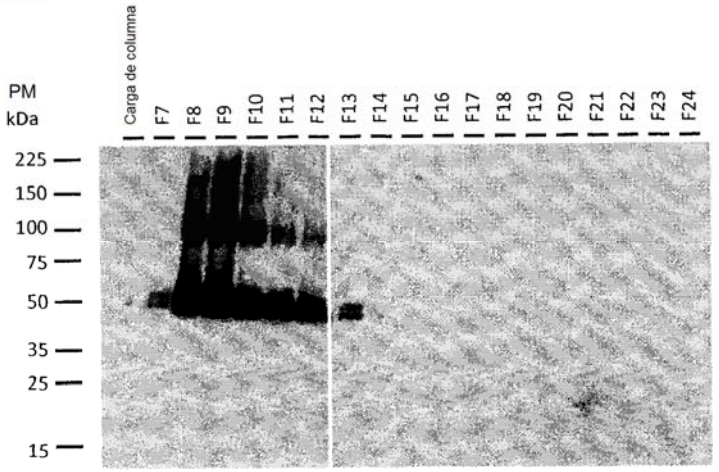
Figura 2

Figura 3A



1091

Figura 3B



1091 + 1086

Figura 4

A-2X35S/CPMV-HT/M de la rabia/NOS (Construcción número 1066)

Figura 4A, SEQ ID NO: 1

IF-RabM-S3.c

AAATTTGTCGGGCCCATGAACTTTCTACGTAAGATAG

Figura 4B, SEQ ID NO: 2

IF-RabM-S1-4.r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATTCTAGAAGCAGAGAGGA

Figura 4C, SEQ ID NO: 3

Secuencia codificante de la proteína M sintetizada (correspondiente a nt2496-3104 del Genbank número de acceso FJ913470)

ATGAACTTTCTACGTAAGATAGTGAAAAATTGCAGGGACGAGGACACTCAAAAACC
CTCTCCCGTGTCAGCCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCCTGAATAC
GTCCCGCTGAAAGAACTTACAAGCAAGAAGAACATGAGGAACTTTTGTATCAACGG
AGGGGTTAAAGTGTGTAGCCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCCTGCGGCACATTCT
GAAATCATTCGACGAGATATATTCTGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAGT
AGTTATTGGACTGGCTTTGTCAGGATCTCCAGTCCCTGAGGGCATGAACTGGGTATA
CAAATTGAGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGGCTGATTCCAGGGGCCCTCTTGAAGG
GGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCGTCGG
ATTGCAAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTCATATCCAGGGCAGAATCTGGTGTAT
CAACATGAACCCGAGAGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCTTCAGACACAAAG
GTCCGAAGAGGACAAAGATTCCTCTCTGCTTCTAGAATAA

Figura 4D

Representación esquemática de la construcción número 1191. Los sitios de enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización plasmídica se anotan en la representación.

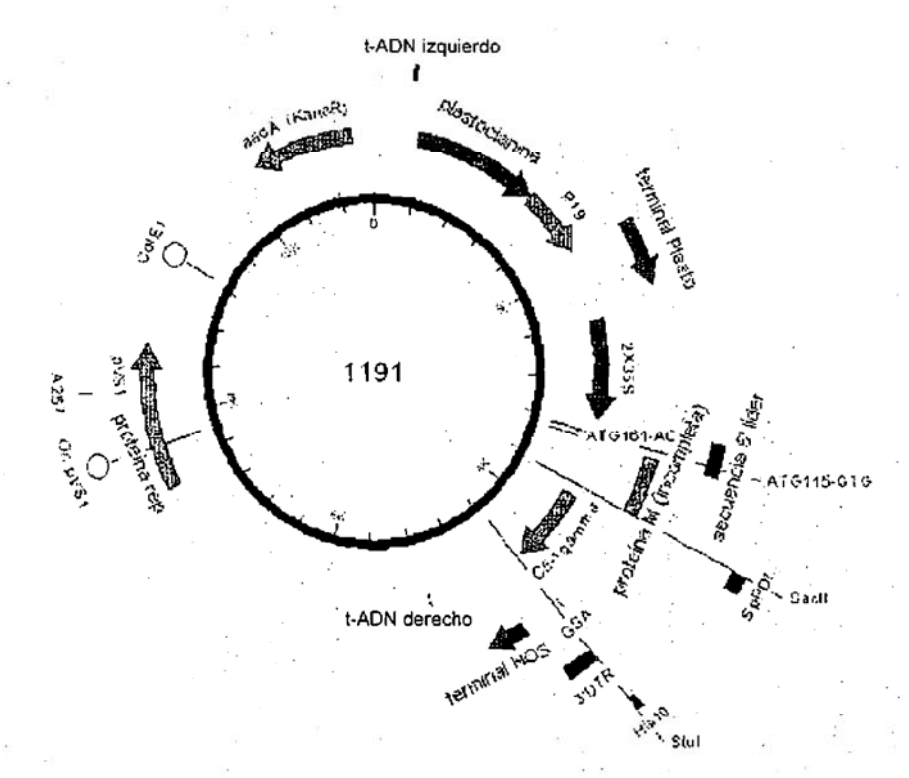


Figura 4E, SEQ ID NO: 4

Construcción número 1191 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). .2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTG
CAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAA
AATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA

ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACA
TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACTTCCTGACGAAAG
TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTC
AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
CTGCACAGAGTCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACT
CTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
AGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
ACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTA
ATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCG
TTGGGAATTACTAGCGCGTGTCGACAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCT
ACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAA
TATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGA
AGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGT
GGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCA
AAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGAT
ACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGA
TTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCC
ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG
ATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGG
AAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCG
AACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGC
GATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAG
ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTC
GGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTG
ATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAG
ATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCGCGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCG
GCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAACGACA
CCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCT
GGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC
ACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTG
GCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGT
GCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCC
CAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAA
GGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCC
CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCA
ATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTT
TGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTT
TATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTT
AATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTT
CAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTT
CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT
GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
ATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCCACGTGACTAG

TGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGC
AGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
CGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTA
AACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 4F, SEQ ID NO: 5

Casete de expresión número 1066 del promotor 2X35S con respecto al terminador NOS. El marco de lectura abierto de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
ATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGG
TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACG
TGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCA
TACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
TTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGC
CCATGAACTTTCTACGTAAGATAGTGAAAAATTGCAGGGACGAGGACACTCAAAAACCCTCTCCCGTGTC
AGCCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCCTGAATACGTCCCGCTGAAAGAACTTACAAGC
AAGAAGAACATGAGGAACTTTTGTATCAACGGAGGGGTTAAAGTGTGTAGCCCGAATGGTTACTCGTTCA
GGATCCTGCGGCACATTCTGAAATCATTCGACGAGATATATTCTGGGAATCATAGGATGATCGGGTTAGT
CAAAGTAGTTATTGGACTGGCTTTGTCAGGATCTCCAGTCCCTGAGGGCATGAACTGGGTATACAAATTG
AGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGGCTGATTCCAGGGGCCCTCTTGAAGGGGAGGAGTTGGAATACTCTC
AGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCGTCGGATTGCAAATAAGAGTGATTGCAAAACAGTGTC
ATATCCAGGGCAGAATCTGGTGTATCAACATGAACCCGAGAGCATGTCAACTATGGTCTGACATGTCTCT
TCAGACACAAAGGTCCGAAGAGGACAAAGATTCCTCTCTGCTTCTAGAATAAAGGCCTATTTTCTTTAGT
TTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATT
TTATGTAATTTAATTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTT
TAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTT
CAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTT
CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT
GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
ATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

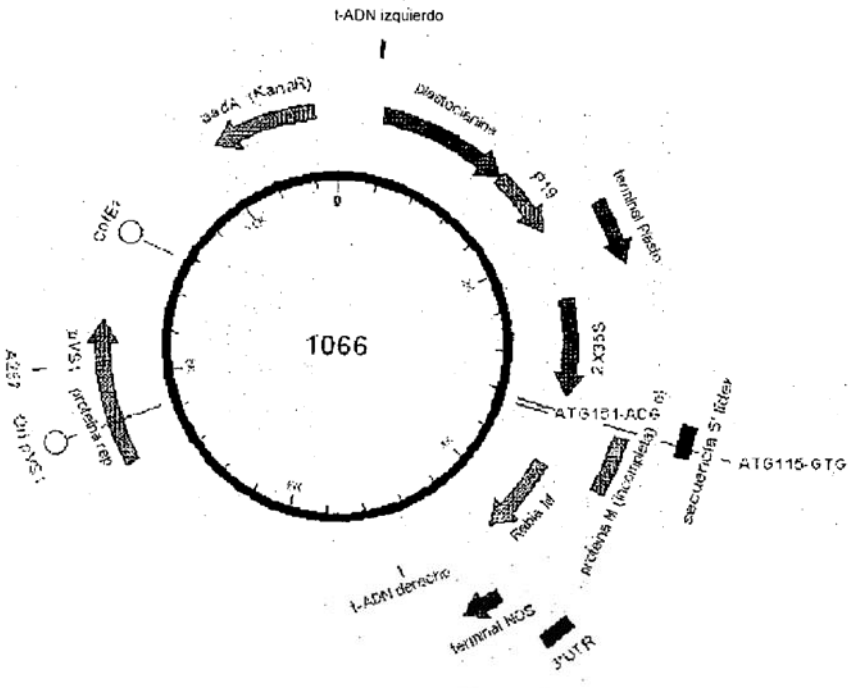
Figura 4G, SEQ ID NO: 6

Secuencia de aminoácidos de la proteína M de la cepa ERA del virus de la rabia

MNFLRKIVKNCRDEDTQKPSPVSAPLDDDDLWLPPPEYVPLKELTSKKNMRNFCINGGV
KVCSPNGYSFRILRHILKSFDEIYSGNHRMIGLVKVVIGLALSGSPVPEGMNWVYKLRRT
FIFQWADSRGPLEGEELEYSQEITWDDDTEFVGLQIRVIAKQCHIQGRIWCINMNPRACQ
LWSDMSLQTQRSEEDKDSSLLLE*

Figura 4H,

Representación esquemática de la construcción número 1066



B-2X35S/CPMV-HT/M de la rabia/NOS en sistema de amplificación BeYDB+Replicasa (Construcción número 1066)

Figura 5A

Representación esquemática de la construcción número 1193. Los sitios de enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización plasmídica se anotan en la representación.

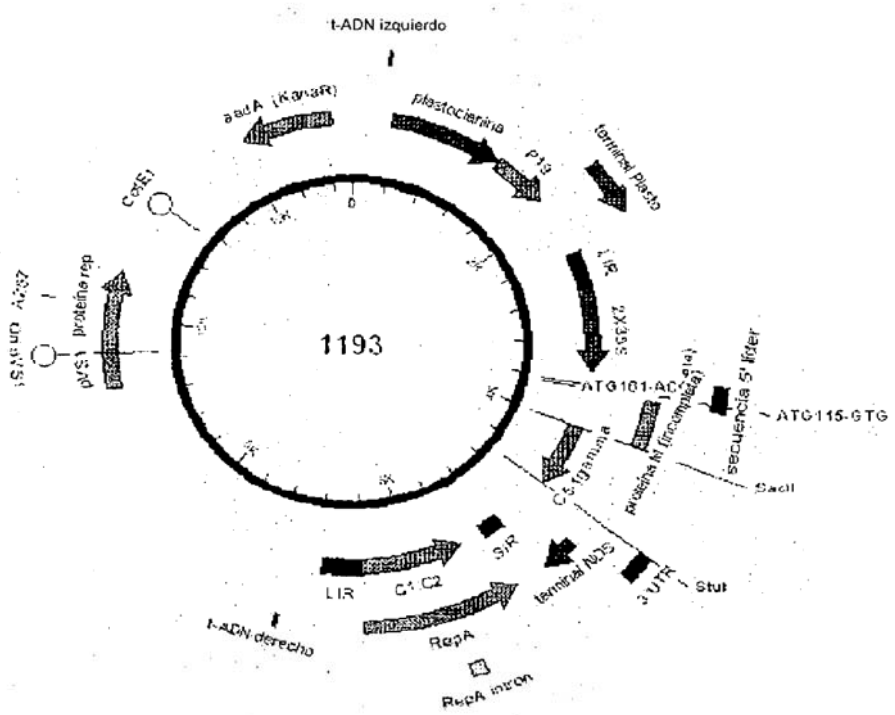


Figura 5B, SEQ ID NO:7

Construcción número 1193 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión de plastocianina-TBSV P19-Plastocianina (supresor de silenciamiento)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTG
CAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAA
AATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT

TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA
ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACA
TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACTTCCTGACGAAAG
TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTC
AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
CTGCACAGAGTCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACT
CTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
AGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
ACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTA
ATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCG
TTGGGAATTACTAGCGCGTGTCGACACGCGTGGCGCGCCCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAG
GGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGT
AGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAATTTT
AATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAA
GTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAG
CGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGT
GGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGA
GACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTG
TGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTG
AAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAG
ACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTA
CTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAAT
ATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAA
GGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTG
GTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAA
AGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGA
CCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGC
GAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCT
TGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCA
CTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTA
TTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTT
ACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTC
TTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGT
TTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCGCGGCTCCTCA
GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGA
CCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTC
CAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCC
CCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGG
ACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGT
CTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGG
TAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGC
TCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCAC
CAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTC

TATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCT
GTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
GACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAG
ATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAA
TTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA
TACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTAC
TAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTG
GAAATCAATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACAT
AACACACGAAATAAACAAAAAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAAACAAAATAACACTATATATATC
CTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCCGTCACACAT
ATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCATTGATAACATCCAGTCTTCGT
CAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACA
GTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGATGA
TATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCGAGA
CTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCCAG
TCCTTCCCTCATCCTGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGAT
GTATGAAAGTGTAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGG
CAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTG
AATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAGATACTCC
TCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATCGTGCGTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTATGAT
CTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAG
CTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCCTTCAAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTTATC
AAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAA
AATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCCAGAGAAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGG
TAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCC
GAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTA
AGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAA
TTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAG
AAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGAT
GGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACGGCCGGCCACTAGTGGCACTG
GCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATC
CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTATCA
GTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 5C, SEQ ID NO: 8

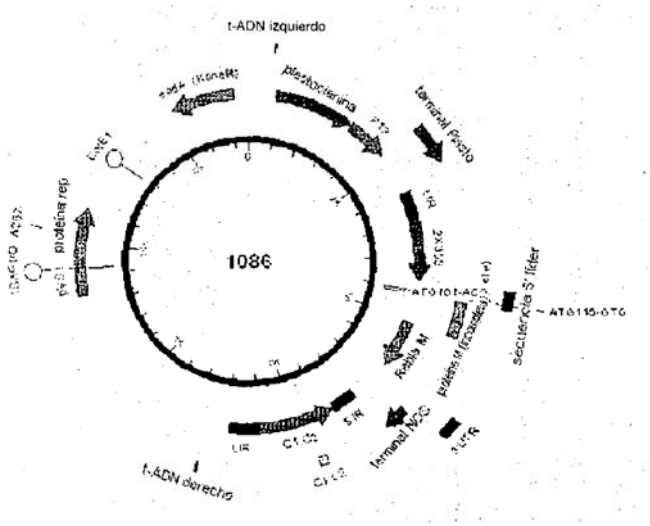
Casete de expresión número 1086 de la LIR izquierda de BeYDV a la LIR derecha de BeYDV.
El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGC
ATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGT
CTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTT
AGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAA
AAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTA
TTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
GATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTC
GGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
GCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT

CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC
GTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
GGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAG
AGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAA
CTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGA
TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAG
TGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTG
GAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTAC
TTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCT
AGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATAT
TCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGAACTTTCTACGTAAGATAGTGAAAAATTGCAGGGACGAGGACACT
CAAAAACCCTCTCCCGTGTCAGCCCCTCTGGATGACGATGACTTGTGGCTTCCACCCCCTGAATACGTCCC
GCTGAAAGAACTTACAAGCAAGAAGAACATGAGGAACTTTTGTATCAACGGAGGGGTTAAAGTGTGTAG
CCCGAATGGTTACTCGTTCAGGATCCTGCGGCACATTCTGAAATCATTCGACGAGATATATTCTGGGAAT
CATAGGATGATCGGGTTAGTCAAAGTAGTTATTGGACTGGCTTTGTCAGGATCTCCAGTCCCTGAGGGCA
TGAACTGGGTATACAAATTGAGGAGAACCTTTATCTTCCAGTGGGCTGATTCCAGGGGCCCTCTTGAAGG
GGAGGAGTTGGAATACTCTCAGGAGATCACTTGGGATGATGATACTGAGTTCGTCGGATTGCAAATAAG
AGTGATTGCAAAACAGTGTCATATCCAGGGCAGAATCTGGTGTATCAACATGAACCCGAGAGCATGTCA
ACTATGGTCTGACATGTCTCTTCAGACACAAAGGTCCGAAGAGGACAAAGATTCCTCTCTGCTTCTAGAA
TAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTC
TGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCA
GCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAG
CTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTT
GCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTT
ATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATA
TAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGC
TTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCAATAAAATGATTATT
TTATGAATATATTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATAACACACGAAATAAACAAAA
AAACACAATCCAAAACAAACACCCCAAACAAAATAACACTATATATATCCTCGTATGAGGAGAGGCACG
TTCAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATC
TTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTATAG
AAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCT
ATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCAT
CGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTT
CCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCCAGTCCTTCCCTCATCCTGGTTAG
ATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAGGCATCG
ATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGGCAGCGGAGATCTGATTCTGT
GAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATTCCAGCCATTGAAGC
TTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAGATACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTG
GATAATAGTTCGCCATCGTGCGTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTT
TAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGA
TTTCCTTCAAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGAT
AGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTT
TCTCCCAGAGAAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAACATATTT
AGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCT
ATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAATGAC
GTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGC
CCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGG
TTAAAGGTGTTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATTGTATCAGGT
ATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTAC

Figura 5D

Representación esquemática de la construcción número 1086



C-2X35S/CPMV-HT/PDISP/G de la rabia/NOS (Construcción número 484)

Figura 6A, SEQ ID NO: 9

IF-RabG-S2+4.c

TCTCAGATCTTCGCCAAATTCCCTATTTACACGATACCAGAC

Figura 6B, SEQ ID NO: 10

IF-RabG-S1-4.r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTCTTGTG

Figura 6C, SEQ ID NO: 11

Secuencia codificante de la proteína G de la rabia sintetizada (correspondiente a nt 3317-4891 del Genbank número de acceso EF206707)

ATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGGTTTTTCCATTGTGTTTTGGGAAATTCCCTATTTAC
ACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGG

TAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCCTACATGGAACTTAAAGTTGGATACATCTT
AGCCATAAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTT
GGTTATGTCACAACCACGTTCAAAAGAAAGCATTTCCGCCCAACACCAGATGCATGTAGAGCCGCGTAC
AACTGGAAGATGGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACCGCTGGC
TTCGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATA
TGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTAC
TGCTCCACTAACCACGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTT
TTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGCGGCTTTGTAGATGAAAGAGGCC
TATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGG
AACATGGGTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCGATCAGTTGGTGAACCTGCA
CGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGTGTCT
GGATGCACTAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAAAACTT
GTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGT
CAGTCAGAACTTGGAATGAGATCCTCCCTTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCCTCA
TGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGATGCAA
TCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGAATCCTCGGTTATCCCCCTTGTGCACCCCCTGGCAGA
CCCGTCTACCGTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATTTTGTTGAAGTTCACCTTCCCGATGTGCAC
AATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGTGCAGGGGCCC
TGACTGCCTTGATGTTGATAATTTTCCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTACGCA
ACACAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCAGTCACTCCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATG
GGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTGA

Figura 6D

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

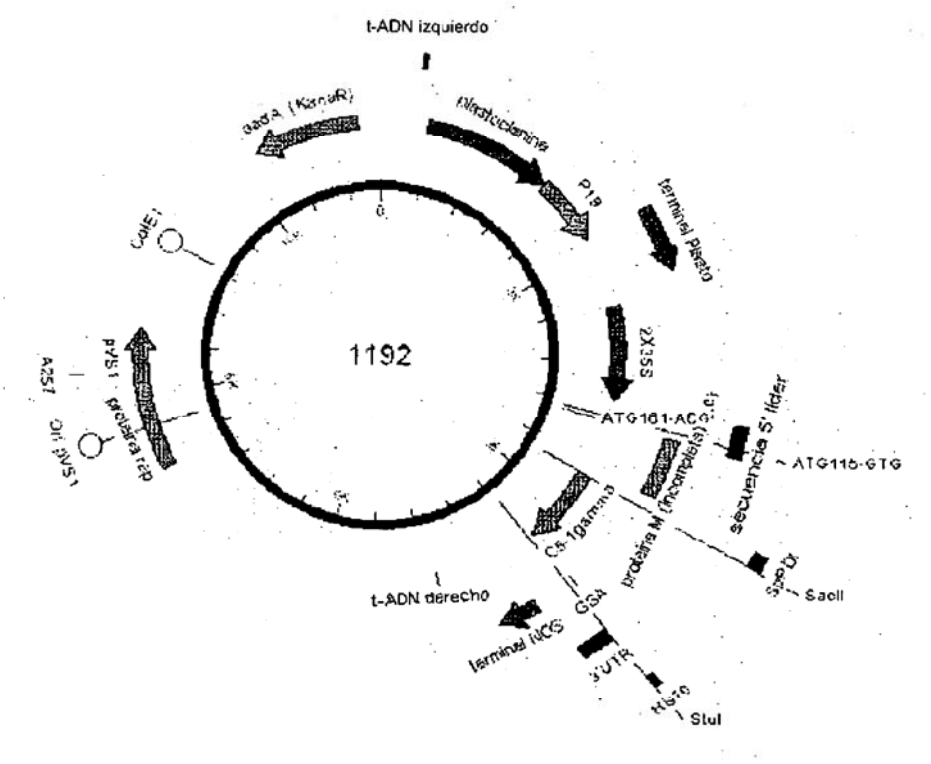


Figura 6E, SEQ ID NO: 12

Construcción número 1192 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTG
CAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAA
AATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA

AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA
ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACA
TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACTTCCTGACGAAAG
TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTC
AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
CTGCACAGAGTCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACT
CTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
AGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
ACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTA
ATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCG
TTGGGAATTACTAGCGCGTGTCGACAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCT
ACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAA
TATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGA
AGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGT
GGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCA
AAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGAT
ACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGA
TTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCC
ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG
ATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGG
AAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCG
AACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGC
GATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAG
ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCT
TGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTC
GGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTG
ATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAG
ATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTT
ATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGCGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCA
TCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAA
GGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTC
CCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCA
GCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCA
GGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAG
CCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATG
ATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGA
GGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGC
AAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAAT
TTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGT
AATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTT
TATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAAC
ATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTT
GAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTA
GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTAT

CGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCCACGTGACTAGTGGC
ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA
CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA
GCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACT
ATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 6F, SEQ ID NO: 13

Casete de expresión número 1071 del promotor 2X35S al terminador NOS.
El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCT
GTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
AGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCG
TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACG
ACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCA
ACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
GTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCC
TCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA
ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACT
ATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGG
TTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAG
CAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACA
ACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACG
TGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCA
TACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTG
TTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGA
GTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGC
CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCG
CCAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACATCACCTCAG
CTGCCCAAACAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCCTACATGGAACTT
AAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAA
ACCTACACTAACTTCGTTGGTTATGTCACAACCACGTTCAAAAGAAAGCATTTCCGCCCAACACCAGATG
CATGTAGAGCCGCGTACAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGT
ACCCTGACTACCGCTGGCTTCGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGT
GGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGCTCAGGAGTA
GCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACTAG
GGATGTCTTGTGACATTTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGCGGCTT
TGTAGATGAAAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATGTGGAGTTCTAGGA
CTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCGATC
AGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAA
GAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGT
CATTTAAGAAAACTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCG
ATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGGAATGAGATCCTCCCTTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGG
GAGGTGTCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTA
ATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGAATCCTCGGTTATCCCCCTTGT
GCACCCCCTGGCAGACCCGTCTACCGTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATTTTGTTGAAGTTCAC
CTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAGTATGTATTAC
TGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCCTTGATGTTGATAATTTTCCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCG
ATCAGAACCTACGCAACACAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTCAGTCACTCCCCAAAGCGGGAA
GATCATATCTTCATGGGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTGAAGGCCTATTTTCTTTAGT

TTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATT
TTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTT
TAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTT
CAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTT
CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT
GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAA
ATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

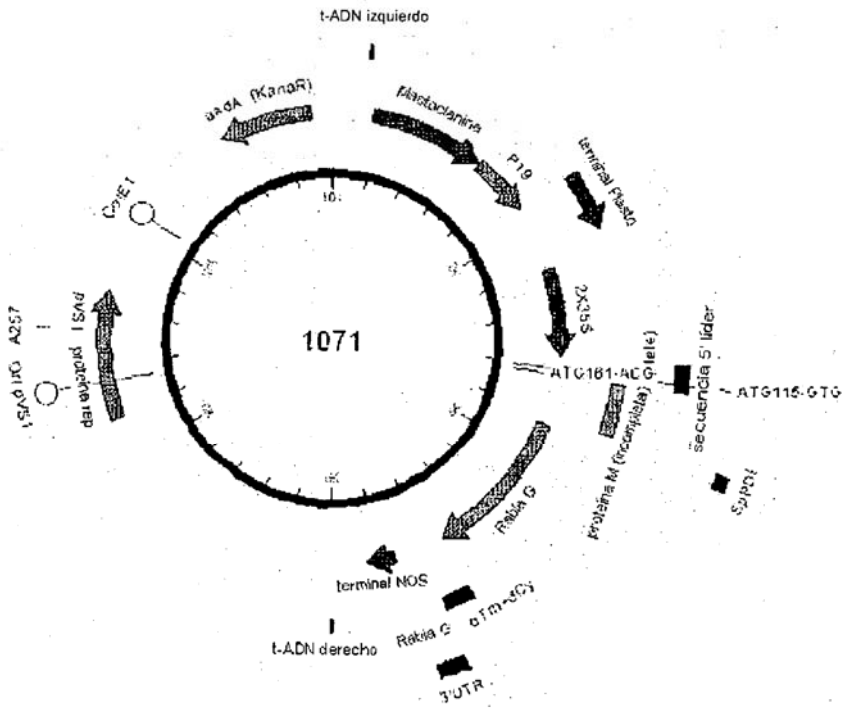
Figura 6G, SEQ ID NO: 14

Secuencia de aminoácidos de PDISP-proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFAKFPIYTIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNL
SGFSYMELKVGYILAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAA
YNWKMAGDPRYEESLHNPYPDYRWLRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPS
GKCSGVAVSSTYCSTNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGL
YKSLKGACKLKLCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLV
VEELVRKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSV
RTWNEILPSKGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELLESSVI
PLVHPLADPSTVFKDGDEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTAL
MLIIFLMTCCRRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESHKSGGETRL*

Figura 6H

Representación esquemática de la construcción número 1071



D-2X35S/CPMV-HT/PDISP/G de la rabia/NOS en sistema de amplificación BeYDB+Replicasa (Construcción número 1091)

Figura 7A

Representación esquemática de la construcción número 1194. Los sitios de enzima de restricción SacII y StuI usados para la linealización plasmídica se anotan en la representación.

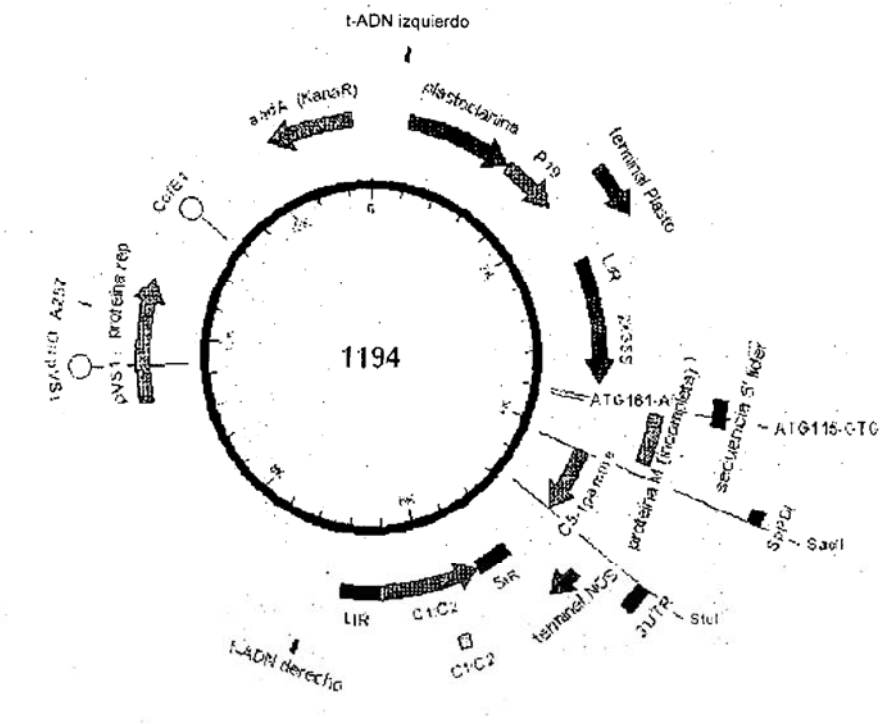


Figura 7B, SEQ ID NO: 15

Construcción número 1194 de bordes de ADN-t de izquierda a derecha (subrayado). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación BeYDV+Replicasa con casete de expresión de Plastocianina-P19-Plastocianina (supresor del silenciamiento)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA
ATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAA
AGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTA
TTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTTG
CAACATTTGAGAAAATTTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGA
GGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTAC
AAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGA
CGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAA
AATTAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGT
TGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATA
ACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACA
TCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCAC
CCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAAC
AAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACTTCCTGACGAAAG
TCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTC

AAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCA
CTGCACAGAGTCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGA
CCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACT
CTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAAA
TGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTTATTGTTAATTTTGTTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAAT
CGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTC
AGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGA
ACAACTAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTT
CAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACTACTA
ATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTG
TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCG
TTGGGAATTACTAGCGCGTGTCGACACGCGTGGCGCGCCCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAG
GGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGT
AGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAATTTT
AATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAA
GTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAG
CGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGT
GGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGA
GACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTG
TGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTG
AAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAG
ACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTA
CTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAAT
ATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAA
GGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTG
GTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAA
AGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGA
CCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGC
GAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCT
TGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCA
CTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTA
TTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTT
ACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTC
TTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGT
TTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGGCGAAAA
ACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGCGGCTCCTC
AGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTG
ACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGT
CCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTC
CCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTG
GACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTG
TCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTG
GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA
GCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGC
ACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATT
TCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTC
CTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAA
AGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAA
GATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATA
ATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTA
ATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTT
ACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGT
TGGAAATCAATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTAC

ATAACACACGAAATAAACAAAAAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAAACAAAATAACACTATATAT
ATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCCGTCACAC
ATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCATTGATAACATCCAGTCTTC
GTCAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGA
CAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGAT
GATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCGA
GACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCC
AGTCCTTCCCTCATCCTGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAG
GATGTATGAAAGTGTAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCG
TGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGG
CTGAATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAGATAC
TCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATCGTGCGTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTAT
GATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTC
TAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCCTTCAAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTT
ATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAA
GAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCCAGAGAAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTG
GGGTAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGAC
TCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAAT
TTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCC
GAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAG
TAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTT
GATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACGGCCGGCCACTAGTGGCA
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC
ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTAT
CAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 7C, SEQ ID NO:16

Casete de expresión número 1091 de la LIR izquierda de BeYDV a la LIR derecha de BeYDV.
El marco de lectura abierto de PDISP/proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia está subrayado.

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGC
ATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGT
CTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTT
AGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACACTATAA
AAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTA
TTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAA
GATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTC
GGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
GCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACC
AAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTAT
CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC
GTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
GGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAG
AGGTATTAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAA
CTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGA
TCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAG
TGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCCTATTCTTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTG

GAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTAC
TTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCT
AGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATAT
TCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTT
GGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGA
TTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGG
GTTCTCCTACATGGAACTTAAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGGC
GTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTTGGTTATGTCACAACCACGTTCAAAAGAAAGCATT
TCCGCCCAACACCAGATGCATGTAGAGCCGCGTACAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCCAGATATGAAG
AGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACCGCTGGCTTCGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGT
TATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCG
GGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACACCATTTGGATGCC
CGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGG
GAGTGAGACTTGCGGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAA
GTTATGTGGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACC
AAATGGTGCCCTCCCGATCAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTG
TAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAG
TGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAAAACTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAA
CAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGGAATGAGATCCTCCCTTCAAAA
GGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATATTAG
GACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGA
ATCCTCGGTTATCCCCCTTGTGCACCCCCTGGCAGACCCGTCTACCGTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCT
GAGGATTTTGTTGAAGTTCACCTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGA
ACTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCCTTGATGTTGATAATTTTCCTGATGAC
ATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCTACGCAACACAATCTCAGAGGGACAGGGAGGGAGGTGTC
AGTCACTCCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGGAATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACT
GTGAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTT
CTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTC
AGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAA
GCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCT
TGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGT
TATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAT
ATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAG
CTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCAATAAAATGATTAT
TTTATGAATATATTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACATAACACACGAAATAAACAAA
AAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAAACAAAATAACACTATATATATCCTCGTATGAGGAGAGGCAC
GTTCAGTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAAGTCTCCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTAT
CTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTATA
GAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACC
TATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCA
TCGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTT
TCCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCCAGTCCTTCCCTCATCCTGGTTA
GATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAGGCATC
GATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGGCAGCGGAGATCTGATTCTG
TGAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGAATATTCCAGCCATTGAAG
CTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAGATACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCT
GGATAATAGTTCGCCATCGTGCGTCAGATTTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGT
TTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGT
GATTTCCTTCAAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATG
ATAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAG
TTTCTCCCAGAGAAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAACATAT
TTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACT
CTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGGAAAATG
ACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTG

GCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAG
GGTTAAAGGTGTTCACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATTGTATCAG
GTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTAC

Figura 7D

Representación esquemática de la construcción número 1091

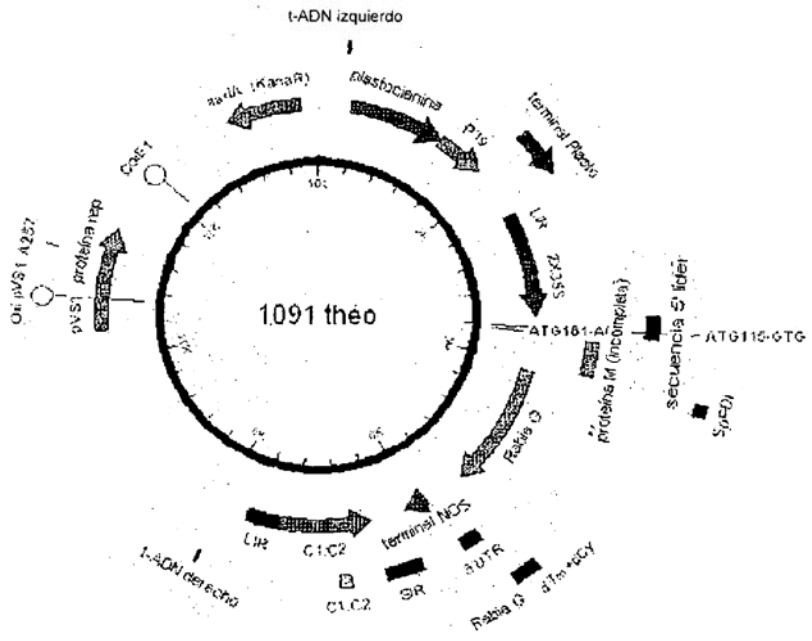


Figura 8A

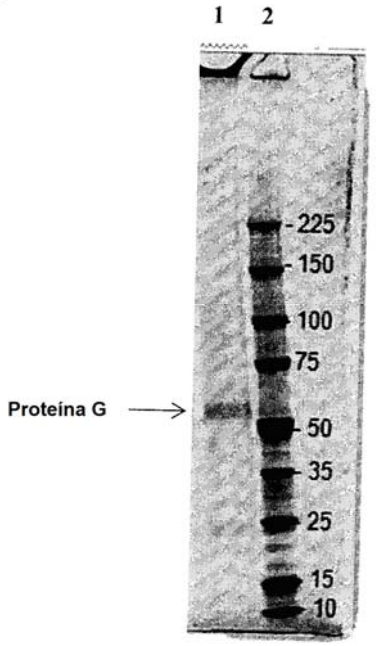
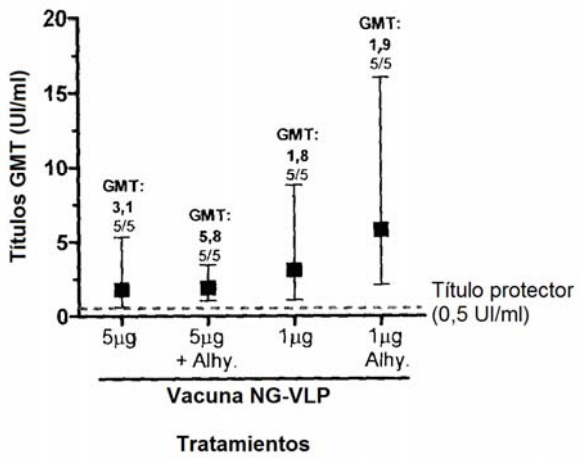


Figura 8B


Títulos GMT (UI/ml)
20
15
10
5
0
GMT:
3,1
5/5
GMT:
5,8
5/5
GMT:
1,8
5/5
GMT:
1,9
5/5
Título protector
(0,5 UI/ml)
5µg
5µg
+ Alhy.
1µg
1µg
Alhy.
Vacuna NG-VLP
Tratamientos